

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel'**  
**Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**



Dissertação

**Análise de patulina e fungicidas em maçãs e sua degradação por campo  
elétrico contínuo**

**Marcela do Vale Garcia**

Pelotas, 2018

**Marcela do Vale Garcia**

**Análise de patulina e fungicidas em maçãs e sua degradação por campo  
elétrico contínuo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves

Coorientador: Prof.Dr. Daniel Ricardo Arsand

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

G216a Garcia, Marcela do Vale

Análise de patulina e fungicidas em maçãs e sua degradação por campo elétrico contínuo / Marcela do Vale Garcia ; Fábio Clasen Chaves, orientador ; Daniel Ricardo Arsand, coorientador. — Pelotas, 2018.

78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Micotoxinas. 2. Fungicidas. 3. QuEChERS. 4. Malus domestica. 5. Cromatografia. I. Chaves, Fábio Clasen, orient. II. Arsand, Daniel Ricardo, coorient. III. Título.

CDD : 664

**Marcela do Vale Garcia**

**Análise de patulina e fungicidas em maçãs e sua degradação por campo  
elétrico contínuo**

Data da defesa: 29 de outubro de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves (orientador). Doutor em Biologia Vegetal, The State University of New Jersey.

Prof. Dr. Daniel Ricardo Arsand. Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Dillenburger Meinhart. Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geniana Carla Dos. Doutora em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Rio Grande.

Dr<sup>a</sup>. Jessica Fernanda Hoffmann. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, por conceder força e sabedoria.

Aos meus pais Marilda e Geraldo, e irmã Gabriela, por apoiarem a realização deste sonho e compreenderem os momentos de ausência.

À minha tia e madrinha Lúcia Helena Campos, pelo carinho e apoio incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Chaves, pelas orientações conselhos e ensinamentos, e também pela paciência e empatia durante toda a jornada.

Ao Prof. Dr. Daniel Arsand, pela coorientação, e ensinamentos.

À Helen Hackbart e ao Alberto Klumb, pela ajuda nas análises estatísticas.

Às colegas de laboratório Rosane Crisel, Bianca Camargo, Ana Clara Antunes, Giovana Zandoná, Camila Nunes, Marjana Radunz, Paula Fidola, e Tanize ACUNHA, pela convivência leve, e por me socorrerem inúmeras vezes.

À bolsista Eliane Lemke pelo auxílio.

Ao meu companheiro Daniel Berbare, pelo amor, incentivo e dedicação incondicional.

Aos colegas de departamento Alexandre Lorini e Thayli Araujo, pelos momentos de descontração, incentivo e colaboração.

À cidade de Pelotas que me acolheu, e aos amigos que aqui fiz.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa.

E finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## Resumo

Garcia, Marcela do Vale. **Análise de patulina e fungicidas em maçãs e sua degradação por campo elétrico contínuo**. 2018. 78. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel', Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A maçã é a segunda fruta mais consumida no mundo e apresenta um importante papel nutricional e econômico. Seu cultivo é suscetível ao ataque de fungos dentre os quais há espécies capazes de sintetizar micotoxinas, como a patulina. Uma alternativa para minimizar a contaminação por micotoxinas é o controle dos fungos utilizando fungicidas, que por sua vez também podem apresentar toxicidade para o ser humano. O presente estudo teve como objetivo utilizar métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas para detectar e quantificar os fungicidas: captan, carbendazim, clorotalonil, epoxiconazol, piraclostrobina, tebuconazol, tetraconazol e trifloxistrobina e a micotoxina patulina em maçãs, e avaliar o potencial da aplicação de um campo elétrico contínuo de baixa intensidade em diferentes condições de pH e potencial na degradação da patulina e do fungicida piraclostrobina. A patulina e os fungicidas foram extraídos da maçã utilizando o método QuEChERS, e avaliados por GC-MS e HPLC-MS respectivamente. O método de análise da patulina por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) apresentou recuperação variando de 91,8% a 114,8% e limites de detecção e quantificação de  $0,61 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $3,57 \text{ ng mL}^{-1}$ , respectivamente. Os fungicidas: carbendazim, epoxiconazol, piraclostrobina, tebuconazol, tetraconazol, e trifloxistrobina, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS-ESI-QToF-MS). O método apresentou recuperação variando de 94,5% a 100,4% e limites de detecção e quantificação que variaram entre  $0,07 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $1,60 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $0,21 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $4,85 \text{ ng mL}^{-1}$ , respectivamente. Os desvios padrão relativos para todos os métodos foram inferiores a 5% e os coeficientes de determinação das curvas analíticas superiores a 0,99%. Dentre as maçãs e os produtos de maçã comercializados no município de

Pelotas – RS analisados, 77% apresentaram resíduo de fungicidas em quantidades inferiores aos limites residuais máximos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e 10% apresentaram presença de fungicida não autorizado para a cultura. A aplicação de campos elétricos contínuos demonstrou potencial para a degradação de patulina e de resíduos de piraclostrobina, apresentando um percentual de degradação de até 76% para a patulina, e de até 64% para a piraclostrobina. O modelo matemático estabelecido para o processo de degradação da patulina apresentou um coeficiente de determinação de 82% e pela análise de superfície de resposta foi possível observar que no potencial ótimo (2,6 V), é possível obter uma degradação maximizada em todas as condições de pH avaliadas.

**Palavras-chave:** Micotoxina; Fungicidas; QuEChERS; *Malus domestica*; Cromatografia; Espectrometria de massas; Campos elétricos contínuos.

## Abstract

Garcia, Marcela do Vale. **Analysis of patulin and fungicides in apples and their degradation by continuous electric field**. 2018. 78p. Dissertation (Masters in Food Science and Technology) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel', Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Apple is the second most consumed fruit in the world and presents important economic and nutritional roles. Its cultivation is susceptible to attack by fungi, among which species capable of synthesizing mycotoxins, such as patulin. An alternative to minimize contamination by mycotoxins is the control of fungi using fungicides, which in turn can also present toxicity to humans. The objective of this study was to use chromatographic methods coupled to mass spectrometry to detect and quantify the fungicides: captan, carbendazim, chlorothalonil, epoxyconazole, pyraclostrobin, tebuconazole, tetraconazole, and trifloxystrobin and the mycotoxin patulin in apples, and to evaluate the potential of applying a continuous low intensity electric field for degradation of patulin and the fungicide pyraclostrobin. Patulin and fungicides were extracted from apples using a QuEChERS method. The method of analysis of patulin by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) showed recovery ranging from 91.8% to 114.8% and limits of detection and quantification of 0.61 ng mL<sup>-1</sup> and 3.57 ng mL<sup>-1</sup>, respectively. The fungicides: carbendazim, epoxiconazole, pyraclostrobin, tebuconazole, tetraconazole, and trifloxystrobin, were analyzed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS-ESI-QToF-MS). The method showed recovery ranging from 94.5% to 100.4% and limits of detection and quantification that ranged from 0.07 ng mL<sup>-1</sup> to 1.60 ng mL<sup>-1</sup>, and from 0.21 ng mL<sup>-1</sup> to 4.85 ng mL<sup>-1</sup>, respectively. Relative standard deviations for all methods were below 5% and coefficients of determination of analytical curves were above 0.99%. Seventy seven percent of apples and apple products marketed in Pelotas –RS analyzed, presented fungicide residue in quantities below the residue limits established by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) and 10% showed the presence of fungicide not authorized for the crop. The application of continuous electric fields showed potential for degradation of patulin and residues of pyraclostrobin, presenting a degradation of up to 76% for patulin, and up to 64% for

pyraclostrobin. The mathematical model established for the process of degradation of patulin presented a determination coefficient of 82% and by response surface analysis it was possible to observe that at the greatest potential tested (2.6 V) it is possible to obtain a maximized degradation in all pH conditions evaluated.

**Keywords:** Mycotoxin; Fungicides; QuEChERS; *Malus domestica*; Chromatography; Mass spectrometry; Continuous electric fields.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Fórmula estrutural da patulina. ....	20
Figura 2 - Ilustração da célula eletrolítica utilizada para os ensaios de eletroxidação. (1) Fonte de alimentação; (2) multímetro; (3) cátodo; (4) ânodo. ....	46
Figura 3 - Espectro de massas da patulina (sililada), por GC-MS. ....	47
Figura 4 - Cromatograma da análise de patulina por GC-MS (a) extrato de maçã puro no modo SCAN; (b) padrão puro no modo SCAN; (c) extrato de maçã puro no modo SIM; (d) padrão puro no modo SIM. ....	48
Figura 5 - Curva analítica do efeito de matriz da patulina. ....	49
Figura 6 - Espectro de massas dos fungicidas: (a) carbendazim, (b) epoxiconazol; (c) tetraconazol; (d) tebuconazol; (e) piraclostrobina; (f) trifloxistrobina. ....	51
Figura 7 - Cromatograma da análise multirresíduo de fungicidas. (1) carbendazim; (2) epoxiconazol; (3) tetraconazol; (4) tebuconazol; (5) piraclostrobina; (6) trifloxistrobina. ....	52
Figura 8 - Gráfico da ocorrência dos fungicidas nas amostras de maçã e produtos, comercializados no município de Pelotas – RS. ....	55
Figura 9 - Gráfico da relação dos resíduos de fungicidas por tipo de amostra (M. – maçã). ....	56
Figura 10 - Gráfico da superfície de respostas do processo de degradação da patulina. ....	60

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas de fungicidas .....	22
Tabela 2 - Limites máximos tolerados no Brasil para alguns fungicidas .....	25
Tabela 3 - Resumo de seleção de métodos desenvolvidos para a determinação de fungicidas em maçã por cromatografia .....	28
Tabela 4 - Concentrações da linearidade.....	41
Tabela 5 - Planejamento experimental da eletroxidação da patulina e da piraclostrobina.....	45
Tabela 6 - Equação da reta, coeficiente de determinação e limites de detecção e quantificação para patulina por GC-MS .....	49
Tabela 7 - Avaliação do percentual de recuperação, da repetitividade e da precisão intermediária para análise de patulina por GC-MS.....	49
Tabela 8 - Fórmula estrutural, relação massa carga e tempo de retenção dos fungicidas .....	50
Tabela 9 - Equações das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e no extrato de maçã, e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) .....	52
Tabela 10 - Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos fungicidas em acetonitrila e no extrato de maçã .....	53
Tabela 11 - Percentual de recuperação dos fungicidas .....	53
Tabela 12 - Repetitividade e precisão intermediária dos fungicidas.....	54
Tabela 13 - Efeito de matriz, em baixa, média e alta concentração dos fungicidas ..	54
Tabela 14 - Percentual de degradação da patulina e piraclostrobina por eletroxidação.....	57
Tabela 15 - Análise de variância dos fatores (ANOVA).....	58
Tabela 16 - Estimativa dos efeitos sobre a degradação de patulina e piraclostrobina .....	58
Tabela 17 - Resultados experimentais e preditos do processo de degradação de patulina.....	59

## Sumário

1	Introdução .....	14
2	Objetivos .....	16
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivos Específicos.....	16
3	Revisão de literatura .....	17
3.1	Maçã .....	17
3.2	Micotoxinas .....	19
3.2.1	Patulina .....	19
3.3	Fungicidas .....	21
3.4	Legislação.....	25
3.5	Métodos de determinação de patulina e fungicidas em maçã. ....	26
3.5.1	Extração .....	26
3.5.2	Identificação e quantificação .....	30
3.6	Métodos de degradação .....	31
3.7	Validação de métodos analíticos .....	32
3.7.1	Seletividade.....	32
3.7.2	Linearidade da curva.....	33
3.7.3	Estabilidade.....	33
3.7.4	Exatidão (Recuperação).....	33
3.7.5	Precisão .....	34
3.7.6	Limite de detecção e quantificação .....	34
3.7.7	Efeito de matriz .....	35
4	Materiais e métodos .....	37
4.1	Materiais .....	37
4.2	Métodos .....	37
4.2.1	Preparo do extrato (QuEChERS) .....	38
4.2.2	Preparo das soluções estoque .....	38

4.2.3 Método de análise de patulina (GC-MS) .....	39
4.2.4 Método de análise de fungicidas (HPLC-ESI-QToF-MS) .....	40
4.2.5 Validação dos métodos analíticos .....	40
4.2.6 Avaliação dos resíduos de fungicidas em maçãs e nos produtos de maçã comercializados no município de Pelotas-RS. ....	43
4.2.7 Utilização de campo elétrico contínuo para degradação de patulina e piraclostrobina .....	44
5 Resultados .....	47
5.1 Validação do método .....	47
5.2 Avaliação dos resíduos de fungicidas em maçãs e nos produtos de maçã comercializados no município de Pelotas-RS.....	54
5.3 Utilização de campo elétrico contínuo para degradação de patulina e piraclostrobina .....	56
6 Discussão.....	61
6.1 Validação do método .....	61
6.1.1 Seletividade.....	61
6.1.2 Modelo de calibração (linearidade) .....	61
6.1.3 Limites de detecção e quantificação .....	62
6.1.4 Exatidão .....	62
6.1.5 Precisão .....	63
6.1.6 Efeito de matriz .....	63
6.2 Avaliação dos resíduos de fungicidas em maçãs e nos produtos de maçã comercializados no município de Pelotas-RS.....	63
6.3 Utilização de campo elétrico contínuo para degradação de patulina e piraclostrobina .....	65
7 Considerações finais .....	67
Referências .....	68

## 1 Introdução

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 600 milhões de pessoas adoecem por ano no mundo após ingerir alimentos contaminados. Capazes de causar mais de 200 doenças, variando de diarreia a câncer, os alimentos podem ser considerados inseguros por conterem bactérias, vírus, parasitas, ou substâncias químicas nocivas, podendo estas ser de origem natural, como as micotoxinas, ou oriundas de poluentes ambientais, como resíduos de agrotóxicos e metais pesados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Com o objetivo de garantir a segurança dos alimentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criou o programa de análise de resíduos de agrotóxicos (PARA) que avalia continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal. Para as micotoxinas, apesar de atualmente não haver nenhum programa de análise contínua, a ANVISA estabelece através da RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011, os limites máximos tolerados (LMT) (ANVISA, 2016; ANVISA, 2011).

Frente à problemática de garantir a segurança dos alimentos, métodos têm sido desenvolvidos e otimizados para identificar e quantificar a presença de traços de agrotóxicos e micotoxinas em diversas matrizes. Devendo o controle ser feito com medidas de monitoramento, mas também com o desenvolvimento de mecanismos de redução e eliminação dos agentes contaminantes. Ademais, com o avanço dos processos industriais, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de incorporar o mecanismo de redução às novas tecnologias de processamento.

A maçã é a segunda fruta mais consumida no mundo e seu suco é considerado um dos mais populares em países da Europa e nos Estados Unidos. Seu consumo tem sido associado a efeitos benéficos à saúde, principalmente pela disseminação do dito popular “*An apple a day keeps the doctor away*”. Contudo, é preciso tomar cuidado com a presença de agentes contaminantes nos frutos e produtos de maçã, visto que a presença da micotoxina patulina e de resíduos de agrotóxicos tem sido frequentemente relatada (ANVISA, 2016; BERETTA et al., 2000).

O presente estudo abordou métodos de análise para a detecção e quantificação de fungicidas e de patulina que foram aplicados em um levantamento

da presença de fungicidas em maçãs e produtos de maçã comercializados no município de Pelotas-RS. Por fim, foi testado o efeito da aplicação de campo elétrico contínuo de baixa intensidade na degradação de patulina e do fungicida piraclostrobina.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Validar métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas para detectar e quantificar fungicidas e patulina em maçãs e produtos derivados e avaliar o efeito da aplicação de um campo elétrico contínuo de baixa intensidade na degradação de patulina e piraclostrobina.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) Detectar e quantificar simultaneamente por HPLC-ESI-QToF-MS os fungicidas: carbendazim, captan, clorotalonil, tetraconazol, epoxiconazol, piraclostrobina, trifloxistrobina, e tebuconazol, em maçã;
- b) Detectar e quantificar patulina em maçã por GC-MS;
- c) Analisar a presença de contaminação por fungicidas em maçãs e produtos derivados comercializados no município de Pelotas – RS;
- d) Avaliar o comportamento da patulina e piraclostrobina, quando submetidas a um campo elétrico contínuo de baixa intensidade;
- e) Determinar as condições ótimas de pH e potencial para eletroxidação de patulina e piraclostrobina.

### 3 Revisão de literatura

#### 3.1 Maçã

A maçã é o pseudofruto pomáceo da macieira (*Malus domestica* Bork.) pertencente à família Rosacea e subfamília das Pomóideas. É originária do Cazaquistão e Ásia central, e possui grande diversidade de espécies selvagens, com diferentes formas, cores e sabores (PASA, CASTRO & SILVA, 2012). A fruta é consumida principalmente *in natura*, mas também é possível encontrá-la processada nas formas de chips, doces, purês, néctares e sucos (PEREIRA, 2014).

Atualmente a China lidera a produção mundial de maçãs, sendo responsável por aproximadamente 56% do total produzido. Os Estados Unidos com 6% vem em segundo lugar, seguido por Polônia com 5% e Peru com 4%. O Brasil ocupa a décima terceira posição com 1,3%, equivalente a uma produção de 1,04 milhões de toneladas no ano de 2016 (FAO, 2018).

De acordo com a Associação Brasileira de Produtores de Maçã (ABPM) o cultivo da maçã teve um importante desenvolvimento no país nos últimos 50 anos. Registros apontam que os primeiros plantios comerciais começaram a partir de testes experimentais em 1963, quando a fruta era o segundo produto alimentar mais importado no país. A possibilidade de cultivo nas regiões altas do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e sul do Paraná levou o governo brasileiro a estimular o cultivo através de incentivos fiscais (KIST, 2015). Após graduais avanços em organização, pesquisa e tecnologia, o país passou de importador a exportador da fruta, com valores aproximados de exportação de 331 mil toneladas de maçãs frescas e sucos no ano de 2012 (MAPA, 2013). Dessa forma, a cultura da maçã adquiriu forte importância econômica e social, principalmente para as áreas onde são produzidas.

Atualmente a região sul é a principal produtora, responsável por 99,4% da produção total no país, dividida entre Santa Catarina (49%), Rio Grande do Sul (46,5%) e Paraná (4,9%), o que resulta aproximadamente em um total de 36 mil hectares de área plantada (IBGE, abril/2016).

A predominância e a alta produtividade da região sul, são atribuídas ao clima subtropical e temperado, propício para o melhor desenvolvimento de maçãs, visto que a macieira exige durante o repouso hibernar um número específico de horas sob

temperaturas baixas, podendo variar de 300 a 700 horas, sob temperaturas abaixo de 7,2 ° C, ou 9,7 ° C dependendo da cultivar (EMBRAPA, 1994).

As cultivares Gala e Fuji produzem frutos com algumas características apreciadas pelos consumidores do mercado interno para o consumo *in natura*, como por exemplo, a epiderme avermelhada e a baixa acidez de polpa. Além disso, as tecnologias atualmente disponíveis permitem que as maçãs Gala sejam colhidas em fevereiro e estocadas em câmara fria até dezembro, e as variedades Fuji sejam colhidas em abril e estocadas até o mês de fevereiro do ano seguinte, tendo o abastecimento garantido ao longo de todo ano (QUEJI, 2008; MAPA, 2013). Por esses fatores, as cultivares Gala e Fuji junto com suas diversas mutações concentram quase toda a produção brasileira. Juntas representam aproximadamente 90% da produção, enquanto os 10% restantes são distribuídos entre as cultivares *Golden Delicious*, Brasil, Anna, Condessa, Catarina e *Granny Smith* (SEBRAE, 2016).

A instrução normativa Nº 5, de 9 de fevereiro de 2006, regulamenta os parâmetros de identidade e qualidade da maçã. Atualmente as maçãs de mesa são divididas nas categorias: extra; categoria 1; categoria 2 e categoria 3. A classificação se baseia no peso e a presença/ausência de defeitos, tais como: baixa qualidade quanto à forma, tamanho e uniformidade da cor; presença de cicatrizes (provenientes de insetos, pássaros, granizo ou resultantes de tratamentos culturais e transporte inadequados); problemas fisiológicos, e sintomas de doenças, como por exemplo, manchas de sarna-da-macieira, ocasionada pelo fungo *Venturia inaequalis* (BRASIL, 2006; QUEJI, 2008).

Apesar da classificação da maçã ocorrer a partir dos aspectos visuais, as maçãs também podem apresentar sintomas internos de doenças, visto que esporos fúngicos são capazes de penetrar o núcleo do fruto quando em desenvolvimento, e após a colheita, com a redução dos mecanismos de defesa, podem germinar, causando deterioração interna (TOURNAS & MEMON, 2009). Soliman et al. (2014) estudaram a microbiota do núcleo de diferentes variedades de maçãs, quando frescas, armazenadas e com injúrias, e identificaram a presença de fungos dos gêneros: *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. e *Trichoderma* spp. Os fungos foram isolados e avaliados quanto à capacidade de biossíntese de micotoxinas, sendo verificada a produção de ocratoxina A, patulina, alternariol, tentoxina e T2-toxina, além de transcritos de genes específicos que

codificam para enzimas das rotas de biossíntese de aflatoxina, tricotocenos e AM-toxina.

### 3.2 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos especializados, tóxicos, produzidos principalmente por fungos filamentosos quando em condições ideais de umidade e temperatura. São formados no final da fase exponencial do crescimento fúngico, e não possuem significância aparente no metabolismo ou crescimento do organismo produtor (FIB, 2009; NIELSEN et al., 2009). São consideradas contaminantes de origem biológica, de grande incidência nos alimentos, e de difícil controle. Produtos agrícolas como grãos, nozes e frutas, são *commodities* comumente contaminadas por estes fungos (MURPHY et al., 2006).

#### 3.2.1 Patulina

A patulina é uma micotoxina produzida por mais de 60 espécies de fungos, entre eles o *Penicillium expansum*, *P. patulum*, *P. crustosum*, *P. roqueforti*, *P. claviforme*, *Paecilomyces* spp., *Saccharomyces vesicarium*, *Alternaria alternata*, *Byssochlamys nivea*, *B. fulva*, *Aspergillus giganteus* e *A. clavatus* (MOAKE; PADILLA & WOROBO, 2005). Por ser o agente causador de uma doença de alta incidência na pós-colheita, o mofo azul ou bolor azul, o *P. expansum* tornou-se o principal fungo associado à contaminação por patulina em frutas. As áreas de podridão no fruto podem conter patulina que pode se difundir até quatro centímetros além da lesão, devido a sua hidrossolubilidade (LAIDOU, LOPOULOS & LIAKOPOULOU, 2001; TRUCKSESS & TANG 1999). A patulina, 4-hydroxy-4H-furo [3,2c] pyran-2(6H)-one (Figura 1), de fórmula molecular  $C_6H_7O_4$ , massa molecular  $154,12 \text{ g mol}^{-1}$ , e ponto de fusão  $111^\circ \text{C}$  é uma lactona, que quando pura forma cristais incolores. Possui absorção no UV máxima de  $276 \text{ nm}$  em etanol e solubilidade em água e solventes orgânicos comuns, com exceção do éter etílico, benzeno e éter de petróleo (AOAC, 2002; SIGMA ALDRICH, 1998). Apresenta estabilidade em ácidos diluídos e instabilidade em soluções alcalinas e compostos sulfurosos como metabissulfito e radicais sulfidríla, e é resistente à temperatura de  $125^\circ \text{C}$  na faixa de pH entre 3,5 e 5,0 (MOAKE; PADILLA & WOROBO, 2005).

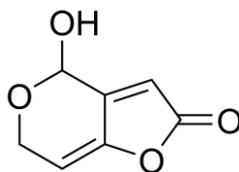


Figura 1 - Fórmula estrutural da patulina.

A patulina foi isolada na década de 1940, e vários estudos foram desenvolvidos com objetivo de explorar sua atividade biológica; foi testada em *sprays* de nariz e garganta para o tratamento de resfriados, e em pomadas para tratamento de infecções fúngicas. Contudo, tornou-se evidente durante as décadas de 1950 e 1960 que a patulina além de sua atividade antibacteriana, antiviral e antiprotozoária, também apresenta toxicidade para plantas e animais. Por este motivo, na década de 1960, foi reclassificada como micotoxina (BENNETT; KLICH, 2003).

Em geral a toxicidade da patulina é determinada por sua afinidade com o grupo sulfidril, que favorece a inativação de enzimas, alterações no DNA, e a desregulação no equilíbrio redox, devido à formação de adutos com a glutatona (FLIEGE & METZLER, 2000; LIU et al., 2006; WRIGHT, 2015). Sintomas agudos como, nervosismo, convulsões, congestão pulmonar e edema, além de efeitos gastrointestinais, como distensão do trato gastrointestinal, hemorragia intestinal e degeneração de células epiteliais, foram atribuídos ao consumo de patulina (ASSUNÇÃO et al., 2016; PUEL; GALTIER & OSWALD, 2010).

Estudos também demonstraram efeitos neurotóxicos, imunotóxicos, genotóxicos e embriotóxicos em roedores (PUEL; GALTIER & OSWALD, 2010). Becci et al. (1981) observaram que ratos tratados oralmente com doses de 0,1 a 2,5 mg de patulina / kg / dia no período entre 74 e 104 semanas não apresentaram tumores. A agência internacional de pesquisa sobre o câncer (IARC, 2002) classifica a patulina como grupo 3, isto é, não carcinogênica para humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Embora ainda existam poucos dados toxicológicos em humanos, a patulina vem sendo empregada como indicador de qualidade em suco e produtos de maçã. De forma que alguns países têm estabelecido legislações para determinar limites máximos toleráveis para patulina. Segundo as recomendações da Organização

Mundial da Saúde (OMS), o consumo de patulina não deve ultrapassar 0,4 µg / kg do peso corporal / dia.

Uma alternativa para minimizar a ocorrência de patulina em alimentos e atender aos limites máximos estabelecidos é controlar o crescimento fúngico no período pré-colheita e pós-colheita com a aplicação de fungicidas.

### **3.3 Fungicidas**

Os fungicidas constituem uma classe de agrotóxicos que tem por objetivo controlar a ocorrência dos fungos em plantas e alimentos por mecanismo fungistático, inibindo o crescimento dos fungos, ou por mecanismo antiesporulante, inibindo a formação de esporos, podendo ser aplicados para ação preventiva ou de tratamento (TOFOLI MELO & DOMINGUES, 2012). No Brasil, aproximadamente 20% dos agrotóxicos utilizados são fungicidas, com destaque para o mancozebe, carbendazim, tiofanato metílico e oxicloreto de cobre, que juntos representam 49,4% dos fungicidas utilizados (IBGE, 2016). As técnicas empregadas para produção de maçãs juntamente com os parâmetros de uso adequado dos agrotóxicos são estabelecidos no Brasil pelo Ministério da Agricultura pelo programa Produção Integrada de Maçã (PIM). Os fungicidas recomendados pela PIM incluem Captan, Tetraconazol, Tebuconazol, e Trifloxistrobina, além dos recomendados com restrição Clorotalonil e Piraclostrobina. A Tabela 1 apresenta algumas características físico-químicas de fungicidas comumente utilizados na agricultura.

Tabela1 - Propriedades físico-químicas de fungicidas

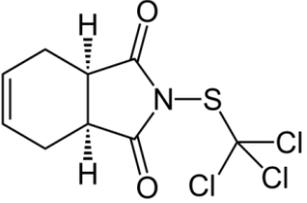
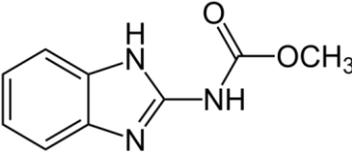
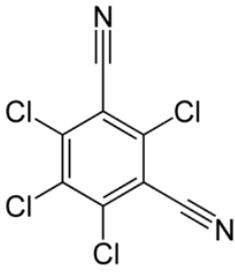
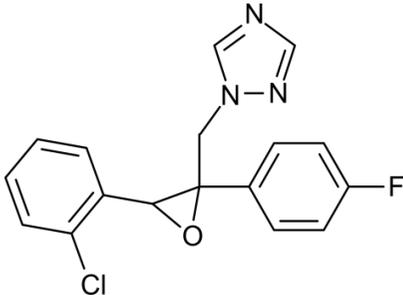
Fungicida	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Estrutura química	Solubilidade	Toxicidade *
Captan	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> S	300,578		Água	IV
Carbendazim	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	191,187		Insolúvel em água	III
Clorotalonil	C <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub> N	265,91		Água, e solventes orgânicos: benzeno, acetona, metanol, e outros	III
Epoxiconazol	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub> O	329,76		Água e solventes orgânicos: acetato de etila, acetona, etanol, tolueno, e outros.	III

Tabela 1 - (continuação) Propriedades físico-químicas de fungicidas

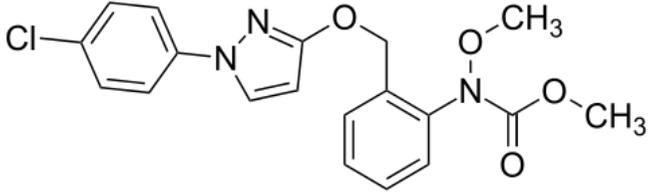
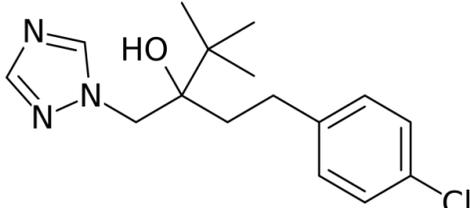
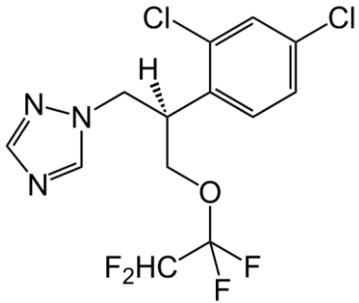
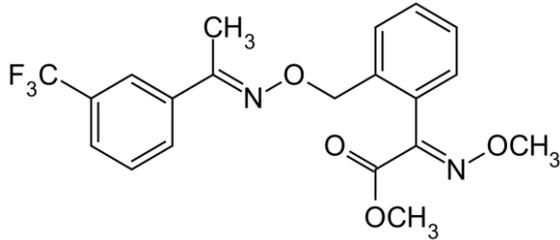
Fungicida	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Estrutura química	Solubilidade	Toxicidade *
Piraclostrobina	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	387,82		Água, e solventes orgânicos: octanol, acetona, n-heptano, metanol, e outros.	III
Tebuconazol	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	307,82		Água, e solventes orgânicos: diclorometano, n-hexano, tolueno e octanol	IV

Tabela 1 - (continuação) Propriedades físico-químicas de fungicidas

Fungicida	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Estrutura química	Solubilidade	Toxicidade *
Tetraconazol	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O	372,14		Água, e solventes orgânicos: dicloroetano, acetona, metanol, e outros.	II
Trifloxistrobina	C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	408,37		Água e solventes orgânicos: acetona, diclorometano, acetato de etila, hexano, metanol, tolueno, e outros.	II

\* Conforme classificação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo: I extremamente tóxico; II altamente tóxico; III medianamente tóxico; IV pouco tóxico (ANVISA, 2018).

Fonte: ANVISA, 2018; PubChem, 2018.

O uso comum de fungicidas tem despertado um alerta sobre questões de saúde e meio ambiente, visto que apesar de menos tóxicos que outras classes de agrotóxicos, também podem apresentar potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico para o ser humano. Dessa forma, países têm estabelecido limites máximos toleráveis para cada uma dessas substâncias de acordo com o tipo de alimento (ANVISA, 2011; ANVISA, 2018; PAVESPA, 2018).

### 3.4 Legislação

Os limites máximos estabelecidos pela legislação visam proteger os consumidores dos possíveis efeitos tóxicos que agentes contaminantes como as micotoxinas e resíduos de fungicidas podem ocasionar à saúde. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina através da RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos, que estabelece para patulina em suco e em polpa de maçã um limite máximo tolerável de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  (BRASIL, 2011). Os limites máximos toleráveis para fungicidas da cultura da maçã são estabelecidos pelo Índice de Monografias – ANVISA (2016), (Tabela 2).

Tabela 2 - Limites máximos tolerados no Brasil para alguns fungicidas

Fungicida	LMT ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Captan	25,00
Carbendazim	5,00
Clorotalonil	1,00
Epoconazol	*
Piraclostrobina	2,00
Tebuconazol	0,10
Tetraconazol	0,40
Trifloxistrobina	0,05

\*Fungicida não autorizado para cultura da maçã.

### 3.5 Métodos de determinação de patulina e fungicidas em maçã

Com o objetivo de aperfeiçoar e garantir o fornecimento de alimentos seguros, pesquisas vêm sendo realizadas para desenvolver, otimizar e validar métodos analíticos, mais rápidos, específicos e com menores limites de detecção. Atualmente os métodos analíticos utilizados para identificar a presença de contaminantes nos alimentos dividem-se em duas categorias: métodos qualitativos, como os baseados em ensaios imunoquímicos que são rápidos e ideais para triagem de um amplo número de amostras, e métodos quantitativos como os cromatográficos que permitem uma determinação sensível, precisa e seletiva (LIMA et al., 2007; STOPPELLI & MAGALHÃES, 2005).

Um ponto crítico nas análises quantitativas é o preparo de amostras, visto que é nesta etapa que se realizam a extração do analito de interesse, sua pré-concentração e a limpeza do extrato. Esta etapa é imprescindível para remoção de interferentes, principalmente para quantificação de traços em matrizes alimentícias complexas, como a maçã, uma vez que proporciona a eliminação de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos fenólicos e elementos minerais, reduzindo o efeito de matriz (LI et al., 2017; MARKOWSKI et al., 2015).

#### 3.5.1 Extração

A extração em fase sólida (SPE), a partição líquido-líquido e o método QuEChERS, são alguns métodos utilizados para promover a extração de fungicidas em maçãs (Tabela 3). O método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) é atualmente o mais utilizado na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e permite a extração de vários analitos de interesse em apenas três etapas: extração com solvente, partição com sais e limpeza. São vantagens desse método a simplicidade, a diminuição da utilização de solventes, a redução dos gastos, além de redução do tempo de análise e dos riscos à saúde e ao ambiente (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES, ADAIME & ZANELLA, 2011).

Apesar de desenvolvido inicialmente para extração multirresíduo de agrotóxicos, estudos têm demonstrado a aplicação do método QuEChERS para

extração de micotoxinas. Manzanares, Campaña & Garcia (2013) testaram o método para 15 diferentes micotoxinas em *Silybum marianum*, e concluíram ser uma boa alternativa para analisar micotoxinas.

Atualmente as análises de patulina em maçã são realizadas utilizando partição líquido-líquido com acetato de etila, sendo esta adotada como método oficial da AOAC internacional, também conhecida por Associação das Comunidades Analíticas (AOAC; 2000; LI et al., 2017). No método, o suco é extraído três vezes com acetato de etila, e limpo por partição líquido-líquido com uma solução de carbonato de sódio (1,5%). Em seguida é adicionado sulfato de sódio anidro para adsorção da água, o solvente é evaporado sob corrente de nitrogênio gasoso e a ressuspensão do resíduo é feita em água acidificada (pH 4). Contudo, este é um método demorado, e a adição de carbonato de sódio é indesejável, tendo em vista que a patulina é instável em soluções alcalinas (LI et al., 2017; MOAKE; PADILLA & WOROBO, 2005).

Kharandi, Barbri & Azad (2013) adaptaram o método QuEChERS para análise de patulina por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (GC-MS). Inicialmente compararam a influência dos solventes acetato de etila e acetonitrila na reação de derivatização utilizando BSFTA [N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide] e concluíram que a acetonitrila além de aumentar o rendimento de sililação, apresentou maior área relativa do pico e recuperação quando comparada com o acetato de etila. Foram testados três volumes diferentes de solvente para a extração, além da presença de cloreto de sódio e carbonato de sódio. Para a etapa de limpeza, três concentrações diferentes de amina primária secundária (PSA) foram estudadas. Foi identificado que o volume ideal de solvente é 15 mL de acetonitrila para 5 mL de suco e que a combinação dos sais cloreto de sódio e carbonato de sódio aumentam a recuperação de extração de patulina em suco de maçã. Para a etapa de limpeza, foi observado que a adição de 400 mg de PSA promoveu maior área do pico relativo à patulina, e foi destacada a importância da adição de ácido acético imediatamente após a etapa de limpeza para reduzir o pH, assegurando a estabilidade da patulina.

Tabela 3 - Resumo de seleção de métodos desenvolvidos para a determinação de fungicidas em maçã por cromatografia

Fungicida	Matriz	Extração	Separação	Ionização	Deteção	Coluna	Fase móvel	Autor/Ano
Tiabendazol, Imazalil, Tiofanato-metila, Pirimetanil, Epoxiconazol, Iprodiona, Procloraz, e outros sete.	laranja, uva, maçã, tomate, banana e alface	Extração em fase sólida (SPE), e acetato de etila	Cromatografia Líquida	<i>Electrospray</i>	Espectrometria de massas	C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Metanol e água contendo 5 mM de ácido fórmico	(WANG et al., 2007)
Vinclozolina, Metalaxil, Cyprodinil, Captan, Azoxistrobina	Sucos e purês de maçãs	Microextração líquido-líquido	Cromatografia Gasosa	Impacto de elétrons	Espectrometria de massas	Capilar (15mm x 0,25mm; 0,25µm )	Hélio	(CUNHA et al., 2009)
Carbendazim e Tiabendazol	Maçãs	Microextração em fase sólida (SPME)	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	-	UV (315nm)	C18 (150 mm x 3.9 mm; 5 µm)	Metanol 50%	(HU et al., 2008)
Diniconazol, Flusinazol, Trifloxistrobina, Tebufenozida.	Maçã, uva e vinho	Extração em fase sólida (SPE) e ciclohexano-diclorometano	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	-	UV (210 nm)	C18 (250 mm x 2,1 mm; 5 µm)	Acetonitrila e água	(LIKAS &TSIROPOULOS, 2010)
Carbendazim, Tiabendazol, Imazalil, Tridemorph, Triadimefon, e outros sete.	Suco de maçã	QuEChERS , ou SPE	Cromatografia líquida (LC)	<i>Electrospray</i>	Espectrometria de massas (MS-MSD-ToF)	C8 (150 mm x 4,6 mm; 5µm)	Água e metanol	(LÓPEZ et al., 2007)

Tabela 3 - (continuação) Resumo de seleção de métodos desenvolvidos para a determinação de fungicidas em maçã por cromatografia

Fungicida	Matriz	Extração	Separação	Ionização	Deteção	Coluna	Fase móvel	Autor/Ano
Bixafen, Fluxapiraxade, Furametpir, Piraclostrobina e Rabenzazol	Arroz, trigo, pepino, tomate, alface, maçã e uva	QuEChERS	Cromatografia líquida (LC)	<i>Electrospray</i>	Espectro- metria de massas	C18 (50mmx 2,1 mm; 1,7 µm)	Água e acetonitrila	(DONG et al., 2012)
Fenobucarb, Diazinon, Chlorotalonil e Chlorpyrifos	Maçã	Microextração em fase sólida (SPME)	Cromatografia gasosa (CG)	Impacto de Elétrons	Espectro- metria de massas	Capilar (30mm x0,25mm; 0.25 µm)	Hélio	(BOLA & HUAT, 2013)
Pirimetanil, Fludioxonil, Azoxistrobina, Ciprodinil e Piraclostrobina	Sucos de uva, maçã e pêra	Microextração líquido-líquido	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	-	UV 270 nm	C18 (150mm x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitrila e água	(YOU et al., 2018)
Piraclostrobina, Procloraz; 1,4,6- Trichlorophenol	Maçã	QuEChERS	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	<i>Electrospray</i>	Espectro- metria de massas	C18 (50 mm x 3,0 mm; 2,7 µm)	Acetonitrila e tampão acetato de amônio (20mM)	(FAN et al., 2018)

### 3.5.2 Identificação e quantificação

Técnicas analíticas baseadas em separação por cromatografia líquida ou gasosa têm sido frequentemente utilizadas para análise de micotoxinas e fungicidas em maçã, variando no tipo de método de detecção (Tabela 3). Atualmente o método mais utilizado para detecção de patulina é por absorvância no UV conforme recomendado pela AOAC. Contudo alguns fatores, como a presença de interferentes advindos da composição da matriz e a baixa seletividade dificultam uma análise precisa (MACDONALD et al., 2000; KHARANDI; BABRI & AZAD, 2013).

A espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular, e quando acoplada com técnicas cromatográficas ela combina a capacidade de separação da cromatografia, com seu alto potencial em fornecer informações estruturais de massa molecular (COLLINS; BRAGA & BONATO, 2006; LI et al., 2017). Além disso, apresenta alta seletividade, e em alguns casos permite a quantificação de picos sobrepostos, diferentemente dos detectores por absorvância no ultravioleta e no visível. Os espectrômetros de massas podem diferir entre si pelo tipo de fonte de ionização, analisador de massas e detector de íons (COLLINS; BRAGA & BONATO, 2006).

Atualmente existem métodos confiáveis que permitem a detecção e quantificação da patulina, utilizando espectrômetros de massas com fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI) e com fotoionização a pressão atmosférica (APPI) (SEWRAM et al., 2000; TAKINO; DAISHIMA & NAKAHARA, 2003). Kataoka et al. (2009) desenvolveram um método para determinação de patulina em amostras de suco de frutas e em frutas secas utilizando água e acetonitrila (80:20, v / v) como fase móvel e fonte de ionização *electrospray* (ESI) concluindo que no modo negativo é possível obter uma ionização eficaz atingindo um limite de detecção de 23,5 pg mL<sup>-1</sup>. Contudo, Malysheva et al. (2012) relataram que as tentativas para alcançar um sinal ESI-MS útil para a patulina utilizando três diferentes gerações de instrumentos triplos quadrupolo e diferentes fases móveis, não foram bem-sucedidas.

As análises de patulina realizadas por cromatografia gasosa necessitam de uma etapa prévia de derivatização, por exemplo, a sililação, para promover a redução da polaridade da molécula e favorecer sua volatilização. Kharandi, Barbri & Azad (2013) observaram ao comparar a curva de calibração em solvente com as

curvas de calibração na matriz, que os interceptos da curva da matriz com o eixo y foram maiores que os obtidos para solução padrão em solvente na mesma concentração, indicando um efeito de matriz positivo.

### 3.6 Métodos de degradação

Medidas para minimizar o risco potencial da presença de micotoxinas e resíduos de fungicidas nos alimentos devem se basear no monitoramento da ocorrência de agentes contaminantes, mas também no emprego de medidas que visem sua redução (JARDIM & ANDRADE, 2009).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de reduzir o conteúdo de patulina a níveis seguros durante o processamento de alimentos, baseando-se em tratamentos químicos, como a aplicação de ácido ascórbico e ozônio, tratamentos biológicos como o uso de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias *Rhodospiridium paludigenum*, e tratamentos físicos como a aplicação de radiação UV, alta pressão hidrostática, luz pulsada e sonicação (AVSAROGLU et al., 2015; CHANDRA et al., 2017; FUNES et al., 2013; SALADINO et al., 2016; KOKKINIDOU, FLOROS & LABORDE, 2014; MCKENZIE et al., 1997).

A degradação de fungicidas ocorre habitualmente de maneira natural através de mecanismos oxidativos, porém alguns estudos também têm sido desenvolvidos para promover sua degradação com tratamentos como, por exemplo, a aplicação de radiação UV para degradar o fungicida piraclostrobina (PASSOS; RODRIGUES & REIS, 2013; LAGUNAS-ALLUÉ et al. 2012).

Apesar de estudos demonstrarem o potencial de tratamentos para reduzir o conteúdo de patulina e de fungicidas, alguns tratamentos podem alterar as características nutricionais e sensoriais dos produtos limitando sua aplicação. Sendo assim, tratamentos baseados em tecnologias não térmicas como a aplicação de campos elétricos apresentam potencial de utilização por preservar essas características (CHOI & NIELSEN, 2005; RAWSON et al., 2011; CRUSSES, 1973; MORRIS, BRODY & WICKER, 2007).

O campo elétrico contínuo de baixa intensidade, ou campo elétrico moderado, é uma técnica não térmica caracterizada pelo uso de campos elétricos menores ou iguais a 1000 V/cm. Contudo, apesar de ter sido estudado para inativação de microrganismos, proteínas e enzimas, e para promover a modificação

do amido, ainda pouco se conhece sobre seu uso para degradar compostos tóxicos como as micotoxinas e resíduos de fungicidas (SAMARANAYAKE & SASTRY, 2016; SASTRY, 2008)

A aplicação de corrente elétrica já tem sido utilizada em outras áreas, como no tratamento de resíduos, para promover a degradação de moléculas por eletroxidação. No geral o fenômeno da passagem de corrente elétrica através de uma célula eletroquímica provoca a transferência de cargas e condução iônica, podendo levar a uma eletroxidação por um mecanismo direto com a adsorção do composto na superfície do anodo (eletrodo positivo) e degradação pela transferência de elétrons, ou indireto pela formação de oxidantes fortes como hipoclorito, ozônio e peróxido hidrogênio, ocorrendo a degradação da molécula a partir da reação de oxidação proporcionada por estes oxidantes (WIMMER, 2007).

### **3.7 Validação de métodos analíticos**

A validação tem por objetivo demonstrar através de evidências documentadas que um método analítico é adequado para o seu propósito. Este procedimento deve ser realizado sempre que se desenvolver um novo método, ou realizar adaptações em metodologias já validadas, incluindo novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos. Para tal se deve avaliar parâmetros como exatidão, repetitividade, precisão intermediária, seletividade, limites de detecção e quantificação e linearidade (BRITO et al., 2003).

#### **3.7.1 Seletividade**

A seletividade é definida como a capacidade do método analítico em medir inequivocamente e diferenciar o(s) analito(s) na presença de outros componentes como metabólitos, impurezas, degradantes, componentes da matriz, etc. Num processo de validação este deve ser o primeiro aspecto avaliado, visto que se não for assegurado, os parâmetros de linearidade, exatidão e precisão estarão comprometidos (PETERS; DRUMMER & MUSSHOF, 2007; RIBANI et al., 2004).

### **3.7.2 Linearidade da curva**

A linearidade da curva é definida a partir da relação entre a concentração do analito e a resposta do equipamento. O procedimento de calibração mais simples requer a preparação de uma série de diluições a partir de uma solução padrão estoque que cubra uma faixa razoável de resposta do sinal, isto é, de seis a oito pontos espaçados (AOAC, 2002). No geral as curvas devem ser preparadas por adição do analito na matriz, mas quando esta não exerce nenhum efeito sobre o sinal do equipamento é possível que as curvas sejam preparadas em solvente (RIBANI et al., 2004). A partir das repetições faz-se o ajuste dos resultados a um modelo matemático que seja capaz de descrever adequadamente a relação entre a concentração e a resposta. Normalmente os modelos lineares são preferíveis, contudo, se necessário, é possível usar modelos não lineares, por exemplo, a equação de segundo grau (BRITO et al., 2003; PETERS; DRUMMER & MUSSHOF, 2007).

### **3.7.3 Estabilidade**

A determinação da estabilidade do analito na matriz durante todo o procedimento é pré-requisito para uma quantificação confiável. Uma validação completa deve realizar experimentos de estabilidade para os vários estágios da análise, incluindo a etapa de armazenamento. No entanto, quando se tem bem estabelecidos os dados sobre a estabilidade do analito em estudo, e estes se encontram disponíveis na literatura, esta etapa pode ser dispensada (PETERS; DRUMMER & MUSSHOF, 2007).

### **3.7.4 Exatidão (Recuperação)**

A exatidão é expressa através da concordância entre o valor resultante do ensaio experimental e o valor teórico, tido como verdadeiro (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004). As formas mais utilizadas para determinar a exatidão de um método são: materiais de referência, a comparação de métodos e os ensaios de recuperação (RIBANI et al., 2004). A avaliação deve ser verificada a partir de no

mínimo nove determinações, desde que sejam contempladas as concentrações baixa, média e alta, em triplicata (ANVISA, 2012).

### **3.7.5 Precisão**

A precisão é expressa pela dispersão dos resultados entre ensaios repetidos utilizando uma mesma amostra, sob uma condição específica, de forma que, quanto menor a dispersão maior a precisão do método (RIBANI et al., 2004). A precisão deve ser calculada pela determinação do desvio padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) (GIUDICE, 2016). Num processo de validação, normalmente são aceitos coeficientes de variação entre 1% e 2%, mas para análise de traços ou impurezas, é aceita uma variação de até 20% dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004).

Quanto às condições de análise, a precisão pode ser dividida em três categorias: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade, precisão intra-ensaio ou intra-corrída, consiste na concordância entre os resultados obtidos de medições sucessivas, realizadas sob as mesmas condições (mesmo método, analista, local e instrumento) em curto intervalo de tempo (RIBANI et al., 2004). Já a precisão intermediária é a concordância entre os resultados obtidos a partir de medições realizadas em diferentes dias, analistas e/ou equipamentos. Sendo recomendado pela ANVISA um intervalo mínimo de dois dias com diferentes analistas. Esta medida é considerada a que melhor representa a variabilidade dos resultados em um único laboratório (ANVISA, 2003; GIUDICE, 2016; RIBANI et al., 2004).

A reprodutibilidade é obtida a partir do grau de concordância entre os resultados da medição de uma mesma amostra, sob condições distintas (mudança de operador, local e equipamento). Dados de reprodutibilidade são obtidos normalmente de estudos de colaboração entre laboratórios, para determinar a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em farmacopeias, procedimentos do CODEX e outros (RIBANI et al., 2004).

### **3.7.6 Limite de detecção e quantificação**

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser distinguida do sinal do branco/ruído, mas não necessariamente pode ser quantificada, sendo útil apenas para o controle de impurezas indesejáveis. Enquanto que o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade ou concentração de um analito que pode ser estimada com confiabilidade (AOAC, 2002; BRITO et al., 2003)

### 3.7.7 Efeito de matriz

O efeito de matriz é determinado pela interferência causada pelas substâncias inerentes à matriz na resposta do equipamento (CASSIANO et al., 2009). A amplitude desses efeitos pode estar relacionada ao preparo da amostra. Amostras quando muito concentradas ou que passaram por uma etapa de limpeza ineficiente podem afetar a qualidade dos dados, levando a uma supressão ou aumento no sinal do íon (HOLADOVA & KEMPNY, 1998). O efeito de matriz pode ser classificado em baixo quando houver uma variação de 20%, médio quando a variação for entre 20% e 50% e alto quando superior a 50% (FERRER et al., 2011).

São descritos dois tipos de efeito de matriz, o chamado efeito rotacional e o chamado efeito translacional. O efeito de matriz rotacional se caracteriza pela variação no coeficiente angular da curva obtida na adição de padrão, em relação à curva obtida em condições similares na padronização externa, enquanto o efeito translacional se caracteriza pela relação entre a soma do sinal da amostra ao sinal do padrão e o sinal da amostra fortificada (TONEGURRI, 2017).

O efeito de matriz pode ser influenciado pela estrutura química, propriedades físicas do analito (como volatilidade), tipo de matriz e pela relação entre a concentração de analito e matriz (TANG & KEBARLE, 1993; TAYLOR, 2005). Na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas o efeito de matriz ocorre devido a coeluição de moléculas advindas da matriz junto ao composto de interesse, afetando a eficiência de ionização na interface *electrospray* (TAYLOR, 2005). Na cromatografia gasosa o efeito de matriz é explicado pela presença de sítios ativos livres no injetor, coluna e fontes de íons, principalmente grupos silanol. Quando uma solução padrão preparada em solvente é analisada por GC, o analito se liga a esses sítios, reduzindo a quantidade transferida para a coluna e/ou detector. Quando se analisa na matriz, os componentes presentes reduzem a interação do analito de

interesse com os sítios ativos, ocasionando uma resposta mais alta (FRENICH et al., 2009; FUJIYOSHI et al., 2016).

## 4 Materiais e métodos

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Fisiologia Pós-colheita de Frutas e Hortaliças e de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM), pertencentes ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial e vinculados ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl). Os ensaios de campo elétrico contínuo foram realizados no Laboratório de Eletroquímica do Instituto Federal Sul-riograndense (IFSul).

### 4.1 Materiais

Para validação do método foram utilizadas maçãs do tipo Gala adquiridas no comércio local de Pelotas - RS, sendo selecionados frutos sadios, isentos de injúrias e podridões e contendo pedúnculo. Para avaliação dos resíduos de fungicidas foram adquiridas amostras de maçã e produtos de maçã de acordo com a oferta de cada estabelecimento realizando coletas em 9 estabelecimentos comerciais (supermercados e feiras) do município de Pelotas-RS.

Foram utilizados os reagentes de grau analítico para análise (P.A), sulfato de magnésio anidro ( $MgSO_4$ ), ácido acético glacial e ácido clorídrico da marca Vetec. Cloreto de sódio (NaCl) e carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ ) da marca Synth, e amina primária secundária (PSA) da marca Sigma Aldrich. Acetonitrila grau HPLC da marca AppliChem, ácido fórmico e reagente de derivatização N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) da marca Sigma Aldrich,

Os padrões analíticos utilizados foram: micotoxina patulina (CAS: 149-29-1), e os fungicidas clorotalonil (CAS: 1897-45-6), captan (CAS: 133-06-2), tetraconazol (CAS: 112281-77-3), epoxiconazol (CAS: 133855-98-8), e piraclostrobina (CAS: 175013-18-0), todos com alto grau de pureza e da marca Sigma-Aldrich. Para a análise dos fungicidas trifloxistrobina (CAS: 141517-21-7), tebuconazol (CAS: 107534-96-3) e carbendazim (CAS: 10605-21-7), foram utilizados os produtos comerciais Fox (Bayer), Nativo (Bayer) e Carbendazim (Nortox).

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Preparo do extrato (QuEChERS)

As maçãs e produtos de maçãs adquiridos para análise do teor de contaminação por fungicidas foram preparados conforme descrito no item 4.2.6.

Para a validação do método as maçãs selecionadas foram lavadas em água corrente e imersas em solução clorada ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), por 15 min. Em seguida foram novamente lavadas em água corrente, e cortadas, sendo descartadas a parte central e as sementes. Os pedaços foram triturados e centrifugados em centrífuga para sucos (Walita, TuttiFrutti). O suco obtido foi imediatamente utilizado para o preparo do extrato.

Para a extração, adicionou-se 15 mL de acetonitrila em 5 mL de suco em um tubo de polipropileno para centrífuga de 50 mL. Após agitação em vórtex por 20 s uma mistura de 4 g  $\text{MgSO}_4$ , 1 g  $\text{NaCl}$  e 0,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  foi adicionada à solução, que foi imediatamente agitada em vórtex por 30 s. A mistura foi centrifugada a  $1878 \times g$  durante 5 min, e o sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga de 50 mL contendo 400 mg de PSA e 1200 mg de  $\text{MgSO}_4$ . A mistura foi agitada em vórtex por 30 s, e centrifugada ( $2935 \times g$  durante 5 min), o sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL, onde foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial. O extrato foi armazenado sob refrigeração ( $-4^\circ\text{C}$ ) (KHARANDI; BABRI & AZAD, 2013).

#### 4.2.2 Preparo das soluções estoque

A solução estoque de patulina foi preparada a partir da ressuspensão do padrão em etanol. A concentração da solução foi determinada pela lei de Lambert-Beer (Equação 1) dada pela medida da absorbância no UV no comprimento de onda 276 nm no espectrofotômetro Jenway 6700 (AOAC, 2000).

$$\text{Abs} = \varepsilon \times b \times C \quad (1)$$

Onde *Abs* corresponde ao valor da absorbância medida,  $\varepsilon$  o coeficiente de absorvidade molecular da patulina em etanol (14600), *b* o comprimento atravessado pelo feixe de radiação (1 cm) e *C* a concentração em  $\text{mol L}^{-1}$ .

As soluções estoques dos fungicidas foram preparadas na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  a partir da dissolução de 10 mg do padrão seco, pesado em balança analítica de precisão, em 10 mL de acetonitrila grau HPLC. As soluções dos fungicidas comerciais foram preparadas a partir da diluição em água ultrapura, de forma a obter uma concentração final de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  do ingrediente ativo de maior concentração no produto. Desta forma, a concentração dos ingredientes ativos presentes na solução estoque do fungicida comercial FOX foi  $0,85 \text{ mg mL}^{-1}$  de trifloxistrobina; do fungicida comercial NATIVO foi  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de tebuconazol e  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  de trifloxistrobina; e do fungicida comercial Carbendazim foi  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de carbendazim.

#### 4.2.3 Método de análise de patulina (GC-MS)

Para a análise de patulina por cromatografia gasosa, realizou-se previamente uma reação de derivatização, na qual 1 mL do extrato (item 4.2.1) foi transferido para um microtubo de centrífuga de 2 mL, e evaporado até a secura aplicando uma leve corrente de gás nitrogênio. Após a evaporação, o resíduo seco foi ressuspenso em  $300 \mu\text{L}$  de acetonitrila sob agitação em vórtex por 15 s. Em seguida foram adicionados  $100 \mu\text{L}$  de BSTFA novamente sob agitação em vórtex. A mistura foi mantida a  $70^\circ \text{C}$  por 30 min em banho-maria. Após a reação, a solução foi transferida para um *insert* de  $250 \mu\text{L}$  contido em um vial ( $1,5 \text{ mL}$ ) e  $1 \mu\text{L}$  da solução foi injetada imediatamente no GC-MS.

Os parâmetros para a análise por cromatografia e espectrometria de massas foram adaptados de Kharandi, Barbri & Azad (2013). Foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra com injetor automático AOC-20i e biblioteca de espectro de massas NIST 2011, com uma coluna capilar Rtx-1MS ( $30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$ ) para a separação, e gás hélio para arraste, com um fluxo constante de  $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ . A injeção foi feita no modo *splitless*, com temperatura do injetor de  $250^\circ \text{C}$ , e as temperaturas da fonte de íons e interface do MS de  $280^\circ \text{C}$ . O forno foi inicialmente mantido a  $100^\circ \text{C}$  durante 2 min e programado para  $140^\circ \text{C}$  a uma taxa de aquecimento de  $15^\circ \text{C min}^{-1}$ , ao atingir  $140^\circ \text{C}$ , a temperatura foi elevada para  $170^\circ \text{C}$  a uma taxa de aquecimento de  $5^\circ \text{C min}^{-1}$  e em seguida para  $280^\circ \text{C}$  a uma taxa de aquecimento de  $15^\circ \text{C min}^{-1}$  a qual foi mantida por 5 min. O tempo total de análise foi de 26 min. Inicialmente o espectrômetro de massas foi operado no modo

de varredura (SCAN), utilizando uma faixa de massas de  $m/z$  70 a 600. Uma vez estabelecido o tempo de retenção da patulina, assim como seus fragmentos mais intensos (170, 183 e 226), passou-se a utilizar o modo de monitoramento de íons selecionados (SIM).

#### 4.2.4 Método de análise de fungicidas (HPLC-ESI-QToF-MS)

A análise multirresíduo de fungicidas foi baseada no método descrito por Luz et al., (2016). Foi utilizado cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência (Shimadzu, Prominence) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de vôle) (Brucker Impact HD), com fonte de ionização *electrospray*. Os compostos foram separados por uma coluna de fase reversa Shim-pack XR-ODS C18 (75mm x 2,0mm; 2,2 $\mu$ m). Para eluição dos compostos foi utilizado um gradiente com as soluções de ácido fórmico em água (0,1% v/v, fase móvel A) e ácido fórmico em acetonitrila (0,1% v / v, fase móvel B). O gradiente iniciou com 10% B, mantido por 2 min, passou a 50% B em 7 min e 100% B aos 22 min, permanecendo nessa condição até 25 min; aos 27 min voltou-se a condição inicial (10% B), permanecendo assim por 3 min.

Inicialmente o espectrômetro de massas foi operado nos modos positivo e negativo, e após a identificação do melhor modo de ionização, passou a ser utilizado apenas no modo positivo. A faixa de massas selecionada para obtenção dos espectros foi de  $m/z$  50 a 1200. O potencial do capilar foi 4500 V com pressão do nebulizador de 40 psi, fluxo de gás de secagem (N<sub>2</sub>) de 9 L min<sup>-1</sup>, e temperatura da fonte 180 °C. Para a calibração foi utilizada uma solução de formiato de sódio (10 mM). Os dados foram analisados pelo *software* Data analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), a partir da identificação da relação massa/carga ( $m/z$ ), considerando a adição de um próton [M+H]<sup>+</sup> e a possibilidade da formação de outros adutos. O processamento das curvas de calibração foi realizado utilizando o *software* Quany Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

#### 4.2.5 Validação dos métodos analíticos

As metodologias estudadas foram validadas, a partir da avaliação da seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção, e

efeito de matriz, de acordo com as orientações do guia de validação da ANVISA (2003).

#### 4.2.5.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela observação da presença, ou ausência de picos interferentes. Isto é, picos provenientes da matriz, ou dos analitos que coincidam em tempo de retenção.

#### 4.2.5.2 Linearidade de resposta do detector

A linearidade de resposta do detector foi obtida com base na injeção das soluções preparadas a partir das soluções estoque. Foi transferido um volume específico de cada solução estoque para um microtubo de centrifuga (2mL), no qual a solução foi evaporada sob leve corrente de N<sub>2</sub> gasoso. O mix de fungicidas foi ressuspensionado em 1 mL de acetonitrila e a patulina ressuspensionada em 300 µL para derivatização, conforme descrito no item 1.2.3. Após o preparo, foram realizadas dez diluições seriadas na proporção de 1:1 (v / v). As concentrações máximas e mínimas injetadas de cada analito estão informadas na Tabela 4. A linearidade foi atribuída ao coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>), calculado para a equação linear da reta (Equação 2), onde y é a concentração real e x a área referente ao pico do analito.

$$y = ax + b \quad (2)$$

Tabela 4-Concentrações da linearidade

Analito	Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	
	Máxima	Mínima
Patulina	1500	2,92
Captan	2500	4,88
Carbendazim	2500	4,88
Clorotalonil	2500	4,88
Epoconazol	2500	4,88
Piraclostrobina	2500	4,88
Tebuconazol	2500	4,88
Tetraconazol	2500	4,88
Trifloxistrobina	3393	6,63

#### 4.2.5.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados com base no coeficiente angular (CA) e no desvio padrão do coeficiente linear ( $\sigma_{CL}$ ) dos modelos analíticos ajustados no ensaio de linearidade, Equações 3 e 4 respectivamente (ANVISA, 2003; Ribani et al., 2004).

$$LD = 3 \times \left( \frac{\sigma_{CL}}{CA} \right) \quad (3)$$

$$LQ = 10 \times \left( \frac{\sigma_{CL}}{CA} \right) \quad (4)$$

#### 4.2.5.4 Exatidão

A exatidão foi calculada a partir de ensaios de recuperação baseados na comparação da área dos picos referentes à amostra pura, fortificada com padrão, e do padrão puro em solvente (Equação 5). Foram testadas três faixas de concentração (baixa, intermediária e alta) realizando três repetições (ANVISA, 2003).

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{AAF + AA}{AP} \quad (5)$$

Onde:

AAF = área do pico da amostra fortificada com o padrão;

AA = área da amostra não fortificada;

AP = área do pico do padrão.

#### 4.2.5.5 Precisão

Foram avaliadas a repetitividade e a precisão intermediária. A repetitividade foi avaliada injetando três concentrações diferentes (alta, média e baixa) em três repetições consecutivas, enquanto a precisão intermediária foi determinada pela

injeção das três concentrações com três repetições em dias não consecutivos. Os resultados foram avaliados a partir do coeficiente de variação (CV) (Equação 6).

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

CV = Coeficiente de variação;

DP = Desvio padrão;

CMD = Concentração média determinada.

#### 4.2.5.6 Efeito matriz

O efeito de matriz foi verificado a partir da construção de duas curvas, uma preparada pela leitura do padrão em acetonitrila e a outra pela avaliação do padrão diluído no extrato, contendo todos os interferentes e co-extrativos da matriz. A percentagem do efeito de matriz foi calculada a partir da Equação 7.

$$EM = \left[ \left( \frac{APE}{APS} \right) - 1 \right] \times 100 \quad (7)$$

Onde:

EM = Efeito de matriz;

APE = Área do pico do analito presente no extrato;

APS = área do pico do analito no solvente.

#### 4.2.6 Avaliação dos resíduos de fungicidas em maçãs e nos produtos de maçã comercializados no município de Pelotas - RS

Foram adquiridos no comércio de Pelotas-RS nove amostras de produtos de maçã (4 de chás, 1 de purê, 1 de suco, e 3 de maçãs desidratadas), e 22 amostras de maçã *in natura* dos tipo: Gala (16), Fuji (4), *Pink Lady* (1) e *Granny Smith* (1). As amostras foram adquiridas de acordo com a oferta dos nove estabelecimentos comerciais visitados aleatoriamente.

Os produtos secos (chá e maçã desidratada) foram macerados em moinho de bolas até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Foi preparado um extrato misturando 5 g do pó obtido em 25 mL de água ultrapura. O extrato foi sonificado por 30 min a uma frequência de 40 kHz em temperatura ambiente. Em seguida foi filtrado em filtro de papel (25 µm de poro). Cinco mililitros foram transferidos para um tubo de centrifuga de 50 mL, no qual se procedeu a extração pelo método QuEChERS (item 4.2.1). Foram utilizados 5 g das amostras de purê e 5 mL das amostras de suco para extração (QuEChERS). As maçãs *in natura* foram picadas, descartando-se o pedúnculo, as sementes e a parte central, trituradas em uma centrífuga para sucos e 5 mL foram separados para extração (QuEChERS).

Os extratos foram analisados por HPLC-ESI-QToF-MS conforme descrito no item 4.2.4. A identificação dos resíduos de fungicida foi realizada a partir da detecção dos íons de interesse, considerando uma precisão de massa de 5 ppm. Comparou-se os valores de  $m/z$  dos compostos nas amostras com os dados obtidos durante a validação do método utilizando os padrões e com informações obtidas em diferentes bases de dados livres disponíveis (METLIN, PubChem, Mass Bank) para se ter evidência adicional para confirmação da identidade do composto quando não havia disponibilidade de padrão analítico, mas apenas se disposto do produto comercial.

#### **4.2.7 Utilização de campo elétrico contínuo para degradação de patulina e piraclostrobina**

O experimento foi montado com o objetivo de avaliar o processo de eletroxidação da patulina e da piraclostrobina. Foi utilizado um delineamento composto central fatorial completo incluindo 4 pontos axiais e 4 centrais (DCC+ ponto central). A Tabela 5 apresenta o planejamento experimental com os 12 ensaios realizados, os valores codificados e os valores originais das variáveis independentes estudadas (potencial aplicado e pH).

Os padrões de patulina e piraclostrobina foram transferidos para microtubos de centrifuga de 2 mL e evaporados sob leve corrente de nitrogênio gasoso. Após a secagem o conteúdo foi ressuscendido em 1 mL de solução salina preparada com NaCl e HCl de modo a obter uma condição de condutividade e pH semelhante ao

encontrado no suco de maçã. Desta forma a condutividade foi fixada em  $2,00 \pm 0,1 \text{ mS cm}^{-1}$  e o pH foi ajustado conforme determinado pelo planejamento experimental.

Para realização dos experimentos foi montada uma célula eletrolítica (Figura 2) contendo uma fonte de alimentação controlada (Polimed DC power supply PMI 3002 S), acoplada a um multímetro digital portátil (Intrutherm MD-300). Como cátodo e ânodo foram usados eletrodos de platina de 0,5 mm de diâmetro. O eletrodo foi imerso aproximadamente 13,38 mm na solução, proporcionando uma área de trabalho de  $2,62 \text{ mm}^2$ . O potencial previamente estabelecido foi ajustado e mantido por 20 min.

Após o tratamento, as soluções de trabalho foram congeladas, e posteriormente evaporadas até a secura por uma leve corrente de gás nitrogênio. O conteúdo seco foi ressuspensão em acetonitrila e as amostras foram analisadas conforme descrito nos itens 4.2.3 e 4.2.4. O processamento dos dados foi realizado utilizando o *software Statistica 7.0*.

Tabela 5 - Planejamento experimental da eletroxidação da patulina e da piraclostrobina

Experimento	Potencial (V)	pH
1	1,72 (-1,0)	4,0 (-1,0)
2	1,72 (-1,0)	6,0 (1,0)
3	2,80 (1,0)	4,0 (-1,0)
4	2,80 (1,0)	6,0 (1,0)
5	1,50 (-1,4)	5,0 (0,0)
6	3,00 (1,4)	5,0 (0,0)
7	2,25 (0,0)	3,6 (-1,4)
8	2,25 (0,0)	6,4 (1,4)
9 (C)	2,25 (0,0)	5,0 (0,0)
10 (C)	2,25 (0,0)	5,0 (0,0)
11 (C)	2,25 (0,0)	5,0 (0,0)
12 (C)	2,25 (0,0)	5,0 (0,0)

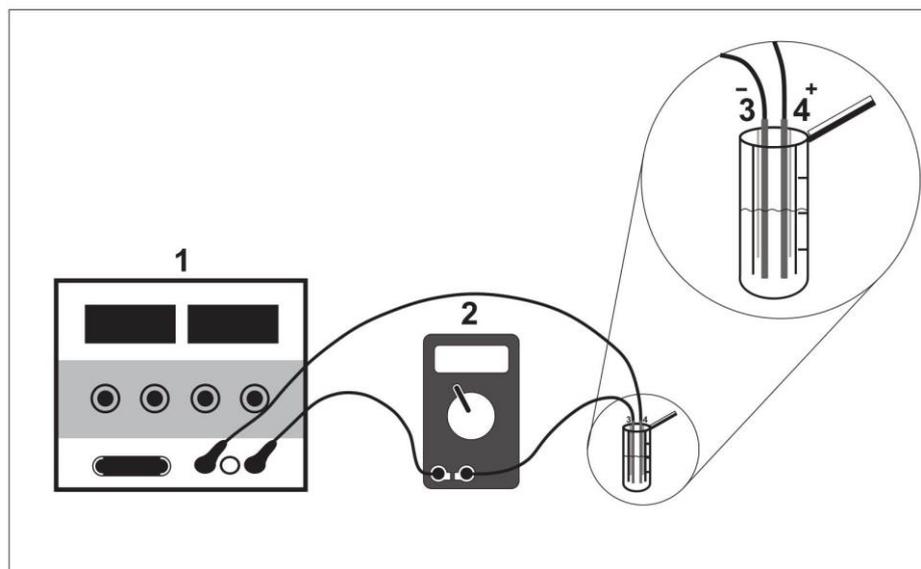


Figura 2 - Ilustração da célula eletrolítica utilizada para os ensaios de eletroxidação. (1) Fonte de alimentação; (2) multímetro; (3) cátodo; (4) ânodo.

## 5 Resultados

### 5.1 Validação do método

#### 5.1.1 Análise de patulina por GC-MS em maçã

O íon com razão massa/carga ( $m/z$ ) 226, referente à massa molecular da patulina adicionada de um radical trimetilsilil, apresentou tempo de retenção de 8,42 min. O pico correspondente a patulina foi confirmado a partir da comparação entre o perfil de fragmentação experimental com o teórico. Sendo que o padrão utilizado apresentou 93% de similaridade com o perfil de fragmentação da biblioteca do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST). Os principais íons de referência apresentados na Figura 3 foram 73 (100%); 170 (53%); 183 (50%); 111 (24%); 226 (22%), 198 (18%).

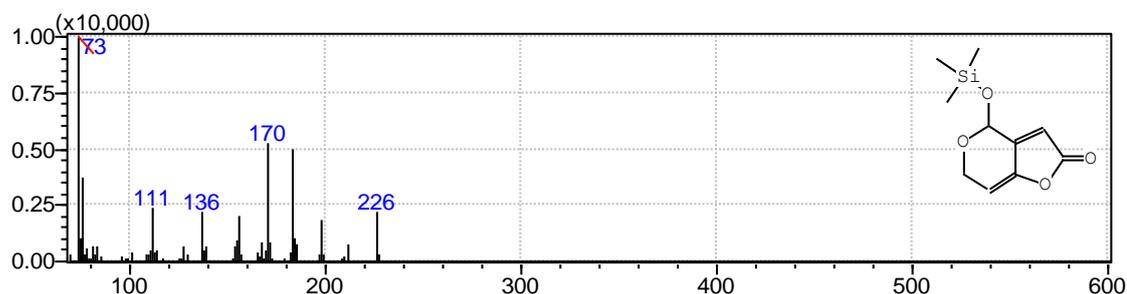


Figura 3- Espectro de massas da patulina (sililada), por GC-MS.

A seletividade do método, determinada a partir da comparação entre os cromatogramas do extrato de maçã puro e o da solução padrão de patulina, revelou ausência de picos advindos da matriz no mesmo tempo de retenção do analito, conforme ilustrado na Figura 4.

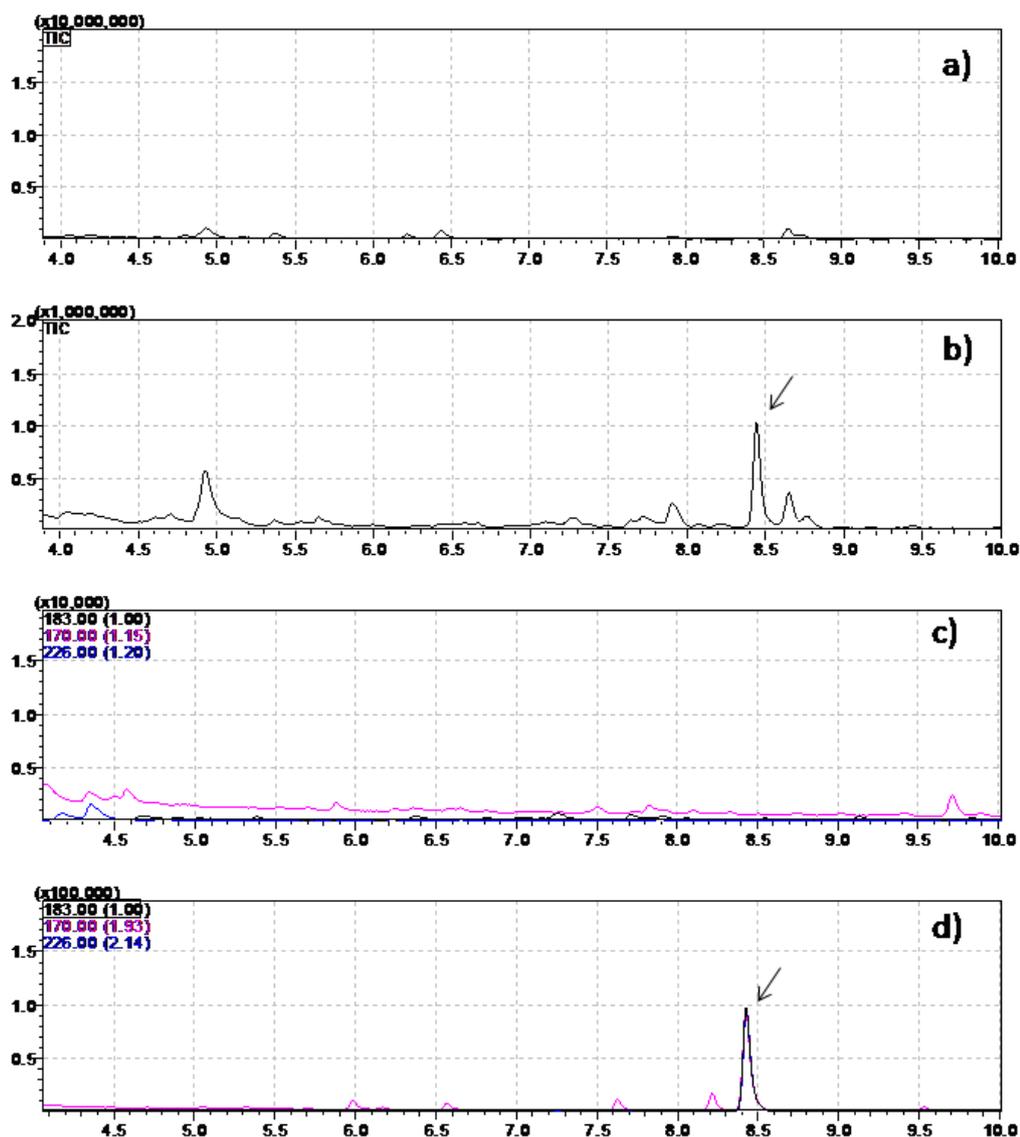


Figura 4- Cromatograma da análise de patulina por GC-MS (a) extrato de maçã puro no modo SCAN; (b) padrão puro no modo SCAN; (c) extrato de maçã puro no modo SIM; (d) padrão puro no modo SIM.

Na Tabela 6 estão apresentadas as equações de regressão na matriz e no solvente, seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). A curva de calibração da patulina foi construída a partir de seis pontos, no intervalo de concentração 23-1500  $\mu\text{g L}^{-1}$  apresentando  $R^2 = 0,98$  na curva em solvente e  $R^2 = 0,99$  na matriz. Em solvente, a patulina apresentou LD de 1,68  $\mu\text{g L}^{-1}$  e LQ de 5,08  $\mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto na matriz apresentou LD de 1,15  $\mu\text{g L}^{-1}$  e LQ de 3,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Tabela 6 - Equação da reta, coeficiente de determinação e limites de detecção e quantificação para patulina por GC-MS

Analito	Diluição	Equação	R <sup>2</sup>	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Patulina	Solvente	$y = 49,05x - 3962$	0,983	1,68	5,08
	Matriz	$y = 55,19x - 2666$	0,991	0,99	3,02

Os resultados obtidos para os ensaios de precisão e exatidão encontram-se dispostos na Tabela 7. Os ensaios de precisão que consistiram na avaliação da repetitividade e precisão intermediária apresentaram um coeficiente de variação percentual inferior a 5% e os ensaios de exatidão apresentaram uma média de recuperação de  $102,6\% \pm 11,5\%$ .

Tabela 7-Avaliação do percentual de recuperação, da repetitividade e da precisão intermediária para análise de patulina por GC-MS

Analito	Parâmetros	Baixo*	Médio*	Alto*	Média $\pm$ DP**
Patulina	Recuperação (%)	114,8	101,2	91,8	$102,6 \pm 11,5$
	Repetitividade (CV%**)	1,1	0,1	0,4	$0,9 \pm 0,6$
	Precisão Intermediária (CV%**)	0,4	1,1	1,3	$0,9 \pm 0,2$

\*Níveis de concentração da patulina:  $49 \text{ ng mL}^{-1}$  (baixo),  $187 \text{ ng mL}^{-1}$  (médio), e  $750 \text{ ng mL}^{-1}$  (alto).

\*\* Desvio Padrão.

A Figura 5 demonstra a plotagem da curva do efeito de matriz, onde é possível observar que o efeito de matriz foi inversamente proporcional a concentração do analito, de modo que nos níveis de concentração:  $23 \text{ ng mL}^{-1}$  (baixa),  $375 \text{ ng mL}^{-1}$  (intermediária), e  $1500 \text{ ng mL}^{-1}$  (alta), foi obtido um efeito de matriz positivo de 177,5%; 47,7% e 13,7% respectivamente.

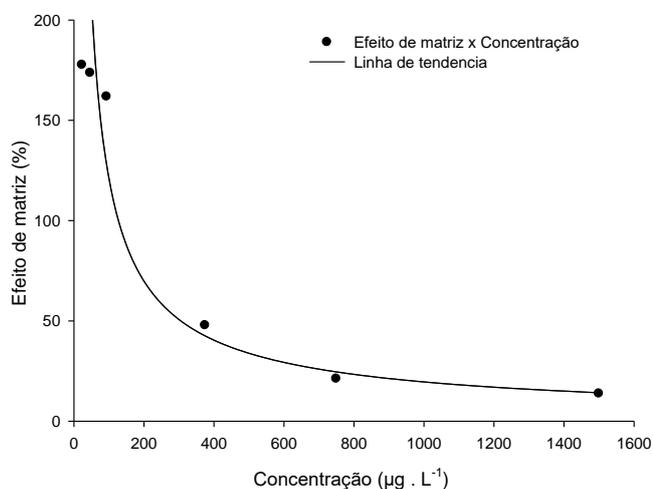


Figura 5 - Curva analítica do efeito de matriz da patulina.

### 5.1.2 Análise multirresíduo de fungicida por HPLC-ESI-QToF-MS em maçã

Os fungicidas carbendazim, epoxiconazol, piraclostrobina, tebuconazol, tetraconazol trifloxistrobina foram detectados apenas no modo positivo de ionização, enquanto os íons dos fungicidas clorotalonil e captan não foram detectados em nenhum dos modos testados, tampouco foi verificada a presença de adutos. Desta forma, como a maioria dos compostos foi detectada no modo positivo, optou-se por utilizar este modo. A Tabela 8 apresenta os compostos avaliados, com as respectivas fórmulas moleculares, relação massa/carga dos compostos na forma protonada e tempo de retenção.

Tabela 8 - Fórmula estrutural, relação massa carga e tempo de retenção dos fungicidas

Analitos	Fórmula	$m/z$ [M+H]	TR (min)
Carbendazim	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	192,0767	1,29
Epoxiconazol	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub> O	330,0803	12,31
Tetraconazol	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O	372,0288	12,53
Tebuconazol	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	308,1524	12,71
Piraclostrobina	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	388,1058	14,84
Trifloxistrobina	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	409,1369	15,74

Os picos correspondentes aos fungicidas foram confirmados a partir da comparação da relação massa/carga ( $m/z$ ) com a dos padrões e com dados disponíveis em bibliotecas *online* (KEGG, ChEBI e ChemSpider), Além disso os perfis de fragmentação, com exceção do carbendazim, visto que não foi obtido o perfil de fragmentação da molécula, também contribuíram para as identificações (Figura 6).

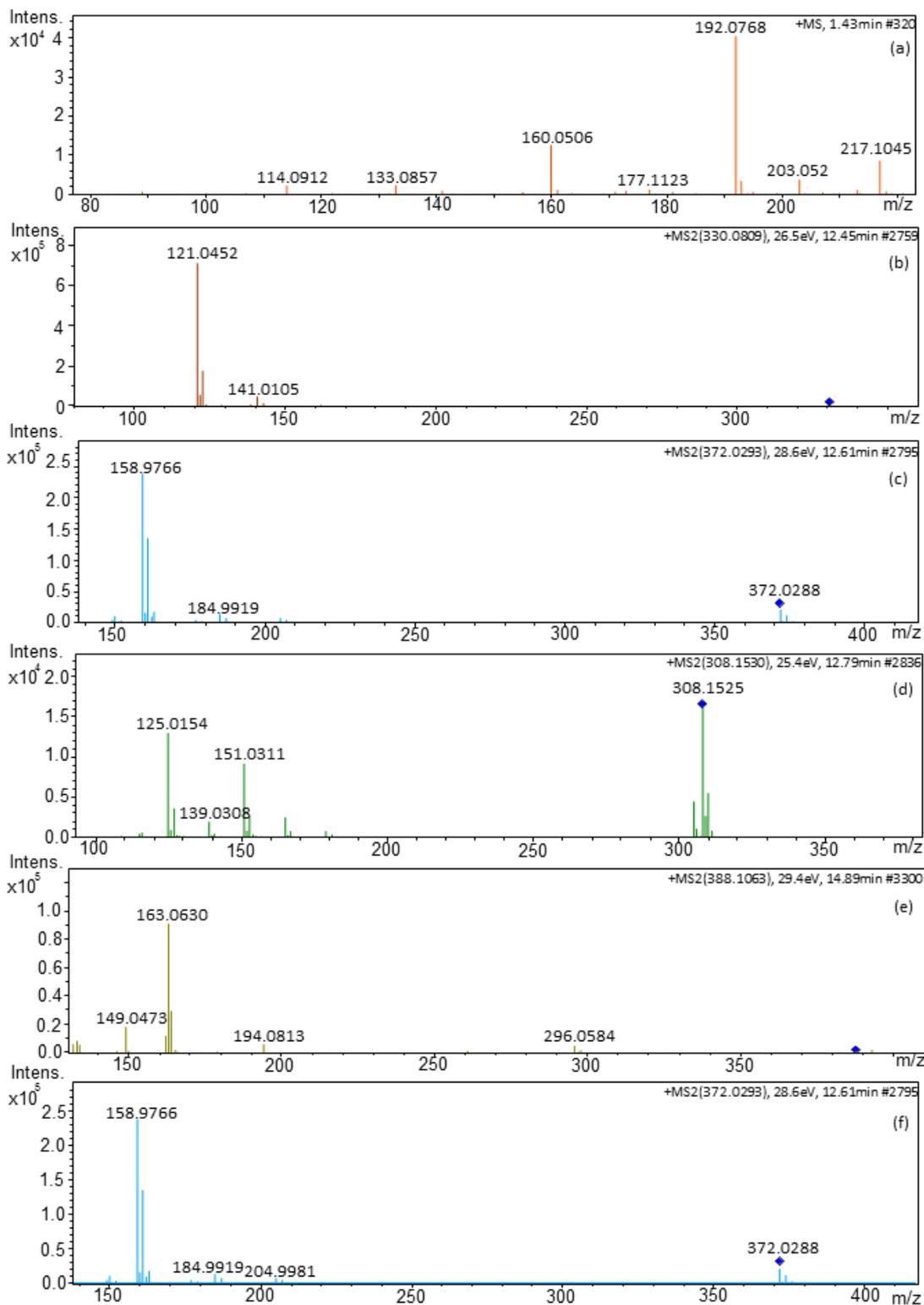


Figura 6 - Espectro de massas dos fungicidas: (a) carbendazim; (b) epoxiconazol; (c) tetraconazol; (d) tebuconazol; (e) piraclostrobina; (f) trifloxistrobina.

A seletividade do método foi confirmada pela ausência de íons interferentes de mesma relação massa/carga no mesmo tempo de retenção, conforme ilustrado na Figura 7.

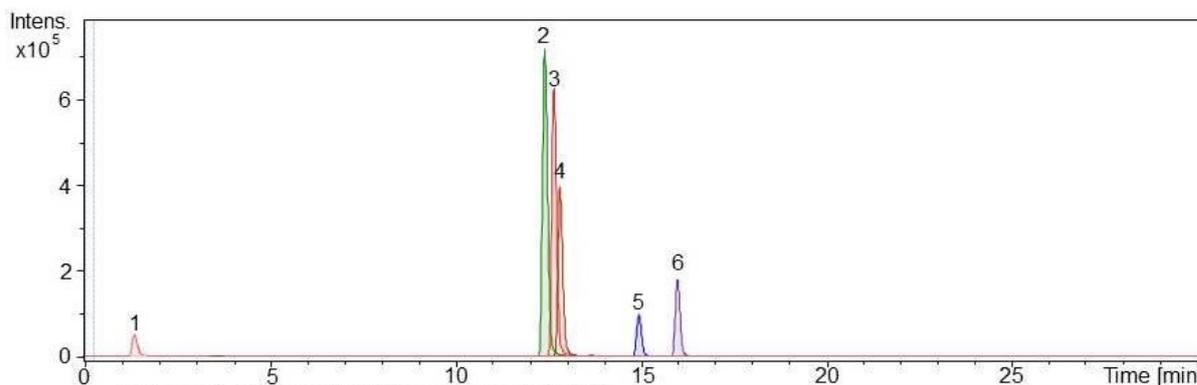


Figura 7-Cromatograma da análise multirresíduo de fungicidas. (1) carbendazim; (2) epoxiconazol; (3) tetraconazol; (4) tebuconazol; (5) piraclostrobina; (6) trifloxistrobina.

Quanto à linearidade, os fungicidas foram avaliados a partir da equação da reta utilizando um modelo linear. A Tabela 9 apresenta as equações das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e no extrato de maçã, e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), sendo possível observar que todas as curvas apresentaram coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,99.

Tabela 9 - Equações das curvas analíticas em solvente (acetonitrila) e no extrato de maçã, e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ )

Analito	Solvente		Matriz	
	Equação	$R^2$	Equação	$R^2$
Carbendazim	$y = 273,3x + 18170$	0,997	$y = 213,8x + 6445$	0,998
Epoxiconazol	$y = 1548x + 47033$	0,999	$y = 1957x + 25553$	0,999
Tetraconazol	$y = 2257x + 21585$	0,999	$y = 2511x - 4713$	0,999
Tebuconazol	$y = 1506x - 1126$	0,999	$y = 1549x - 5369$	0,999
Piraclostrobina	$y = 355,4x + 1497$	0,999	$y = 342,4x + 899,8$	1,000
Trifloxistrobina	$y = 520,8x + 1784$	0,999	$y = 448,5x + 193,4$	0,999

Os limites de detecção e quantificação obtidos para os fungicidas encontram-se dispostos na Tabela 10. Observa-se que em solvente os fungicidas apresentaram limites de detecção (LD) variando de  $0,20 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $1,18 \text{ ng mL}^{-1}$ , e limites de quantificação (LQ) variando de  $0,61 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $3,57 \text{ ng mL}^{-1}$ , enquanto no extrato da matriz apresentaram LD variando de  $0,07 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $1,60 \text{ ng mL}^{-1}$ , e LQ variando de  $0,21 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $4,85 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Tabela 10-Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos fungicidas em acetonitrila e no extrato de maçã

Analito	Solvente ( $\eta\text{g mL}^{-1}$ )		Matriz ( $\eta\text{g mL}^{-1}$ )	
	LD	LQ	LD	LQ
Carbendazim	1,18	3,57	1,60	4,85
Epoxiconazol	0,80	2,43	0,07	0,21
Tetraconazol	1,08	3,28	1,10	3,30
Tebuconazol	0,20	0,61	0,54	1,64
Piraclostrobina	0,54	1,63	1,06	3,22
Trifloxistrobina	0,35	1,07	0,36	1,09

Observa-se que os fungicidas carbendazim, tebuconazol e piraclostrobina apresentaram um aumento nos limites de detecção e quantificação na presença do extrato quando comparados com os obtidos em solvente, indicando uma supressão no sinal causado pelos componentes da matriz. Ao contrário, o epoxiconazol apresentou uma redução nos valores dos limites de detecção e quantificação na presença do extrato quando comparado com os obtidos em solvente, indicando um aumento no sinal causado pelos componentes da matriz. O tetraconazol e a trifloxistrobina não apresentaram variação maior que  $0,02 \text{ } \eta\text{g mL}^{-1}$  entre o sinal obtido na matriz e no solvente, indicando que não há interferência da matriz no sinal.

A exatidão do método foi avaliada a partir dos ensaios de recuperação apresentados na Tabela 11. As médias de recuperação dos fungicidas variaram de  $95,0 \% \pm 0,8\%$  a  $100,4 \% \pm 7,2\%$ .

Tabela 11 - Percentual de recuperação dos fungicidas

Analito	% Recuperação			
	Baixo*	Médio*	Alto*	Média $\pm$ DP**
Carbendazim	76,3	100,3	110,4	$95,7 \pm 17,5$
Epoxiconazol	111,4	97,6	90,4	$99,8 \pm 10,7$
Tetraconazol	108,6	97,2	95,4	$100,4 \pm 7,2$
Tebuconazol	91,4	97,5	97,2	$95,4 \pm 3,4$
Piraclostrobina	101,8	97,5	100,8	$100,1 \pm 2,2$
Trifloxistrobina	94,3	95,9	94,7	$95,0 \pm 0,8$

\*Níveis de concentração da trifloxistrobina:  $53 \text{ } \eta\text{g mL}^{-1}$  (baixo),  $424 \text{ } \eta\text{g mL}^{-1}$  (médio), e  $1696 \text{ } \eta\text{g mL}^{-1}$  (alto); e outros fungicidas:  $39 \text{ } \eta\text{g mL}^{-1}$  (baixo),  $312 \text{ } \eta\text{g mL}^{-1}$  (médio), e  $1250 \text{ } \eta\text{g mL}^{-1}$  (alto).

\*\* Desvio Padrão.

Os resultados obtidos na determinação da precisão dos fungicidas estão apresentados na Tabela 12. Todos os analitos em estudo apresentaram um coeficiente de variação percentual (CV%) inferior a 5%.

Tabela 12- Repetitividade e precisão intermediária dos fungicidas

Analito	Repetitividade (CV%)			Precisão intermediária (CV%)		
	Baixo	Médio	Alto	Baixo	Médio	Alto
Carbendazim	1,1	0,6	0,3	4,5	3,5	2,3
Epoxiconazol	0,3	0,2	0,1	0,4	0,5	0,0
Tetraconazol	0,3	1,3	0,2	0,5	0,6	0,7
Tebuconazol	0,1	0,2	0,1	0,9	0,3	0,0
Piraclostrobina	0,3	0,1	0,6	0,3	0,2	0,3
Trifloxistrobina	0,7	0,1	0,2	0,2	0,1	0,4

\*Níveis de concentração da trifloxistrobina: 26 ng mL<sup>-1</sup> (baixo), 212 ng mL<sup>-1</sup> (médio), e 1696 ng mL<sup>-1</sup> (alto); e outros fungicidas avaliados: 19 ng mL<sup>-1</sup> (baixo), 156 ng mL<sup>-1</sup> (médio), e 1250 ng mL<sup>-1</sup> (alto).

Os valores do efeito de matriz estabelecidos para os fungicidas estão apresentados na Tabela 13. É possível observar que para os fungicidas epoxiconazol, tetraconazol e trifloxistrobina o efeito de matriz foi inversamente proporcional à concentração do analito, isto é, quanto maior a concentração do analito, menor foi o efeito de matriz. Para o carbendazim houve um aumento do efeito de matriz ao aumentar a concentração do analito. A piraclostrobina e o tebuconazol, aparentemente apresentaram baixo efeito de matriz em todas as faixas de concentrações estudadas (menor que  $\pm 20\%$ ).

Tabela 13 - Efeito de matriz, em baixa, média e alta concentração dos fungicidas

Analito	Efeito de matriz (%) **		
	Baixo*	Médio*	Alto*
Carbendazim	-14,6	-34,2	-31,6
Epoxiconazol	24,9	14,2	8,4
Tetraconazol	24,2	5,4	0,1
Tebuconazol	-7,4	10,3	1,9
Piraclostrobina	1,0	4,3	-1,9
Trifloxistrobina	-24,8	-11,5	-10,6

\*Níveis de concentração da trifloxistrobina: 6 ng mL<sup>-1</sup> (baixo), 212 ng mL<sup>-1</sup> (médio), e 3393 ng mL<sup>-1</sup> (alto); e outros fungicidas: 10 ng mL<sup>-1</sup> (baixo), 312 ng mL<sup>-1</sup> (médio), e 1250 ng mL<sup>-1</sup> (alto).

\*\*O efeito de matriz pode ser classificado como: baixo (inferior à  $\pm 20\%$ ); médio (maior que  $\pm 20\%$  e menor que  $\pm 50\%$ ); alto (maior que  $\pm 50\%$ )

## 5.2 Avaliação dos resíduos de fungicidas em maçãs e nos produtos de maçã comercializados no município de Pelotas-RS

As amostras de maçãs e produtos de maçã foram avaliadas quanto à presença ou ausência de resíduos de fungicida. Treze por cento das amostras não apresentaram resíduos de fungicida, 77% apresentaram resíduos abaixo do limite

máximo residual (LMR) estabelecido e 10% foram consideradas insatisfatórias por conterem resíduo de epoxiconazol, substância não autorizada para aplicação em maçã. Não foi observada a presença de amostras com contaminação por fungicida acima do LMR estabelecido.

A Figura 8 apresenta os principais fungicidas identificados nas amostras e o percentual de cada um no grupo de amostras com resíduo. Observa-se que o principal resíduo de fungicida identificado foi o carbendazim, presente em 74,3% das amostras. Os 25,7% restantes foram atribuídos aos fungicidas piraclostrobina (8,6%), epoxiconazol (8,6%) e tebuconazol (8,6%).

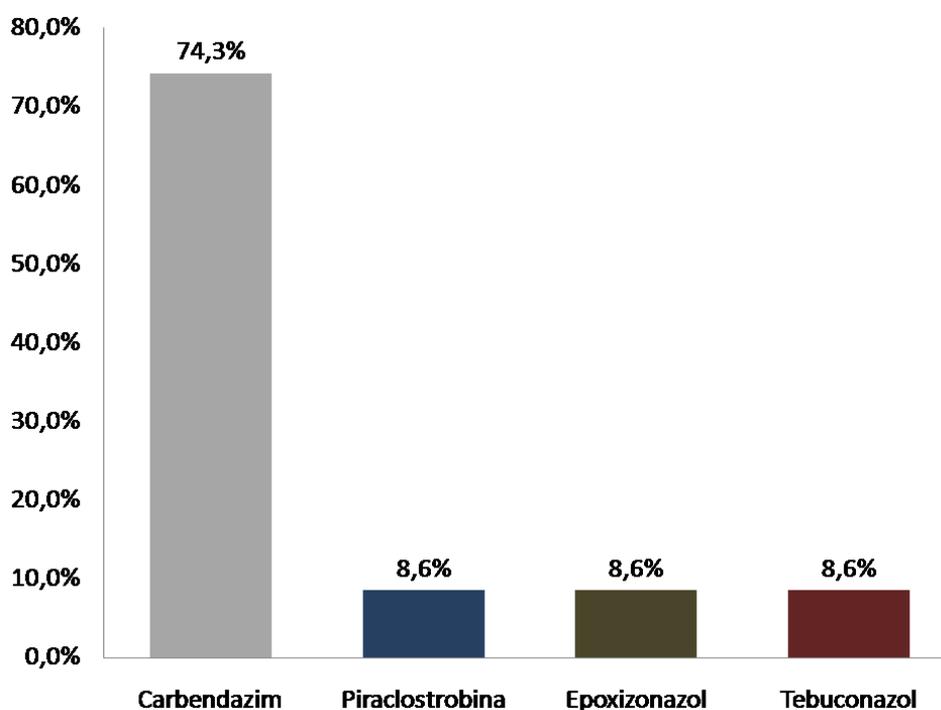


Figura 8 - Gráfico da ocorrência dos fungicidas nas amostras de maçã e produtos, comercializados no município de Pelotas – RS.

A Figura 9 apresenta a distribuição dos resíduos de fungicidas de acordo com o tipo de amostra avaliada: maçã *in natura* tipo Gala, Fuji, *Pink Lady* e *Granny Smith*, suco, maçã desidratada, chá e purê. Não foram detectados resíduos de fungicidas nas amostras de purê e de maçã *Granny Smith*. Todas as amostras de chá, maçã desidratada, suco e maçãs tipo Fuji e *Pink lady* apresentaram resíduo de carbendazim. As amostras de chá e maçãs Gala, Fuji e *Pink lady* apresentaram contaminação por mais de um tipo de fungicida.

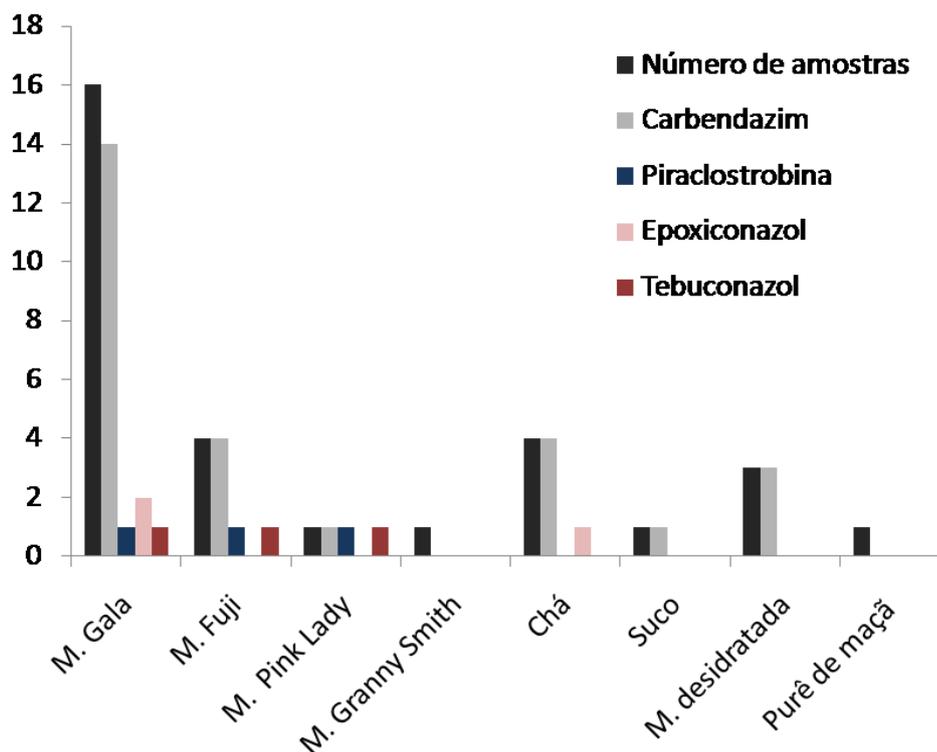


Figura 9 - Gráfico da relação dos resíduos de fungicidas por tipo de amostra (M. – maçã).

A maior concentração de carbendazim encontrada foi  $1417 \text{ ng mL}^{-1}$ . Aproximadamente 55% das amostras apresentavam contaminação por carbendazim com concentração acima do limite de quantificação do equipamento, isto é, continham mais que  $4,65 \text{ ng mL}^{-1}$  da substância. Os fungicidas piraclostrobina, epoxiconazol e tebuconazol apresentaram concentrações inferiores ao limite de quantificação do equipamento, apresentando menos que  $3,22$ ,  $0,21$  e  $1,64 \text{ ng mL}^{-1}$  respectivamente.

### 5.3 Utilização de campo elétrico contínuo para degradação de patulina e piraclostrobina

As condições avaliadas no ensaio de eletroxidação foram definidas a partir do planejamento experimental descrito no item 4.2.7. A Tabela 14 contém os resultados obtidos para degradação da patulina e da piraclostrobina em solução salina, quando submetidas a diferentes condições de potencial e pH. Os percentuais de degradação obtidos variaram entre 27% e 76% para a patulina e 15% e 64% para piraclostrobina.

Ao analisar condições iguais de potencial, é possível verificar que houve pouca alteração no percentual de degradação obtido para a patulina, indicando que o pH exerce pouca influência neste processo. Do contrário, para a piraclostrobina, observa-se que em condições iguais de potencial, houve uma maior variação na resposta, indicando uma influência do pH em sua degradação. Ao analisar condições iguais de pH, observa-se que ocorre variação na resposta, indicando a influência do potencial na degradação da patulina e da piraclostrobina.

Tabela 14 - Percentual de degradação da patulina e piraclostrobina por eletroxidação

Experimento	Potencial (V)	pH	% degradação patulina	% degradação piraclostrobina
1	1,72	4,0	45,4	38,6
2	1,72	6,0	49,9	15,3
3	2,80	4,0	65,4	39,8
4	2,80	6,0	61,8	34,9
5	1,50	5,0	27,2	26,2
6	3,00	5,0	76,5	64,1
7	2,25	3,6	59,6	29,3
8	2,25	6,4	59,9	17,6
9 (C)	2,25	5,0	71,3	44,9
10 (C)	2,25	5,0	71,2	44,5
11 (C)	2,25	5,0	70,3	40,1
12 (C)	2,25	5,0	70,1	49,8

Os resultados das análises de variância (ANOVA) para o percentual de degradação estão descritos na Tabela 15. Observa-se que para a degradação de patulina o valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado (8,85) em todos os casos, exceto para pH (linear) ( $p < 0,05$ ), indicando que a variação dos fatores causa efeito significativo na resposta. Para a piraclostrobina, observa-se que apenas a interação entre pH e potencial não foi significativa (F calculado < F tabelado), indicando que a variação do pH e do potencial causam efeito significativo na degradação da piraclostrobina, contudo são independentes. Isto é, o efeito do fator potencial na degradação independe do fator pH e o efeito do fator pH independe do fator potencial.

A Tabela 16 apresenta a estimativa dos efeitos sobre o processo de degradação. Observa-se a interação potencial x pH, e o pH não foram significativos para a patulina e a piraclostrobina respectivamente ( $p > 0,05$ ), semelhante ao observado na análise de variância. Verifica-se que para o processo de degradação

da patulina, o principal efeito foi do fator potencial (linear e quadrático), enquanto para a piraclostrobina os principais efeitos foram os fatores pH quadrático, e potencial linear.

Tabela 15 - Análise de variância dos fatores (ANOVA)

Fatores	Patulina				Piraclostrobina			
	SQ	GL	QM	F <sub>cal</sub>	SQ	GL	QM	F <sub>cal</sub>
Potencial (linear)	1246,03	1	1246,03	3460,35	309,55	1	309,55	19,76
Potencial (quadrático)	593,81	1	593,81	1649,08	308,19	1	308,19	19,68
pH (linear)	0,17	1	0,17	0,47*	249,77	1	249,77	15,95
pH (quadrático)	194,41	1	194,41	539,91	608,57	1	608,57	38,86
Potencial x pH	16,76	1	16,76	46,56	84,98	1	84,98	5,42*
Erro	1,08	3	0,36		46,97	3	15,65	
Total SQ	2150,07	11			2061,86	11		

\* Não significativo (F calculado < F tabelado). F (8:3: 5%) = 8,85

Tabela 16 - Estimativa dos efeitos sobre a degradação de patulina e piraclostrobina

Fatores	Patulina			Piraclostrobina		
	Efeitos	DP**	P	Efeitos	DP**	p
Média	71,0841	0,2999	0,0000	42,9166	1,7136	0,0001
Potencial (linear)	25,1868	0,4281	0,0000	14,8047	3,3296	0,0212
Potencial (quadrático)	-19,7636	0,4826	0,0000	-0,0104	0,0023	0,0213
pH (linear)	0,2930	0,4264	0,5414*	-11,1761	2,7982	0,0281
pH (quadrático)	-11,1704	0,4807	0,0002	-20,1474	3,2317	0,0083
Potencial x pH	-4,0943	0,6000	0,0064	9,2186	3,9570	0,1022*

\*Variável não significativa ( $p > 0,05$ ). \*\* Desvio Padrão.

Os resultados foram submetidos à análise de regressão, sendo que para um melhor ajuste do modelo matemático, apenas as variáveis significativas foram consideradas. O fato da interação potencial x pH não ter sido significativa no processo de degradação da piraclostrobina, indica que os dados obtidos apontam apenas uma tendência de comportamento da resposta em relação aos fatores estudados, não sendo adequados para ajustar um modelo e gerar superfícies de resposta.

O modelo matemático obtido para o processo de degradação da patulina (Equação 8) apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,82 indicando um bom

ajuste da curva. A Tabela 17 contém os valores teóricos (preditos), obtidos pela equação, e os valores reais (experimentais).

$$Z = -128,5641 + 150,3202x - 30,6290x^2 - 0,5392y^2 + 2,2881xy \quad (8)$$

Onde: “z” representa o percentual de degradação; “x” potencial em volts, e “y” o pH do meio.

O coeficiente de determinação e a avaliação do desvio padrão obtido a partir da comparação do valor real e teórico, indicam que o modelo matemático é preditivo. Logo, o modelo matemático é capaz de descrever o comportamento da variável resposta em relação aos fatores estudados, sendo adequado para gerar uma superfície de resposta.

A Figura 10 contém os efeitos de pH e do potencial na degradação da patulina. Observa-se que ao fixar o potencial em 2,6 V, para qualquer valor de pH obtém-se um percentual de degradação maximizado.

Tabela 17 - Resultados experimentais e preditos do processo de degradação de patulina

Experimento	Valor real (%) (experimental)	Valor teórico (%) (predito)	Desvio padrão (%)
1	45,4	46,5	0,8
2	49,9	43,6	4,5
3	65,4	69,2	2,7
4	61,8	71,2	6,6
5	27,2	31,7	3,2
6	76,5	67,6	6,3
7	59,6	66,1	4,6
8	59,9	65,5	3,9
9	71,3	66,9	3,1
10	71,2	66,9	3,0
11	70,3	66,9	2,4
12	70,1	66,9	2,3

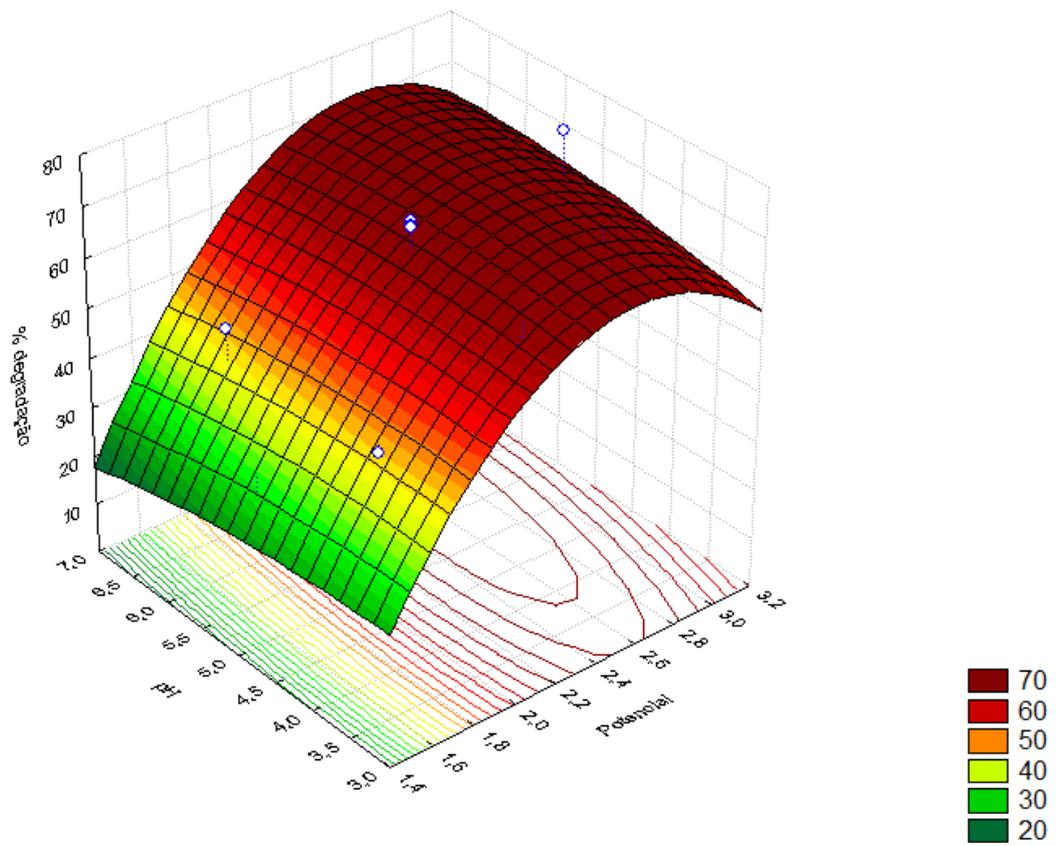


Figura 10 - Gráfico da superfície de respostas do processo de degradação da patulina.

## 6 Discussão

### 6.1 Validação do método

Os fungicidas estudados apresentaram melhor ionização no modo positivo semelhante ao observado por Luz et al.(2017), Krueve et al.(2008), e Sannino, Bolzoni & Bandini et al.(2004) ao utilizarem fonte de ionização *electrospray*. No geral, compostos que possuem grupamentos básicos como aminas, amidas e ésteres, protonam com mais facilidade, apresentando uma melhor ionização no modo positivo (CROTTI et al., 2006).

#### 6.1.1 Seletividade

Os íons obtidos da fragmentação da patulina e os perfis de fragmentação estabelecidos para os fungicidas epoxiconazol, piraclostrobina, tebuconazol, tetrazonazol e trifloxistrobina estão de acordo com as informações contidas nos bancos de dados (METLIN, MassBank e KeggCompound). Os mesmos perfis de fragmentação dos compostos também foram relatados por Kharandi, Barbri & Azad (2013), Pareja et al. (2011), Sannino, Bolzoni & Bandini et al. (2004), Wang et al. (2007), e Wang, Leung & Chow (2010).

De acordo com a plataforma Mass Bank – (<https://massbank.eu/MassBank/QuickSearch.html>), o principal íon formado na fragmentação do carbendazim é o  $m/z$ 160,05. Apesar de não ter sido estabelecido um perfil de fragmentação para este fungicida, é possível verificar no espectro de massas, a presença do íon 160,0506, possivelmente oriundo da sua fragmentação. De acordo com Thurman, Ferrer & Fern (2005), esse íon é formado pela perda de um metanol (CH<sub>3</sub>OH) de massa 32,0266, o que é coerente com a estrutura integral da molécula. Desta forma, a partir das técnicas utilizadas para verificação da seletividade e pureza de cada pico pode-se concluir que as condições de extração, limpeza e instrumentação foram satisfatórias e os métodos foram seletivos para os analitos estudados.

#### 6.1.2 Modelo de calibração (linearidade)

As curvas de calibração apresentaram coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,99, atendendo os parâmetros determinados pela AOAC (2002) e ANVISA (2003), com exceção da curva da patulina em solvente que apresentou coeficiente de determinação de 0,98. Ressalta-se que quando se estabelece um modelo de calibração, deve ser priorizado o preparo da curva por adição do analito na matriz, neste caso a curva analítica da patulina preparada na matriz apresentou  $R^2$  de 0,99 dispensada (PETERS; DRUMMER & MUSSHOF, 2007). Portanto, os modelos matemáticos estabelecidos são capazes de descrever adequadamente a relação entre a concentração e a resposta do equipamento.

### **6.1.3 Limites de detecção e quantificação**

Os limites de detecção e quantificação estabelecidos para a patulina foram inferiores ao limite residual máximo estabelecido pela legislação para presença de patulina ( $50 \text{ ng mL}^{-1}$ ), determinando que o método é válido para identificar amostras de maçãs fora de conformidade. Kharandi, Barbri & Azad (2013) encontraram limites de detecção e quantificação na matriz de  $0,4 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $1,3 \text{ ng mL}^{-1}$  respectivamente, valores próximos aos encontrados neste trabalho. Os limites de detecção e quantificação estabelecidos para os fungicidas (regulamentados) foram inferiores ao limite residual máximo estabelecido pela ANVISA, determinando que o método é válido para identificar amostras de maçã fora de conformidade. Além disso, o resultado da comparação dos LDs e LQs com outros trabalhos multirresíduos demonstra a eficiência e sensibilidade do método empregado (LUZ et al., 2017; PAREJA et al., 2011; THURMAN; FERRER & FERN, 2005).

### **6.1.4 Exatidão**

Para os ensaios de recuperação a ANVISA (2003) estabelece como aceitáveis valores dentro da faixa de 70% a 120%. Enquanto a AOAC (2002) admite para concentrações em ppb valores que estejam entre 70% e 125%. Todos os valores de recuperação ficaram dentro do limite especificado pelas diretrizes da ANVISA (2003) e AOAC (2002), indicando que o método utilizado é exato.

### **6.1.5 Precisão**

A AOAC (2002) estabelece que análises de concentrações em ppm devem apresentar um CV% máximo de 6% e para análises de concentrações residuais (ppb) 15%. Portanto, observa-se que todos os analitos estudados encontraram-se dentro da faixa aceitável de repetitividade e precisão intermediária, indicando que o método analítico utilizado é preciso.

### **6.1.6 Efeito de matriz**

Kharandi, Barbri & Azad (2013) desenvolveram e validaram método por GC-MS para detecção e determinação de patulina em suco de maçã e observaram que a curva de calibração obtida na matriz apresentou interceptos com o eixo y ligeiramente maiores em comparação com a curva de calibração obtida em solução padrão, caracterizando um efeito de matriz positivo, isto é, um aumento no sinal do equipamento ocasionado pela interferência de compostos presentes no extrato. A presença de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos fenólicos e elementos minerais no extrato obtido da maçã são considerados os principais interferentes na resposta do equipamento (LI et al., 2017). A redução do efeito de matriz com o aumento da concentração do analito pode ser justificado pela saturação dos sítios ativos livres presentes no injetor, coluna e fontes de íon, já que de acordo com Frenich et al. (2009), o efeito de matriz na cromatografia gasosa é dado principalmente pela adsorção do analito a esses sítios.

Dos fungicidas avaliados o carbendazim foi o que apresentou maior efeito de matriz, atingindo uma supressão do sinal de 34%. De acordo com Stahnke et al., (2012), a supressão iônica é decorrente da competição entre os componentes da matriz (co-eluídos) e o analito de interesse pela ionização ou pelo aumento da viscosidade provocado pela presença dos componentes da matriz que podem dificultar a evaporação do solvente, fazendo com que os não voláteis co-precipitem e arrastem os analitos antes da formação dos íons gasosos (STAHNKE et al., 2012).

## **6.2 Avaliação dos resíduos de fungicidas em maçãs e nos produtos de maçã comercializados no município de Pelotas-RS**

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos coletados no período de 2013 a 2015, realizado pelo PARA identificou que 88% das amostras de maçãs avaliadas estavam satisfatórias contendo resíduo de agrotóxico abaixo dos limites máximos estipulados pela ANVISA e 9% estavam insatisfatórias por conter substância não autorizada, semelhante ao observado neste trabalho que identificou 90% das amostras como satisfatórias e 10% como insatisfatória por conter substância não autorizada (ANVISA, 2016).

A presença de resíduos de substâncias não autorizadas pode ser justificada pela sensibilidade das técnicas atuais de análises, que permitem a detecção de substâncias em concentrações muito baixas, na faixa de ppb. Os resíduos detectados podem não ser necessariamente oriundos de uma aplicação intencional, e sim de uma contaminação cruzada ocasionada pelo contato com resíduos de outras culturas, durante o cultivo, transporte ou armazenamento (ANVISA, 2016; USDA, 2014).

O Carbendazim foi o principal fungicida identificado nas amostras avaliadas. De acordo com o PARA, este é o segundo agroquímico mais presente nas maçãs atrás apenas do glifosato. Em sua avaliação 78% das amostras estavam contaminadas por Carbendazim, enquanto os fungicidas piraclostrobina e tebuconazol foram encontrados em 17% e 6% das amostras respectivamente.

A alta incidência de Carbendazim pode ser justificada por este ser o ingrediente ativo mais utilizado entre os fungicidas benzimidazóis, podendo ser aplicado como carbendazim, ou ser convertido em cabendazim através da reação de degradação de outros fungicidas, como por exemplo por hidrólise do benomil, ou por ciclização do tiofanato-metílico (EMBRAPA, 1997). O tiofanato-metílico é atualmente amplamente empregado para o tratamento de diversas doenças fúngicas na macieira, principalmente no controle da sarna (*Venturia inaequalis*; *Cladosporium carpophilum*), doença recorrente nos pomares (EMBRAPA, 2004).

Os resultados obtidos para contaminação de maçãs comercializadas no município de Pelotas - RS vão ao encontro dos estudos de amostragem nacional divulgados pela ANVISA, indicando que o método desenvolvido é adequado para análise multirresíduo dos fungicidas avaliados.

### **6.3 Utilização de campo elétrico contínuo para degradação de patulina e piraclostrobina**

A variação do pH apresentou efeito sobre a taxa de degradação da piraclostrobina durante a aplicação de campo elétrico contínuo. Lagunas-Allué et al. (2012) ao estudarem a degradação fotocatalítica da piraclostrobina na presença de dióxido de titânio (fotocatalisador) por irradiação de luz UV (365 nm) observaram que é possível se obter uma degradação completa da piraclostrobina quando em meio aquoso em pH 6,2 e após 60 minutos de exposição. Contudo, ao avaliarem a influência da variação do pH na taxa de degradação observaram que o pH na faixa de 2,0 a 6,2 teve pouco efeito, diferente do observado neste estudo.

O pH apresentou pouco efeito na degradação de patulina diferentemente do ocorrido para a piraclostrobina. A aplicação de campo elétrico contínuo foi o principal fator responsável pela degradação da patulina em solução aquosa, atingindo uma degradação de até 74% no potencial máximo aplicado (2,6 V). Outras técnicas aplicadas para promover a degradação de patulina em suco de maçã, como a aplicação de radiação UV-C 254 nm e de alta pressão hidrostática obtiveram um percentual de degradação de 69% e 61% respectivamente (AVSAROGLU et al., 2015; CHANDRA et al., 2017).

De acordo com Chandra et al.(2017) a degradação de patulina baseada em fotodegradação por radiação UV-C pode ser dependente da presença de agentes cromóforos como a riboflavina visto que não foi possível degradar a patulina em água ultra-pura, somente em suco diluído, e em solução tampão suplementada com riboflavina. Dessa forma, a degradação de patulina por campos elétricos contínuos destaca-se por ocorrer de modo independente à presença de agentes cromóforos, visto que a degradação é induzida por um mecanismo de eletroxidação, e não fotodegradação.

O tratamento de suco de frutas e hortaliças a base de maçã com alta pressão hidrostática também demonstrou potencial para reduzir os níveis de patulina. A combinação de calor com pulsos suaves de pressão hidrostática reduziu os níveis de patulina no suco de maçã em até 61%. No entanto, as taxas de redução não seguiram um padrão regular, ao contrário do observado na aplicação de campos elétricos contínuos que demonstrou reprodutibilidade a partir da avaliação dos pontos centrais(AVSAROGLU et al., 2015).

Dessa forma, a aplicação de campos elétricos contínuos demonstrou ser uma tecnologia com potencial de aplicação para reduzir os níveis de patulina e piraclostrobina, contudo novos estudos devem ser realizados para melhor compreender os efeitos da aplicação de potencial sobre a patulina e piraclostrobina, de modo a identificar os produtos formados e a toxicidade dos mesmos, além de avaliar a aplicação do potencial e sobre a patulina contida no suco de maçã, e da aplicação do potencial sobre o suco de maçã, com o objetivo de avaliar as alterações sensoriais e físico-químicas decorrentes do processo.

## 7 Considerações finais

O método desenvolvido para análise simultânea de fungicidas por HPLC-ESI-QToF-MS, assim como o método de análise de patulina por GC-MS atenderam aos parâmetros de validação estabelecidos pela AOAC e pela ANVISA, ficando dentro dos limites estipulados.

A maior parte das maçãs e produtos de maçãs comercializados no município de Pelotas analisadas demonstraram estar adequadas para consumo, atendendo os limites estipulados pela ANVISA para resíduos de fungicidas, porém 10% foram consideradas inadequadas por conterem resíduos de fungicida não autorizado para a cultura.

A patulina e a piraclostrobina foram degradadas quando submetidas a um campo elétrico contínuo de baixa intensidade, sendo reduzidas em até 74% e 64% respectivamente quando aplicado o maior potencial, 2,6V. O pH na faixa estudada apresentou pouco efeito sobre o processo de degradação da patulina, sendo possível obter uma degradação maximizada quando em potencial ótimo para qualquer condição de pH dentro da faixa analisada. Para a piraclostrobina, o pH apresentou um maior efeito sobre o processo de degradação, demonstrando aparentemente uma melhor degradação em pH 4. Contudo como não foi possível traçar uma superfície de resposta para a piraclostrobina, e portanto, novos estudos devem ser realizados.

## Referências

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive SPE” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412–431, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. PARA – Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Nota técnica para divulgação dos resultados do PARA**, 2016.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitárias. Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos**. 2011.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitárias. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 2003.

ANVISA. Regularização de produtos: Agrotóxicos. **Monografias Autorizadas**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: Julho, 2018.

AOAC. Guidelines for single laboratory: validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. **AOAC International**, p. 1–38, 2002.

ASSUNÇÃO, R. et al. Characterization of *in vitro* effects of patulin on intestinal epithelial and immune cells. **Toxicology Letters**, v. 250–251, p. 47–56, 2016.

AVSAROGLU, M. D. et al. Use of pulsed-high hydrostatic pressure treatment to decrease patulin in apple juice. **High Pressure Research**, v. 35, n. 2, p. 214–222, 2015.

BECCI, P. J. et al. Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat. **Journal of Applied Toxicology**, v. 1, n. 5, p. 256–261, 1981.

BENNETT, J. W. & KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.

BERETTA, B. et al. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. **Food and Additives and Contaminants**. v. 17, n. 5, p. 399 – 406, 2000.

BOLA, L.& HUAT, G. Multivariate study of parameters in the determination of pesticide residues in apple by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography – mass spectrometry using experimental factorial design. **Food Chemistry**, v. 141, p. 4344–4348, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 jun. 2009. Seção 1. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2009/decreto-6871-4-junho-2009-588673-norma-pe.html> . Acesso em: 13 de março de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 5, de 9 de fevereiro de 2006. Aprova Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Maçã. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 fev. 2016. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=805793610>. Acesso em: 23 de março de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000. Art.2º- Aprovar os Regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa das seguintes frutas, e para suco das seguintes frutas:..., maçã,... conforme consta do Anexo II desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/downloads/1379429768.pdf> . Acesso em: 23 de março de 2018.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, p. 129–146, 2003.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

CHANDRA, S. et al. Patulin degradation and cytotoxicity evaluation of UV irradiated apple juice using human peripheral blood mononuclear cells. **Food Process Engineering**, 40:e12586, 2017.

CHOI, L. H. & NIELSEN, S. S. The effects of thermal and nonthermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability. **Journal of Food Quality**, v. 28, n. 1, p. 13–29, 2005.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. & BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 5ª ed. p.456, 2006.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

CRUSSES, W.V. **Produtos Industriais de Frutas e Hortaliças**: livro texto para estudantes, pesquisadores e industriais. São Paulo: Edgard Blücher, v.1, p. 802 1973.

CUNHA, S. C. et al. Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid – liquid microextraction and multidimensional gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8835–8844, 2009.

DONG, F. et al. Simultaneous determination of five pyrazole fungicides in cereals, vegetables and fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 98–106, 2012.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Biodegradação de fungicidas benzimidazóis. **Embrapa Meio Ambiente**. Brasília, DF. p.141–165, 1997.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Coleção Plantar: A cultura da maçã. SPI – **Serviço de Produção de Informação**. Brasília, DF. p. 1–107, 1994.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Maçã Produção. **Embrapa uva e vinho**. Brasília, DF. p. 1–24, 2004.

FAN, X. et al. Simultaneous determination of Pyraclostrobin, Prochloraz, and its metabolite in apple and soil via RRLC-MS / MS. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 5, p. 1312–1320, 2018.

FAO – Food and Agriculture Organization. 2018 **FAO STAT**. Produção Mundial de Maçã. Disponível em: <[www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org)> acesso em: janeiro de 2018.

FIB – FOODS INGREDIENTS BRASIL: **Micotoxinas**. 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>> acesso em: junho de 2016.

FERRER, C. et al. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7634–7639, 2011.

FLIEGE, R. & METZLER, M. Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 373–381, 2000.

FRENICH, A. G. et al. Compensation for matrix effects in gas chromatography – tandem mass spectrometry using a single point standard addition. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4798–4808, 2009.

FUJIYOSHI, T. et al. Evaluation of the matrix effect on gas chromatography–mass spectrometry with carrier gas containing ethylene glycol as an analyte protectant. **Journal of Chromatography A**, v. 1434, p. 136–141, 2016.

FUNES, G. J. et al. Application of pulsed light to patulin reduction in McIlvaine buffer and apple products. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 405–410, 2013.

GIUDICE, G. H. Parâmetros de uma validação analítica: uma revisão bibliográfica. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 1, p. 130–134, 2016.

HOLADOVA, K. & KEMPNY, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 283–295, 1998.

HU, Y. et al. A sensitive determination method for carbendazim and thiabendazole in apples by solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Additives & Contaminants Part A**, v. 25, n. 3, p. 37–41, 2008.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em:<<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94254.pdf>> acesso em: julho de 2016.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **Coordenação Geral de Acreditação**, 2010.

JARDIM, I. C. S. F. & ANDRADE, J. A. Resíduos de agrotóxico em alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 996–1012, 2009.

KATAOKA, H. et al. Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 18, p. 3746–3750, 2009.

KHARANDI, N.; BABRI, M. & AZAD, J. A novel method for determination of patulin in apple juices by GC-MS. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1619–1623, 2013.

KIST, B. B. **Anuário Brasileiro da Maçã**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 72p.

KOKKINIDOU, S.; FLOROS, J. D. & LABORDE, L. F. Kinetics of the thermal degradation of patulin in the presence of ascorbic acid. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 1, p. 108–114, 2014.

KRUBE, A. et al. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, n. 1–2, p. 58–66, 2008.

LAGUNAS-ALLUÉ, L. et al. Environmental degradation intermediates and reaction pathway of pyraclostrobin with TiO<sub>2</sub> photocatalysis. **Applied Catalysis B, Environmental**, v. 115–116, p. 285–293, 2012.

LAI DOU, I. A. L.; LOPOULOS, T. C. C. T. & LIAKOPOULOU, K. M. Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four post-harvest. **Phytopathology**, v. 461, p. 457–461, 2001.

LI, X. et al. Determination of trace patulin in apple-based food matrices. **Food Chemistry**, v. 233, p. 290–301, 2017.

LIKAS, D. T. & TSIROPOULOS, N. G. Residue screening in apple, grape and wine food samples for seven new pesticides using HPLC with UV detection. An application

to trifloxystrobin dissipation in grape and wine. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 89, p. 37–41, 2010.

LIMA, R. S. et al. Biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamatos. Estudo cinético da enzima aldeído desidrogenase e otimização do biossensor. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 9–17, 2007.

LIU, B. H. et al. Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells. **Toxicological Sciences**, v. 95, n. 2, p. 340–347, 2006.

LÓPEZ, B. G. et al. Analyses of pesticide residues in fruit-based baby food by liquid chromatography / electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.21; n.13; p. 2059–2071, 2007.

LUZ, S. R. et al. Mycotoxin and fungicide residues in wheat grains from fungicide-treated plants measured by a validated LC-MS method. **Food Chemistry**, v. 220, p. 510–516, 2017.

MACDONALD, S. et al. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 83, p. 1387–1394, 2000.

MALYSHEVA, S. V. et al. Improved positive electrospray ionization of patulin by adduct formation: Usefulness in liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-mycotoxin analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 334–339, 2012.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.  
**Secretaria de política agrícola Informativo**, nº54: Maçã. Vol. 54, 2013.

MARKOWSKI, J. et al. Composition of clear and cloudy juices from French and Polish apples in relation to processing technology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 813–820, 2015.

MANZANARES, N. A.; CAMPAÑA, A. M. G. & GRACIA, L. G. Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1282, p.11–19, 2013.

MCKENZIE, K. et al. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 807–820, 1997.

MOAKE, M. M.; PADILLA, Z. O. I. & WOROBO, R. W. Comprehensive review of patulin control methods in foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 4, n. 1, p. 8–21, 2005.

MORRIS, C.; BRODY, A. L. & WICKER, L. Non-thermal food processing/preservation technologies: A review with packaging implications. **Packaging Technology and Science**, v. 20, n. 4, p. 275–286, 2007.

MURPHY, P. A. et al. Food mycotoxins: An update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. 51–65, 2006.

NIELSEN, K. F. et al. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 1225–1242, 2009.

PAREJA, L. et al. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC – MS / MS . **Talanta**, v. 83, p. 1613–1622, 2011.

PASA, S. P; CASTRO, M.C & SILVA, C.P. Recursos genéticos da macieira. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.18, p. 44–53, 2012.

PASSOS, F. R.; RODRIGUES, M. & REIS, D. O. S. Resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal. **Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 23, p. 49–58, 2013.

PAVESPA. Intoxicações agudas por agrotóxicos. **Manual técnico: intoxicações por agrotóxicos**, Paraná, v.1, p.120, 2018.

PEREIRA, A. S. G. Avaliação da bioacessibilidade de compostos antioxidantes em variedades de maçã produzidas em Portugal. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Nova Lisboa, Nova Lisboa, 2014.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H. & MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v. 165, p. 216–224, 2007.

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

PUCHEM – National Center for Biotechnology Information.  
PubchemCompoundDatabase. **Disponível em:**  
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3317081>>. Acesso em Julho, 2018.

PUEL, O.; GALTIER, P. & OSWALD, I. P. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 613–631, 2010.

QUEJI, M. D. Determinação de açúcares simples, ácido málico e compostos fenólicos totais em bagaço de maçã por espectroscopia no infravermelho e método de calibração multivariada. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

RAWSON, A. et al. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1875–1887, 2011.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SALADINO, F. et al. Bioactive compounds from mustard flours for the control of patulin production in wheat tortillas. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 101–107, 2016.

SAMARANAYAKE, C. P., & SASTRY, S. K. Effect of moderate electric fields on inactivation kinetics of pectin methylesterase in tomatoes: the roles of electric field strength and temperature. **Journal of Food Engineering**, v.186, p 17- 26, 2016.

SANNINO, A.; BOLZONI, L. & BANDINI, M. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1036, n. 2, p. 161–169, 2004.

SASTRY, S. Ohmic heating and moderate electric field processing. **Food Science and Technology**, v. 14, p. 419–422, 2008.

SEBRAE - SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. O cultivo e o mercado da maçã. 2016. **Disponível em:** <https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-maca,ea7a9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>. Acesso em 10 de fevereiro de 2018

SEWRAM, V. et al. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 897, n. 1–2, p. 365–374, 2000.

SIGMA ALDRICH, Patulin: **Product information**. n. 314, p. 13–14, 1998.

SOLIMAN, S. et al. Potential mycotoxin contamination risks of apple products associated with fungal flora of apple core. **Food Control**, v. 47, p. 585–591, 2015.

STAHNKE, H. et al. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 1474–1482, 2012.

STOPPELLI, I. M. B. & MAGALHÃES, C. P. Health and food safety: the pesticides issue. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 10, p. 1–10, 2005.

TAKINO, M.; DAISHIMA, S. & NAKAHARA, T. Liquid chromatography/mass spectrometric determination of patulin in apple juice using atmospheric pressure photoionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 17, p. 1965–1972, 2003.

TANG, L. & KEBARLE, P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrospray solution. **Analytical Chemistry**, v. 65 n. 24, p. 3654–3668, 1993.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography – electrospray – tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 328–334, 2005.

TOFOLI, J. G.; MELO, P. C. T. & DOMINGUES, R. J. Ação protetora, residual, curativa e antiesporulante de fungicidas no controle da requeima e da pinta preta da batata em condições controladas. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 79, n.2, p.209-221, 2012.

TONEGURRI, C. A. Calibração em química analítica: uma breve revisão. Universidade Federal do Paraná. 2017. **Disponível em:** <http://www.quimica.ufpr.br/tonегutti/Artigos/Calibracao.pdf>. Acesso em: julho de 2018.

TOURNAS, V. H. & MEMON, S. U. Internal contamination and spoilage of harvested apples by patulin-producing and other toxigenic fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1–2, p. 206–209, 2009.

TRUCKSESS, E. W. & TANG, Y. Solid phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. **Journal of AOAC International**. v. 82, n. 5, p. 1109–1113, 1999.

THURMAN, E. M.; FERRER, I.; & FERN, A. R. Matching unknown empirical formulas to chemical structure using LC / MS TOF accurate mass and database searching: example of unknown pesticides on tomato skins. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 127–134, 2005.

USDA – United States Department of Agriculture. Pesticide Data Program. 2014. **Disponível em:** <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/2014%20PDP%20Annual%20Summary.pdf> Acessado em: out. 2018.

WANG, J.; LEUNG, D. & CHOW, W. Applications of LC / ESI-MS / MS and UHPLC QqTOF MS for the determination of 148 pesticides in berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 5904–5925. 2010.

WANG, S. et al. Application of matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography – mass spectrometry to fungicide residue analysis in fruits and vegetables. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 673–685, 2007.

WIMMER, A. C. S. Aplicação do processo eletrolítico no tratamento de efluentes de uma indústria petroquímica. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, I. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. **International Agency for Research on Cancer** [s.l.: s.n.]. v. 82, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety. 2017. **Disponível em:** <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>. Acesso em: out. 2018.

WRIGHT, S. A. I. Patulin in food. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 105–109, 2015.

YOU, X. et al. Ionic liquid-based air-assisted liquid – liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for the determination of five fungicides in juice samples. **Food Chemistry**, v. 239, p. 354–359, 2018.