



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOSEANE DE OLIVEIRA MOZZAQUATRO

**RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM MARACUJÁ E PRODUTOS COMERCIAIS:
VALIDAÇÃO DE MÉTODOS, ANÁLISE E AVALIAÇÃO DE RISCO**

BRASÍLIA

2021

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOSEANE DE OLIVEIRA MOZZAQUATRO

**RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM MARACUJÁ E PRODUTOS COMERCIAIS:
VALIDAÇÃO DE MÉTODOS, ANÁLISE E AVALIAÇÃO DE RISCO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

**BRASÍLIA
2021**

JOSEANE DE OLIVEIRA MOZZAQUATRO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 29 de Abril de 2021.

Banca examinadora

Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Fernando Fabriz Sodré
Universidade de Brasília

Dra. Andréia Nunes Jardim

Prof. Dra. Laila Salmen Espindola
Universidade de Brasília
(Suplente)

*À Lívia e ao Álvaro por todo amor, apoio e
Carinho*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João Valdenir e Iara, por todo amor, dedicação e incentivo aos estudos.

À minha filha Lívia, por ser minha luz e fonte de inspiração! Mesmo sem saber é minha maior incentivadora em sempre buscar o melhor!

Ao meu marido Álvaro, por todo amor, carinho, parceria diária, companheirismo e incentivo para alcançar essa conquista. Muito grata por todo apoio!

Ao meu irmão Jovane, minha cunhada Carine e meus afilhados Lorenzo e Bento por fazerem parte da minha caminhada mesmo à distância, me apoiando e acolhendo.

À professora Eloisa pela confiança, orientação, apoio e disponibilidade em todas as etapas deste trabalho. Muito grata por todos ensinamentos e oportunidade recebidos!

À Embrapa Cerrados e especialmente à pesquisadora Ana Maria Costa pelo apoio financeiro e coleta das amostras.

À FAP, CAPES, e Ministério da Justiça pelo auxílio financeiro.

Aos professores Dr. Osmar Damin Prestes, Dr. Fernando Fabríz Sodré, Dra. Laila Espindola e Dra. Andreia Jardim por aceitarem o convite de participação na banca.

À Patrícia e Denise pelo acolhimento ao Laboratório desde minha chegada, amizade, disponibilidade em ajudar e ensinamentos recebidos.

Ao Reginaldo, Nathalya, Gabriel, André, Izabelle e Anna Eduarda pela grande ajuda ao longo do trabalho no processamento e análises das amostras.

À Beatriz e Nayara pela amizade, companheirismo, convivência e parceria que mesmo em tempos difíceis de pandemia seguimos firmes no laboratório.

À Esmeralda, Gabriel, Ettore e Peter pela disponibilidade em ajudar durante o desenvolvimento do trabalho.

À Alessandra pela colaboração na estimativa dos dados de consumo da POF.

Aos demais familiares, pelo carinho, que mesmo à distância contribuíram de alguma forma para essa conquista.

RESUMO

MOZZAQUATRO, Joseane de Oliveira. **Resíduos de pesticidas em maracujá e produtos comerciais: validação de métodos, análise e avaliação de risco**. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília 2021.

Este estudo teve como objetivos gerais: 1) Validar métodos analíticos e determinar os níveis de ditiocarbamatos e outros pesticidas em frutos e folhas de maracujá (*Passiflora edulis*) produzido em diferentes regiões do Brasil, polpa de maracujá e farinha; 2) Estimar fatores de processamento (FP) para lavagem e secagem da folha e casca de maracujá e 3) Estimar a ingestão diária e o risco da exposição da população brasileira aos pesticidas pelo consumo de polpa de maracujá e farinha. No total, 55 amostras de maracujá e 53 amostras de folhas foram coletadas de produtores nos estados da Bahia, Minas Gerais e Goiás, e no Distrito Federal. Amostras de polpa congelada (n=30) e farinha de maracujá (n=12) foram obtidas do comércio local. O método espectrofotométrico para determinação de ditiocarbamatos foi validado com LOQ de 0,05 mg kg⁻¹ CS₂. Cerca de 25% das amostras de cascas do fruto foram positivas (0,06 a 1,4 mg kg⁻¹ CS₂) e apenas uma apresentou resíduos na polpa (0,09 mg kg⁻¹ CS₂); 43,4% das folhas continham resíduos. O método multirresíduos validado para o fruto, folha e farinha foi o QuEChERS modificado, com extração com acetato de etila acidificado, partição com sais, *clean-up* em fase sólida dispersiva, e determinação de 80 pesticidas por LC-MS/MS e GC-MS/MS, com LOQ de 5 ou 10 µg kg⁻¹. Dezenove analitos foram detectados nas amostras analisadas, principalmente imidacloprido, carbendazim e metamidofós (até 0,10 mg kg⁻¹). Cerca de 60% das cascas foram positivas para pelo menos um analito, e 40% das polpas desses frutos continham resíduos. Cerca de 60% das polpas comerciais e 30% das farinhas analisadas foram positivas para pelo menos um pesticida. O mesmo método foi validado para análise de 49 analitos nas folhas por LC-MS/MS (LOQ=5 µg kg⁻¹); 60,4% das amostras foram positivas, principalmente para carbendazim, difenoconazol e tebuconazol (até 12 mg kg⁻¹). Os resultados apontam que boas práticas agrícolas não têm sido aplicadas pelos produtores, que utilizaram pesticidas não autorizadas para a cultura do maracujá. No geral, a lavagem reduz os níveis dos analitos detectados (até 90% para ditiocarbamatos) e a secagem aumenta esses níveis (até 9,3 vezes para tebuconazol em folha seca). O consumo de polpa e farinha de maracujá contendo pesticidas não indicou um risco à saúde dos consumidores brasileiros.

Palavras chave: *pesticidas; maracujá; frutos, farinha; LC-MS/MS; GC-MS/MS*

ABSTRACT

MOZZAQUATRO, Joseane de Oliveira. *Pesticide residues in passion fruit and commercial products: method validation, analysis, and risk assessment*. PhD Thesis in Pharmaceutical Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil 2021.

*This study aimed at: 1) to validate analytical methods and to analyze the levels of dithiocarbamates and other pesticides in passion fruit (*Passiflora edulis*) and leaves collected from Brazilian growers, frozen pulp and passion fruit flour; to estimate processing factors for washing and drying of passion fruit leaves and peel; and 3) to estimate the potential risks from the consumption of passion fruit commercial pulp and flour. In total, 55 samples of passion fruit and 53 samples of leaves were collected from growers in the states of Bahia, Minas Gerais and Goiás, and in the Federal District. Samples of frozen pulp (n=30) and flour (n=12) were obtained from the local market. The spectrophotometric method for the determination of ditiocarbamates was validated at a LOQ of 0,05 mg kg⁻¹ CS₂. About 25% of the peel samples were positives (0.06 to 1.4 mg kg⁻¹ CS₂) and only one pulp sample contained residues (0.09 mg kg⁻¹ CS₂); 43.4 % of the leaf samples contained residues. A multiresidue QuEChERS method was validated for 80 pesticides by LC-MS/MS and GC-MS/MS, which included extraction with ethyl acetate, partition with salts and clean-up with dispersive solid phase. LOQ were 5 or 10 µg kg⁻¹. Nineteen analytes were detected in the fruit samples, mainly imidacloprid, carbendazim and methamidophos (up to 0.10 mg kg⁻¹). Residues were detected in 60% of the peel samples and 40% of these fruits contained residues. About 60% of the commercial frozen pulps and 30% of the flour also contained residues. The same method was validated for the determination of 49 analytes in passion fruit leaves by LC-MS/MS at a LOQ of 5 µg kg⁻¹; 60.4% of the samples contained residues, mainly carbendazim, difenoconazole and tebuconazole (up to 12 mg kg⁻¹). The results indicated that the growers are not applying good agricultural practices and most pesticides detected are not registered to be used in passion fruit in Brazil. In general, washing the fruits and the leaves decrease residues levels (up to 90% for dithiocarbamates) and drying increases considerably the pesticide residues (up to 9.3 times for tebuconazole in dried leaves). The consumption of passion frozen pulp and flour containing pesticides does not represent a health risk to consumers.*

Keywords: pesticides; passion fruit; leaves; flour ; LC-MS/MS ; GC-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** A: *P. edulis* e variantes (maracujá-azedo de casca amarela, vermelha e roxa); B: *P. alata* (maracujá-doce); C: *P. quadrangularis*; D: Híbrido de *P. setacea* (BRS Pérola do cerrado); E: *P. tarminiana*; F: *P. ligularis*; G: *P. tripartita*; H: Híbrido ornamental (BRS Estrela do cerrado); I: *P. cincinnata*; J: *P. incarnata*. 19
- Figura 2.** Esquema de obtenção da polpa de maracujá. A: lavagem; B: separação da polpa com uso de uma despulpadeira de palhetas; C: Produtos industriais derivados da polpa. 21
- Figura 3.** Medicamentos fitoterápicos que utilizam partes de *Passiflora* sp. O produto Florien é uma droga vegetal. Não foram analisadas amostras comerciais de fitoterápicos neste trabalho. 26
- Figura 4.** Pesticidas com uso permitido para cultura do maracujá. LMR = limite máximo de resíduo (ANVISA, 2021) 33
- Figura 5.** Estrutura química dos ditiocarbamatos registrados no Brasil. ¹ Uso permitido na cultura do maracujá com LMR = 1,0 mg kg⁻¹ CS₂. 33
- Figura 6.** Hidrólise ácida de ditiocarbamatos e métodos de determinação de CS₂. Fonte: Mello, 2014. 43
- Figura 7.** Etapas da derivatização do EBDC (M=metal). Fonte: Hayama e Takada, 2008. 44
- Figura 8.** Avaliação de risco químico na dieta. Fonte: Caldas, 2017 adaptado. 49

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1.** Distribuição do número de amostras de frutos e folhas de maracujá coletadas em 2016, 2017 e 2018 em três regiões do País. 55
- Figura 1.2.** Amostra congelada de maracujá, fracionada em casca, polpa e sementes, juntamente com as folhas do respectivo maracujazeiro. As sementes não foram analisadas nesse estudo. 57
- Figura 1.3.** Esquema do tratamento dado às folhas de *P. edulis* 58
- Figura 1.4.** Elaboração de farinha da casca de maracujá em laboratório (Srur, 2003). 59

CAPÍTULO 3

- Figura 3.1.** Cromatograma do método Scheduled MRM (*multiple-reaction-monitoring*) no sistema LC-MS/MS de uma solução de trabalho de mistura com 50 analitos na concentração de 100 ng mL⁻¹ em polpa de maracujá. Os tempos de retenção de cada analito estão mostrados na Tabela S1 (Material Suplementar). 70
- Figura 3.2.** Resultados da validação do método para determinação de 50 analitos em casca e polpa de *P. edulis* por LC-MS/MS, em quatro níveis de fortificação. Percentagem de analitos em cada faixa de A: Recuperação; B: Repetibilidade; C: Precisão intermediária. 73
- Figura 3.3.** Cromatograma dos íons totais (TIC) do método SRM no sistema GC-MS/MS de uma solução de trabalho de mistura com 30 analitos na concentração de

1100 ng mL ⁻¹ em casca de maracujá. Os tempos de retenção de cada analito estão mostrados na Tabela S2 (Material Suplementar).....	74
Figura 3.4. Resultados da validação do método para determinação de 30 analitos em casca e polpa de <i>P. edulis</i> por GC-MS/MS, em quatro níveis de fortificação. Percentagem de analitos em cada faixa de A: Recuperação; B: Repetibilidade; C: Precisão intermediária.....	76

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. A: Cromatograma do método Scheduled MRM (multiple-reaction-monitoring) no sistema LC-MS/MS de uma solução de trabalho de mistura com 49 analitos na concentração de 100 ng mL ⁻¹ em matriz folha de <i>P. edulis</i> ; B: Amostra real de folha fresca contendo carbendazim, difenoconazol e trifloxistrobina; C: Amostra real de folha seca contendo imidacloprido.....	116
Figura 4.2. Resultados da validação do método para determinação de 49 analitos em folha de <i>P. edulis</i> por LC-MS/MS, em quatro níveis de fortificação. Percentagem de analitos em cada faixa de A: Recuperação; B: Repetibilidade; C: Precisão intermediária.	117

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros de validação analítica.....	45
Quadro 2. Resíduos de pesticidas em amostras de maracujá.....	47

LISTA DE TABELAS

II REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Métodos para determinação de pesticidas multiclases em frutas.	37
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1. Ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (ARfD) dos pesticidas considerados para avaliação de risco*	69
Tabela 3.2. Pesticidas detectados em 32 das 55 amostras de maracujá analisadas por LC-MS/MS ou GC-MS/MS	78
Tabela 3.3. Resíduos de pesticidas organofosforados, carbendazim e imidacloprido em amostras de casca (N=24) e fatores de processamento (FP) para casca lavada e farinha	79
Tabela 3.4. Pesticidas detectados (< LOQ ou ≥ LOQ) em amostras comerciais de polpa congelada e farinha de maracujá por LC-MS/MS.....	81
Tabela 3.5. Avaliação do risco crônico (%IDA) e agudo (% ARfD) da exposição de pesticidas quantificados pelo consumo de amostras de polpa de maracujá comercial	82
Tabela 3.6. Avaliação do risco crônico (%IDA) e agudo (% ARfD) da exposição de pesticidas quantificados pelo consumo de farinha de maracujá comercial.....	83

Material Suplementar

Tabela S3.1. Parâmetros dos 50 analitos no sistema LC-MS/MS (LC Shimadzu-4000QTRAP SCIEX).....	88
Tabela S3.2. Parâmetros adquiridos no GC-MS/MS para 30 pesticidas.....	92
Tabela S3.3. Recuperação, repetibilidade e precisão intermediária de 50 analitos na matriz casca de maracujá em LC-MS/MS em 4 níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$).....	95
Tabela S3.4. Recuperação, repetibilidade e precisão intermediária de 50 analitos na matriz polpa de maracujá em LC-MS/MS em 4 níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	98
Tabela S3.5. Ensaios de recuperação na matriz casca de maracujá em GC-MS/MS em 3 níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$).....	101
Tabela S3.6. Ensaios de recuperação na matriz polpa de maracujá em GC-MS/MS em 4 níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$).....	102
Tabela S3.7. Resíduos de pesticidas em amostras de maracujá (casca, polpa e fruto) por LC-MS/MS ou GC-MS/MS.....	104
Tabela S3.8. Resíduos de pesticidas em 30 amostras comerciais de polpa de maracujá congelada de 11 marcas diferentes.....	106
Tabela S3.9. Resíduos de pesticidas em 12 amostras comerciais de farinha de maracujá congelada de 11 marcas diferentes	107

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1. Pesticidas detectados em amostras de folhas de <i>P. edulis</i> (N=53) por LC-MS/MS e fatores de processamento (FP) para diferentes grupos químicos.....	119
---	-----

Material Suplementar

Tabela S4.1. Recuperação, repetibilidade e precisão intermediária de 49 analitos na matriz folha de maracujá em LC-MS/MS em 4 níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$).	122
Tabela S4.2. Resíduos de pesticidas em amostras de folhas de <i>P. edulis</i> por LC-MS/MS	125

ANEXO I

Tabela A1.1. Analito, grupo químico, classe, classificação toxicológica, culturas de alimentos autorizadas no Brasil pela ANVISA, propriedades físico-químicas, pureza do padrão analítico e solvente de preparo das soluções mãe dos analitos utilizados neste estudo.	146
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARfD	Dose de referência aguda
BPA	Boas Práticas Agrícolas
CB	Carbamatos
CE	<i>Collision energy</i>
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
CV	Coefficiente de variação
CXP	<i>Collision cell exit potential</i>
DMD	Dimetilditiocarbamatos
DP	<i>Declustering potential</i>
DT	Ditiocarbamatos
EBDC	Etilenobisditiocarbamatos
EPA	<i>U.S. Environmental Protection Agency</i>
ESI	Ionização por eletrospray
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FP	Fator de processamento
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LC-HRMS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de de alta resolução
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas sequencial
LMR	Limite máximo de resíduo
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MM	Massa molar

MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MSPD	Dispersão de matriz em fase sólida
ND	Não detectado
NPD	<i>Nitrogen-Phosphorus Detector</i>
OF	Organofosforados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PBDC	Propilenobisditiocarbamatos
PNCRC	Programa Nacional de Resíduos e Contaminantes
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PSA	<i>Primary Secondary Amine</i>
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
SPME	<i>Solid-Phase Micro Extraction</i>
TOL	Tolueno
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>
μ ECD	<i>μElectron Capture Detector</i>

SUMÁRIO

RESUMO	21
ABSTRACT	22
I. INTRODUÇÃO	16
II. REVISÃO DE LITERATURA	18
1. Maracujá: <i>Passiflora edulis</i> Sims	18
1.1 Maracujá e subprodutos: uso como alimento funcional.....	20
1.2 Maracujá: uso medicinal	23
2. Pesticidas	27
2.1 Toxicidade dos pesticidas	29
3. Métodos analíticos para determinação de resíduos de pesticidas em alimentos	34
3.1 Métodos multirresíduos.....	34
3.2 Métodos para determinação de fungicidas ditiocarbamatos	41
3.3 Validação de métodos analíticos.....	44
4. Resíduos de pesticidas em alimentos	46
5. Avaliação de risco da exposição humana a resíduos de pesticidas	48
III. OBJETIVOS	53
Geral.....	53
Objetivos específicos	53
IV. ESTRUTURA DA TESE	54
CAPÍTULO 1: MATERIAIS E MÉTODOS	55
1. Amostragem	55
2. Processamento das amostras	56
3. Secagem das amostras de folhas de <i>P. edulis</i>	57
4. Preparação da farinha de maracujá	59
CAPÍTULO 2: DITHIOCARBAMATE RESIDUES IN FRUITS AND LEAVES OF PASSION FRUIT (<i>Passiflora edulis</i>) FROM DIFFERENT BRAZILIAN REGIONS	60
Abstract	60
CAPÍTULO 3: VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE PESTICIDAS EM MARACUJÁ (<i>P. edulis</i>) UTILIZANDO LC-MS/MS E GC-MS/MS E ANÁLISE DE FRUTOS E PRODUTOS COMERCIAIS	61
Resumo	61
1. Introdução	62
2. Materiais e Métodos	63
2.1. Químicos e reagentes	63
2.2. Extração e <i>clean-up</i>	64
2.3. LC-MS/MS.....	65
2.4. GC-MS/MS	65
2.5. Validação do método	66
2.6. Amostras	67
2.7. Fator de processamento.....	68
2.8. Avaliação de risco da exposição	68
3. Resultados	70
3.1 Validação do método multirresíduos por LC-MS/MS	70
3.2 Validação do método multirresíduos por GC-MS/MS	73
3.3 Amostras de maracujá.....	77
3.4 Fator de processamento.....	79
3.5 Amostras de produtos industriais	80

3.6 Avaliação de risco	81
4. Discussão	83
5. Conclusão	86
Material Suplementar	88
CAPÍTULO 4: RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM FOLHAS DE <i>PASSIFLORA EDULIS</i> SIMS UTILIZANDO LC-MS/MS.....	108
Resumo	108
1. Introdução.....	109
2. Materiais e Métodos	110
2.1 Reagentes e padrões	110
2.2 Amostras	112
2.3 Preparo das amostras.....	112
2.4 Fator de processamento.....	113
2.5 LC-MS/MS.....	113
2.6 Validação	113
3. Resultados	114
3.1 Validação	114
3.2 Amostras reais e fatores de processamento.....	118
4. Discussão	120
5. Conclusão	121
Material Suplementar	122
V. CONCLUSÕES FINAIS.....	127
REFERÊNCIAS	129
ANEXO I.....	146
ANEXO II	158
<i>Journal of Brazilian Chemical Society, 1834-1840, 2019</i>	<i>158</i>

I. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá, e o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) é responsável por 98% dos cultivos (Bernacci et al., 2008). A polpa do maracujá é destinada à produção de suco, o principal produto industrial, e as folhas são utilizadas para fins medicinais como droga vegetal, seja pela indústria farmacêutica na produção de fitoterápicos ou em lojas de produtos naturais com produtos para preparo de chás. Além disso, o uso diversificado das partes do fruto, como alimento funcional tem sido amplamente estudado apresentando resultados positivos e benéficos à saúde, gerando interesse em fabricar outros produtos a base de maracujá, incluindo novas formulações, utilizando além da polpa, as cascas e as sementes do fruto (Embrapa Cerrados).

A cultura do maracujá requer cuidados ao longo da produção, e o uso de pesticidas é largamente utilizado para o controle e prevenção de pragas e doenças que ocorrem no campo. Porém, quando utilizados de forma inadequada, estes produtos podem deixar resíduos em níveis altos nos frutos, acima do LMR estabelecido para maracujá e, principalmente, nas folhas, já que a aplicação da maioria dos compostos com uso permitido nesta cultura é foliar (ANVISA, 2021).

A determinação de resíduos de pesticidas multiclasses deve considerar as baixas concentrações dos analitos presentes, as propriedades químicas distintas e a complexidade das matrizes, havendo uma necessidade de etapa prévia no preparo de amostra. Devido aos baixos níveis de concentração, os interferentes presentes na matriz são problemas frequentes que devem ser considerados e para isso curvas de calibração em matriz são utilizadas (Prestes et al., 2009).

Os fungicidas ditiocarbamatos são insolúveis ou pouco solúveis nos solventes orgânicos normalmente utilizados nos métodos multirresíduos, sendo necessária a utilização de método específico para sua determinação. O método mais utilizado no Brasil e no mundo se baseia na mensuração de dissulfeto de carbono (CS₂), que é formado pela degradação ácida de todos ditiocarbamatos. Como esses compostos permanecem na superfície dos alimentos, as amostras devem ser processadas congeladas, para preservar e garantir a integridade dos resíduos presentes na superfície, uma etapa crucial na determinação desse tipo de composto (Jardim et al., 2014).

Dados de resíduos de pesticidas em maracujá e seus produtos são inexistentes no Brasil e escassos no mundo. Esses dados são importantes para identificar se os níveis de resíduos estão dentro daqueles previstos na legislação para as substâncias autorizadas no País, como também para identificar a aplicação de substâncias proibidas e/ou com uso não permitido nessa cultura. Adicionalmente, esses dados são essenciais para se avaliar a segurança do consumo da fruta e seus produtos, e das folhas utilizadas como droga vegetal e no preparo de chá.

Este estudo tem como objetivos validar métodos analíticos para determinação de pesticidas em *Passiflora edulis* (frutos e folhas) por LC-MS/MS e GC-MS/MS, analisar amostras cultivadas em várias regiões do Brasil e amostras comerciais de polpa congelada e farinha de maracujá, e avaliar a segurança para fins alimentício.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. Maracujá: *Passiflora edulis* Sims

O gênero *Passiflora* pertence à família Passifloreaceae, distribuída em aproximadamente 530 espécies e 400 híbridos artificiais (Ulmer; Macdougall, 2004), sendo a maioria localizada na América Latina (Faleiro et al., 2018). O Equador é o maior exportador de polpa de maracujá-azedo e a Colômbia tem a maior diversidade na cadeia produtiva, com produção e exportação de frutos de diferentes espécies de maracujá (Faleiro et al., 2018).

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá (Faleiro et al., 2018), com ao menos 140 espécies nativas (Ferreira, 2005; Cervi, 2006; Faleiro et al., 2008), das quais 70 apresentam frutos comestíveis (Cunha et al., 2002), e mais de 50 possuem potencial comercial (Vieira; Carneiro, 2004). A *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Degener, também denominada de *Passiflora edulis* Sims (Bernacci et al., 2008), é a espécie nativa mais representativa do país, responsável por 98% da produção brasileira. Possui várias denominações populares (maracujá-azedo, maracujá-amarelo e maracujá-roxo) e diferentes tonalidades na casca (amarelo-pálido, amarelo, amarelo-alaranjado, vermelho, roxo-avermelhado, roxo) (Bernacci et al., 2008). Em termos taxonômicos, a *Passiflora edulis* Sims corresponde todas as variedades de maracujá-amarelo (Bernacci et al., 2008).

Passiflora alata Curtis (maracujá-doce) é a segunda espécie mais produzida no país (Sousa; Melleti, 1997), enquanto as demais espécies (*P. ligularis*, *P. tripartita*, *P. tarminiana*, *P. cincinnata*, *P. edulis* Sims f. *edulis*, *P. maliformis*, *P. nitida*, *P. incarnata*, *P. setacea* e *P. quadrangularis*) são cultivadas e comercializadas em menor escala (Faleiro et al., 2017). A Figura 1 ilustra algumas espécies de *Passiflora* spp.

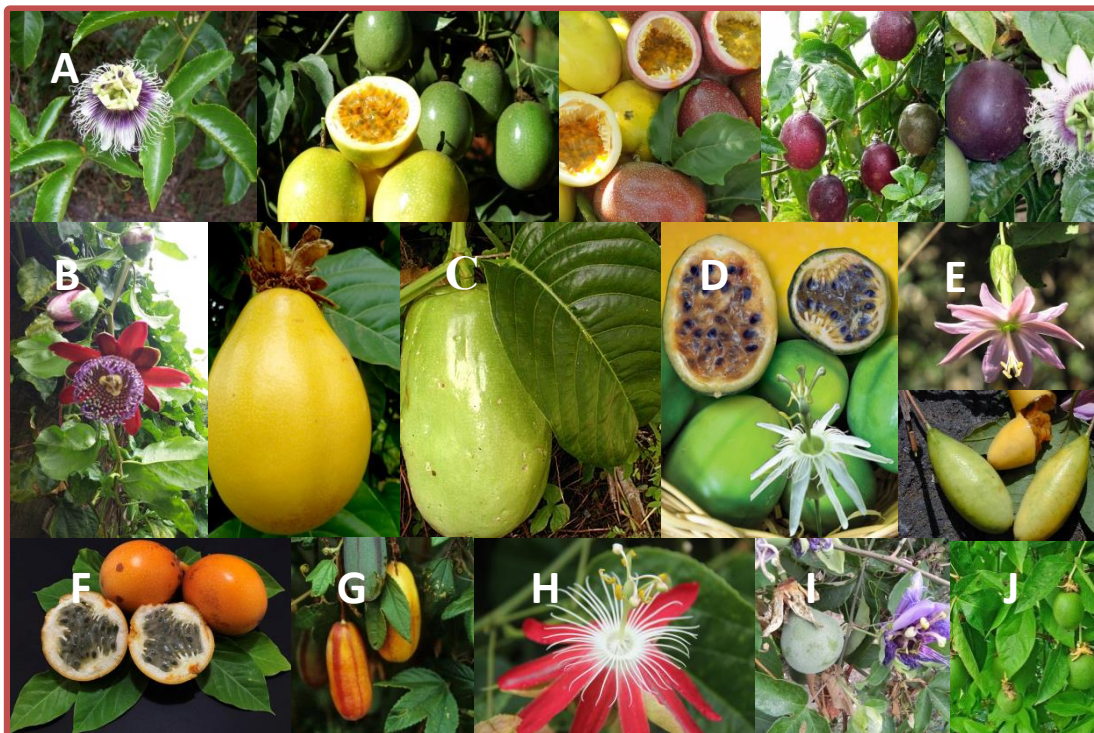


Figura 1. A: *P. edulis* e variantes (maracujá-azedo de casca amarela, vermelha e roxa); B: *P. alata* (maracujá-doce); C: *P. quadrangularis*; D: Híbrido de *P. setacea* (BRS Pérola do cerrado); E: *P. tarminiana*; F: *P. ligularis* G: *P. tripartita*; H: Híbrido ornamental (BRS Estrela do cerrado); I: *P. cincinnata*; J: *P. incarnata*.

A maior exploração comercial da *P. edulis* Sims é devido ao elevado rendimento industrial (Meletti e Brückner, 2001; Vianna-Silva et al., 2008) e desconhecimento das demais espécies comestíveis por parte dos consumidores (Jesus et al., 2018). A produção de maracujá-amarelo no Brasil em 2019 foi cerca de 593 mil toneladas, com valor de produção estimado em mais de 1 bilhão de reais, obtida em uma área aproximada de 42 mil hectares (IBGE, 2021). A região Nordeste é responsável por mais da metade da produção nacional (64,5%), sendo o Estado da Bahia, o maior produtor, responsável por 28% da produção nacional, seguido do Ceará, com 24,5%. A segunda região de maior produção é a Sudeste (15,1%), seguida das regiões Sul (11,3%), com maior produtividade média (20,5 t/ha), Norte (6,7%) e Centro-oeste (2,4%), esta última obtendo a segunda maior produtividade (19 t/ha) (IBGE, 2019).

Segundo estimativas do *Tropical Fruit Compendium*, a produção mundial de maracujá é de aproximadamente 900 mil toneladas e a brasileira próxima de 60% deste valor (FAO, 2011). Apesar da elevada produção, a exportação brasileira de maracujá ainda é incipiente. O volume de fruta fresca e suco exportado pelo Brasil são

pequenos quando comparado com o de outras frutas (Faleiro, 2018), e o mercado interno absorve quase a totalidade da produção (Meletti, 2011).

A participação da fruta fresca no total das exportações de maracujá do Brasil corresponde a cerca de 5% da produção nacional (apenas 28 toneladas). Portugal e Espanha são os principais destinos (46,3%), seguido de Austrália (20,2%), Reino Unido (12,2%) e Uruguai (8,7%) (Comexstat, 2019). O suco de maracujá é o principal produto industrial, e a exportação corresponde em volume cerca de 440 toneladas. O destino principal são os Estados Unidos, que correspondem em volume a 75,5%, seguido da Holanda (18%), França (3,3%), Portugal (2%) e Canadá (0,7%) (Comexstat, 2019).

A polpa representa aproximadamente 33% do peso total do fruto, da qual se produz o suco, que apresenta alto teor de vitaminas, minerais e ácido ascórbico (Medina et al. 2017), e também serve de ingrediente na formulação de produtos, como bolo, iogurte, sorvete e sobremesa. Durante o processamento industrial da polpa, os frutos são lavados, e cortados para a extração da polpa e das sementes, que são separadas por meio de uma despulpadeira, que força o fruto desintegrado a passar através de peneiras, promovendo o seu esmagamento e posterior refinamento (Embrapa, 2016) (Figura 2).

1.1 Maracujá e subprodutos: uso como alimento funcional

De acordo com Oliveira et al. (2002), os subprodutos do maracujá correspondem a cerca de 65 a 70% do peso do fruto, que não são aproveitados normalmente. A casca do maracujá tem sido foco de estudos por apresentar bom valor nutricional, incluindo fibras solúveis (pectinas e mucilagens), vitamina B3, cálcio e fósforo (Córdova et al., 2005). A casca pode servir de ingrediente de vários produtos, como iogurtes e sorvetes, conferindo-lhes uma melhor textura e consistência, além da produção de farinha para uso culinário (Embrapa Cerrados).

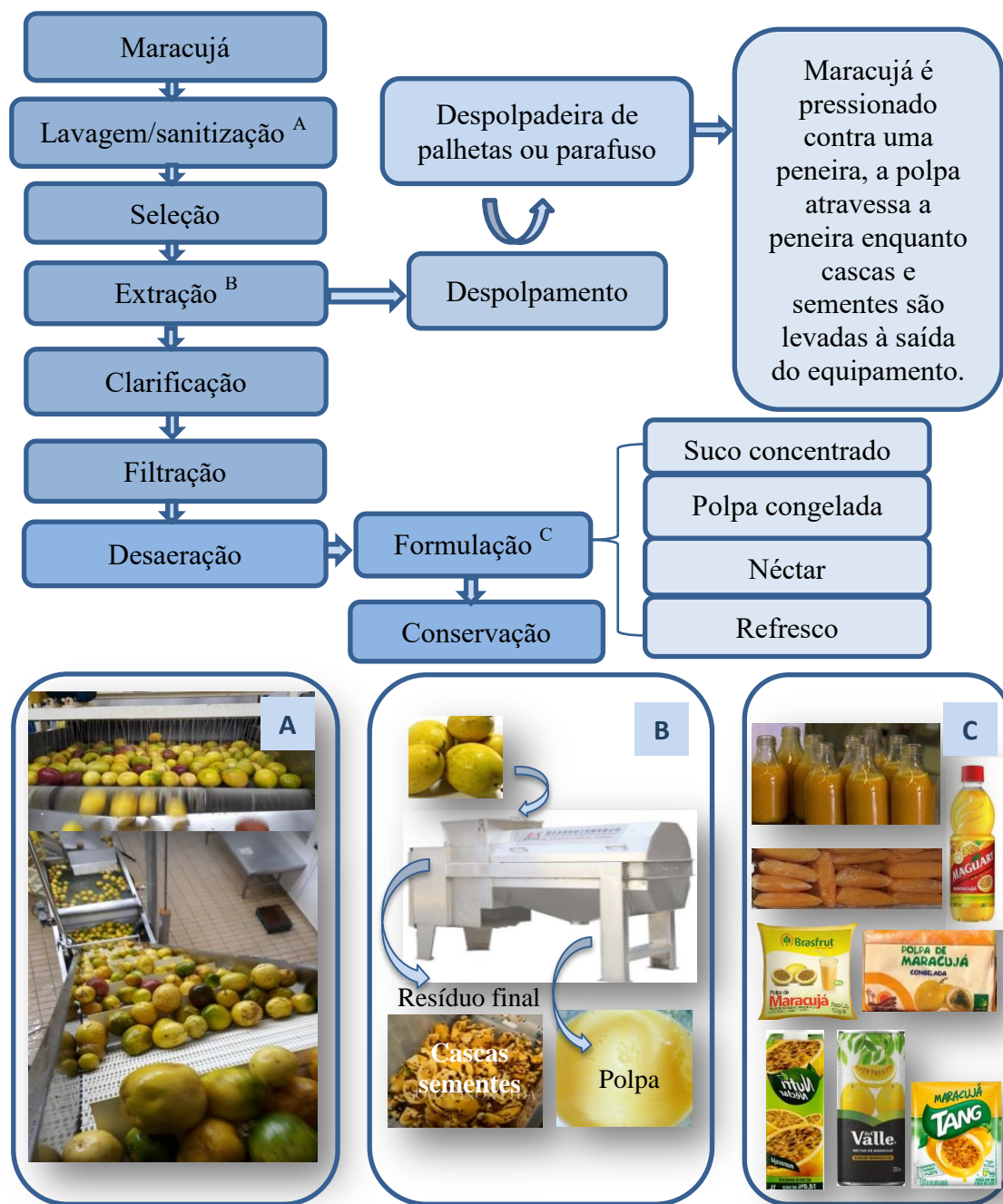


Figura 2. Esquema de obtenção da polpa de maracujá. A: lavagem; B: separação da polpa com uso de uma despoldadeira de palhetas; C: Produtos industriais derivados da polpa.

A farinha de maracujá, elaborada a partir da casca desidratada (umidade entre 7 e 10%), é o principal produto comercial derivado da casca, com patente estabelecida desde 2003 (Srur, 2003). Pode ser utilizada na indústria de panificação para melhorar a qualidade nutricional dos produtos, principalmente com relação ao teor de fibras (Ishimoto et al., 2007; Lima et al., 2007; Santana et al., 2011; Miranda et al., 2013), e

até mesmo como doce em calda de maracujá, com elevada aceitabilidade por parte dos consumidores, inclusive crianças (Oliveira et al., 2002). Utilizada como ingrediente, a adição de 10% de farinha de casca de maracujá para produção de massa fresca sem glúten, proporcionou um aumento do valor nutricional, com aumento no teor de fibras e cinzas, e uma redução de carboidratos e do valor energético, obtendo índice de aceitabilidade acima de 70% (Ribeiro et al., 2018). A pectina, presente na casca, é um ingrediente alimentar funcional altamente valorizado, e amplamente utilizado como gelatina e agente estabilizante, e sua extração industrial eficiente envolve o uso de ácido cítrico (Pinheiro et al., 2008).

O efeito anti-hipertensivo da casca do maracujá tem sido atribuído parcialmente ao efeito vasodilatador dos polifenóis, especialmente ao flavonoide luteolina (Ichimura et al., 2006). Um estudo farmacológico “*in vivo*” com *P. edulis* Sims, descreveu efeitos antioxidantes importantes da casca quando comparada aos extratos de polpa de *P. edulis* e *P. alata*, o que torna a casca um potente alimento funcional e uma fonte natural de flavonoides (Zeraik et al., 2011).

Junqueira-Guertzenstein; Srur (2002) mostraram efeito positivo do consumo de farinha da casca de maracujá por ratos nos níveis de diabetes e obesidade. Salgado et al. (2010) analisaram o efeito do consumo de farinha de maracujá na glicemia de ratos diabéticos, a partir da administração de dietas balanceadas em concentrações de 5, 10 e 15% de farinha. Os resultados foram significativos para a dieta de 5%, com redução da glicemia em até 60% e aumento do glicogênio hepático em 71%, atingindo níveis similares ao grupo controle (ratos normais).

Efeitos semelhantes também foram observados em humanos, a partir de ensaio clínico fase II com 43 pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo II com a ingestão de 30g/dia durante 60 dias. Os resultados mostraram atividade hipoglicêmica da farinha da casca de maracujá, com redução significativa na glicemia de jejum e hemoglobina glicada. Também houve redução nos níveis de triglicerídeos e aumento dos níveis de colesterol transportado por HDL (*high density lipoprotein*) (Janebro et al., 2008). Resultados semelhantes com redução na glicemia de jejum e hemoglobina glicada também foram observados por Queiroz et al. (2012).

Ramos et al. (2007) demonstraram em humanos que a farinha de maracujá foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total e colesterol transportado por LDL (*low density lipoprotein*), sem alterar os valores do colesterol transportado por HDL.

Estudos clínicos conduzidos com voluntários saudáveis com suplementação de farinha da casca de *P. edulis* na dieta indicaram redução da glicemia (5%), e de colesterol total, LDL e triglicérides totais (15 a 19%) (Medeiros et al., 2009).

O óleo da semente de maracujá é rico em compostos emolientes e atuam na reposição e restauração das frações lipídicas da pele, sendo encontrado em formulações de cremes hidratantes para aumento da sedosidade da pele (Pereira, 2011). Além disso, as sementes são potenciais fontes de fibras insolúveis e mostraram ter ação no controle da glicose (Chau e Huang, 2004).

1.2 Maracujá: uso medicinal

O uso da *P. edulis* na medicina tradicional é bastante comum em vários países, com indicações sedativas, diuréticas, analgésicas, vermífugas e antitumorais (Costa & Tupinambá, 2005), assim como no tratamento de dependência a benzodiazepínicos (Dhawan et al, 2003), ansiedade e depressão (Gutiérrez , 2014), e controle de tremores e distúrbios nervosos diversos (Zeraik et al 2010; 2011).

Segundo a Farmacopeia Brasileira, droga vegetal é definida como

“a planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, que causam a ação terapêutica, após processos de coleta, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada” (BRASIL, 2011).

O Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde incluiu 71 plantas na Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse do SUS (Rennisus), das quais três são espécies de *Passiflora* spp. (*P. alata*, *P. incarnata* e *P. edulis*) (Ministério da Saúde, 2009). Estas espécies constam também no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição (BRASIL, 2011). A *Passiflora edulis* Sims encontra-se na Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado, como ansiolítico leve, com recomendação de uso do extrato das partes aéreas da planta, na dose de 30 a 120 mg de flavonoides totais expressos em vitexina por via oral (ANVISA, 2014).

A RDC nº 26 de 13 de maio de 2014 (BRASIL, 2014) regulamenta o registro de Medicamentos Fitoterápicos (MF) e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF) (BRASIL, 2014). Além disso, a RDC nº 26/2014 incluiu a necessidade de apresentação de resultados de análises de resíduos de pesticidas nesses medicamentos, estipulando um prazo de dois anos para que as empresas apresentassem os resultados dessas análises (BRASIL, 2014). O prazo previsto nesta foi prorrogado pela RDC nº 235/2018, que estipulou que todas as empresas fabricantes de fitoterápicos deveriam apresentar à ANVISA, até 25 de junho de 2019, testes de análise de resíduos de agrotóxicos para todos os medicamentos registrados no país.

A RDC 105/2016 (ANVISA, 2016) estabelece que a análise de resíduos de pesticidas deve ser realizada apenas para fitoterápicos registrados, ficando isentos os que comprovadamente foram obtidos de espécies vegetais cultivadas por agricultura orgânica. Ademais, nessa mesma resolução, foi incluída uma lista de 250 agrotóxicos selecionados para análise, pertencentes a diferentes grupos químicos, incluindo ditiocarbamatos (CS₂), organofosforados, carbamatos e piretróides.

No caso do maracujá e demais plantas medicinais que também são utilizadas como alimento, o uso de agrotóxicos é permitido, respeitando os Limites Máximos de Resíduo (LMR) para cada espécie vegetal. Para as demais plantas, resíduos de agrotóxicos não devem ser encontrados (ANVISA, 2019a).

A parte vegetal com ação terapêutica ou a droga vegetal são as folhas secas para *P. edulis* Sims e *P. alata curtis*, e as partes aéreas secas para *P. Incarnata*. A partir destas pode-se fazer preparações extemporâneas por infusão de acordo com a proporção indicada (3g da droga vegetal e 150 mL de água fervente) (BRASIL, 2011). O processo de infusão consiste em verter água fervente sobre a droga vegetal e, em seguida, tampar ou abafar o recipiente por tempo determinado (BRASIL, 2011). Além de infusões, *P. edulis* Sims é indicada no preparo de tinturas, que necessita de uma etapa prévia de secagem da parte vegetal em estufa a 40° C por 48 horas (Rocha et al., 2008).

As variedades de *Passiflora edulis* mais conhecidas são *P. edulis* 'edulis' (maracujá-roxo) e *P. edulis* 'flavicarpa' (maracujá-amarelo) se diferenciam principalmente pela coloração da casca, mas atualmente padroniza-se como *P. edulis* Sims, sem distinção para a tonalidade da casca para todo fruto de maracujá-azedo

(Bernacci et al., 2008). Um estudo recente indicou diferenças nos perfis cromatográficos (HPLC-DAD) de extratos de folhas de dez espécies do gênero *Passiflora* e duas variedades de *P. edulis*, inclusive dentro de uma mesma espécie (Wosch et al., 2017). Li et al. (2011) também evidenciaram diferenças significativas no perfil cromatográfico de seis compostos majoritários em extratos etanólicos das folhas de *P. edulis 'flavicarpa'* e *P. edulis 'edulis'*. Os seis principais compostos flavonóides isolados das folhas de *P. edulis 'flavicarpa'*, lucenina-2, vicenina-2, isoorientina, isovitexina, luteolina-6-C-chinovosida e luteolina-6-C-fucosídeo, não foram detectados nas folhas de *P. edulis 'edulis'* (Li et al., 2011). Os autores inferiram que a parte aérea de *P. edulis 'flavicarpa'* apresenta potencial terapêutico em distúrbios do SNC, e a ação ansiolítica e sedativa descrita por Deng et al. (2010) foi confirmada (Li et al., 2011).

Um estudo recente observou efeitos antidepressivos de extratos orgânicos (acetato de etila e n-butanol) de folhas de *P. edulis 'edulis'* em camundongos pelo teste de natação forçada, com potência similar à de antidepressivos já conhecidos, o que foi atribuindo aos flavonoides presentes nas folhas (Ayres et al., 2017). Demais pesquisas também comprovaram ações ansiolíticas com *P. edulis* (Barbosa et al., 2008; Otify et al., 2015; Ayres et al., 2015).

A atividade anti-inflamatória das folhas de maracujá-amarelo foram evidenciadas por Montanher et al. (2007) em camundongos tratados com extrato liofilizado de *P. edulis* (250 mg/kg, *i.p.*). Efeitos anti-inflamatórios também foram demonstrados por Zucolotto et al (2009) em frações butanólicas (50 e 100 mg/kg; *i.p.*) de folhas de maracujá-amarelo, provavelmente devido à compostos C-glicosil-flavonas. Outro estudo também comprovou ação anti-inflamatória nesta espécie (Vargas et al., 2007) e também foram descritas ações anti-hipertensivas (Konta et al., 2014).

Devido à grande variedade de espécies do gênero *Passiflora*, o uso popular pode incluir espécies que não constem na Farmacopeia Brasileira para uso fitoterápico, pois muitas vezes a espécie não é descrita no rótulo do produto. Adicionalmente, pode-se esperar também o uso equivocado de partes da planta sem indicação de uso pela Farmacopeia Brasileira. A Figura 3 mostra alguns medicamentos produzidos a partir das três espécies para uso medicinal: *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. alata*.



Figura 3. Medicamentos fitoterápicos que utilizam partes de *Passiflora* sp. O produto Florien é uma droga vegetal. Não foram analisadas amostras comerciais de fitoterápicos neste trabalho.

A cultura do maracujá, assim como de outras frutas tropicais, requer cuidados ao longo da produção, devido à incidência de doenças causadas por fungos e bactérias, além do ataque de insetos. Entre as doenças que acometem o maracujazeiro estão a Fusariose, causada pelo patógeno *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae*, a podridão do pé, causada por fungos do gênero *Phytophthora* e a Antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, que ocorre em quase todos os cultivos de maracujá do Brasil (EMBRAPA, 2000).

O controle dessas doenças e outras pragas do maracujazeiro normalmente demandam medidas fitossanitárias, incluindo o uso de pesticidas. Um aplicativo gratuito denominado AgroPragas Maracujá foi desenvolvido pela Embrapa e pela Universidade do Recôncavo da Bahia (UFRB) em 2019, como forma de auxiliar os produtores na identificação adequada e controle das principais doenças e pragas do maracujazeiro (Embrapa, 2019). O aplicativo se baseia em informações contidas no Guia de Identificação e Controle de Pragas do Maracujazeiro, publicado pela Embrapa em 2017. Como a Embrapa não indica agrotóxicos, para cada doença ou praga identificada pelo aplicativo, um link direciona o usuário para o Sistema de Agrotóxicos e Fitossanitários (Agrofit) registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Embrapa, 2019). Ainda assim, a falta de

informação por parte dos produtores e o uso de práticas inadequadas no campo podem ocorrer durante o cultivo do maracujá.

Desta maneira, não se descarta a possibilidade de se encontrar no mercado plantas medicinais com níveis elevados de pesticidas, principalmente aquelas que são cultivadas como alimento, uma vez que a aplicação é do tipo foliar. Sendo assim, uma avaliação das partes aéreas da droga vegetal quanto à presença de pesticidas se faz necessária para garantir segurança do consumo destes produtos.

2. Pesticidas

Os pesticidas, ou agrotóxicos, no Brasil são regidos pela Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002, que estabelece em seu Artigo 1º as definições para agrotóxicos e afins, resíduo de pesticida e limite máximo de resíduo (LMR), respectivamente como

Art. 1º

[...]

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

[...]

XLIV- substância ou mistura de substâncias remanescente ou existente em alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive, quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de

degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas, consideradas toxicológica e ambientalmente importantes (Brasil, 2002).

[...]

XXII - LMR é a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes (em peso) do agrotóxico e afim ou seus resíduos por milhão de partes de alimento (em peso) (ppm ou mg/kg) (Brasil, 2002).

O registro de pesticidas no Brasil é realizado mediante avaliação de três esferas governamentais: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Ministério do Meio Ambiente, por meio do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), e o Ministério da Saúde (MS), através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Cabe ao IBAMA avaliar os impactos do pesticida no meio ambiente e em outros organismos vivos, ao MAPA avaliar a eficiência agrônômica do produto no campo, e à ANVISA fazer a classificação toxicológica dos produtos formulados, estabelecer o LMR, a Ingestão Diária Aceitável (IDA) e realizar estudos de avaliação de risco ocupacional e na dieta (Brasil, 2002). No total, 494 ingredientes ativos de pesticidas estavam registrados no Brasil em março de 2021, incluindo feromônios e produtos biológicos, que não possuem LMR (ANVISA, 2021).

Os pesticidas são substâncias que podem oferecer risco para o homem, dependendo da toxicidade, da dose e do tempo de exposição (Castro e Confalonieri, 2005), podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora, entre outros efeitos (Casida e Durkin, 2013). Alimentos contendo resíduos de pesticidas abaixo do LMR não representam risco à saúde humana, porém, deficiências na aplicação das boas práticas agrícolas (BPA), com o desrespeito às instruções de uso descritas na bula do fabricante, podem gerar resíduos acima do LMR, o que pode causar um risco à saúde humana pelo consumo de alimentos tratados com esses compostos (Jardim e Caldas, 2012).

Existem dois programas nacionais para monitoramento de pesticidas em produtos de origem vegetal no Brasil: o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), de responsabilidade da ANVISA, e o Plano Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes em produtos de origem vegetal (PNCRC/Vegetal), sob responsabilidade do MAPA. Ambos apresentam como objetivos principais monitorar o cumprimento da legislação quanto ao uso adequado do pesticida, tanto no que se refere aos níveis de resíduos estarem dentro do LMR, como também se o ingrediente ativo utilizado é devidamente registrado no país e se foi aplicado nas culturas para as quais é indicado (ANVISA, 2018; MAPA, 2017).

Entre as classes de compostos mais tóxicos com uso autorizado na agricultura e com maior incidência nos alimentos no Brasil encontram-se os inseticidas com ação neurotóxica, os organofosforados e carbamatos. Os ditiocarbamatos são os fungicidas mais utilizados no Brasil, e seus resíduos foram os mais detectados em amostras de alimentos analisadas pelos programas de monitoramento (Jardim e Caldas, 2012; ANVISA, 2019b). Os agrotóxicos mais detectados nas 4616 amostras de 14 alimentos analisadas pelo PARA durante o ciclo 2017/2018 foram imidacloprido, tebuconazol, carbendazim, piraclostrobina, ditiocarbamatos, difenoconazol e acefato (ANVISA, 2019b). O maracujá não foi incluído nesses programas de monitoramento.

2.1 Toxicidade dos pesticidas

O mecanismo de ação dos inseticidas organofosforados e carbamatos, tanto nos insetos quanto nos mamíferos, inclusive no homem, se dá pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Essa inibição gera um aumento do neurotransmissor acetilcolina e uma estimulação dos receptores muscarínicos, conseqüentemente atinge o sistema nervoso autônomo parassimpático, seguida da estimulação dos receptores nicotínicos, atingindo também, o sistema simpático e o sistema nervoso central (Casida e Durkin, 2013).

Os inseticidas piretróides também são muito utilizados na agricultura, e o mecanismo de ação nos insetos e mamíferos pode ser similar, inclusive o homem, está relacionado com o bloqueio dos canais de sódio, cálcio e cloreto (Soderlund et al., 2012). Esses compostos se ligam aos receptores dos canais de sódio e diminuem sua taxa de inativação aumentando o influxo de íons Na^+ no neurônio (Shafer et al., 2005), podendo prejudicar a atividade motora de mamíferos (EPA, 2011).

Outra importante classe de pesticidas amplamente utilizada são os fungicidas triazóis. Este grupo corresponde a uma das maiores classes de fungicidas do mercado mundial, com 11 compostos registrados no Brasil (ANVISA, 2021). Sua ação fungicida é desempenhada pela inibição direta da enzima lanosterol 14-alfa-desmetilase (CYP51), responsável por uma das etapas de biossíntese do ergosterol, derivado do colesterol, cuja ausência prejudica a fluidez e integridade das células dos fungos (Zarn et al., 2003). Nos mamíferos, a enzima esterol 14-alfa-desmetilase é expressa em diferentes tecidos, daí a preocupação com os efeitos adversos desses compostos. Em animais de laboratório, os fungicidas triazóis são hepatotóxicos após exposição crônica (EFSA, 2009), podendo também induzir variações esqueléticas no feto exposto, e alguns podem causar malformação crânio facial (Zarn et al., 2003; JMPR, 2007; EFSA, 2009).

Outro fungicida amplamente utilizado na agricultura é o tiofanato-metílico, um fungicida de amplo espectro que possui atividade sistêmica de inibição da formação de microtúbulos mitóticos durante a mitose, afetando o crescimento e a divisão dos esporos (USEPA, 2014; PMRA, 2019). Este fungicida degrada-se rapidamente transformando-se em carbendazim, seu principal metabólito também em mamíferos, e também um fungicida (USEPA, 2014; EFSA, 2018). Apresenta baixa toxicidade aguda por via oral ou dérmica (USEPA, 2014; EFSA, 2018). Os principais órgãos-alvo após curta e longa exposição são os rins (ratos), o fígado (camundongos e ratos) e a tireoide (ratos e cães), sendo que nestes dois últimos órgãos foram identificadas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas (EFSA, 2018). O carbendazim, não registrado para o maracujá, foi o ingrediente ativo mais detectado no Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA) entre 2013 e 2015, sendo caracterizado risco agudo para o consumo de alimentos monitorados, e ficou entre os mais detectados entre 2017 e 2018 (ANVISA, 2019b). No Brasil, o tiofanato-metílico possui autorização de uso agrícola para aplicação foliar em 60 tipos de culturas, incluindo o maracujá e foi colocado em reavaliação devido à preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, principalmente desregulação endócrina e toxicidade para o desenvolvimento.

Os inseticidas neonicotinóides são agonistas de receptores acetilcolina nicotínicos (nAChRs). Nos insetos, eles se ligam fortemente com estes receptores do sistema nervoso central, que em baixas concentrações causam estimulação nervosa, e em altas concentrações, bloqueio do receptor, paralisia e morte (Jeschke et al., 2011).

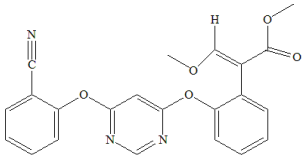
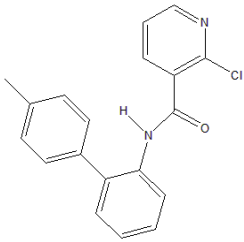
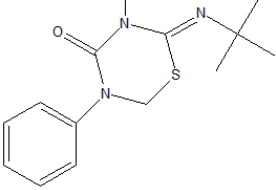
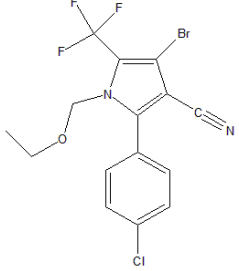
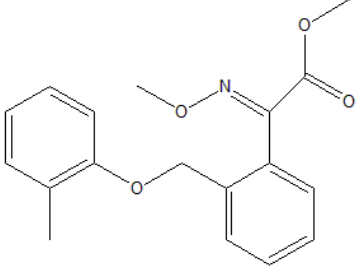
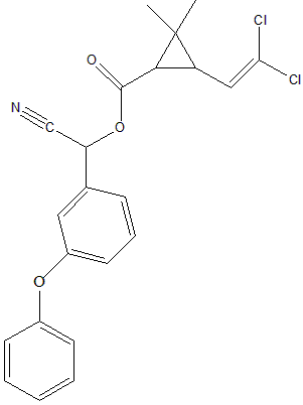
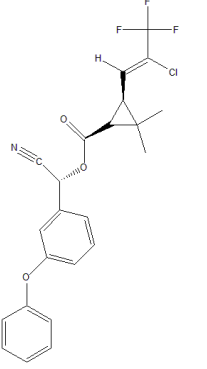
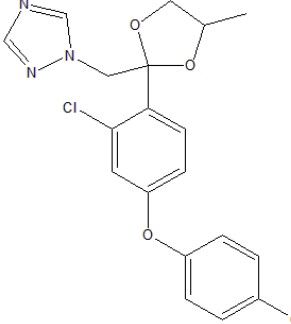
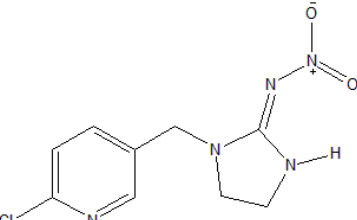
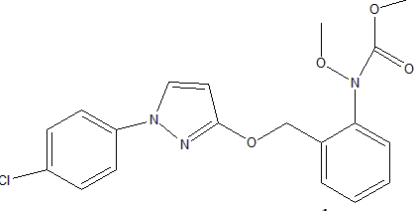
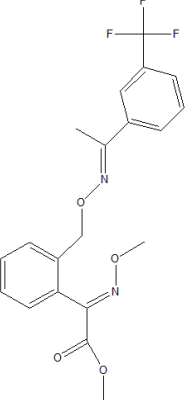
Apresentam diferentes estruturas químicas e podem ser classificados em três grupos: os N-nitroguanidinas (imidacloprido, tiametoxam, clotianidina e dinotefuran), os nitrometilenos (nitenpiram) e N-cianoamidinas (acetamiprida e tiacloprid) (Nauen et al., 2001). Imidacloprido está entre os inseticidas mais detectados em amostras de alimentos analisadas pelo PARA (ANVISA, 2019b). Um escopo de 80 pesticidas foram investigados neste estudo (Anexo 1).

No Brasil, 30 pesticidas tem registro para a cultura do maracujá. A Figura 4 apresenta a fórmula estrutural e o LMR de 13 pesticidas com registro de uso para cultura do maracujá, incluindo o piretróides lambda cialotrina, os triazois difeconazol e tebuconazol e o neonicotinoide imidacloprido.

Os fungicidas ditiocarbamatos encontram-se na lista dos mais detectados nas culturas avaliadas em programas de monitoramento (Jardim e Caldas, 2012; ANVISA, 2019b). Apresentam baixa toxicidade aguda, baixo custo de produção e baixa persistência ambiental, caracterizando-se por serem não sistêmicos, de amplo uso agrícola em frutas e vegetais, desde o preparo do solo, sementes, aplicação foliar e até mesmo, na pós-colheita (Schmidt et al., 2013).

Os ditiocarbamatos são divididos em subclasses, de acordo com o elemento químico presente no complexo organosulfurado (Crnogorac e Schwack, 2009): Metilditiocarbamatos (MDTC): metam-sódico (Na); Dimetilditiocarbamatos (DMD): ziram (Zn), ferbam (Fe) e tiram (não contém elementos de coordenação); Etilenobisditiocarbamatos (EBDC): manebe (Mn), zineb (Zn), nabam (Na), metiram (Zn) e mancozebe (Zn e Mn); Propilenobisditiocarbamatos (PBDC): propinebe (Zn).

O Brasil permite o uso de cinco ditiocarbamatos para 53 culturas de alimentos, sendo eles, o mancozebe, metam-sódico, metiram, propinebe e tiram (ANVISA, 2021). O metiram e o mancozebe são os únicos com uso permitido no cultivo do maracujá, com aplicação foliar e intervalo de segurança de sete dias. O LMR é definido como ditiocarbamatos, em $\text{mg kg}^{-1} \text{CS}_2$. A Figura 5 apresenta a fórmula molecular dos ditiocarbamatos registrados no Brasil, dos quais mancozebe e metiram são permitidos para o maracujá (ANVISA, 2021)

<p style="text-align: center;">Azoxistrobina</p>  <p style="text-align: center;">LMR = 0,4 mg kg⁻¹</p>	<p style="text-align: center;">Boscalida</p>  <p style="text-align: center;">LMR = 1,0 mg kg⁻¹</p>	<p style="text-align: center;">Buprofezina</p>  <p style="text-align: center;">LMR = 0,3 mg kg⁻¹</p>
<p style="text-align: center;">Clorfenapir</p>  <p style="text-align: center;">LMR = 0,05 mg kg⁻¹</p>	<p style="text-align: center;">Cresoxim-metílico</p>  <p style="text-align: center;">LMR = 0,2 mg kg⁻¹</p>	
<p style="text-align: center;">β - cipermetrina</p>  <p style="text-align: center;">LMR = 0,02 mg kg⁻¹</p>	<p style="text-align: center;">λ-cialotrina</p>  <p style="text-align: center;">LMR = 1,0 mg kg⁻¹</p>	<p style="text-align: center;">Difenoconazol</p>  <p style="text-align: center;">LMR = 0,2 mg kg⁻¹</p>
<p style="text-align: center;">Imidacloprido</p>  <p style="text-align: center;">LMR = 0,2 mg kg⁻¹</p>	<p style="text-align: center;">Piraclostrobina</p>  <p style="text-align: center;">LMR = 0,7 mg kg⁻¹</p>	<p style="text-align: center;">Trifloxistrobina</p>  <p style="text-align: center;">LMR = 0,05 mg kg⁻¹</p>

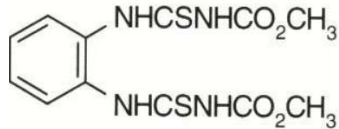
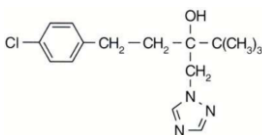
<p>Tiofanato-metil</p>  <p>LMR = 0,5 mg kg⁻¹</p>	<p>Tebuconazol</p>  <p>LMR=0,1 mg kg⁻¹</p>
--	---

Figura 4. Pesticidas com uso permitido para cultura do maracujá. LMR = limite máximo de resíduo (ANVISA, 2021)

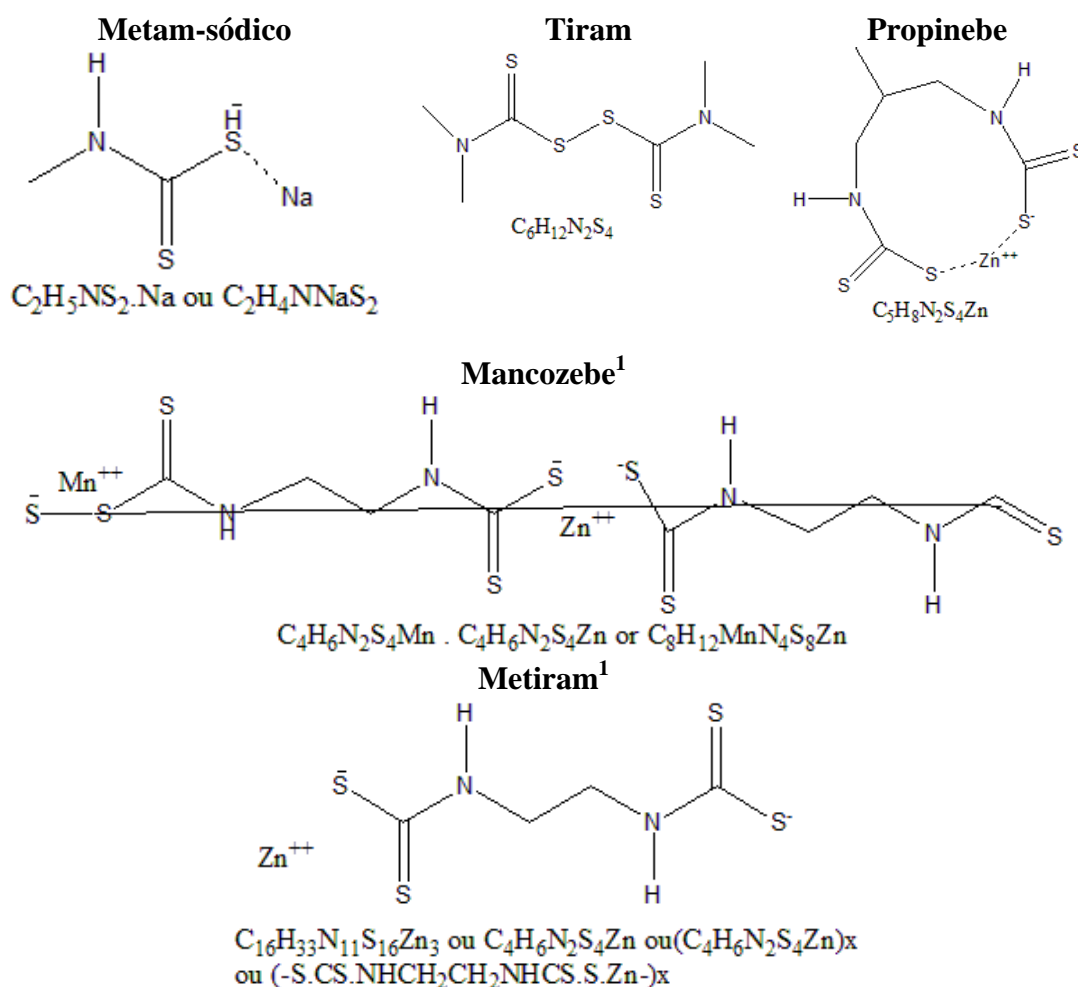


Figura 5. Estrutura química dos ditiocarbamatos registrados no Brasil. ¹ Uso permitido na cultura do maracujá com LMR = 1,0 mg kg⁻¹ CS₂.

A grande preocupação para a população que consome alimentos tratados com ditiocarbamatos está nos produtos de degradação dos etilenobisditiocarbamatos (EBDC), como mancozebe e metiram e do propinebe (etilenotiouréia e propilenotiouréia, respectivamente), que mostraram ser carcinogênicos em estudos com animais de laboratório (Doerge e Takazawa, 1990).

3. Métodos analíticos para determinação de resíduos de pesticidas em alimentos

3.1 Métodos multirresíduos

A agricultura é condicionada aos fatores climáticos peculiares para cada região de cultivo, e a aplicação de mais de um ingrediente ativo para prevenir e controlar a incidência de pragas e doenças no campo se faz necessária. Métodos analíticos flexíveis, robustos, de elevada seletividade e sensibilidade tem sido desenvolvido para determinação de pesticidas multiclases em diferentes matrizes (Anastassiades et al., 2003; Maštovská & Lehotay, 2004; Jardim et al., 2014; Reichert et al., 2015; Walorczyk et al., 2015), denominados métodos multiresíduos (MMR). Esses métodos são fundamentais para a identificação e quantificação de substâncias com estruturas moleculares diversas em matrizes complexas, e servem de pré-requisitos para a implantação em programas de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos.

A determinação de resíduos de pesticidas em alimentos é um grande desafio para o analista, principalmente devido às baixas concentrações dos analitos, às substâncias interferentes extraídas da matriz e às diferentes propriedades químicas dos pesticidas monitorados (Wilkowska & Biziuk, 2011). Estes são os principais fatores que devem ser considerados durante o desenvolvimento de um MMR.

A eficiência analítica de um método está diretamente relacionada à etapa de preparo de amostra. Nesta, deve-se garantir a extração dos analitos de interesse, bem como a remoção de interferentes presentes na matriz (Hercegová et al., 2007; Chen et al., 2008). O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) é umas das técnicas de pré-tratamento mais utilizada por pesquisadores durante a determinação de pesticidas em amostras de alimentos. Desenvolvido por Anastassiades et al. (2003), tem se mostrado adequado e eficaz na extração de uma ampla gama de compostos em diferentes matrizes por cromatografia gasosa ou líquida. O método envolve uma etapa de extração com acetonitrila e a adição de sais (NaCl e MgSO₄), seguida de limpeza ou purificação, por meio de extração em fase sólida

dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, d-SPE) com amina primária secundária (PSA). Para amostras que contêm clorofila e carotenoides, adiciona-se GCB (*Grafitized Carbon Black*) na etapa de limpeza.

Em métodos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) é possível obter maior detectabilidade e menores limites de detecção e quantificação do que quando se utiliza apenas MS (Vidal et al., 2002). No modo de varredura de “monitoramento selecionado de reações” (SRM, “*selected reaction monitoring*”), monitora-se a fragmentação de um íon precursor selecionado em MS_1 e seus respectivos íons produtos filtrados em MS_2 . Sendo assim, o equipamento detecta o íon precursor e o íon produto, aumentando consideravelmente a sensibilidade de monitoramento, fato que se associa ao aumento de seletividade (Chiaradia et al., 2008). Conseqüentemente, quando se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente, este modo de varredura é denominado “monitoramento de reações múltiplas” (*multiple-reaction monitoring*) – MRM (Chiaradia et al., 2008).

Na diretiva 11813/2017 da Comissão Europeia está descrito que para os equipamentos GC-MS/MS e LC-MS/MS devem-se monitorar duas transições, utilizando os modos de varredura SRM ou MRM a partir de um mesmo íon precursor; ou a partir de dois íons precursores, uma transição para cada precursor. O uso de LC-MS/MS ou GC-MS/MS permite a identificação dos analitos com maior exatidão e confiabilidade, sem a necessidade de métodos confirmatórios.

Como forma de melhorar a versatilidade e eficácia do método QuEChERS, várias modificações foram desenvolvidas (Lehotay et al. 2010), as quais têm sido utilizadas com sucesso para a extração de pesticidas em vários tipos de alimentos, especialmente em frutas e vegetais (Húšková et al., 2009; Lesueur et al., 2008; Nguyen et al., 2008; Chen et al., 2011). Lehotay et al. (2005a), validaram um procedimento analítico para 229 pesticidas em amostras de frutas e vegetais utilizando GC-MS e LC-MS/MS, com resultados satisfatórios para a maioria dos analitos, exceto para alguns com instabilidade devido ao pH. Esse problema foi resolvido com a adição de solução de ácido acético ou fórmico (0,1%) (Lehotay et al., 2005a; Lehotay et al., 2005b). Alterações relacionadas ao solvente orgânico também foram introduzidas, com uso de metanol e acetato de etila, este último mais adequado na detecção em GC (Łozowicka, Rutkowska & Jankowska, 2017; Collimore & Bent, 2020), e LC (Lopes

et al., 2012a; Lopes et al., 2012b; Narendran et al., 2019). As vantagens do uso de acetato de etila como solvente extrator é devido à sua capacidade para extrair pesticidas de diferentes classes em diversos tipos de amostras (Prestes et al., 2009). Porém, quando comparado com acetonitrila, os percentuais de recuperação para alguns pesticidas como acefato, metamidofós, dimetoato, ometoato e tiabendazol são baixos e os extratos obtidos menos limpos (Lehotay et al., 2010). Os baixos percentuais de recuperação para pesticidas com caráter básico ($pK_a > 4$) são devido a problemas de degradação, sendo necessária a adição de hidróxido de sódio para um aumento destes percentuais (Pihlström et al., 2007). Diferentes métodos desenvolvidos para determinação de pesticidas multiclasses em frutas são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Métodos para determinação de pesticidas multiclasses em frutas.

Matriz	Local	Analitos (n°)	Instrumento/ Método	LOQ	Ref.
Maracujá e castanha de caju	Brasil	Organofosforados e Permetrina (6)	GC-ECD e GC-MS / MSPD: 0,5 g de florisil foram adicionadas a 1g de amostra. A mistura foi introduzida em cartucho contendo (3 g de CH ₃ COONa e 0,5 g de sílica-gel), eluído com 40 mL de acetato de etila. O eluato foi concentrado para 2 mL.	7 – 14 µg L ⁻¹	Dórea e Lanças (1999)
Suco de maracujá e outras frutas	Tailândia	Piretróides (6)	HPLC-UV / DLLME: 5 mL de amostra filtrada de suco foi adicionada a mistura de 1,25 mL de metanol (solvente de dispersão) e 0,3 mL de clorofórmio (solvente de extração).	5 – 10 µg L ⁻¹	Boonchiangma et al. (2012)
Banana	Brasil	Pesticidas multiclasses (128)	UHPLC-MS/MS / QuEChERS -Extração: Amostra (10 g), ACN (10 mL) (1% ácido acético), MgSO ₄ (4 g) e CH ₃ COONa (1 g); - Clean-up: d-SPE: Testes com MgSO ₄ (1,5 g).	10 – 25 µg kg ⁻¹	Carneiro et al. (2013)
Caqui, cajú, goiaba e pêssego	Brasil	Pesticidas multiclasses (46)	GC- µECD, GC-FPD e LC-MS/MS / QuEChERS acetato modificado -Extração: Amostra (15 g), acetato de etila (15 mL) (1% ácido acético), MgSO ₄ (6 g) e CH ₃ COONa (5 g); - Clean-up: d-SPE: MgSO ₄ (900 mg) e PSA (300 mg).	1 – 8 µg kg ⁻¹	Jardim et al. (2014)
Maçã, pera e uva	Brasil	Pesticidas multiclasses (152)	LC-QTOF MS / QuEChERS acetato modificado	10 – 40 µg kg ⁻¹	Munaretto et al. (2016)
Tamarindo	Brasil	Organoclorados (14)	GC-ECD e GC-MS/MS / - Extração: QuEChERS (kits 1 e 2, respectivamente): (6 e 4 g de MgSO ₄ , 1,5 e 1 g de NaCl, 0,75 e 0,5 g de Na ₂ HCit 1.5H ₂ O e 1.5 e 1 g de Na ₃ Cit 2H ₂ O;	Fruto: 15–49 µg kg ⁻¹ ; Casca: 27–98 µg kg ⁻¹ ;	Paz et al. (2015)

Matriz	Local	Analitos (n°)	Instrumento/ Método	LOQ	Ref.
			- <i>Clean-up</i> : MgSO ₄ (150 mg), PSA (50 mg), C ₁₈ (50 mg) e GCB (50 mg)	Polpa: 7–27 µg kg ⁻¹	
Geleia de frutas	Brasil	107 pesticidas multiclasses	LC-MS/MS /- Extração: QuEChERS modificado: ACN (10 mL), MgSO ₄ (4 g), NaCl (1 g), Na ₃ Cit 2H ₂ O (1 g) e and Na ₂ HCit 1.5H ₂ O (0.5 g). - <i>Clean-up</i> : MgSO ₄ (750 mg), PSA (125 mg) e C ₁₈ (125 mg).	9–45 µg kg ⁻¹	Reichert et al. (2015)
Folhas de hortelã fresca		Pesticidas multiclasses (46)	GC/ECD/NPD QuEChERS modificado: ACN (10 mL), H ₂ O (10mL), MgSO ₄ (4 g), NaCl (1 g), Na ₃ Cit 2H ₂ O (1 g) e and Na ₂ HCit 1.5H ₂ O (0.5 g). - <i>Clean-up</i> : MgSO ₄ (900 mg), PSA (150 mg) e GCB (45 mg).	4 – 10 µg kg ⁻¹	Slowik-Borowiec (2015)
Uva	Brasil	Pesticidas multiclasses (20) e cafeína	GC-MS - Extração: QuEChERS Original: ACN (10 mL), MgSO ₄ (4 g), NaCl (1 g); QuEChERS acetato modificado: ACN (10 mL) (1% ác. acético), MgSO ₄ (4 g) e CH ₃ COONa (1 g); - <i>Clean-up</i> : 7 tipos de d-SPE foram testadas a partir de 2 mL de extrato (transferidos para tubo de 15 mL contendo 300 mg de MgSO ₄).	20–40 µg kg ⁻¹	Volpatto et al. (2016)
Coco	Brasil	Pesticidas multiclasses (10)	LC-MS/MS / - Extração: QuEChERS acetato modificado: Amostra (10 g ou 10 mL), 10 mL de ACN (1% ácido acético), MgSO ₄ (4 g), CH ₃ COONa (1.7 g). - <i>Clean-up</i> : MgSO ₄ (600 mg), C ₁₈ (500 mg) e PSA (100 mg).	10 µg kg ⁻¹	Ferreira et al. (2016)
Golden berry (<i>Physalis peruviana L.</i>)	Brasil	Pesticidas multiclasses (42)	UHPLC-MS/MS / Extração: 3 versões de QuEChERS - Original: Amostra (5 g), ACN (5 mL), MgSO ₄ (2 g) e NaCl (0,5 g); - Acetato: ACN, 1% ácido acético (5 mL), MgSO ₄ (2 g) e CH ₃ COONa (0,5 g);	5 µg kg ⁻¹	Muñoz et al. (2017)

Matriz	Local	Analitos (n°)	Instrumento/ Método	LOQ	Ref.
			- Citrato: ACN (5 mL), MgSO ₄ (2 g) e NaCl (0,5 g); C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O (0,5 g) e and C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ ·1.5H ₂ O (0.25 g).		
Folhas e frutos de alcachofra	Uruguai	Pesticidas multiclases (98)	GC-LC-MS/MS / Extração: 3 métodos testados - QuEChERS modificado: Amostra (2 g); H ₂ O (4mL, 30 min. de hidratação); ACN (10 mL), MgSO ₄ (4 g), NaCl (1 g); C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O (1 g) e and C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ ·1.5H ₂ O (0,5 g). <i>Clean-up</i> : CaCl ₂ (150 mg) e PSA (150 mg); - Acetato de etila: Amostra (2 g); H ₂ O (4 mL, 30 min. de hidratação), AcOEt (10 mL), MgSO ₄ (4 g) e NaCl (1 g); <i>Clean-up</i> : MgSO ₄ (200 mg) GCB (200 mg) e PSA (150 mg); - MSPD: Adsorventes usados no <i>clean up</i> : GCB (0,4 g), Florisil (3,6 g); Na ₂ SO ₄ (4 g); Solvente de eluição (Hex/EtOAc, 4:6);	Folhas = 10 µg kg ⁻¹ Frutos = 10 µg kg ⁻¹	Machado et al. (2017)
Pera	Brasil	Pesticidas multiclases (170)	UHPLC-MS/MS / - Extração: QuEChERS acetato modificado: amostra (10 g), ACN, 1% ácido acético (10 mL), MgSO ₄ (4 g) e CH ₃ COONa (1,7 g); - <i>Clean-up</i> : Sem - Diluição: 1:9 em água ultrapura	2,5–10 µg kg ⁻¹	Kemmerich et al. (2018)
Pêssego, uva, damasco e tomate Néctares de uva, cereja e pêssego	Turquia	Pesticidas multiclases (5)	GC-MS / Combinação de QuEChERS-MSPE- DLLME e nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄	0,7–1 µg L ⁻¹	Farajzadeh et al. (2019)
Mirtilo, framboesa e morangos congelados	Chile	Imidacloprido, Abamectina, Clorpirifós, Spinosad, l-cialotrina e iprodiona (6)	UHPLC-Orbitrap/MS / Método oficial AOAC e Kit QuEChERS	6–96 µg kg ⁻¹	Concha-meyer et al. (2019)
Maçã, pêssego,	Brasil	Pesticidas multiclases	UHPLC-MS/MS /	10 µg kg ⁻¹	Kemmerich et

Matriz	Local	Analitos (n°)	Instrumento/ Método	LOQ	Ref.
pera e ameixa		(133)	BiT-MSPD: Pesagem de 0,5 g de amostra em tubo de 50 mL, adição de 1 g de C18 e 3 bolas de aço (agitação manual por 1 min.). 2 mL de ACN foram adicionados ao tubo (agitação manual por 1 min.). O tubo foi colocado em banho de ultrassom por 15 min. e em seguida, centrifugado (3400 rpm/8min.). Filtração e diluição do extrato.		al. (2020)
Morango e derivados	Espanha	Pesticidas multiclasses (250)	LC-MS/MS / QuEChERS modificado - Extração: amostra (10 g), ACN, 1% ácido fórmico (10 mL), MgSO ₄ (4 g) e NaCl (1 g); - <i>Clean-up</i> : Sem - Diluição: 10 vezes em fase móvel (metanol:água, 0,01 ácido fórmico)	0.6–6.0 µg kg ⁻¹	Valera-Tarifa, (2020)
Maçã e alface	Trinidad e Tobago	Organoclorados (20) e organofosforados (5)	GC-ECD / QuEChERS modificado - Extração: Amostra (10 g), ACN (15 mL), MgSO ₄ (4 g) e NaCl (1 g); - <i>Clean-up</i> : 4 testes com diferentes sorventes	0.1–10 µg L ⁻¹	Collimore e Bent (2020)

LOQ: limite de quantificação; Ref.: referências; GC-ECD: cromatografia gasosa acoplada ao detector de captura de elétrons; GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas; MSPD: dispersão de matriz em fase sólida; HPLC-UV: cromatografia líquida de alta performance acoplada ao detector ultravioleta; DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*); ACN: acetonitrila; AcOEt: acetato de etila; Hex.: Hexano; PSA: amina primária secundária; GCB (*Graphitized carbon black*): carbono grafitizado; SPE: extração em fase sólida; UPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultraperformance acoplada a detector de espectroscopia de massas *in tandem*; LC-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de espectroscopia de massas *in tandem*; BiT-MSPD: GC-FPD: cromatografia gasosa acoplada fotométrico de chamas; BiT-MSPD (*balls-in-tube matrix solid-phase dispersion*): dispersão de matriz em fase sólida utilizando bolas em tubo;

Jardim et al. (2014) validaram um método multirresíduos para determinação de 46 pesticidas e metabólitos em frutas tropicais, utilizando cromatografia gasosa acoplada aos detectores FPD (*Flame Photometric Detector*) e ECD (*Electron Capture Detector*), para determinação de organofosforados e piretroides, respectivamente, e LC-MS/MS para carbamatos e outros grupos. O método de extração adotado fez adaptações à versão original do QuEChERS, utilizando acetato de etila acidificado (ácido acético, 0,1%), MgSO₄ e CH₃COONa para promover o particionamento, e PSA e MgSO₄ para purificação do extrato. Os resultados foram satisfatórios para maioria dos analitos, com valores de LOQ variando de 2 a 5 µg kg⁻¹ para os compostos organofosforados, de 4 a 8 µg kg⁻¹ para os piretroides e de 1 a 4 µg kg⁻¹ para os carbamatos (Jardim et al., 2014).

Slowik-Borowiec (2015) utilizaram cromatografia gasosa acoplada aos detectores NPD (*Nitrogen- Phosphorus Detector*) e ECD (GC/ECD/NPD) para quantificação de 46 pesticidas em hortelã fresca, após extração com acetonitrila, e clean-up com GCB e PSA. A aplicação do método QuEChERS foi estudada por Machado et al. (2017) para detectar resíduos de pesticidas em folhas e frutos de alcachofra. O estudo fez uma comparação do método QuEChERS, MSPD e dispersão por acetato de etila para determinação de 98 pesticidas. Os resultados concluem que o método QuEChERS foi eficiente com uso de CaCl₂ durante a etapa de limpeza, por este apresentar capacidade de desidratar a amostra e formar sais de cálcio insolúveis.

Recentemente, um método inovador denominado *balls-in-tube matrix solid phase dispersion* (BiT-MSPD) para determinação de pesticidas em frutas por UHPLC-MS/MS foi desenvolvido por Kemmerich et al. (2020). Neste método, todo preparo de amostra é realizado em apenas um tubo de extração fechado, com auxílio de bolas de aço, utilizando pouco solvente orgânico e quantidade de amostra.

Diante da literatura consultada, cabe ressaltar que não existem métodos multirresíduos para determinação de pesticidas multiclassés em maracujá, em suas matrizes casca, polpa e folha. Nem mesmo dados que reportem resíduos de pesticidas nesta cultura no país.

3.2 Métodos para determinação de fungicidas ditiocarbamatos

Os fungicidas ditiocarbamatos caracterizam-se por serem insolúveis em solventes orgânicos utilizados para extração de outros grupos de pesticidas, e também

possuem baixa estabilidade, necessitando de métodos específicos para sua determinação, pois não são extraídos por MMR (Mujawar et al., 2014).

Um método bastante tradicional para determinação indireta de ditiocarbamatos em amostras de alimentos baseia-se na determinação de dissulfeto de carbono (CS_2), liberado após a hidrólise ácida do ditiocarbamato presente na amostra, com a presença de cloreto de estanho e expressos em $\text{mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$ da amostra. O CS_2 liberado pode ser analisado espectrofotometricamente ou por cromatografia gasosa (Figura 6). No método espectrofotométrico, o CS_2 forma um complexo em solução de acetato cúprico, dietanolamina e etanol e o produto analisado por espectrofotometria em 435 nm (Cullen, 1964; Keppel, 1969; Caldas et al., 2001). No método de detecção de CS_2 por cromatografia gasosa, a hidrólise ácida do ditiocarbamato ocorre em frasco fechado, onde o CS_2 liberado (*headspace*) pode ser injetado diretamente no cromatógrafo a gás (Hill, 1992; Jianren, 1989; Friedrichs, 1995) ou ser extraído simultaneamente com solvente orgânico antes da injeção (Harrington, 1998; Crnogorac e Schwack, 2009). Porém, essas metodologias não possibilitam a distinção entre os diferentes compostos ditiocarbamatos presentes na amostra, e pode gerar resultado falso positivo para algumas culturas, como cebola, couve, brócolis e repolho, que possuem geração fitogênica de CS_2 (Stertz e Freitas, 2003). Apesar das limitações, a determinação indireta de ditiocarbamatos é usada nos programas de monitoramento em todo o mundo e a base para o estabelecimento do LMR, em termos de CS_2 (Crnogorac e Schwack, 2009; Vareli et al., 2018).

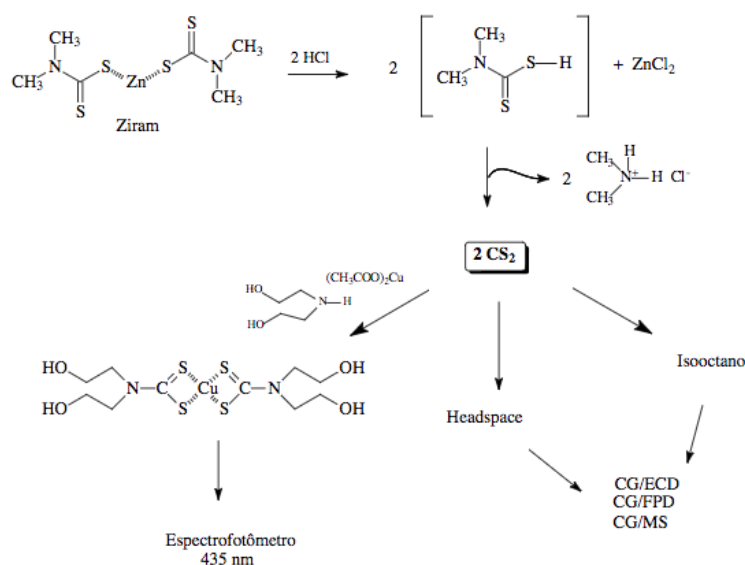


Figura 6. Hidrólise ácida de ditiocarbamatos e métodos de determinação de CS₂.
Fonte: Mello, 2014.

Partindo das limitações que o método indireto apresenta, outros métodos foram desenvolvidos para a determinação direta dos ditiocarbamatos a partir técnicas cromatográficas, incluindo LC-MS e LC-MS/MS (Blasco et al., 2004; Crnogorac et al., 2008; Hayama e Takada, 2008; Schmidt et al., 2013) e HPLC-UV (López-Fernández et al., 2012; Jafari et al., 2012; Mello, 2014; Petha et al., 2017).

Hayama e Takada (2008) utilizaram LC-MS/MS para determinação de mancozebe, manebe e zineb (EBDC) em frutas e vegetais, a partir da reação de derivatização do EBDC, utilizando o manebe como representante dos EBDC para fortificação das amostras. A reação consiste na decomposição e metilação do ditiocarbamato com uso de dimetil-sulfato (Figura 7). Neste método não é possível distinguir entre os três EBDCs, pois é obtido um mesmo produto após a derivatização.

Partindo do método de Hayama e Takada (2008), López-Fernández et al. (2012) desenvolveram um método para determinação de mancozebe, manebe (EBDC) e propinebe em frutas e vegetais por HPLC-UV em coluna de fase reversa (detecção em 270 nm) a partir da derivatização, extração e purificação do extrato. Jafari et al. (2012) desenvolveram um método para determinação simultânea de tiram, mancozebe e propinebe por HPLC-UV (detecção em 272 nm) em tomates, a partir da metilação dos analitos, utilizando iodeto de metila, como agente metilador, segundo Gustafsson and Fahlgren (1983). Durante a metilação, o rendimento do derivado de metila quando se utiliza dimetil sulfato é 15% maior ao obtido com uso de iodeto de metila (Hayama e Takada, 2008).

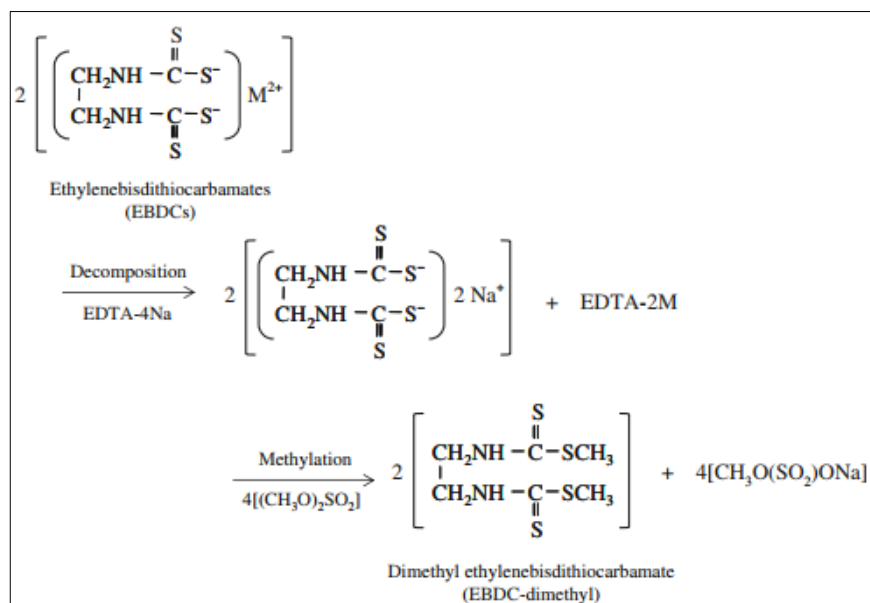


Figura 7. Etapas da derivatização do EBDC (M=metal). Fonte: Hayama e Takada, 2008.

Mello (2014) desenvolveu e validou um método direto para determinação de EBDC (mancozebe) e propinebe por HPLC-UV para três culturas fitogênicas (repolho, couve e brócolis) e para goiaba. A metodologia baseou-se em metilação segundo López-Fernández et al. (2012), extração/*clean up* por QuEChERS e cromatografia em fase reversa (detecção em 270 nm). Resultados satisfatórios foram obtidos com a utilização de PSA/MgSO₄/carvão ativado para purificação do extrato, porém o método ainda precisa ser melhorado para eliminar certos interferentes que co-eluem com os analitos de interesse.

3.3 Validação de métodos analíticos

A necessidade de se evidenciar veracidade e confiabilidade dos resultados gerados em um determinado processo analítico é cada vez mais exigida e reconhecida, já que informações analíticas não confiáveis podem levar a decisões equivocadas e grandes prejuízos financeiros (Ribani et al., 2004). Para garantir que um método analítico a ser desenvolvido gere dados fidedignos com relação a uma amostra, é necessário que o método seja validado, e normas nacionais e internacionais para controle de qualidade em métodos analíticos foram estabelecidas (MAPA, 2015; INMETRO, 2020; SANTE, 2017).

Em métodos multirresíduos, todos os analitos contemplados no escopo devem ser validados e matrizes representativas podem ser utilizadas tanto para métodos multirresíduos como para métodos seletivos. No mínimo uma matriz representativa para cada grupo de produtos deve ser validada (Brasil, 2011).

Os parâmetros normalmente incluídos na validação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (Ribani et al., 2004). Os principais parâmetros e procedimentos de validação analítica estão descritos de maneira geral e resumidamente no Quadro 1, considerando o DOQ-CGCRE-008 do Inmetro (Revisão 09 - 2020) e o Manual de garantia de qualidade analítica (MAPA, 2011).

Quadro 1. Parâmetros de validação analítica.

Parâmetros	Procedimentos
Seletividade	Analisar no mínimo 6 replicatas de amostras “branco” e observar a presença de interferentes (sinais e picos no tempo de retenção do analito de interesse) e a ocorrência de supressão ou aumento de sinal pelo método em estudo.
Linearidade	Dentro da faixa de trabalho selecionada, construir uma curva de calibração, com no mínimo 5 níveis de concentração em 5 ou mais replicatas.
Limite de detecção (LOD)	Analisar amostras com concentrações conhecidas de analito e definir um nível mínimo em que o analito pode ser detectado com confiança. Esta concentração pode ser estimada, primeiramente a partir do LOQ (aproximadamente 1/2 LOQ ou 1/3 LOQ).
Limite de Quantificação ¹ (LOQ)	Fazer análise das amostras com concentrações conhecidas do analito e estabelecer um nível mínimo em que o analito possa ser quantificado com recuperação e precisão aceitáveis.
Recuperação	Analisar amostras fortificadas com o analito em pelo menos 3 níveis de concentração (baixa, média e alta) e em 3 replicatas. Os critérios de aceitação em

Parâmetros	Procedimentos
	cada nível de fortificação e para cada matriz, são de 70% a 120% em média para todos os analitos, com uma precisão de $CV \leq 20\%$.
Precisão	Analisar amostras branco fortificadas em diferentes concentrações (3 níveis, no mínimo) na faixa de trabalho com mínimo de 3 repetições para cada nível.

Fonte: Inmetro (DOQ-CGCRE-008, Revisão 09 – 2020); Manual de garantia da qualidade analítica, MAPA (2011).

4. Resíduos de pesticidas em alimentos

A presença de resíduos de pesticidas nos alimentos é resultado direto do uso desses compostos no campo, e a dieta é uma via potencial de exposição humana. Jardim et al. (2014) determinaram resíduos de pesticidas em amostras de caqui, caju, goiaba e pêssigo oriundas do Brasil, das quais mais de 70% foram positivas. Os ditiocarbamatos foram detectados com maior frequência, presente em todas as culturas analisadas (33,2 % do total de amostras), com a maior concentração em uma amostra de caqui ($7,09 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$). A porcentagem de amostras de caju e goiaba contendo resíduos de ditiocarbamatos foi superior a 15%, enquanto que nas amostras de caqui e pêssigo foi superior a 40%, porém o uso de ditiocarbamatos em caqui, caju e goiaba não é permitido no Brasil. Jardim e Caldas (2012) analisaram os resultados obtidos pelos dois programas nacionais de monitoramento no período de 2001 e 2010, onde foram analisadas 13.556 amostras de 22 tipos de alimentos. Os fungicidas ditiocarbamatos foram os mais frequentes, presentes em mais de 40% das amostras analisadas. As culturas que apresentaram maior porcentagem de amostras positivas para ditiocarbamatos foram de alface (71,3%), maçã (67,7%) e tomate (56,4%).

Atualmente, não há estudos no Brasil que reportem resíduos de pesticidas em maracujá, e o número de estudos disponíveis conduzidos em outros países é limitado (Quadro 2).

Quadro 2. Resíduos de pesticidas em amostras de maracujá

Local de coleta Ref.	Amostras positivas /analizadas	Método	Pesticida detectado (concentração, mg kg⁻¹)
Colômbia Hjorth et al. (2011)	9/18	Não informado	Ditiocarbamatos (0,3-1,9); cipermetrina (0,08-0,17); imidacloprido (0,05); λ-cialotrina (0,06); propamocarbe (0,1); tiabendazol (0,1).
Colômbia Botero-Coy et al. (2012)	-	Extração com acetonitrila e diluição, sem etapa de limpeza, 30 pesticidas por LC-MS/MS	Monocrotofós e imidacloprido (< 0,05 mg kg ⁻¹)
Colômbia Juraske et al. (2012)	Não analisou amostras reais	313 pesticidas por GC-MS e HPLC-MS (mancozebe)	Frutos: Cmáx.= 0,01 a 0,37 (difenoconazol e triacloprido); Polpa: Cmáx.=0,003 a 0,09 (difenoconazol e mancozebe).
Colômbia Botero-Coy et al. (2015)	3/12	QuEChERS, 30 pesticidas por LC-MS/MS	Ometoato (0,04), carbendazim (0,21 e 0,30) e dimetoato (0,16).
Colômbia Varela-Martínez et al. (2019)	0/3	QuEChERS, 38 pesticidas por GC-QqQ-MS/MS;	nd
Índia Narenderan et al. (2019)	0/18	QuEChERS, 5 organofosforados por LC/MS-MS	nd

Cmáx.: concentração máxima; nd: não detectado;

Hjorth et al. (2011) investigaram resíduos de pesticidas em 724 frutas e vegetais provenientes de Países da América do Sul, que incluíam 18 amostras de maracujás originárias da Colômbia. O LMR determinado pela União Europeia foi excedido em 50% das amostras de maracujá analisadas.

Um estudo experimental a campo realizado na Colômbia avaliou a dissipação de fungicidas (azoxistrobina, difenoconazol, tebuconazol e mancozebe) e inseticidas (deltametrina, imidacloprido, triacloprido e tiametoxan) após aplicação foliar em pomares de maracujá-amarelo (Juraske et al., 2012). Amostras de maracujá foram coletadas periodicamente e analisadas (fruto inteiro e polpa). As concentrações máximas detectadas no fruto inteiro foram de 0,01 e 0,37 mg kg⁻¹, para difenoconazol

e triacloprido, respectivamente. Na polpa, as concentrações variaram de 0,003 mg kg⁻¹ para difenoconazol e 0,09 mg kg⁻¹ para mancozebe. Segundo Wyckhuys et al. (2011), a produção de maracujá na Colômbia e em outros países emergentes é feita por pequenos agricultores, que muitas vezes, devido à falta de informação e treinamento, fazem uso de práticas inadequadas no manejo das pragas. Maracujás cultivados na região montanhosa de Nilgiris, no Sul da Índia, foram analisados quanto à presença de pesticidas organofosforados (acefato, malationa, quinalfós, profenofós e clorpirifós). Todas as amostras apresentaram resíduos de pelo menos um pesticida, porém nenhuma excedeu o LMR europeu (Narenderan et al., 2019).

Botero-Coy et al. (2012) validaram um método multirresíduos em frutas tropicais utilizando LC-MS/MS e realizaram um estudo aprofundado de efeito matriz em sete culturas, incluindo o maracujá (*P. edulis*), que foi umas das três frutas que apresentou menores efeitos de matriz.

Nenhum estudo foi encontrado na literatura que tenha avaliado níveis de pesticidas em subprodutos do maracujá, como polpa e casca, e das folhas de *Passiflora sp* utilizados para uso medicinal.

5. Avaliação de risco da exposição humana a resíduos de pesticidas

Avaliar o risco causado pela exposição humana a pesticidas na dieta é considerado um processo fundamental para o estabelecimento de padrões de segurança (WHO, 1997). No Brasil, a ANVISA é o órgão responsável pelo processo de registro de aditivos alimentares, drogas veterinárias e pesticidas, e por avaliar o risco da exposição humana a estas substâncias (ANVISA, 2018). Também dispõe sobre os critérios de avaliação e classificação toxicológica de agrotóxicos e avaliação do risco dietético a exposição humana aos agrotóxicos por meio das RDCs 294/2019 e 295/2019, respectivamente (ANVISA, 2019c; ANVISA, 2019d). No âmbito internacional, comitês científicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization - FAO*) conduzem a avaliação do risco para subsidiar o estabelecimento de padrões alimentares pelo *Codex Alimentarius* (WHO, 2007). O JMPR (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*) é responsável por avaliar as questões referentes a resíduos de pesticidas (FAO/WHO, 2018).

A avaliação do risco tem por objetivo estimar a probabilidade da ocorrência de um efeito adverso após a exposição humana a substâncias potencialmente tóxicas. O processo de avaliação de risco consiste na execução de 4 etapas, onde o risco é estabelecido em função da toxicidade e da exposição (Figura 8).



Figura 8. Avaliação de risco químico na dieta. Fonte: Caldas, 2017 adaptado.

Nas duas primeiras etapas, o perfil toxicológico da substância em estudo é identificado e o efeito adverso é caracterizado em relação à dose de exposição a partir principalmente de estudos com animais (como roedores), quando se estabelece a ingestão segura crônica (IDA, ingestão diária aceitável) e aguda (*Acute Reference Dose* - ARfD) (Caldas, 2017).

A estimativa da exposição humana às substâncias químicas presentes nos alimentos depende da concentração da substância no alimento, do consumo do alimento e do peso corpóreo do indivíduo ou da população em estudo. Dados de concentração podem ser obtidos por meio de estudos de monitoramento ou, na ausência destes, utilizam-se os limites legais (LMR) (IPCS, 2009). Idealmente, os dados de concentração devem considerar o processamento do alimento, como lavagem, descasque e cozimento, já que os níveis e/ou a natureza química das substâncias presentes podem sofrer alterações. Por exemplo, durante o processo de desidratação, os níveis de algumas substâncias são aumentados, ou pode haver a

formação de metabólitos mais tóxicos que o composto original, como é o caso dos fungicidas ditiocarbamatos (Jardim e Caldas, 2009).

A avaliação da exposição crônica, isto é, por um longo período, considera-se o somatório da ingestão pelo consumo de todos os alimentos da dieta da população em estudo (Eq. 1).

$$\text{Ingestão crônica} = \frac{\sum(\text{consumo} \times \text{concentração})}{\text{peso corpóreo}} \quad (\text{Eq. 1})$$

O cálculo para estimativa da ingestão aguda de pesticidas, um evento que ocorre eventualmente, considera o consumo alto de um alimento que contenha uma alta concentração do pesticida (FAO, 2003).

Informações relacionadas ao consumo de alimentos no Brasil podem ser obtidas da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), conduzida pelo IBGE. Na última POF (2017-2018), os dados foram obtidos de 46.164 indivíduos a partir de 10 anos que relataram o consumo individual de cada alimento consumido das últimas 24 horas (recordatório 24 horas) (IBGE, 2020). O cálculo da ingestão pode ser feito usando modelos determinísticos (valores pontuais de concentração e consumo, como médias ou percentis), ou probabilísticos (curvas de distribuição de contaminação e consumo – modelos matemáticos) (IPCS, 2009).

Na etapa de caracterização do risco agudo e crônico, a ingestão estimada é comparada com a IDA e ARfD, e expressos como % IDA e % ARfD, respectivamente (IPCS, 2009). A exposição pode representar risco quando % ARfD ou % IDA for maior que 100.

Jardim et al. (2014) conduziram um estudo de avaliação de risco aguda cumulativa para inseticidas organofosforados (OF) e piretróides (PY) pelo consumo de caju, goiaba, caqui e pêssego. Acefato e metamidofós foram utilizados como composto indicador para os OFs, e a deltametrina, para os PYs. Dentre as frutas analisadas, a goiaba apresentou as maiores porcentagens de ARfD para exposição aos inseticidas OFs e PYs, 45% (acefato como composto de referência) e 12%, respectivamente. Os resultados indicam que a exposição aguda cumulativa a esses pesticidas pelo consumo dessas frutas não representa um risco à saúde da população brasileira.

Jardim et al. (2018a) conduziram um estudo de avaliação do risco cumulativo agudo pela dieta de inseticidas OFs, carbamatos (CBs) e PYs. Dados de resíduos para 30.786 amostras de 30 tipos de alimentos (não inclui maracujá) foram obtidos dos programas nacionais de monitoramento de resíduos de pesticidas da ANVISA (PARA) e do MAPA (PNCRC) e pelo Laboratório de Toxicologia da UnB. Dados de consumo foram adquiridos da POF 2008-2009 em indivíduos acima de 10 anos de idade ou mais. Laranja e suco de laranja foram os alimentos que contribuíam para ingestão dos OFs, em especial, a metidationa. O arroz foi responsável por 80% da ingestão de CBs (adolescentes), principalmente aldicarbe. Macarrão, pão de sal e feijão contribuíram mais para a ingestão de PYs (9-14%), devido principalmente à bifentrina. Esses resultados mostram que para todos os grupos a ingestão não excedeu a ARfD no percentil 99,9, e os riscos da exposição não foram considerados preocupantes para a saúde da população brasileira.

Utilizando as mesmas fontes de dados de resíduos e consumo do estudo anterior, Jardim et al. (2018b) realizou avaliação de risco aos fungicidas triazóis (TR) e ditiocarbamatos (DT). Cerca de 16% das amostras continham fungicidas triazóis, principalmente a uva (53,5%), e 16,2% continham ditiocarbamatos, em especial a maçã (59,3%). O flusilazol foi o composto indicador utilizado para os efeitos agudos dos triazóis em mulheres com idade reprodutiva (malformação crânio-facial e variação esquelética) e ciproconazol para os efeitos crônicos de hepatotoxicidade. Com relação aos DT, o Etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC) foi usado como composto indicador (toxicidade tireoidiana). No percentil 99,9 (P 99.9), a ingestão aguda cumulativa de TR foi responsável por até 0,5% da ARfD, principalmente pelo consumo de feijão e arroz (~70% da ingestão total), e maçã por cerca de 51-56% da ingestão de DT. Os riscos estimados da exposição a TR e DT não indicaram preocupação à saúde do população brasileira.

Estudos de avaliação da exposição à pesticidas que inclua o consumo de maracujá são muito raros. Claeys et al. (2011) observaram que o fungicida difenoconazol esteve entre o mais frequentemente detectados e excedeu o LMR para as amostras de maracujá analisadas pelo programa de monitoramento de pesticidas em frutas e vegetais da Bélgica, em 2008. Os resultados do estudo de avaliação de risco demonstraram que a exposição crônica de indivíduos acima de 15 anos de idade não

representa preocupação com a saúde. Para maioria dos resíduos de pesticidas estudados, a exposição é cerca de cem vezes menor que a IDA (Claeys et al., 2011).

III. OBJETIVOS

Geral

Validar métodos analíticos e determinar os níveis de pesticidas (organofosforados, carbamatos, piretróides e outras classes) em maracujá (*Passiflora edulis*) produzido em diferentes regiões do Brasil e polpa congelada e farinha de maracujá comercial, e assim avaliar a segurança do seu consumo.

Objetivos específicos

1. Validar o método analítico espectrofotométrico para determinação de ditiocarbamatos, em termos de CS₂, em *Passiflora edulis*.
2. Analisar amostras de frutos e folhas de *P. edulis* obtidas de produtores das regiões sudeste, centro-oeste e nordeste quanto aos níveis de fungicidas ditiocarbamatos pelo método espectrofotométrico;
3. Validar um método multirresíduos para determinação de pesticidas em casca e polpa de maracujá por LC-MS/MS e CG-MS/MS.
4. Analisar amostras de maracujá (casca e polpa) de produtores brasileiros quanto aos níveis de pesticidas
5. Analisar amostras de polpa de maracujá congelada e farinha da casca de maracujá adquiridos no comércio do Distrito Federal quanto aos níveis de pesticidas.
6. Estimar fatores de processamento de lavagem do fruto e produção de farinha da casca do maracujá
7. Estimar a ingestão crônica, aguda e o risco da exposição da população aos pesticidas pelo consumo de suco de maracujá e farinha.
8. Validar um método multirresíduos para determinação de pesticidas em folhas de *P. edulis* por LC-MS/MS, analisar amostras de folhas pelo método validado e estimar o fator de processamento de secagem das folhas.

IV. ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está organizada em quatro capítulos de maneira a atingir os objetivos propostos no trabalho:

O Capítulo 1 (Materiais e Métodos) detalha a coleta das amostras de frutos e folhas de *P. edulis*, o processamento, a obtenção de farinha de maracujá e a secagem das folhas. Estas informações serão descritas de maneira mais sucintas nos capítulos posteriores.

O Capítulo 2 (*Dithiocarbamate Residues in Fruits and Leaves of Passion Fruit (Passiflora edulis) from Different Brazilian Regions*) trata dos resultados relacionados ao primeiro e segundo objetivos deste estudo, que foram publicado no periódico *Journal of Brazilian Chemical Society* em 2019 (Mozzaquatro et al., 2019).

O Capítulo 3 (Validação de método multirresíduo de pesticidas em maracujá (*P. edulis*) utilizando LC-MS/MS e GC-MS/MS e análise de frutos e produtos comerciais) traz os resultados da validação do método multirresíduos, análise de amostras de maracujá, polpa de fruta congelada e farinha de maracujá, estimativa de fatores de processamento e avaliação de risco atendendo aos objetivos de 3 a 7 deste trabalho. Este trabalho será posteriormente submetido para publicação no *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.

O Capítulo 4 contempla o último objetivo deste estudo, que correspondem aos resultados obtidos da validação do método multirresíduos na matriz folha por GC-MS/MS, análise de amostras e estimativa de fator de processamento para folha seca. Este trabalho será posteriormente submetido para publicação em revista indexada internacional.

CAPÍTULO 1: MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostragem

A coleta de amostras de maracujá (*P. edulis* Sims) foi de responsabilidade da EMBRAPA CERRADOS, parceira neste trabalho, que também foi responsável pelo transporte das amostras até o Laboratório de Toxicologia da UnB (LabTox).

As amostras de frutos e folhas foram coletadas durante o período de 2016 a fevereiro de 2018 diretamente dos locais de cultivo em três diferentes regiões produtoras do país, compreendendo os estados do Rio de Janeiro, Bahia e Goiás, e o Distrito Federal (Figura 1.1).

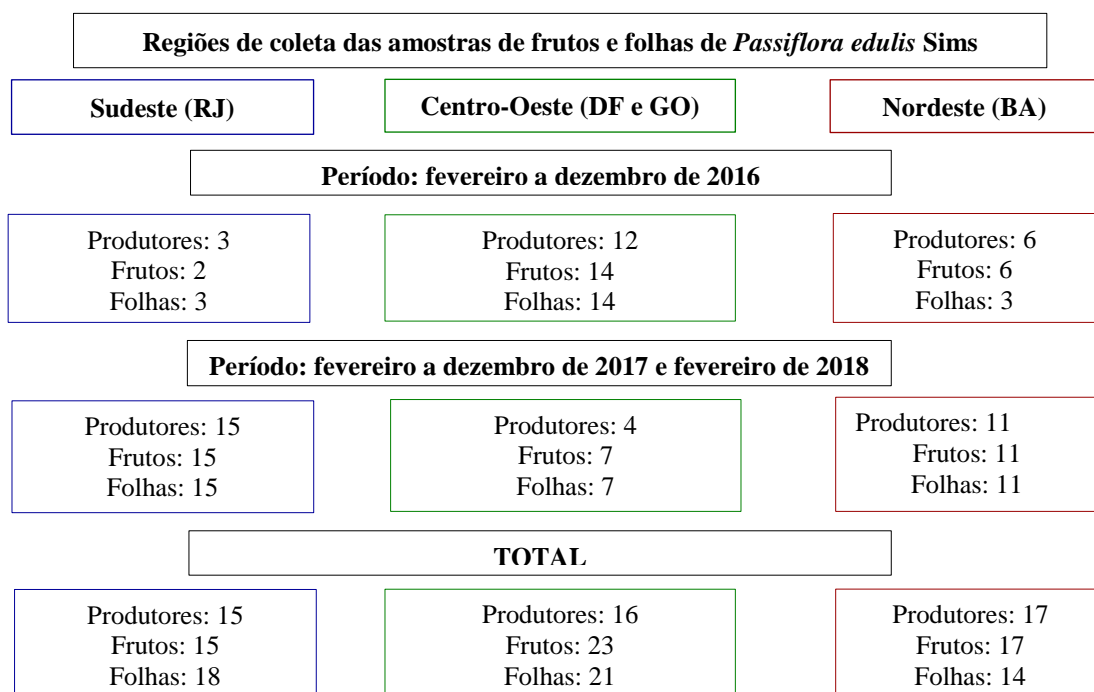


Figura 1.1. Distribuição do número de amostras de frutos e folhas de maracujá coletadas em 2016, 2017 e 2018 em três regiões do País.

As folhas e frutos foram coletados simultaneamente por cada produtor, em estágio ideal de maturação, com exceção da Bahia, que não houve a coleta de três amostras de folhas em 2016, e no do Rio de Janeiro onde não se coletou uma amostra de frutos por não estarem maduros. Ao todo, foram coletadas 55 e 53 amostras de frutos e folhas de maracujá, respectivamente, em 51 áreas de produção. Três produtores do Distrito Federal forneceram amostras em duas safras diferentes, e no estado de Goiás, foi possível coletar de um mesmo produtor durante três safras ao

longo de 2016, 2017 e 2018. Todas as amostras coletadas na Bahia e no Rio de Janeiro têm origem de produtores distintos. Cada produtor forneceu cerca de 2 a 5 kg de frutos e 0,5 a 1 kg de folhas. Adicionalmente, foram coletadas amostras cultivadas no sistema orgânico do Estado da Bahia, isentas de quaisquer resíduos de pesticidas, para serem utilizadas como “branco” durante a validação dos métodos analíticos.

Foram adquiridas em lojas de produtos naturais e supermercados do Distrito Federal, 30 amostras comerciais de polpa de maracujá congelada e 11 amostras comerciais de farinha de maracujá. As amostras de polpa foram devidamente identificadas, homogeneizadas em liquidificador e armazenadas a -15 °C em freezer até a realização das análises.

2. Processamento das amostras

Ao chegarem ao Laboratório, todas as amostras de maracujá foram identificadas e pesadas. Cada amostra de fruto foi dividida em duas porções iguais, uma das quais foi submetida ao processo de lavagem em água corrente por cerca de 1 minuto, para eliminar sujidades e mimetizar as condições na qual é disponibilizada no mercado. As amostras congeladas do fruto foram posteriormente separadas em casca, polpa e semente. As cascas foram cortadas em pedaços menores e congeladas e a polpa separada manualmente da semente com auxílio de uma peneira. Todas as frações foram pesadas, identificadas e armazenadas a - 15 ° C até o momento das análises (Figura 1.2). As amostras de folhas, após congelamento, foram cortadas em pedaços pequenos com auxílio de uma faca e imediatamente armazenadas em freezer a - 15 ° C.

Os procedimentos de processamento de amostra são realizados de maneira distinta de acordo com os diferentes métodos. Para determinação de fungicidas ditiocarbamatos, as amostras foram processadas enquanto congeladas e cascas e folhas foram cortadas em pedaços menores (Capítulo 2). Já, as análises pelo método multirresíduos, as amostras são processadas e homogeneizadas em liquidificador (Capítulo 3).



Figura 1.2. Amostra congelada de maracujá, fracionada em casca, polpa e sementes, juntamente com as folhas do respectivo maracujazeiro. As sementes não foram analisadas nesse estudo.

3. Secagem das amostras de folhas de *P. edulis*

Amostras de folhas selecionadas foram submetidas ao processo de secagem ou desidratação. Cerca de 250g de cada amostra de folhas foram colocadas em uma secadora industrial com circulação de ar quente a uma temperatura média de 40 a 45 ° C por 48 horas, até a secagem completa (Figura 1.3). Esse processo de secagem foi utilizado para se assemelhar ao tratamento de desidratação adotado para as folhas de *P. edulis* quando utilizadas como droga vegetal (Rocha et al., 2008). As folhas secas, posteriormente foram analisadas pelos métodos para determinação de ditiocarbamatos e multirresíduos.



Figura 1.3. Esquema do tratamento dado às folhas de *P. edulis*

4. Preparação da farinha de maracujá

Os frutos inteiros de maracujá já lavados anteriormente em água corrente foram imersos em solução sanitizante de hipoclorito de sódio durante 15 minutos. Após a sanitização, a polpa foi retirada e as cascas cortadas manualmente em pedaços menores. Uma fração de aproximadamente 100 g foi separada e armazenada em freezer até o momento da análise, e a outra foi colocada em secadora com circulação forçada de ar a 60°C, por 10 a 15 horas. Após a secagem, as cascas foram trituradas em liquidificador para obtenção da farinha na granulometria adequada (Figura 1.4). No total, foram produzidas 24 amostras de farinha de maracujá, com umidade média de 9 %, as quais foram armazenadas em sacos plásticos até o momento da análise.



Figura 1.4. Elaboração de farinha da casca de maracujá em laboratório (Srur, 2003).

CAPÍTULO 2: DITHIOCARBAMATE RESIDUES IN FRUITS AND LEAVES OF PASSION FRUIT (*Passiflora edulis*) FROM DIFFERENT BRAZILIAN REGIONS

Este artigo foi publicado no periódico *Journal of Brazilian Chemical Society*, 1834-1840, 2019 (Anexo 2).

Abstract

*Dithiocarbamates are widely used fungicides, including in passion fruit, whose fruits are mainly used for juice production, the leaves for the preparation of herbal tea and medicines. Also, the use of the peel in the food industry has been proposed. In this study, the spectrophotometric method for determination of dithiocarbamate residues, as CS₂, in passion fruit (*Passiflora edulis*) was validated at a limit of quantification (LOQ) of 0.05 mg kg⁻¹ CS₂, and 108 samples (55 fruits and 53 leaves) collected from Brazilian growers were analyzed. About 25% of the fruit peel samples were positive (0.06 to 1.4 mg kg⁻¹) and only one sample had residues in the pulp (0.09 mg kg⁻¹), 43.4% of leaf samples contained residues. Washing of fruit reduced the residues in the peel by up to 100%, and drying the leaves increased residue levels by up to 60%. This is the first study that reports dithiocarbamate residues in passion fruit in Brazil, and the results are important for government authorities when planning monitoring programs, and for food and herbal medicine industries.*

CAPÍTULO 3: VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE PESTICIDAS EM MARACUJÁ (*P. edulis*) UTILIZANDO LC-MS/MS E GC-MS/MS E ANÁLISE DE FRUTOS E PRODUTOS COMERCIAIS

Resumo

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá, principalmente *Passiflora edulis*, popularmente conhecida como maracujá amarelo ou azedo. O suco é o principal produto industrial, mas o uso da casca como alimento funcional tem sido explorado. Este estudo teve como objetivo validar métodos multirresíduos para determinação de 80 pesticidas em casca e polpa de maracujá por LC-MS/MS e GC-MS/MS, e analisar amostras de maracujá e produtos industriais. Um total de 55 amostras de frutos de maracujá foi obtido de produtores nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Goiás e no Distrito Federal e 30 amostras de polpa congelada e 12 amostras de farinha de maracujá foram adquiridos no comércio do Distrito Federal. O método foi satisfatoriamente validado nos dois equipamentos, com percentuais de recuperações entre 70 e 120% e os desvios padrões relativos (RSD) < 20% para a maioria dos compostos, com LOQ de 5 ou 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Cerca de 27% dos 80 analitos monitorados foram detectados, e destes 70% não tem uso autorizado no Brasil para a cultura do maracujá. Pelo menos um analito foi detectado em 60% das amostras de casca analisadas, principalmente imidacloprido, carbendazim e metamidofós, em concentrações máximas de 0,05, 0,07 e 0,1 mg kg^{-1} , respectivamente. Aproximadamente 25% das amostras de polpa das frutas foram positivas para pelo menos um pesticida. Dos pesticidas detectados com uso autorizado no maracujá, nenhum ultrapassou o LMR estabelecido para a cultura. Cerca de 63% das amostras comerciais de polpa congelada foram positivas, indicando possível contaminação no processo industrial. Quatro amostras de farinha de maracujá continham resíduos de pesticidas, principalmente metamidofós. O processo de desidratação da casca aumentou os níveis de resíduos iniciais em até 15 vezes (imidacloprido). As exposições crônica e aguda estimadas não indicaram preocupação à saúde dos consumidores brasileiros, sendo maior para o metamidofós (0,01% da IDA) e carbendazim (0,14% da ARfD) pelo consumo de suco e de 1,3% da IDA e da ARfD do metamidofós pelo consumo de farinha. Porém, o uso ilegal de pesticidas na cultura do maracujá indica que os agricultores não estão seguindo as boas práticas agrícolas, provavelmente por não contarem com uma boa assistência técnica no campo.

Palavras-chave: LC-MS/MS, GC-MS/MS, maracujá, suco, farinha de maracujá.

1. Introdução

O gênero *Passiflora* é o maior da família Passifloraceae e corresponde a mais de 500 espécies, as quais são conhecidas pelos seus frutos comestíveis (maracujá), flores ornamentais e propriedades farmacêuticas (Panelli et al., 2018). O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá, com ao menos 140 espécies nativas, principalmente *Passiflora edulis*, responsável por 98% da produção brasileira (Ferreira, 2005; Cervi, 2006; Faleiro et al., 2008). O suco de maracujá é o principal produto industrial, e a casca, responsável por aproximadamente 60% do peso total do fruto, tem sido foco de estudos por apresentar bom valor nutricional, incluindo fibras solúveis (pectinas e mucilagens), vitamina B3, cálcio e fósforo (Córdova et al., 2005). A ingestão de farinha da casca tem sido testada no tratamento de pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo II e obesidade (Janebro et al., 2008; Queiroz et al., 2012; Ramos et al., 2007; Medeiros et al., 2009).

O uso de pesticidas é atualmente a principal estratégia na agricultura para controle de pragas que comprometem a produtividade e a qualidade dos alimentos, como insetos, fungos e ervas daninhas (FAO/WHO, 2020). No Brasil, 33 pesticidas de diferentes grupos químicos são registrados para uso na cultura do maracujá, incluindo mancozebe e metiram (ditiocarbamatos), imidacloprido (neocotinoide), deltametrina (piretróides), difeconazol (triazol), e piraclostrobinina (estrobilurina) (ANVISA, 2021; Tabela S1, Material Suplementar). O monitoramento dos níveis de resíduos desses compostos nos alimentos é importante para verificar o uso das boas práticas agrícolas no campo, incluindo o uso de pesticidas registrados na cultura e se os níveis não ultrapassam os limites máximos de resíduos (ANVISA, 2019). Adicionalmente, os resultados são utilizados para avaliar a exposição humana a pesticidas e o potencial risco para a saúde (Jardim et al, 2018). No único estudo que avaliou pesticidas em maracujá no Brasil, cerca de 25% das 55 amostras analisadas foram positivas para ditiocarbamatos (Mozzaquatro et al., 2019).

As primeiras etapas do método analítico para determinação dos níveis de resíduos de pesticidas de grupos químicos distintos em alimentos (método multirresíduos) são a extração do analito e a limpeza (*clean-up*) da amostra. O método QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*) tem sido amplamente utilizado desde que foi introduzido por Anastassiades et al. (2003). Inicialmente desenvolvido para análise de frutas, o método se baseia na extração com acetonitrila,

seguida de partição com sais e limpeza por extração em fase sólida dispersiva (*d*-SPE) (Anastassiades et al., 2003). Versões adaptadas foram desenvolvidas posteriormente pelo mesmo grupo de pesquisa, como o QuEChERS acetato, com adição de aceto de sódio e ácido acético durante a extração (Lehotay, 2005), e o QuEChERS citrato, com adição de Na₂HCit e Na₃Cit (Anastassiades et al., 2007). Outras modificações nesta técnica têm sido descritas por outros autores, como a substituição dos sorbentes, com uso de octadecilsilano (C₁₈) (Dankyi et al., 2015), florisil (Volpatto et al., 2016; Kemmerich et al., 2018), C₁₈, florisil e alumina (Cerqueira et al., 2014). Também ocorrem substituições relacionadas ao solvente extrator, como o uso de acetato de etila (Aysal et al., 2007; Banerjee et al., 2007; Sahoo, 2011; Chen et al., 2011; Jardim et al., 2014; Grande-Martinez et al., 2016) e acetonitrila acidificada/acetato de etila (70:30) (Tette et al., 2016).

Dentre as técnicas para identificação e quantificação dos resíduos de pesticidas pertencentes a diferentes grupos químicos nas diferentes matrizes de alimentos, aquelas que utilizam a cromatografia líquida (LC) ou gasosa (GC) acoplada a detectores de espectrometria de massas (MS) são as mais utilizadas nas últimas duas décadas, incluindo LC-MS/MS (Dankyi et al., 2015; Valera-Tarifa, 2020), UHPLC-MS/MS (Carneiro et al., 2013; Lee et al., 2018; Kemmerich et al., 2019), LC-QTOF (Munaretto et al., 2016), UHPLC-Orbitrap-MS (Concha-Meyer et al., 2019), GC-MS (Farajzadeh et al., 2019) e GC-MS/MS (Grande-Martinez et al., 2016).

No melhor do nosso conhecimento, não existem métodos multirresíduos para determinação de pesticidas que inclua a matriz maracujá e dados de resíduos nessa cultura são escassos no Brasil e no mundo. Este estudo teve como objetivo validar método multirresíduos para determinação de 80 pesticidas multiclases na casca e polpa de maracujá por LC-MS/MS e GC-MS/MS, e analisar amostras reais de maracujá obtidas de produtores de diferentes regiões do Brasil e de polpa congelada e farinha de maracujá comercializadas no país.

2. Materiais e Métodos

2.1. Químicos e reagentes

Acetato de etila (AcEt), acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) grau-HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany), e acetona da Dinâmica (Brasil).

Tolueno grau-HPLC foi obtido da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, USA), ácido acético e acetato de sódio anidro (99,5 %) da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ), sulfato de magnésio anidro foi obtido da Sigma-Aldrich ($\geq 99,5$ %) (St. Louis, MO), PSA (primary-secondary amine) foi obtido da Supelco (Bellefonte, PA), e formiato de amônio da Fluka (Buchs, Switzerland).

Padrões analíticos e metabólitos (pureza de 94 a 100%) de 80 pesticidas investigados no estudo foram adquiridos da Accu Standard (USA) (Anexo 1). Soluções mãe individuais dos pesticidas (1 mg mL^{-1}) foram preparadas em 10 mL (balões volumétricos calibrados com certificação “A”) em tolueno, acetona, MeOH, ou AcEt, de acordo com a solubilidade e estabilidade de cada composto. Soluções de trabalho de mistura ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) de 50 analitos determinados por LC-MS/MS (carbamatos, triazóis, organofosforados e outros grupos químicos) foram preparadas em metanol, e de 30 analitos determinados por GC-MS/MS (organofosforados, piretróides e outros grupos químicos) foram preparados em AcEt. A solução de mistura foi diluída para preparação de soluções de trabalho, e todas as soluções preparadas foram identificadas e armazenadas em *vial* âmbar a -15 °C.

2.2. Extração e *clean-up*

O método utilizado nesse estudo se baseou no método QuEChERS modificado desenvolvido por Jardim et al. (2014), que utiliza acetato de etila como solvente de extração. Em resumo, 15 g de amostra previamente homogeneizada (casca ou polpa de maracujá) foram pesadas em tubo falcon de 50 mL, adicionados 15 mL de AcEt (1% de ácido acético), o tudo agitado manualmente por 1 minuto, 6 g de MgSO_4 e 1,5 g de H_3COONa acrescentados, novamente agitação manual, e o tubo levado a centrifugação (3500 rpm/5min.). 6 mL de fase orgânica foram transferidos para tubo falcon de 15 mL contendo PSA e MgSO_4 (300 e 900 mg, respectivamente), seguido de agitação manual, 1,5 mL do extrato foram transferidos para *vial*, evaporados sob N_2 a temperatura ambiente, os resíduos ressuspensos em MeOH:H₂O (50:50) e filtrados com filtro de 0,45 μm para injeção no LC-MS/MS. Para as análises em GC-MS/MS, os extratos purificados foram ressuspensos com AcEt e injetados. Para análise das amostras de farinha de maracujá, 2 g foram previamente hidratadas com 13 mL de água Milli-Q por 30 minutos.

2.3. LC-MS/MS

As análises em LC-MS/MS foram realizadas utilizando um sistema Shimadzu LC (Kyoto, Japan), acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo 4000QTRAP (SCIEX, Framingham, MA, USA), com fonte *TurboIonSpray* com ionização ESI (*Electrospray Ionization*) no modo positivo. Os dados foram adquiridos pelo software de controle Analyst® V 1.5.2 (SCIEX).

Os parâmetros do MS/MS para cada analito foram otimizados através de infusão direta das soluções dos padrões analíticos (50–200 ng mL⁻¹; dissolvidos em MeOH/H₂O, contendo formiato de amônio, 5 mM) no espectrômetro de massas, com fluxo de 10 µL/min. Para separação cromatográfica, foi utilizada uma coluna *Synergi 4u Fusion RP 80 A 50 x 2.00 mm 4 micron (Phenomenex)* com pré-coluna (*Fusion-RP 4x2.0 mm*). O forno operou em temperatura de 40 °C, e as fases móveis foram: (A) água:ACN (80:20) + 5 mmol L⁻¹ formiato de amônio e (B) MeOH + 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio. A vazão foi de 0,25 mL/min, com gradiente de eluição de 0-10 minutos até 90% de B, mantendo entre 10-13 minutos, e em 13-13,1 minutos retorna-se a 0% de B. O tempo total de análise foi de 18,1 minutos. Os dados foram adquiridos no modo Scheduled MRM (*Multiple-Reaction-Monitoring*). As condições de otimização da fonte de íons foram: curtain gas de 20 psi; nitrogen collision gas como alto; ion spray voltage de 4500 V; temperatura de 450 ° C; ion source gas (GS1 e GS2) de 40 psi. Os parâmetros dos 50 analitos no sistema LC-MS/MS estão mostrados na Tabela S2. Para cada analito foram selecionadas duas transições, uma de quantificação e uma de qualificação).

2.4. GC-MS/MS

O equipamento Trace GC Ultra (Thermo Scientific) com injetor de temperatura de vaporização programada (PTV) acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Quantum XLS, Thermo Scientific) foi usado no estudo. Uma coluna TR-Pesticide II (Thermo Scientific) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm ID, precedida de coluna guarda (5m x 0,25 mm) foram usada na separação cromatográfica, com fluxo de 1,2 mL/min de gás hélio (99,99% de pureza) como gás de arraste. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização positiva, e os dados foram adquiridos usando monitoramento de reação selecionada (selected reaction monitoring, SRM). Argônio (1,5 mTorr) foi usado como gás de colisão e a temperatura da fonte de íons

foi de 250 °C. O volume de injeção foi de 1 µL no modo splitless. Inicialmente os padrões analíticos foram inseridos no espectrômetro de massas por meio de injeções no modo *full scan* na concentração de 1000 ng mL⁻¹. Após análises qualitativas, por meio de comparações dos espectros de massas dos padrões analíticos com a library NIST (Versão 2.0, Thermo) e identificação do tempo de retenção de cada um através da separação cromatográfica, o método SRM foi criado. A Tabela S3 mostra os parâmetros otimizados para determinação de 30 analitos no sistema GC-MS/MS. Para cada analito foram selecionados dois íons produtos, um de quantificação e um de qualificação, a partir de um mesmo íon precursor ou a partir de íons precursores distintos.

2.5. Validação do método

A validação do método foi realizada de acordo com as recomendações preconizadas por SANTE 11813/2017. Amostras de maracujá de cultivo orgânico provenientes da Bahia e do Distrito Federal foram utilizadas como branco. A seletividade foi avaliada analisando os cromatogramas no LC-MS/MS e GC-MS/MS de amostras branco e fortificada, verificando a existência de interferentes com mesmo tempo de retenção que os pesticidas de interesse. A linearidade foi avaliada para cada analito em cinco níveis de concentração, três repetições, usando calibração externa em matriz, ou seja, o extrato da amostra branco foi fortificado com solução de trabalho de mistura contendo os analitos do escopo. A curva de calibração em matriz foi usada para compensar quaisquer efeitos matriz que podem ocorrer. Os parâmetros lineares da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, a presença de *outliers* verificada pelo teste de Grubbs, a homogeneidade das variâncias pelo teste de Cochran e o coeficiente de determinação (R²) e a significância da regressão obtida pela ANOVA. Para dados heterocedásticos, diferentes fatores de ponderação foram testados e aquele que produziu a menor soma de erros relativos foi escolhido para a regressão. As faixas de concentração das curvas de calibração (cinco pontos) no sistema LC-MS/MS variaram de 20 a 500 ng mL⁻¹ e no sistema CG-MS/MS de 20 a 1100 ng mL⁻¹.

Os ensaios de recuperação dos analitos em cada matriz foram avaliados pela comparação das áreas das amostras fortificadas em 4 ou 3 níveis diferentes com a área da matriz compatível com os padrões externos, expressa em %. O experimento foi

realizado no mesmo dia, pelo mesmo analista, em cinco replicatas. A repetibilidade foi expressa como desvios padrão relativo (% RSDr). A precisão intermediária foi avaliada pela análise de amostras fortificadas em 4 ou 3 níveis de concentração, pelo mesmo analista, em dias diferentes (% RSDp). Para cada pesticida, o LOQ foi definido como o nível mais baixo para o qual o método foi validado de forma satisfatória (recuperação entre 70 e 120% e RSDr e RSDp \leq 20%). Todas as réplicas usadas para validação foram preparadas a partir de soluções de trabalho de mistura.

2.6. Amostras

Foram obtidas 55 amostras de maracujá (*P. edulis*) diretamente de 51 produtores nos estados do Rio de Janeiro, Goiás e Bahia, e no Distrito Federal, cultivados em sistema convencional, no período de fevereiro de 2016 a fevereiro de 2018, cobrindo duas safras (Mozzaquatro et al., 2019). Ao chegarem no laboratório, as amostras de frutos de maracujá foram divididas em duas porções, sendo que uma delas foi submetida à lavagem em água corrente por cerca de 1 minuto. Os frutos lavados e não lavados foram congelados e posteriormente separados manualmente em casca, polpa e semente, com auxílio de faca e peneira, tomando cuidado para evitar contato entre a polpa e a parte externa da casca. Polpa e semente foram congeladas novamente logo após a separação. As cascas foram cortadas em pequenos pedaços, trituradas em liquidificador para homogeneização da amostra. Todas as amostras foram mantidas congeladas até o momento da análise. As sementes não foram analisadas nesse estudo.

Adicionalmente, em 2020 foram adquiridas em lojas de produtos naturais e supermercados no Distrito Federal 30 amostras de polpa de maracujá congelada de 11 marcas diferentes e 12 amostras de farinha da casca de diferentes marcas. As amostras de polpa congelada foram armazenadas a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e as amostras de farinha em temperatura ambiente ($23\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento da análise.

Durante as análises das amostras, controles fortificados (QC) e branco de cada matriz contendo todos os analitos do escopo, com duas replicatas autênticas em pelo menos dois níveis de fortificação (5 e $10\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$) para cada matriz foram inseridas nos *batches* de análise nos sistemas LC-MS/MS e GC-MS/MS. Os dados adquiridos serviram para avaliar a performance do método validado numa análise de rotina.

A partir das concentrações de pesticida detectadas nas amostras de casca e o peso que esta representa, foi estimada a concentração de pesticida no fruto total para

cada amostra. Para o cálculo da concentração no fruto, resíduos detectados em níveis abaixo do LOQ do método foram considerados como $\frac{1}{2}$ do LOQ.

2.7. Fator de processamento

Para a produção da farinha de maracujá, os frutos foram lavados com solução de hipoclorito por 5 minutos e a casca separada manualmente. Uma porção de 100 g da casca foi pesada para posterior processamento e análise, e o restante foi submetido ao processo de secagem em secadora industrial com circulação de ar quente a uma temperatura média de 60 ° C por cerca de 10 horas (teor médio de umidade de 10%) (Srur, 2003). As cascas secas foram trituradas em liquidificador e peneiradas para obtenção da farinha.

Primeiramente foram analisadas amostras de casca da porção não lavada, e aquelas que apresentaram resultados \geq LOQ, foram selecionadas e a porção lavada foi analisada para estimar o impacto de lavagem no nível de resíduos. As cascas lavadas e não lavadas e a farinha produzida foram analisadas para determinar o fator de processamento (FP) da lavagem (casca não lavada \rightarrow casca lavada) e da farinha (casca lavada \rightarrow farinha). O FP é definido como a razão entre as concentrações do pesticida na amostra depois e antes do processamento do alimento (Hamilton et al., 2016).

2.8. Avaliação de risco da exposição

A ingestão crônica e aguda de pesticidas pelo consumo de suco (a partir da polpa congelada comercial) e farinha de maracujá (comercial) foi estimada para os pesticidas detectados em níveis quantificáveis (\geq LOQ) nas amostras, considerando a Equação:

$$\text{Ingestão} = \text{concentração} \times (\text{consumo}/\text{peso corpóreo})$$

O consumo de suco de maracujá e peso corpóreo foram obtidos da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) 2017/2018 conduzida pelo IBGE com 46164 indivíduos a partir de 10 anos de idade. A estimativa considerou o fator de expansão da amostra para representar toda a população brasileira (IBGE, 2020).

Para a avaliação da exposição crônica, considerou-se o consumo médio de suco de maracujá e o peso corpóreo (pc) médio de toda a população da POF 2017/2018 (0,15 g/kg pc), e a concentração média dos pesticidas encontradas nas amostras.

Para a avaliação da exposição aguda (no período de 24 hs), considerou-se o 97,5 percentil (97,5P) de consumo (FAO/WHO, 2020) e o peso médio dos participantes que reportaram o consumo de suco de maracujá (n=3090), ou seja, 4,59 g/kg pc. Na exposição aguda a triazóis, considera-se somente a população de consumidores mulheres em idade gestacional (15 a 45 anos; n=1793), que tem o 97,5P de 12 g/kg pc. Como parâmetro de concentração, considerou-se a concentração máxima encontrada nas amostras. A estimativa da ingestão de pesticidas pelo consumo de suco considerou um fator de diluição da polpa de 70%, que foi aplicado aos níveis de resíduos quantificados nas amostras.

A estimativa da ingestão crônica e aguda a pesticida pelo consumo de farinha considerou a recomendação de consumo nos rótulos dos produtos, que variou entre 1-2 colheres de sopa (15 a 30 g) de 1-3 vezes ao dia (15 a 180g/dia; média de 87 g e 97,5P de 174g). Nos dois casos foram considerados o peso médio da população estimada pela POF 2017/2018 (69,0 kg).

O risco da exposição foi avaliado comparando-se a ingestão estimada com o parâmetro toxicológico de segurança crônico (ingestão diária aceitável, IDA) ou aguda do pesticida (dose de referência aguda, ARfD), quando disponível. Risco pode existir quando a ingestão for maior que a IDA ou ARfD. As IDAs e ARfD foram obtidas da FAO/WHO JMPR utilizadas no estudo estão na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Ingestão diária aceitável (IDA) e dose de referência aguda (ARfD) dos pesticidas considerados para avaliação de risco*

Pesticida	IDA, mg/kg pc	ARfD, mg/kg pc
Acefato	0.03	0.1
Carbendazim	0.03	0.1
Difenonazol	0.01	0.3
Imidacloprido	0.06	0.4
Tebuconazol	0.03	0.3
Malation	0.3	2
Metamidofós	0.004	0.01

Piraclostrobina	0.03	0.7
Pirimifos metílico	0.03	0.2
Trifloxistrobina	0.04	não necessário

<https://www.who.int/foodsafety/publications/jmpr-monographs/en>

3. Resultados

3.1 Validação do método multirresíduos por LC-MS/MS

Os cromatogramas dos brancos das matrizes casca e polpa não mostraram nenhum pico de interferência eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos em avaliação, indicando seletividade satisfatória do método. A Figura 3.1 mostra um cromatograma contendo os 50 pesticidas determinados por LC-MS/MS, onde são monitorados duas transições para cada um dos analitos (Tabela S2).

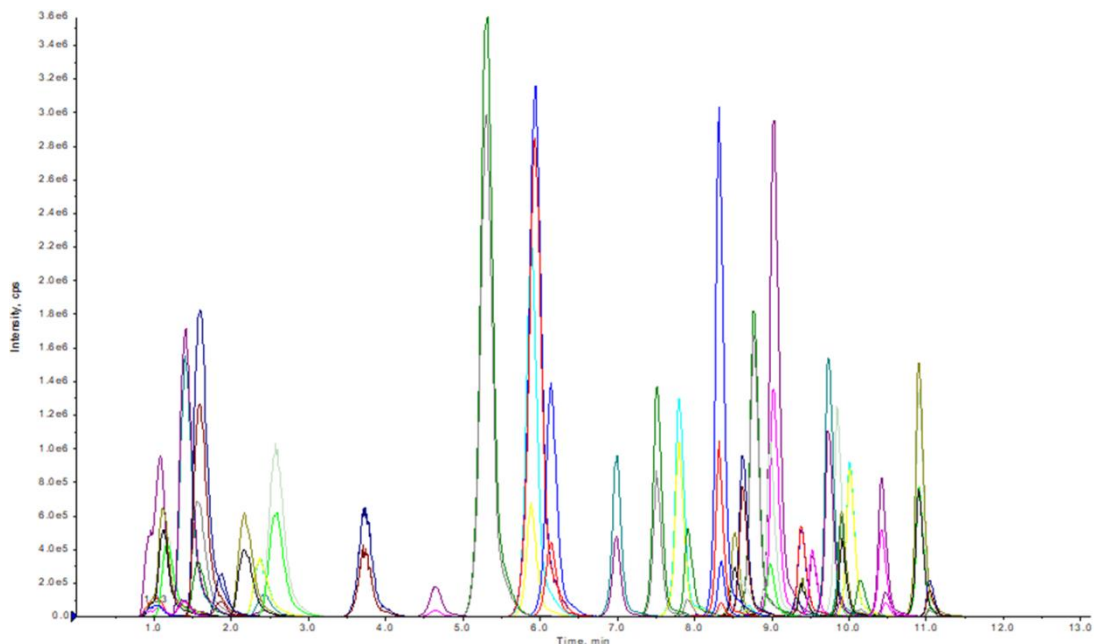


Figura 3.1. Cromatograma do método Scheduled MRM (*multiple-reaction-monitoring*) no sistema LC-MS/MS de uma solução de trabalho de mistura com 50 analitos na concentração de 100 ng mL^{-1} em polpa de maracujá. Os tempos de retenção de cada analito estão mostrados na Tabela S1 (Material Suplementar).

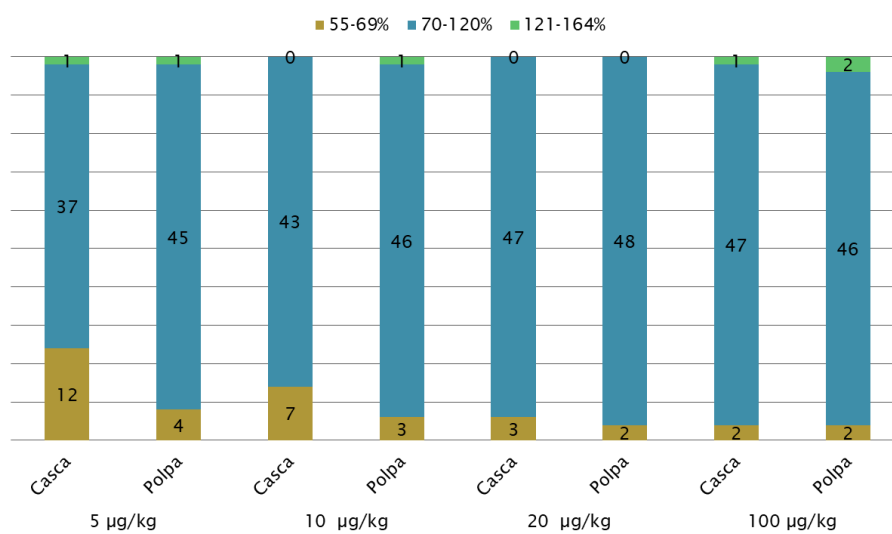
O comportamento dos resíduos das curvas analíticas obtido pelo método dos

mínimos quadrados mostrou homocedasticidade ($C_{\text{calc}} < C_{\text{tab}}; 5;3$) para 39 analitos. Para os demais (heterocedásticos = $C_{\text{calc}} > C_{\text{tab}}; 5;3$) regressões lineares ponderadas foram testadas (Miller e Ambrus, 2000), onde os melhores fatores de ponderação foram selecionados: $1/x$ para carbendazim, carbofurano e pirimicarbe, $1/x^2$ para aldicarbe, azoxistrobina, boscalida, dimetoato e paraoxom-metílico e $1/y^2$ para aldicarbe sulfóxido, metiocarbe e buprofezina. Coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,99 para todos os analitos, as regressões foram significativas ($p < 0,05$), e não houve falta de ajuste para as regressões usadas nos procedimentos de calibração.

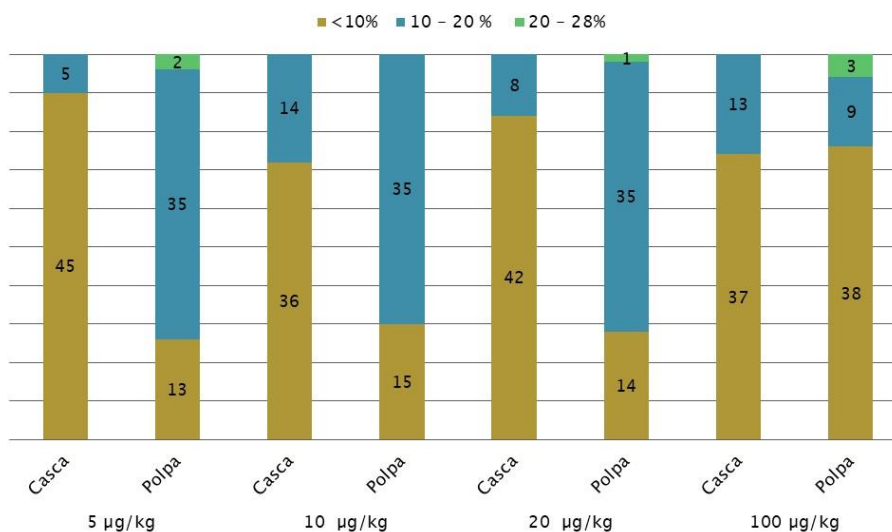
A Figura 3.2 resume os resultados da recuperação e da precisão intermediária (RSD_p) obtidas durante a validação em diferentes concentrações (5; 10; 20 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) para os 50 analitos em casca de maracujá analisados por LC-MS/MS. Os resultados para cada analito, inclusive de repetibilidade (RSD_r), estão mostrados na Tabela S3 (Material Suplementar). A maioria dos analitos obteve recuperações entre 70 e 120% e repetibilidade e precisão intermediárias inferiores a 20%. Para 17 analitos (34%) a recuperação média ($n=5$) foi menor que 70% em pelo menos um nível avaliado, com o menor percentual de recuperação (55%) encontrado para clorpirifós e diazinona no menor nível de fortificação (Tabela S3). Resultados de recuperação foram maiores que 120% para o metidationa nos níveis menor e maior (164 e 133%, respectivamente). A repetibilidade foi menor que 20% para todos os analitos em todos os níveis, e a precisão intermediária $> 20\%$ (21-28%) em pelo menos um nível para seis analitos (aldicarbe-sulfóxido, boscalida, carbofuran-3-OH, cresoxim metílico, metidationa e diazinona, Tabela S3). Estes desvios pontuais dos parâmetros de validação foram considerados aceitáveis e o LOQ para a matriz casca foi definido como 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os analitos, com exceção de diazinona, clorpirifós e metidationa que foi definido como 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A Figura 3.2 também resume os resultados da validação da polpa de maracujá e os valores individuais estão mostrados na Tabela S4 em material suplementar. Resultados de recuperações médias menores que 70% em pelo menos um nível de fortificação foram encontradas para quatro analitos, com metamidofós apresentando os menores percentuais de recuperações (63 a 65%, nos três menores níveis de fortificação), e o percentual médio de recuperação para o triclofon foi de 143% no maior nível. Repetibilidade média entre 22 e 26% foram obtidos para pirimifós,

tebuconazol e triclorfon em um nível de fortificação, e precisão intermediária média acima de 20% para vinte analitos, com cresozim-metílico e metiocarbe apresentando os valores mais altos (29 e 30% no nível de fortificação mais baixa), e ometoato e triclorfon (30 e 35% no nível mais alto) (Tabela S4). Apesar de alguns critérios de validação não estarem de acordo com o preconizado pela legislação para pesticidas, o LOQ foi estabelecido como $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os analitos na matriz polpa de maracujá.



A



B

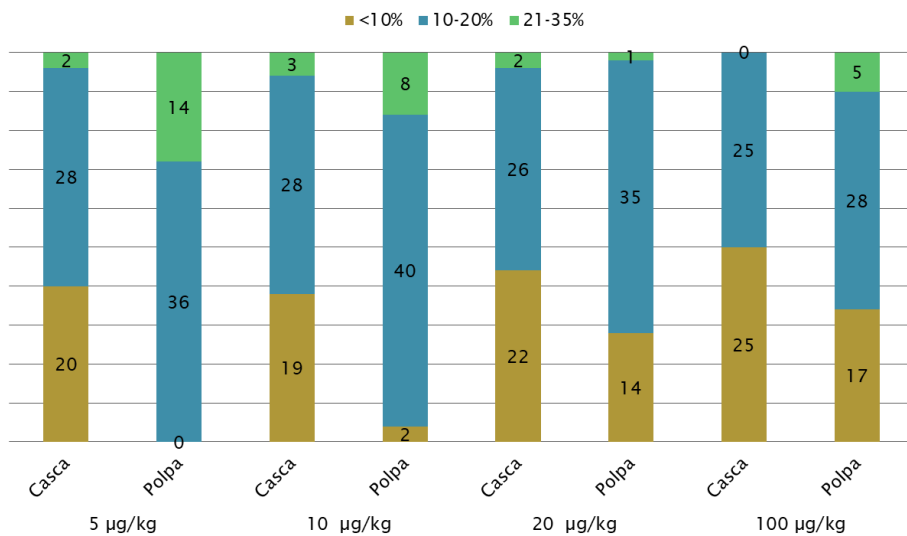


Figura 3.2. Resultados da validação do método para determinação de 50 analitos em casca e polpa de *P. edulis* por LC-MS/MS, em quatro níveis de fortificação. Percentagem de analitos em cada faixa de A: Recuperação; B: Repetibilidade; C: Precisão intermediária.

3.2 Validação do método multirresíduos por GC-MS/MS

O teste de seletividade com amostras branco de casca e polpa de maracujá não mostraram a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos inseridos no método SRM do GC-MS/MS. A Figura 3.3 mostra um cromatograma incluindo os 30 analitos analisados por SRM.

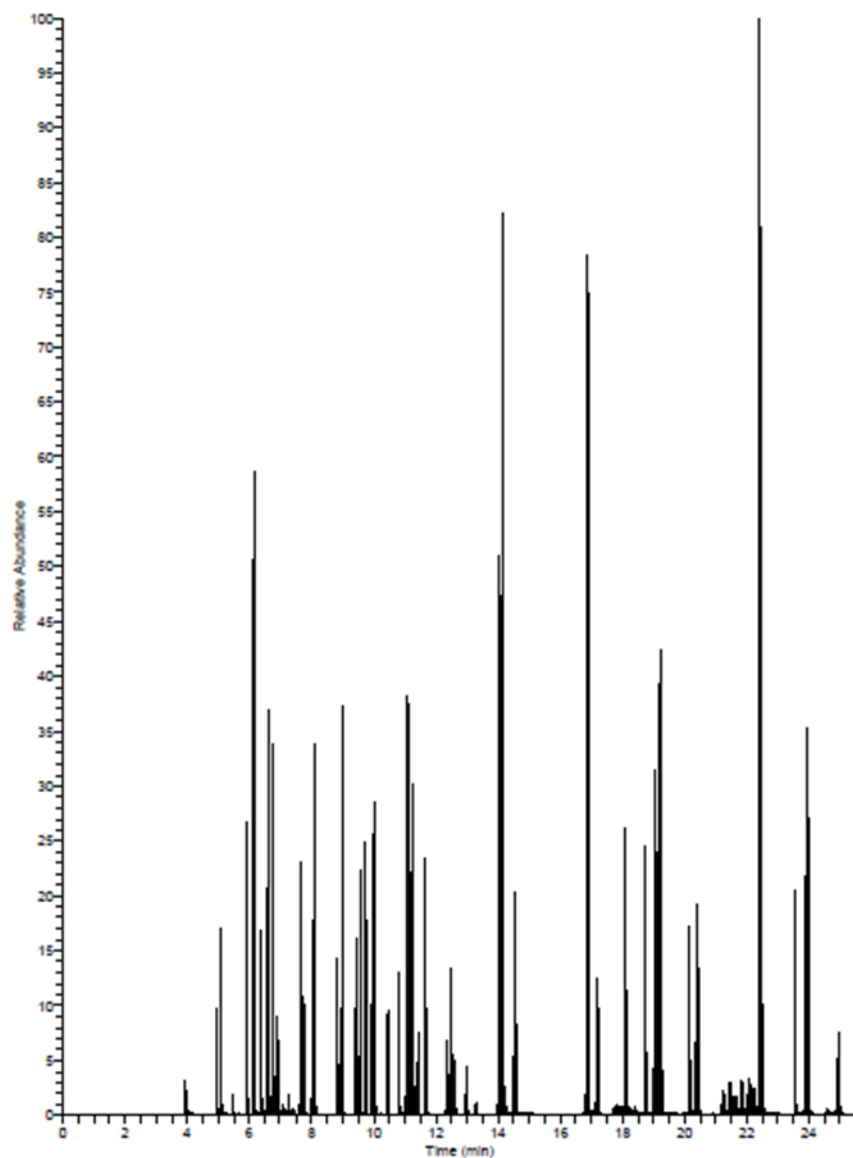


Figura 3.3. Cromatograma dos íons totais (TIC) do método SRM no sistema GC-MS/MS de uma solução de trabalho de mistura com 30 analitos na concentração de 1100 ng mL^{-1} em casca de maracujá. Os tempos de retenção de cada analito estão mostrados na Tabela S2 (Material Suplementar).

As análises das curvas analíticas de calibração externa em matriz mostraram comportamento homocedástico ($C_{calc} < C_{tab}$; 5;3) para todos os analitos inseridos no método. Coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,99, regressões foram significativas ($p < 0,05$), e não houve falta de ajuste para as regressões usadas nos procedimentos de calibração.

Um resumo dos dados dos resultados de recuperação e precisão intermediária nas matrizes casca e polpa de maracujá são mostrados na Figura 3.4, e os resultados de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária para cada analito nas matrizes casca e polpa estão apresentados nas Tabelas S5 e S6, respectivamente. Com relação à matriz casca de maracujá, recuperações médias ($n=5$) inferiores a 70% (valores entre 61 e 69%) foram obtidas apenas para 4 analitos. A recuperação de mevinfós foi de 61% no menor nível de fortificação e nenhum dos analitos obteve recuperação média acima de 120%. A precisão intermediária foi satisfatória para maioria dos analitos, com valores de RSD_p inferiores a 20%, com exceção de fentiona, λ -cialotrina e parationa-metflica, cujos valores foram entre 22 e 24% em pelo menos um dos níveis de fortificação.

Para matriz polpa de maracujá, recuperação média inferior a 70% foi obtida apenas para o azinfós metílico (69%). A repetibilidade foi inferior a 20% para todos os analitos, com exceção de azinfós-metílico, que obteve 31% no maior nível de fortificação e ciflutrina com valores de 33 e 21%, no menor e maior nível de fortificação, respectivamente. Para grande maioria dos analitos, os valores de RSD_p foram inferiores a 20%, com exceção de 4 analitos (até 32% para clortiofós no nível de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$). O valor do LOQ de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ foi definido para as matrizes casca e polpa de maracujá para todos os níveis de fortificação avaliados.

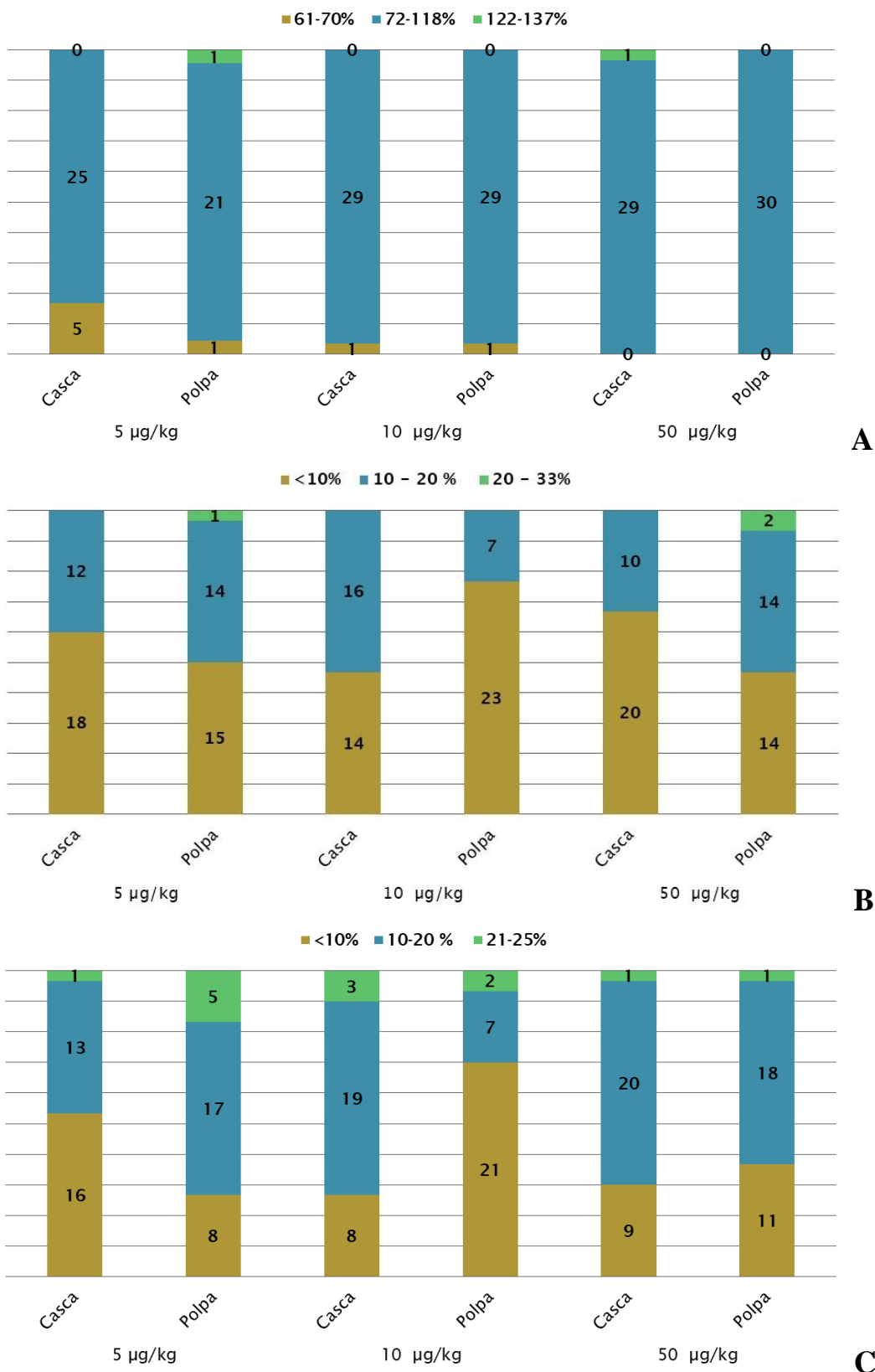


Figura 3.4. Resultados da validação do método para determinação de 30 analitos em casca e polpa de *P. edulis* por GC-MS/MS, em quatro níveis de fortificação. Percentagem de analitos em cada faixa de A: Recuperação; B: Repetibilidade; C: Precisão intermediária

3.3 Amostras de maracujá

Cerca de 60 % das 55 amostras de cascas analisadas foram positivas (n=32) para pelo menos um ingrediente ativo em níveis traços (< LOQ) ou quantificáveis (\geq LOQ). A Tabela 3.2 resume os resultados das amostras positivas na casca, polpa e fruto de maracujá coletadas em diferentes regiões do País, e a Tabela S7 (Material Suplementar) mostra os níveis de resíduos presentes em cada amostra positiva. Os controles de qualidade internos (n = 2), em níveis 5 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, incluídos em cada lote de extração estavam dentro da faixa aceitável para recuperações (65-120%) e repetibilidade (RSDr <20%), confirmando que o método teve um bom desempenho durante a análise de rotina nos dois equipamentos.

Dos 80 analitos avaliados pelos métodos multirresíduos validados neste estudo, 19 foram detectados, dos quais 12 por LC-MS/MS (24% dos 50 analitos investigados) e sete por GC-MS/MS (23,3% dos 30 analitos investigados). Imidacloprido foi o analito que obteve a maior frequência de detecção, presente em 40,6 % das amostras de casca positivas (n=13), com concentração máxima de 0,07 mg kg^{-1} . A segunda maior frequência foi obtida para carbendazim (37,5%; máxima de 0,15 mg kg^{-1}), seguida de metamidofós (25%; 0,30 mg kg^{-1}), λ -cialotrina (21,8%; 0,04 mg kg^{-1}) e acefato (18,7 %; 0,50 mg kg^{-1}).

Cerca de 25% das amostras de polpa (n=14) apresentaram resíduos de pelo menos um dos ingredientes ativos detectados na casca. As concentrações variaram entre < LOQ a 0,09 mg kg^{-1} (acefato). Para todas as amostras analisadas, os níveis detectados na polpa foram inferiores aos da casca, representando em média 13,8% da concentração nas cinco amostras quantificadas. Uma das amostras de casca de maracujá analisada continha sete analitos, sendo dois piretróides (cipermetrina e λ -cialotrina), dois triazóis (difenoconazol e tebuconazol), dois organofosforados (dimetoato e ometoato) e um neonicotinóide (imidacloprido) (Tabela S7). Quando analisada a polpa deste fruto, foi detectado apenas cipermetrina (0,01 mg kg^{-1}) e traços de imidacloprido (< LOQ). Nove amostras de casca apresentaram 4 ou 5 analitos (Tabela S7).

As concentrações máximas estimadas no fruto a partir das concentrações na casca e na polpa variaram de traços (piraclostrobina e tebuconazol) a 0,4 mg kg^{-1} (cipermetrina). Para todos pesticidas com registro de uso autorizado, as concentrações estimadas no fruto de maracujá foram inferiores ao LMR estabelecido.

Tabela 3.2. Pesticidas detectados em 32 das 55 amostras de maracujá analisadas por LC-MS/MS ou GC-MS/MS

Pesticida		Casca			Polpa			Fruto ^b
		≥ LOQ,	Traços,	Max.,	≥ LOQ,	Traços,	Max.,	Max.,
		n	n ^a	mg kg ⁻¹	n	n ^a	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹
Imidacloprido	LC	11	2	0,07	7	1	0,008	0,05
Carbendazim	LC	10	2	0,15	nd	1	nd	0,07
Metamidofós	LC	6	2	0,30	1		0,03	0,20
L-cialotrina	GC	6	1	0,04	nd		nd	0,03
Acefato	LC	6		0,50	5		0,09	0,25
Clorotalonil	GC	5		0,05	1		0,005	0,03
Clorfenapir	GC	5		0,05	nd		nd	0,02
Deltametrina	GC	3		0,02	nd		nd	0,01
Cipermetrina	GC	3		0,5	3		0,01	0,4
Ometoato	LC	3		0,03	nd		nd	0,02
Dimetoato	LC	2		0,2	nd		nd	0,1
Tebuconazol	LC	2		0,02	nd		nd	0,01
Metomil	LC	1	2	0,01	nd		nd	0,006
Difeconazol	LC	1	1	0,005	nd		nd	traços
Profenophos	LC	1		0,01	nd		nd	0,009
Malationa	LC	1		0,02	nd		nd	0,01
Esfenvarelato	GC	1		0,02	nd		nd	0,005
Fenvarelato	GC	1		0,04	nd		nd	0,01
Piraclostrobina	LC		1	Traços	nd		nd	traços

n= número de amostras; nd= não detectado; ^a < LOQ; ^b concentrações no nível de traços foram consideradas como ½ LOQ no cálculo da concentração no fruto total;

3.4 Fator de processamento

Um total de 24 amostras de cascas não lavadas contendo resíduos \geq LOQ foram submetidas ao processo de lavagem, desidratação e moagem até obtenção da farinha de maracujá, para se estimar fator de processamento para casca lavada e para farinha, a partir da razão da concentração de pesticida depois e antes do processo. Os resultados estão mostrados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Resíduos de pesticidas organofosforados, carbendazim e imidacloprido em amostras de casca (N=24) e fatores de processamento (FP) para casca lavada e farinha

Pesticidas	Não lavada	Lavada		Seca, farinha	
	Faixa, mg kg ⁻¹	Faixa, mg kg ⁻¹	FP ^a , faixa (mediana)	Faixa, mg kg ⁻¹	FP ^c , faixa (mediana)
Acefato (n=5)	0,01 – 0,5	0,006 – 0,3	0,2 – 0,6 (0,6)	0,02 – 1,1	2,0 – 5,7 (3,2)
Clorpirifós (n=1)	0,1	0,08	0,7	0,2	1,9
Dimetoato (n=2)	0,04 – 0,1	0,005 – 0,1	0,1 – 0,7 (0,4)	0,06 – 0,4	3,6 – 10 (6,8)
Ometoato (n=3)	0,006 – 0,03	traços ^b – 0,01	0,3 – 0,5 (0,4)	0,02	1,3 – 7,5 (2,8)
Malationa (n=1)	0,02	0,01	0,5	0,07	7,3
Metamidofós (n=5)	0,01 – 0,3	0,005 – 0,1	0,4 – 0,5 (0,4)	0,02 – 0,8	4,0 – 6,8 (6,2)
Organofosforados (N=17)	0,006 – 0,3	0,005 – 0,3	0,1 – 0,7 (0,5)	0,02 – 0,8	1,9 – 10 (4,0)
Carbendazim (n=5)	0,01 – 0,1	0,006 – 0,05	0,2 – 0,5 (0,4)	0,04 – 0,3	5,7 – 12 (6,6)
Imidacloprido (n=10)	0,007 – 0,07	0,006 – 0,07	0,1 – 1,0 (0,6)	0,04 – 0,5	4,5 – 15 (7,6)

^a em relação à concentração na casca não lavada; ^b considerado como $\frac{1}{2}$ LOQ no cálculo do fator de processamento; ^c em relação à concentração na casca lavada

Durante a lavagem das cascas, a concentração de resíduos dos cinco inseticidas organofosforados avaliados foi reduzida de maneira similar (FP entre 0,1 e 0,7), e foram agrupados para estimar o FP do processo de lavagem para o grupo (n=17), com mediana de 0,5 (redução de 50%). O FP para o processo de desidratação para a produção de farinha para os organofosforados variou entre 1,9 e 10, indicando a concentração dos resíduos pela perda de água, com mediana 4.

Redução dos resíduos no processo de lavagem da casca e concentração dos resíduos por desidratação também foram estimados para o carbendazim (FP mediano de 0,4 e 6,6, respectivamente) e imidacloprido (mediana de 0,6 e 7,6, para lavagem e desidratação, respectivamente).

3.5 Amostras de produtos industriais

A Tabela 3.4 mostra os onze analitos detectados em 19 das 30 amostras de polpa de maracujá congelada analisadas (63%) e a Tabela S8 detalha os resultados. Carbendazim foi o pesticida mais frequente, detectado em 57,8% das amostras positivas, seguido de imidacloprido e acefato, ambos detectados em 47% delas. A concentração de carbendazim chegou a $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo a concentração máxima encontrada entre as amostras analisadas. A maioria das amostras tinha mais de um analito detectado, chegando a seis analitos em uma delas (carbendazim, imidacloprido, tebuconazol, malationa, piraclostrobina e trifloxistrobina; Tabela S8).

Das 12 amostras industriais de farinha de maracujá analisadas (somente por LC-MS/MS), quatro continham resíduos de pesticidas, principalmente metamidofós presente em todas as amostras positivas com concentração máxima de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ (Tabela 3.4; Tabela S9). Destas, duas amostras continham, além de metamidofós, imidacloprido ($70 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) e outra pirimifós-metílico ($40 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabela 3.4. Pesticidas detectados (< LOQ ou ≥ LOQ) em amostras comerciais de polpa congelada e farinha de maracujá por LC-MS/MS

Analito	Polpa (N=30)	Farinha (N=12)
	(n) média/max., mg kg ⁻¹	(n) média/max., mg kg ⁻¹
Carbendazim	(12) 0,026/0,1	nd
Acefato	(9) 0,011/0,03	nd
Imidacloprido	(11) 0,005/0,008	(1) 0,007/0,07
Difenoconazol	(4) 0,005/0,006	nd
Tebuconazol	(3) 0,005/0,005	nd
Piraclostrobina	(3) 0,004/0,008	nd
Malationa	(2) 0,005/0,007	nd
Metamidofós	(1) 0,008/0,008	(4) 0,004/0,05
Trifloxistrobina	(1) 0,005/0,005	nd
Azoxistrobina	(1) < LOQ	nd
Pririmifós-metílico	Nd	(1) 0,004/0,04

n: número de amostras positivas; < LOQ; nd: não detectado; levels <LOQ foram considerado como ½ LOQ

3.6 Avaliação de risco

A Tabela 3.5 resume os resultados da avaliação de risco crônico e agudo pelo consumo de suco de maracujá feito a partir da polpa comercial. Dentre os 9 pesticidas avaliados, ingestão crônica contribuiu no máximo com 0,009% da IDA e a ingestão aguda representou no máximo 0,11% da ARfD para o metamidofós.

Tabela 3.5. Avaliação do risco crônico (%IDA) e agudo (% ARfD) da exposição de pesticidas quantificados pelo consumo de amostras de polpa de maracujá comercial

Pesticida	Exposição crônica		Exposição aguda	
	Ingestão ^a , mg/kg pc /dia	% IDA ^c	Ingestão ^b , mg/kg pc	% ARfD ^c
Acefato	4,8 x10 ⁻⁷	0,002	4,1 x10 ⁻⁵	0,041
Carbendazim	1,2 x10 ⁻⁶	0,004	1,4 x10 ⁻⁴	0,138
Difenonazol	2,1 x10 ⁻⁷	0,002	2,2 x10 ⁻⁵	0,007
Imidacloprido	2,4 x10 ⁻⁷	0,000	1,1 x10 ⁻⁵	0,003
Malation	2,1 x10 ⁻⁷	0,000	9,7 x10 ⁻⁶	0,000
Metamidofos	3,6 x10 ⁻⁷	0,009	1,1 x10 ⁻⁵	0,11
Tebuconazol	2,3 x10 ⁻⁷	0,001	6,9 x10 ⁻⁶	0,002 ^d
Piraclostrobina	1,5 x10 ⁻⁷	0,001	1,1 x10 ⁻⁵	0,002
Trifloxistrobina	2,2 x10 ⁻⁷	0,001	e	e

^a concentração média listada na Tabela 3.3; ^a concentração máxima listada na Tabela 3.3; ^c IDA e ARfD listados na Tabela S11; ^d mulheres em idade gestacional (15-45 anos); ^e ARfD não necessária

A Tabela 3.6 resume os resultados da avaliação de risco crônico e agudo pelo consumo de farinha de maracujá comercial. Dentre os 3 pesticidas avaliados, ingestão crônica e aguda contribuíram no máximo a 1,3 % da IDA e da ARfD do metamidofós, respectivamente.

Tabela 3.6. Avaliação do risco crônico (%IDA) e agudo (% ARfD) da exposição de pesticidas quantificados pelo consumo de farinha de maracujá comercial

Pesticida	Exposição crônica		Exposição aguda	
	Ingestão ^a , mg/kg pc /dia	% IDA ^c	Ingestão ^b , mg/kg pc	% ARfD ^c
Imidacloprido	8,8 x10 ⁻⁵	0,14	0,0002	0,04
Metamidofós ^b	5,4 x10 ⁻⁵	1,3	0,0001	1,3
Pirimifós metil	5,0 x10 ⁻⁵	0,17	0,0001	0,05

^a concentração média listada na Tabela 3.4; ^b concentração máxima listada na Tabela 3.4; ^c IDA e ARfD listados na Tabela 3.1.

4. Discussão

Os valores de LOQ estabelecidos neste trabalho, de 5 a 10 µg kg⁻¹ são semelhantes a outros estudos que utilizaram detectores seletivos ou espectrometria de massas (Muñoz et al., 2017; Carneiro et al., 2013; Ferreira et al., 2016; Machado et al., 2017). Kemmerich et al. (2019) obtiveram valores de LOQ de 2,5 µg kg⁻¹ para 90% dos 170 analitos monitorados no método multirresíduos validado na matriz pêra utilizando UHPLC-MS/MS, enquanto valores superiores a 10 µg kg⁻¹ também foram descritos nos equipamentos GC-ECD/GC-MS/MS, GC-MS e UHPLC-Orbitrap/MS (Paz et al., 2015; Volpatto et al., 2016; Concha-meyer et al., 2019).

As recuperações de 34% dos analitos analisados por LC-MS/MS foram menores que 70% em pelo menos um nível avaliado. Dentre eles, diazinona e metidationa, analitos que não foram detectados nas amostras analisadas neste trabalho, e o clorpirifós, que foi detectado em apenas uma amostra com nível superior ao LOQ estabelecido para este analito (10 µg kg⁻¹) (Tabela S7). O metamidofós apresentou as menores recuperações na matriz polpa de maracujá (63 – 70%), porém o RSD_r foi ≤ 20% (Tabela S4). Para compostos de alta polaridade, como é o caso do metamidofós, é possível que não ocorra um particionamento total durante a extração com acetato de etila (Jardim et al., 2014). Resultados semelhantes foram reportados por outros autores (Berrada et al., 2010; Lehotay et al., 2010; Mol et al., 2007; Jardim et al., 2014). Porém, outros estudos reportam boas recuperações para metamidofós com uso de outras técnicas de extração e acetonitrila como solvente extrator (Ferrer et al., 2011; Kemmerich et al., 2019).

Os LOQs do método analítico encontram-se abaixo dos valores de LMR estabelecidos pela legislação brasileira para a cultura do maracujá (ANVISA, 2021). Dos 19 analitos detectados, apenas seis têm uso permitido para maracujá (clorfenapir, difenoconazol, λ -cialotrina, imidacloprido, piraclostrobina e tebuconazol) e os níveis de pesticidas presentes nas amostras de fruto de maracujá analisadas estavam abaixo do LMR estabelecido pela ANVISA (2021). Imidacloprido e carbendazim foram os pesticidas mais detectados nas amostras de maracujá, presentes em 23,6 e 21,8% das amostras analisadas, respectivamente.

Dois pesticidas encontrados nas amostras tiveram seus registros cancelados no Brasil (ometoato e metamidofós). O ometoato, metabólito do dimetoato, teve seu registro cancelado no Brasil há quase duas décadas (ANVISA, 2002). Nesse estudo, duas amostras de casca de maracujá continham dimetoato e ometoato, semelhante ao que foi reportado por outros autores em amostras de frutas (Jardim et al., 2014) e suco (Ferrer et al., 2011). O metamidofós, metabólito do acefato, teve seu registro cancelado no Brasil em 2011 (ANVISA, 2011), e os dois foram detectados juntos em 5 amostras de casca, resultados também reportados por Jardim et al. (2014) em frutas tropicais. Em ambos os casos (ometoato/dimetoato e metamidofós/acefato), todas as amostras têm resíduos ilegais, já que o uso de dimetoato ou acefato não é permitido no maracujá. Por outro lado, o tiofanato-metílico, não incluído nesse estudo, tem uso permitido para cultura do maracujá (LMR= 0,5 mg kg⁻¹), mas seu metabólito carbendazim foi o segundo mais detectado nas amostras de casca, com nível máximo de 0,1 mg kg⁻¹. Nesse caso, não se pode afirmar que os resíduos de carbendazim são ilegais.

O uso de pesticidas não autorizados para cultura é bem comum no Brasil, sendo reportado pelos programas de monitoramento brasileiros, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), de responsabilidade da ANVISA, e o Plano Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes em produtos de origem vegetal (PNCRC/Vegetal), sob responsabilidade do MAPA. Dados desses dois programas relativos ao período de 2001 a 2010 indicaram que 72% das irregularidades encontradas se referiram ao uso de pesticida não autorizado para a cultura (Jardim e Caldas, 2012). Resultados similares foram encontrados no PARA 2017/2018, que analisou 4616 amostras de 14 alimentos, das quais 5 frutas (laranja, abacaxi, manga, goiaba e uva) (ANVISA, 2019). Nesse período, imidacloprido,

tebuconazol e carbendazim foram os pesticidas mais detectados.

Enquanto 32 amostras de casca analisadas continham resíduos de pelo menos um analito (~60%), 14 amostras de polpa (25%) continham resíduos. Esse percentual é bem superior àquele encontrado para fungicidas ditiocarbamatos nas mesmas amostras por Mozzaquatro et al (2019), quando apenas uma polpa analisada continha resíduos ($0,09 \text{ mg kg}^{-1} \text{ CS}_2$), o que é esperado, já que os ditiocarbamatos não são sistêmicos e permanecem na casca. Com o objetivo de evitar a contaminação cruzada, a polpa foi separada manualmente sem entrar em contato com a parte externa da casca, que recebe diretamente a aplicação foliar do pesticida. Isso indica que o resíduo encontrado na polpa no presente estudo é devido a ação sistêmica do pesticida, que se transcolou da casca para a polpa, e detectados em concentrações bem menores que as da casca. Juraske et al. (2012) na Colômbia reportaram que os níveis detectadas de vários pesticidas na polpa de maracujá, para qualquer período de coleta, também foram inferiores às do fruto inteiro, com redução de até 85% do seu valor.

O alto percentual de amostras de polpa de maracujá comercial que continham algum resíduo de pesticida (63%) indica uma possível contaminação cruzada durante o processo industrial, onde ocorre esmagamento dos frutos para extração da polpa (Embrapa, 2016). É provável que resíduos ainda presentes na casca após a lavagem dos frutos sejam transferidos para a polpa, já que esse processo pode não remover 100% dos resíduos presentes, como foi observado nesse estudo. Por outro lado, a lavagem de frutos de maracujá com água corrente reduziu em até 100% os resíduos de ditiocarbamatos (Mozzaquatro et al., 2019), fungicidas não sistêmicos.

Jardim et al. (2014) também detectaram resíduos de pesticidas na maioria das amostras de polpas comerciais de caqui, pêsego e goiaba. Essas frutas têm casca bem fina, o que aumenta a transferência dos pesticidas até a polpa.

Além dos pesticidas estarem mais presentes na casca, sua desidratação contribui para aumentar a concentração inicial dos resíduos de pesticidas presentes, o que já é descrito na literatura (Gonzalez-Rodríguez et al., 2011). As amostras de farinha comercial analisadas nesse estudo continham três dos 30 analitos investigados por LC-MS/MS, o metamidofós e imidacloprido, também detectados nas amostras de casca, e o pirimifós-metílico, somente detectado nessa matriz em todo estudo. Além do número pequeno de compostos detectados na farinha, os níveis encontrados foram menores que aqueles esperados a partir dos níveis encontrados na casca, levando em

consideração o FP. Por exemplo, considerando o nível máximo de metamidofós na casca ($0,30 \text{ mg/kg}^{-1}$) e os processos de lavagem e secagem ($\text{FP}_{\text{med.}} = 0,4$ e $6,2$), o nível esperado de metamidofós na farinha seria de $0,22 \text{ mg kg}^{-1}$, menor que o valor máximo encontrado na amostra comercial ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$). Apesar dessa conclusão ser baseada na análise de um número limitado de amostras de farinha analisadas (12), é provável que os frutos destinados para a produção desse produto venham de uma produção agrícola sem uso intensivo de pesticidas.

Considerando os dados de consumo e peso corpóreo da POF 2017/2018 e concentração adquiridos neste estudo, foi possível estimar a exposição crônica e aguda frente o consumo de suco de maracujá, para 9 e 8 pesticidas, respectivamente. Os resultados apontam que é improvável haver risco aos consumidores frente o consumo de suco. Da mesma forma, a avaliação da ingestão crônica e aguda pelo consumo de farinha de maracujá comerciais (de acordo com a recomendação do fabricante) para os 3 pesticidas detectados não representa risco para a saúde dos consumidores.

Poucos estudos no Brasil avaliaram o risco da exposição aguda a pesticidas. Jardim et al. (2014) conduziram um estudo de avaliação de risco aguda cumulativa para inseticidas organofosforados e piretróides pelo consumo de caju, goiaba, caqui e pêsego. A goiaba apresentou as maiores porcentagens de ARfD para exposição aos organofosforados (45%) e piretróides (12%). Nos últimos resultados do PARA (2017/2018), a ingestão de carbendazim pelo consumo de abacaxi representou até 100% da ARfD, e a ingestão de metamidofós representou no máximo 40% da ARfD para os alimentos analisados (ANVISA, 2019).

Um estudo conduzido na Bélgica em 2008 incluiu o maracujá dentre as frutas que excederam o LMR europeu para o fungicida difenoconazol, detectado entre os pesticidas mais frequentes (Claeys et al., 2011). Os resultados do estudo de avaliação de risco demonstraram que a exposição crônica de indivíduos acima de 15 anos de idade não representa preocupação com a saúde. Para maioria dos resíduos de pesticidas estudados, a exposição é cerca de cem vezes menor que a IDA (Claeys et al., 2011).

5. Conclusão

Este é o primeiro estudo de validação de método multirresíduos usando LC-MS/MS e GC-MS/MS em matrizes de casca e polpa de maracujá, como também é o

primeiro que reporta dados de pesticidas por método multiresíduos em amostras de maracujá e seus produtos no Brasil. O método incluiu a determinação de 80 pesticidas e metabólitos e foi satisfatoriamente validado com LOQ de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, com exceção de diazinona, clorpirifós e metidationa por LC-MS/MS ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$).

A presença de pelo menos um analito foi detectada em 60 % das 55 amostras de maracujá analisadas. Imidacloprido, carbendazim e metamidofós foram os mais frequentes, mas apenas o imidacloprido tem uso permitido para a cultura do maracujá. O processo de lavagem reduz a concentração de pesticidas em até 90%, mas, como esperado, o processo de desidratação da casca pode concentrar o resíduo em até 15 vezes (imidacloprido), informação que deve ser considerado quando este subproduto for utilizado para fins alimentares. Enquanto as amostras de polpa obtidas dos maracujás apresentaram baixa frequência de detecção dos pesticidas analisados, mais de 60% das polpas congeladas adquiridas no comércio foram positivas para algum analito, indicando transferência de pesticidas durante o processamento industrial de extração da polpa. Os riscos estimados da exposição aos pesticidas avaliados pelo consumo dos produtos industriais não indicaram preocupação à saúde dos consumidores brasileiros.

A alta incidência de uso de pesticidas não autorizados pela legislação brasileira para essa cultura indica que o agricultor pode não estar tendo a assistência adequada no campo que o oriente na aplicação das boas práticas agrícolas. O monitoramento desta cultura pelos programas brasileiros é importante, uma vez que o nosso país é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá. A inclusão dessa cultura no PARA está prevista para o biênio 2019/2020 do PARA, porém dados de resíduos ainda não estão disponíveis.

Material Suplementar

Tabela S3.1. Parâmetros dos 50 analitos no sistema LC-MS/MS (LC Shimadzu-4000QTRAP SCIEX)

Pesticida	T _r (min)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	Transição (m/z) ^a			Razão dos íons ^b (RSD, %), n=67
Acephate	1.1	46	11	10	184.04	→	143	0.1 (16)
			25	8	184.04	→	125	
Aldicarb	3.8	31	11	3	208.1	→	116	0.6 (2.5)
			20	3	208.1	→	89	
Aldicarb-sulfone	1.4	66	13	12	223.00	→	86	0.9 (4.6)
			20	3	223.00	→	148	
Aldicarb-sulfoxide	1.2	41	9	3	207.00	→	132	0.8 (5.3)
			19	3	207.00	→	89	
Atrazine	6.2	66	25	12	216.19	→	174	0.3 (3)
			41	6	216.19	→	104	
Azoxystrobin	8.4	46	19	12	404.09	→	372	0.3 (2.5)
			35	28	404.09	→	344	
Boscalid	8.4	71	27	24	343.04	→	307	0.3 (8.4)
			27	8	343.04	→	139	
Buprofezin	10.9	46	17	16	306.08	→	201	0.6 (2.6)
			23	8	306.08	→	116	
Carbaryl	6	56	15	10	202.08	→	145	0.3 (4.2)
			41	8	202.08	→	127	
Carbendazim	2.4	56	25	12	192.65	→	160	0.5 (45)
			43	10	192.65	→	132	
Carbofuran	5.4	56	17	12	222.12	→	165	0.8 (1.8)
			29	8	222.12	→	123	
Carbofuran-3-	2.2	62	21	4	238.1	→	163	0.7 (3.4)

Pesticida	T _r (min)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	Transição (m/z) ^a			Razão dos íons ^b (RSD, %), n=67
						→		
OH			15	2	238.1	→	181	
Chlorpyrifos	11.1	66	27	14	349.97	→	198	0.7 (5.2)
			49	6	349.97	→	97	
Chlorpyrifos methyl	10.1	61	29	8	321.95	→	125	0.6 (18)
			23	22	321.95	→	290	
Kresoxim- methyl	9.4	36	11	16	314.08	→	206	0.8 (4)
			19	8	314.08	→	116	
Diazinon	9.8	61	31	12	305.09	→	169	0.7 (1.9)
			31	10	305.09	→	153	
Dicrotophos	1.6	61	19	8	238.03	→	112	0.7 (3.6)
			15	16	238.03	→	193	
Difenoconazole	10.2	81	35	20	406.09	→	251	0.2 (2.2)
			65	12	406.09	→	188	
Dimethoate	2.7	56	13	16	230.03	→	199	0.6 (2.7)
			29	8	230.03	→	125	
EPN	10.3	66	33	12	324.06	→	157	0.9 (7.2)
			19	22	324.06	→	296	
Epoxiconazole	9	61	29	8	330.05	→	121	0.3 (10)
			71	6	330.05	→	101	
Ethion	11.1	46	15	16	385.03	→	199	0.7 (2.3)
			35	10	385.03		143	
Ethoprop	8.8	51	29	10	243.04	→	131	0.9 (2.6)
			21	14	243.04	→	173	
Fenamiphos	9.1	66	33	16	304.07	→	217	0.4 (7.8)
			25	14	304.07	→	234	
Phenthoate	9.6	41	17	12	321.10	→	163	1.0 (2.6)
			27	8	321.10	→	135	

Pesticida	T _r (min)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	Transição (m/z) ^a			Razão dos íons ^b (RSD, %), n=67
Fluquinconazole	8.8	56	35	18	376.03	→	307	0.7 (9.8)
			29	26	376.03	→	349	
Heptenophos	7.1	61	19	10	251.13	→	127	0.5 (2.4)
			19	10	251.13	→	125	
Imidacloprid	2.5	56	21	16	256.04	→	209	1.0 (1.5)
			27	14	256.04	→	175	
Fosmet	8	66	17	12	317.95	→	160	0.2 (7.3)
			51	8	317.95	→	133	
Malaixon	2.7	46	46	17	316.10	→	128	0.7
			46	17	316.10	→	127	
Malathion	8.7	66	19	8	330.97	→	127	0.9 (9.7)
			33	6	330.97	→	99	
Methamidophos	1.1	56	19	6	141.98	→	112	0.7 (13)
			19	6	141.98	→	94	
Methidathion	7.6	36	13	12	302.88	→	145	0.6 (1.7)
			29	6	302.88	→	85	
Methiocarb	7.9	31	25	8	226.10	→	121	0.8 (2.6)
			13	12	226.10	→	169	
Methomyl	1.6	35	13	3	162.9	→	106	0.4 (2.4)
			13	3	162.9	→	88	
Myclobutanil	8.6	56	45	12	289.03	→	70	0.6 (2.4)
			47	8	289.03	→	125	
Monocrotophos	1.4	51	21	8	224.07	→	127	0.9 (2.2)
			11	16	224.07	→	193	
Omethoate	1.1	46	17	12	213.99	→	183	0.8 (7.3)
			31	8	213.99	→	125	
Paraoxon-	4.7	71	27	16	247.94	→	202	0.2 (7.4)

Pesticida	T _r (min)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	Transição (m/z) ^a			Razão dos íons ^b (RSD, %), n=67
						→		
methyl			25	18	247.94	→	231	
Pyraclostrobin	10	31	17	16	388.07	→	194	0.7 (2.1)
			35	12	388.07	→	163	
Pirimicarb	6	61	23	14	239.19	→	182	1.0 (3.5)
			20	6	239.19	→	72	
Pirimiphos	10.9	66	31	16	334.14	→	198	0.5 (3.5)
			31	12	334.14	→	182	
Pirimiphos methyl	10.1	61	31	12	306.06	→	164	1.0 (3.0)
			43	6	306.06	→	108	
Prochloraz	9.9	36	17	8	376.02	→	308	0.2 (3.8)
			25	22	376.02	→	266	
Profenofos	10.5	71	25	26	372.97	→	303	0.6 (3.5)
			19	10	372.97	→	345	
Quinalphos	9.4	51	23	18	299.03	→	243	1.0 (2.4)
			33	12	299.03	→	163	
Tebuconazole	9.4	56	51	8	308.06	→	125	0.4 (4.8)
			35	10	308.06	→	151	
Thiobencarb	9.9	31	23	8	258.05	→	125	0.1 (5.4)
			17	6	258.05	→	100	
Trichlorfon	1.9	66	25	8	258.92	→	127	0.4 (12)
			17	14	258.92	→	223	
Trifloxystrobin	10.4	56	25	14	409.11	→	186	0.5 (18)
			61	8	409.11	→	145	

T_r= tempo de retenção; DP: declustering potential; CE: collision energy CXP: collision cell exit potential; ^a o íon de quantificação está identificado em negrito; ^b Razão entre os íons de quantificação e qualificação.

Tabela S3.2. Parâmetros adquiridos no GC-MS/MS para 30 pesticidas

Pesticida	TR (min)	Energia de colisão (eV)	Íon precursor m/z		Íon produto m/z ^a	Razão dos íons ^b (RSD, %), n=107
Azinphos-Methyl	18.2	5	160	→	132	0.6 (11)
		15	132	→	77	
Azynphos Ethyl	19.3	5	160.02	→	132.01	0.3 (4.7)
		10	160.02	→	104.01	
Bifenthrin	16.9	25	181.05	→	166.05	0.1 (47)
		15	165.05	→	139.04	
Chlorfenapyr	13.3	20	246.98	→	226.98	0.3 (22.0)
		20	248.98	→	228.98	
Chlorfenvinphos	11.1	15	266.98	→	158.99	0.6 (9.4)
		15	322.97	→	266.98	
Chlorothalonil	8.1	20	265.88	→	169.92	0.6 (4.4)
		20	265.88	→	132.94	
Chlorthiophos	14.2	15	324.96	→	268.97	0.2 (4.8)
		10	324.96	→	296.97	
Cypermethrin peak 1	21.9	10	163.03	→	127.02	0.3 (11.7)
		25	181.03	→	152.03	
Cypermethrin peak 2	22.1	10	163.03	→	127.02	0.4 (7.2)
		25	181.03	→	152.03	
Cypermethrin peak 3	22.2	10	163.03	→	127.02	0.5 (6.5)
		25	181.03	→	152.03	
Cypermethrin peak 4	22.3	10	163.03	→	127.02	0.5 (17.2)
		25	181.03	→	152.03	
Cyfluthrin Peak 1	21.4	12	163.02	→	91.01	0.3 (27.2)
		20	206.03	→	151.02	
Cyfluthrin Peak 2	21.6	12	163.02	→	91.01	0.3 (7.7)
		20	206.03	→	151.02	
Cyfluthrin Peak 3	22.0	12	163.02	→	91.01	0.4 (12.7)
		20	206.03	→	151.02	
Cyfluthrin Peak 4	22.2	12	163.02	→	91.01	0.4 (13.7)
		20	206.03	→	151.02	
λ-cyhalothrin	18.8	23	181.04	→	152.03	0.5 (13)
		15	197.04	→	141.03	

Pesticida	TR (min)	Energia de colisão (eV)	Íon precursor m/z		Íon produto m/z^a	Razão dos íons^b (RSD, %), n=107
Deltamethrin	25.1	20	180.99	→	151.99	0.5 (4.4)
		18	252.99	→	93	
Esfenvalerate	24.1	10	167.05	→	125.04	0.1 (18.5)
		10	167.05	→	139.04	
Etofenprox	22.5	10	163.09	→	135.07	1.1 (1.5)
		16	163.09	→	107.06	
Fenitrothion	9.6	20	277.02	→	260.02	0.7 (5.3)
		10	277.02	→	109.01	
Fenpropathrin	17.2	23	181.09	→	152.07	0.4 (8.6)
		15	265.13	→	210.1	
Fenthion	10.1	18	278.02	→	109.01	0.7 (4.8)
		18	278.02	→	127.01	
Fenvalerate	23.6	10	167.05	→	125.04	0.3 (2.5)
		10	225.07	→	119.04	
Mevinphos	4.9	10	127.03	→	109.02	0.7 (20.3)
		12	192.04	→	127.03	
Oxyfluorfen	13.0	10	300.03	→	223.02	1.0 (4.9)
		12	361.03	→	300.03	
Parathion-Methyl	9.0	15	263	→	109	0.8 (4.9)
		15	263	→	127	
Permethrin peak 1	20.2	15	183.04	→	165.03	0.7 (3.8)
		15	183.04	→	168.03	
Permethrin peak 2	20.5	15	183.04	→	153.03	1.1 (2.6)
		15	183.04	→	168.03	
Phendimetalin	10.9	12	252.12	→	162.08	0.8 (6)
		12	252.12	→	191.09	
Phorate	6.9	10	121.01	→	65	0.2 (17.8)
		5	260.01	→	75	
Procymidone	11.5	15	283.02	→	96.01	0.5 (6.6)
		10	283.02	→	255.02	
Prothiofos	12.5	10	266.97	→	238.97	0.2 (6.4)
		5	308.97	→	238.97	
Pyrazophos	19.1	10	221.05	→	193.04	0.4 (4.5)
		15	221.05	→	177.04	

Pesticida	TR (min)	Energia de colisão (eV)	Íon precursor m/z		Íon produto m/z ^a	Razão dos íons ^b (RSD, %), n=107
Terbufos	7.7	15	231.04	→	175.03	0.6 (3.8)
		10	231.04	→	203.03	
Triazophos	14.6	10	257.05	→	162.03	1.0 (4)
		10	161.03	→	134.03	
Trifluralin	6.6	15	264.09	→	160.05	0.9 (9.2)
		15	306.1	→	264.09	
Vinclozolin	8.9	15	285	→	212	0.7 (10.4)
		15	212	→	172	

^a O íon em negrito é o de quantificação; ^b Razão entre os íons de quantificação e qualificação.

Tabela S3.3. Recuperação, repetibilidade e precisão intermediária de 50 analitos na matriz casca de maracujá em LC-MS/MS em 4 níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

Pesticida	Recuperação e repetibilidade (RSD_r), % (n=5)				Precisão intermediária (RSD_p), % (n=8 ou 9)			
	5	10	20	100	5	10	20	100
Acephate	64 (17)	75 (5.9)	72 (3.5)	77 (1.0)	18	5.2	17	15
Aldicarb	119 (13)	93 (8)	82 (16)	93 (18)	19	6.4	15	14
Aldicarb-sulfone	75.5 (3.5)	76 (5.5)	72.6 (2.5)	76.6 (4.4)	19	15	17	15
Aldicarb-sulfoxide	65 (18)	65 (4.2)	72 (5.5)	62 (8.0)	17	13	23	18
Atrazine	88 (3.5)	77 (2.2)	71 (4.5)	85 (3.6)	10	20	5.2	7.4
Azoxystrobin	81 (5.2)	84 (4.5)	70 (1.0)	70.3 (4.2)	9.6	10	16	4.2
Boscalid	61 (4)	62 (8)	78 (19)	83 (2)	21	23	15	9.0
Buprofezin	73 (8.5)	75 (5.2)	70 (3.4)	72 (8.5)	8.0	16	19	12
Carbaryl	94 (3.6)	88 (4.5)	74 (7.5)	82 (5.5)	8.2	16	8.6	6.0
Carbendazim	74 (9.5)	79 (16)	70 (9.8)	75 (5.5)	10	18	10	8.5
Carbofuran	115 (7)	86 (4)	85 (7)	99 (11)	6.4	17	5.0	8.5
Carbofuran-3-OH	101 (4.4)	72 (6.2)	68 (6.2)	90 (6.4)	10	23	10	7.2
Chlorpyrifos	55 (6.0)	60 (7.0)	84 (4.0)	70 (12)	19	7.0	4.2	9
Chlorpyrifos methyl	75 (9.8)	110 (12)	100 (13)	92 (6)	18	13	10	6.5
Kresoxim-methyl	97 (4.9)	118 (17)	80 (18)	93 (8)	5.0	15	21	14
Diazinon	55 (3.2)	68 (14)	80 (3.5)	81 (5.0)	3.0	22	3.2	8.0
Dicrotophos	74 (4.0)	74 (4.0)	70 (9.0)	70 (5.0)	17	8.8	9.5	12
Difenoconazol	61 (4.5)	72 (11)	75 (3.2)	73 (14)	9.0	10	19	20
Dimethoate	91 (3.0)	80 (4.0)	79 (4.0)	90 (3.0)	12	13	5.0	3.0
EPN	93 (8.2)	104 (7.5)	70 (2.5)	74 (18)	11	8.0	7.0	16
Epoxiconazole	65 (6.2)	76 (13)	85 (16)	72 (14)	7.5	10	15	20

Pesticida	Recuperação e repetibilidade (RSD _r), % (n=5)				Precisão intermediária (RSD _p), % (n=8 ou 9)			
	5	10	20	100	5	10	20	100
Ethion	73 (7.5)	74 (7.5)	70 (5.0)	75 (9.2)	10	11	4.5	11
Ethoprop	96 (9.8)	77 (5.2)	79 (7.2)	78 (3.4)	13	19	16	12
Fenamiphos	87 (10)	78 (8.2)	78 (4.5)	80 (4.6)	12	10	4.5	6.5
Phenthoate	73 (3.0)	71 (3.9)	73 (4.2)	85 (4.0)	11	4.5	4.3	3.2
Fluquinconazole	68 (3.5)	84 (13)	81 (4.5)	72 (10)	9.5	17	11	15
Heptenophos	83 (4)	79 (4.5)	78 (3.4)	82 (3.6)	12	8.0	3.2	4.4
Imidacloprid	98 (5.8)	79 (5.9)	78 (8.5)	93.5 (7.5)	7.5	20	7.5	8.2
Fosmet	100 (6.5)	95 (10)	90 (9)	97 (6.8)	18	10	10	8.9
Malaoxon	96 (5.2)	90 (4.3)	72 (5.3)	87 (6.9)	4.5	4.1	5.2	6.1
Malathion	72 (3.7)	71 (16)	80 (14)	80 (11)	6.3	13	11	14
Methamidophos	75 (4.3)	69 (10)	72 (4.5)	75 (3.9)	4.5	8	15	15
Methidathion	164 (7.6)	98 (6.9)	71 (9.5)	133 (10)	28	6	6.5	13
Methiocarb	71 (1.2)	71 (5.3)	71 (5.7)	74 (4.7)	18	19	18	17
Methomyl	77.5 (3.5)	78 (4.3)	75 (4.6)	77 (4.2)	19	13	15	14
Myclobutanil	64 (5.7)	81 (3.4)	77 (10)	83 (3.1)	20	5.6	14	9.2
Monocrotophos	71.5 (4.3)	74 (4.0)	65 (4.0)	70 (4.4)	6.2	5.1	16	16
Omethoate	73 (3.4)	73 (3.0)	75 (3.2)	80 (2.8)	4.1	3.0	3.0	3.2
Paraoxon-methyl	110 (14)	84.8 (4.1)	72 (6.6)	96 (4.2)	10	17	12	18
Piraclostrobina	67 (5.8)	84 (12)	82 (5.5)	75 (12)	15	12	14	13
Pirimicarb	88 (6.1)	88(6.0) ()	70 (4.2)	84 (3.1)	19	8.9	6.2	8.9
Pirimiphos (-Ethyl)	70.5 (2.8)	65 (2.1)	71 (14)	69 (9.0)	15	19	17	9.2
Pirimiphos (-Methyl)	69 (1.5)	68 (3.2)	67 (5.8)	77 (4.2)	3.2	5.5	8.9	3.6

Pesticida	Recuperação e repetibilidade (RSD _r), % (n=5)				Precisão intermediária (RSD _p), % (n=8 ou 9)			
	5	10	20	100	5	10	20	100
Prochloraz	80 (4.9)	86 (4.9)	67 (6.9)	72 (4.1)	10	11	14	4.0
Profenofos	74 (4.5)	70 (6.2)	76 (6.1)	71 (11)	3.2	8.2	10	11
Quinalphos	80 (4.9)	82 (7.5)	75 (4.9)	78 (6.9)	3.9	7.5	5.5	6.5
Tebuconazole	79 (6.5)	77 (10)	82 (18)	75 (7.2)	5.0	8.9	16	15
Thiobencarb	65 (3.2)	71 (13)	81 (2.2)	75 (12)	3.2	14	2.4	10
Trichlorfon	80 (5)	82 (7.5)	75 (5.3)	78 (7.2)	15	8.0	4.9	6.1
Trifloxystrobin	80 (7.2)	76 (18)	75 (2.2)	71 (12)	12	14	3.2	14

EPN= O-Ethyl O-(4-nitrophenyl) phenylphosphonothioate

Tabela S3.4. Recuperação, repetibilidade e precisão intermediária de 50 analitos na matriz polpa de maracujá em LC-MS/MS em 4 níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

Pesticida	Recuperação e repetibilidade (RSD _r), % (n=4 ou 5)				Precisão intermediária (RSD _p), % (n=8 ou 9)			
	5	10	20	100	5	10	20	100
Acephate	67 (11)	70 (4)	69 (13)	91 (4)	15	10	13	17
Aldicarb	98 (17)	107 (13)	111 (17)	66 (17)	19	24	18	27
Aldicarb-sulfone	86 (8)	86 (11.5)	78 (11)	105 (28)	15	12	11	26
Aldicarb-sulfoxide	85 (7)	80 (13)	79 (11)	102 (8.5)	11	10	14	17
Atrazine	77 (10)	92 (12)	92 (12)	96 (1)	18	14	11	7.5
Azoxystrobin	111 (11)	113 (8)	92 (10)	83 (9)	10	12	10	10
Boscalid	85 (14)	96 (13)	87 (12)	80 (4)	20	12	12	8.5
Buprofezin	82 (13)	94 (13)	99 (12)	82 (7)	18	17	11	12
Carbaryl	78 (19)	96 (8)	92 (9)	106 (3)	24	17	8.5	13
Carbendazim	82(14)	81(7.6)	89(16)	100 (14)	18	8.5	14	18
Carbofuran	102 (20)	102 (17)	113 (11)	98 (27)	22	19	10	22
Carbofuran-3-OH	73 (4)	82 (5)	89 (5)	-	25	22	4.5	-
Chlorpyrifos	94 (19)	111 (12)	99 (10)	91 (4)	17	15	10	10
Chlorpyrifos methyl	89 (11)	102 (11)	96 (9)	87 (8)	18	12	8.5	12
Kresoxim-methyl	105 (17)	111 (4)	96 (18)	73 (11)	29	14	16	19
Diazinon	84 (12)	85 (12)	87 (10)	81 (6)	15	20	11	11
Diclotophos	74 (8)	69 (4)	83 (11)	88 (3.5)	22	23	10	8
Difenoconazole	98 (12)	101 (18)	92 (14)	88 (6)	13	15	14	9
Dimethoate	100 (5)	86 (9)	91 (11)	119 (3)	14	16	10	11
EPN	92 (16)	82 (15)	93 (7)	75 (7)	17	26	8.5	15
Epoxiconazole	88 (19)	102 (18)	82 (22)	76 (10)	22	16	20	11
Ethion	100	121	90 (10)	86	14	10	13	10

Pesticida	Recuperação e repetibilidade (RSD _r), % (n=4 ou 5)				Precisão intermediária (RSD _p), % (n=8 ou 9)			
	5	10	20	100	5	10	20	100
	(15)	(11)		(5)				
Ethoprop	81 (16)	94 (11)	94 (10)	85 (5)	18	15	10	7.5
Fenamiphos	88 (14)	96 (10)	99 (12)	83 (11)	13	18	12	12
Phenthoate	79 (15)	99 (10)	91 (13)	82 (9)	14	10	13	12
Fluquinconazole	89 (10)	93 (12)	92 (10)	84 (3)	14	16	10	11
Heptenophos	77 (5)	80 (8)	90 (8)	85 (4.5)	13	16	8.5	12
Imidacloprid	77 (4)	70 (2)	94 (5)	96 (3)	24	25	5.2	9.5
Fosmete	124 (8)	110 (17)	-	-	18	16	-	-
Malaoxon	97 (15)	95 (14)	91 (9)	105 (5)	14	13	8,	5,
Malathion	97 (24)	111 (10)	91 (11)	81 (9)	20	14	11	11
Methamidophos	63 (20)	64 (12)	65 (4.5)	70 (2)	15	12	7.5	9.2
Methidathion	87 (13)	91 (14)	100 (15)	81 (13)	20	15	13	12
Methiocarb	73 (17)	88 (8.0)	96 (8.5)	88 (2.5)	30	20	2.5	9.3
Methomyl	93 (6.5)	74 (11)	78 (11)	90 (0.5)	21	22	10	7.2
Myclobutanil	74 (10)	82 (10)	90 (15)	89 (3)	21	22	14	7.5
Monocrotophos	69 (9.8)	66 (7.2)	84 (12)	99 (4.7)	25	23	10	13
Omethoate	70 (13)	78 (9.2)	93 (4.8)	126 (5.3)	22	12	13	30
Paraoxon-methyl	77 (7.9)	74 (3.3)	94 (5.8)	91 (4.6)	20	21	8.4	8.1
Piraclostrobina	103 (14)	111 (8.4)	93 (15)	81 (4.0)	14	9.9	12	13
Pirimicarb	67 (2.6)	87 (18)	88 (15)	88 (3.2)	23	19	14	6.8
Pirimiphos	84 (22)	108 (10)	94 (12)	87 (7.5)	20	12	12	10
Pirimiphos Methyl	84 (14)	94 (12)	95 (9.7)	86 (6.0)	20	16	8.7	8.8
Prochloraz	89 (15)	106 (16)	88 (12)	85 (7.1)	15	16	12	6.8

Pesticida	Recuperação e repetibilidade (RSD _r), % (n=4 ou 5)				Precisão intermediária (RSD _p), % (n=8 ou 9)			
	5	10	20	100	5	10	20	100
Profenofos	91 (17)	97 (11)	91 (11)	78 (4.6)	18	16	12	11
Quinalphos	85 (10)	94 (11)	92 (11)	89 (7.9)	14	15	11	9.2
Tebuconazole	75 (3.6)	85 (17)	85 (20)	77 (10)	19	20	25	12
Thiobencarb	77 (14)	93 (11)	101 (9.9)	89 (2.5)	26	11	9.1	7.4
Trichlorfon	103 (12)	95 (13)	88 (4.1)	143 (24)	13	15	4.5	35
Trifloxystrobin	101 (10)	101 (11)	97 (12)	73 (6.3)	15	12	9.5	16

EPN= O-Ethyl O-(4-nitrophenyl) phenylphosphonothioate

Tabela S3.5. Ensaios de recuperação na matriz casca de maracujá em GC-MS/MS em 3 níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

Pesticida	Recuperação e repetibilidade (RSD _r), % (n=5)			Precisão intermediária (RSD _p), % (n=8)		
	5	10	50	5	10	50
Azinphos-Ethyl	104 (5.0)	87 (11)	76 (7.5)	5.5	12	7.5
Azinphos-Methyl	95 (11)	70 (4.2)	77 (5.5)	9.5	5.2	9.2
Bifenthrin	87 (6.5)	99 (10)	112 (9.0)	7.5	16	18
Chlorfenapyr	83 (17)	86 (18)	103 (11)	19	19	19
Chlorfenvinphos	62 (3.5)	89 (0.3)	73 (1.5)	3.2	6.0	6.0
Chlorothalonil	98 (12)	108 (2.5)	78 (6.0)	8.2	12	14
Chlorthiophos	70 (3.5)	88 (19)	103 (10)	19	18	18
Cipermetrin	78 (12)	73 (11)	82 (2.2)	16	20	15
Cyfluthrin	81 (12)	76 (7.2)	77 (5.2)	9.6	19	20
Deltamethrin	103 (16)	105 (8.5)	104 (8.0)	18	14	13
Esfenvalerate	79 (10)	99 (15)	101 (8.5)	8.5	17	16
Etofenprox	94 (6)	99 (18)	99 (8.5)	7.5	18	16
Fenitrothion	114 (6.6)	80 (7.0)	78 (2.0)	5.5	6.5	5.5
Fenpropathrin	79 (6.4)	95 (12)	111 (8.4)	8.0	16	19
Fenthion	109 (8.6)	80 (9.5)	83 (1.5)	7.0	22	10
Fenvalerate	111 (4.6)	102 (13)	97 (9.5)	16	19	14
λ -cyhalothrin	77 (13)	103 (16)	120 (8.5)	12	22	22
Mevinphos	61 (6.5)	80 (18)	86 (11)	20	16	10
Oxyfluorfen	77 (11)	93 (18)	105 (10)	12	20	15
Parathion-Methyl	109 (6.4)	77 (6.6)	73 (2.5)	24	7.2	5.4
Permetrin	74 (4.0)	71 (7)	77 (4.0)	11	17	16
Phendimetalin	80 (8.5)	88 (18)	100 (12)	8.5	20	18
Phorate	89 (10)	85 (10)	74 (5)	14	12	4.0
Procimidona	82 (4.6)	73 (3.6)	76 (1.5)	6.5	8.2	7.2
Prothiofos	67 (7.4)	88 (4.0)	107 (11)	15	10	19
Pyrazophos	79 (4.2)	84 (12)	86 (11)	10	13	16
Terbufos	69 (6.5)	76 (4.6)	98 (10)	5.5	4.6	20
Triazophos	94 (8.2)	80 (6.5)	77 (3.5)	12	7.5	6.0
Trifluralin	89 (11)	72 (15)	97 (15)	9.5	9.8	13
Vinclozolin	81 (10)	108 (2.5)	74 (10)	8.5	1.8	9.5

Tabela S3.6. Ensaios de recuperação na matriz polpa de maracujá em GC-MS/MS em 4 níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

Pesticida	Recuperação (%) e precisão (RSD _r), % (n=5)			Precisão intermediária (RSD _p), % (n=8)		
	5	10	50	5	10	50
Azinphos-ethyl	102 (2)	87 (7)	92 (13)	6,0	8,0	10
Azinphos-methyl	69 (15)	70 (15)	71 (31)	17	14	25
Bifenthrin	84 (7)	111 (12)	128 (5)	19	12.5	20
Chlorfenapyr	128 (20)	95 (7)	82 (16)	19	10	16
Chlorfenvinphos	129 (16.5)	92 (4.5)	90 (14)	15	7	11
Chlorothalonil	96 (9)	72 (9)	102 (1)	8	15	4
Chlorthiophos	122 (17)	89 (7)	91 (15)	16	32	12
Cipermetrin	88 (8)	93 (16)	104 (4)	21	14	9
Cyfluthrin	96 (33)	88 (20)	87 (21)	33	20	16
Deltamethrin	111 (8)	95 (10)	93 (16)	10	9	12.5
Esfenvalerate	123 (17)	91 (7)	93 (18)	10	8	14
Etofenprox	100 (11)	90 (8)	90 (14)	8.5	5	12
Fenitrothion	100 (6)	80 (9)	103 (2)	21	9	2
Fenpropathrin	86 (6)	88 (6)	91 (15.5)	18	5	12
Fenthion	113 (4)	90 (2)	103 (3)	4	4	5
Fenvalerate	111 (17)	92 (10)	91 (16)	14.5	9	13
λ -cyhalothrin	124 (13)	91 (7)	91 (14)	10	6	14
Mevinphos	85 (4)	81 (9)	82 (7)	18	8.5	7
Oxyfluorfen	74 (12)	81 (9)	92 (15)	13	14	13
Parathion-methyl	129 (17)	88 (5)	103 (2)	15	9	11
Permetrin	88 (8)	84 (8)	96 (16)	21	22	12
Phendimethalin	101 (9)	82 (5)	103 (3)	7	5	5
Phorate	102 (4)	100 (2)	87 (5)	7	3	4
Procimidon	98 (13)	88 (8.5)	83 (4)	16	9	3
Prothiofos	137 (14)	92 (7)	102 (2)	13	7	10
Pyrazophos	100 (19)	88 (7)	90 (16)	17	8	12
Terbufos	97 (4)	84 (10)	102 (2)	12	9	10
Triazophos	87 (19)	90 (9)	92 (11.5)	35	7	9.5

Trifluralin	118 (7)	96 (4.5)	76 (5)	6	6	4
Vinclozolin	125 (7)	93 (5.5)	103 (4)	9	9	5.5

Tabela S3.7. Resíduos de pesticidas em amostras de maracujá (casca, polpa e fruto) por LC-MS/MS ou GC-MS/MS

Amostra	Casca (mg kg⁻¹)	Polpa (mg kg⁻¹)	Fruto (mg kg⁻¹)*
3/16-BA	Deltamethrin (0,007)	Nd	Deltamethrin (0,004)
4/16-BA	Chlorothalonil (0,01)	Nd	Chlorothalonil (0,006)
6/16-BA	Dimethoate (0,2) λ--cihalothrin (0,04) Omethoate (0,03)	Nd	Dimethoate (0,1) Λ-cyhalothrin (0,03) Omethoate (0,02)
8/17-BA	Carbendazim (0,05)	Nd	Carbendazim (0,03)
9/17-BA	Carbendazim (< LOQ) Difenoconazol (0,005) Methamidophos (0,006) Profenophos (0,015)	Nd	Carbendazim (0,002) Difenoconazol (< LOQ) Methamidophos (0,004) Profenophos (0,009)
13/18-BA	Cypermethrin (0,5) Difenoconazol (< LOQ) Dimethoate (0,04) Imidacloprid (0,04) λ-cyhalothrin (0,02) Omethoate (0,02) Tebuconazol (0,02)	Cypermethrin (0,01) Imidacloprid (< LOQ)	Cypermethrin (0,4) Difenoconazol (< LOQ) Dimethoate (0,03) Imidacloprid (0,03) Λ-cyhalothrin (0,02) Omethoate (0,01) Tebuconazol (0,01)
14/18-BA	Cypermethrin (0,1) Imidacloprid (0,007) Λ-cyhalothrin (0,01) Omethoate (0,005)	Cypermethrin (0,01)	Cypermethrin (0,07) Imidacloprid (0,005) Λ-cyhalothrin (0,007) Omethoate (< LOQ)
15/18-BA	Cypermethrin (0,07)	Cypermethrin (0,01)	Cypermethrin (0,05)
16/18-BA	Imidacloprid (0,04)	Imidacloprid (0,005)	Imidacloprid (0,02)
17/18-BA	Imidacloprid (0,04)	Nd	Imidacloprid (0,02)
18/16-DF	Methamidophos (< LOQ)	Nd	Methamidophos (< LOQ)
20/16-GO	Acephate (0,01) Deltamethrin (0,015) Methamidophos (0,02) Methomyl (0,01)	Acephate (0,007)	Acephate (0,007) Deltamethrin (0,007) Methamidophos (0,008) Methomyl (0,006)
21/16-DF	Chlorfenapyr (0,02) Malathion (0,02)	Nd	Chlorfenapyr (0,009) Malathion (0,01)
23/16-GO	Carbendazim (0,005) Imidacloprid (0,02)	Nd	Carbendazim (< LOQ) Imidacloprid (0,007)
24/16-GO	Chlorpyriphos (0,13)	Nd	Chlorpyriphos (0,06)
25/16-DF	Carbendazim (0,02) λ-cyhalothrin (0,03)	Nd	Carbendazim (0,01) Λ-cyhalothrin (0,02)
27/16-GO	Acephate (0,5) Esfenvalerato (0,02) Fenvalerato (0,04) Methamidophos (0,09)	Acephate (0,01)	Acephate (0,25) Esfenvalerato (0,005) Fenvalerato (0,01) Methamidophos (0,04)
29/16-DF	Acephate (0,06) Carbendazim (0,09)	nd	Acephate (0,03) Carbendazim (0,05)

Amostra	Casca (mg kg⁻¹)	Polpa (mg kg⁻¹)	Fruto (mg kg⁻¹)*
	Chlorfenapyr (0,05) Methamidophos (0,015) Piraclostrobina (< LOQ)		Chlorfenapyr (0,02) Methamidophos (0,008)
32/17-GO	Carbendazim (0,15) Chlorfenapyr (0,005) Chlorothalonil (0,05) Imidacloprid (< LOQ) Methomyl (< LOQ)	Chlorothalonil (0,005)	Carbendazim (0,07) Chlorfenapyr (< LOQ) Chlorothalonil (0,03) Imidacloprid (< LOQ) Methomyl (0,001)
34/17-DF	Carbendazim (0,02) Imidacloprid (0,03)	Imidacloprid (0,005)	Carbendazim (0,01) Imidacloprid (0,02)
35/17-GO	Acephate (0,4) Deltamethrin (0,02) Imidacloprid (0,07) Methamidophos (0,3)	Acephate (0,09) Imidacloprid (0,006) Methamidophos (0,03)	Acephate (0,25) Deltamethrin (0,01) Imidacloprid (0,04) Methamidophos (0,2)
38/17-DF	Acephate (0,02) Carbendazim (0,03) Chlorfenapyr (0,007) Methamidophos (0,01)	Acephate (0,01) Carbendazim (< LOQ)	Acephate (0,01) Carbendazim (0,01) Chlorfenapyr (< LOQ) Methamidophos (0,005)
39/17-DF	Carbendazim (0,015) Imidacloprid (< LOQ) Methamidophos (< LOQ) Tebuconazol (0,005)	Nd	Carbendazim (0,007) Imidacloprid (0,005) Methamidophos (0,001) Tebuconazol (< LOQ)
42/16-RJ	Carbendazim (< LOQ) L-cialothrin (< LOQ)	Nd	Carbendazim (< LOQ) L-cialothrin (< LOQ)
44/17-RJ	L-cialothrin (0,005)	Nd	L-cialothrin (< LOQ)
46/17-RJ	Chlorothalonil (0,03)	Nd	Chlorothalonil (0,01)
47/17-RJ	Imidacloprid (0,02)	Imidacloprid (0,008)	Imidacloprid (0,02)
48/17-RJ	Chlorothalonil (0,01) λ -cialothrin (0,005)	Nd	Chlorothalonil (0,006) L-cialothrin (< LOQ)
52/18-RJ	Imidacloprid (0,05)	Imidacloprid (0,005)	Imidacloprid (0,03)
53/18-RJ	Acephate (0,2) Chlorothalonil (0,006) Imidacloprid (0,07)	Acephate (0,02) Imidacloprid (0,007)	Acephate (0,15) Chlorothalonil (< LOQ) Imidacloprid (0,05)
54/18-RJ	Carbendazim (0,02) Imidacloprid (0,04) Methomyl (< LOQ)	Imidacloprid (0,005)	Carbendazim (0,009) Imidacloprid (0,03) Methomyl (< LOQ)
55/18-RJ	Chlorfenapyr (0,015)	Nd	Chlorfenapyr (0,009)

nd: não detectado; LOQ: 0,005 mg kg⁻¹. * amostras de polpa contendo resíduos < LOQ foram considerados como ½ LOQ

Tabela S3.8. Resíduos de pesticidas em 30 amostras comerciais de polpa de maracujá congelada de 11 marcas diferentes

Amostra	Pesticida (mg kg⁻¹)	Marca*
15/20	nd	Brasfrut
34/20	acefato (< LOQ)	Brasfrut
43/20	Nd	Brasfrut
50/20	acefato (0,008); carbendazim (0,007), azoxistrobina (< LOQ), difenoconazol (0,006)	Brasfrut
36/20	carbendazim (0,006); tebuconazol (< LOQ)	CAMTA
20/20	Nd	Eva polpas
21/20	Nd	Eva polpas
45/20	Nd	Eva polpas
46/20	carbendazim (0,01), imidacloprido (0,006), tebuconazol (0,008), malationa (< LOQ), piraclostrobina (< LOQ), trifloxistrobina (0,005)	Eva polpas
49/20	acefato (0,01), imidacloprido (0,006), malationa (0,007), difenoconazol (0,005)	Eva polpas
40/20	Nd	Fruta
22/20	carbendazim (0,07); imidacloprido (< LOQ)	Frutaê
47/20	acefato (0,007); carbendazim (0,008), imidacloprido (0,008), tebuconazol (0,005), piraclostrobina (< LOQ)	Frutaê
12/20	acefato (0,03); metamidofós (0,008); imidacloprido (0,006);	Marca A ^a
13/20	carbendazim (0,006); imidacloprido (0,005);	Marca A ^a
14/20	carbendazim (0,02); imidacloprido (0,007);	Marca A ^a
17/20	carbendazim (0,04); imidacloprido (< LOQ); difenoconazol (< LOQ)	Frutpres
32/20	acefato (0,02)	Frutpres
33/20	acefato (0,009); carbendazim (0,025); imidacloprido (0,006)	Frutpres
48/20	acefato (0,007), imidacloprido (0,005)	Frutpres
18/20	Nd	FrutySul
19/20	Nd	FrutySul
24/20	Nd	FrutySul
25/20	acefato (0,005); carbendazim (< LOQ)	FrutySul
41/20	Nd	FrutySul
42/20	acefato (0,008)	FrutySul
35/20	carbendazim (0,02); difenoconazol (0,005)	Mais fruta
44/20	Nd	Nature
37/20	carbendazim (0,006);	Sempre Viva
38/20	carbendazim (0,1); imidacloprido (0,005); piraclostrobina (0,008)	Triangfrut

^a: marca da amostra com restrição de divulgação; * amostras da mesma marca são de lotes diferentes

Tabela S3.9. Resíduos de pesticidas em 12 amostras comerciais de farinha de maracujá congelada de 11 marcas diferentes

Amostra	Pesticida (mg kg⁻¹)	Marca
26/20	Nd	Amo Chá
11/20	metamidofós (0,04)	Dieb energia natural
39/20	Nd	Estação verde Produtos Naturais
09/20	metamidofós (0,04)	Frutos da terra
16/20	metamidofós (0,04), imidacloprido (0,07)	Frutos da terra
30/20	Nd	Leve Crock
28/20	Nd	Rei das Castanhas
10/20	metamidofós (0,05), pirimifós metílico (0,04)	San Mar
27/20	Nd	Unilife Vitamins
31/20	Nd	Vigor e Saúde
29/20	Nd	Vitalícia
23/20	Nd	Vitalin sem glúten

CAPÍTULO 4: RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM FOLHAS DE *PASSIFLORA EDULIS* SIMS UTILIZANDO LC-MS/MS

Resumo

A espécie comercial, *P. edulis* Sims está entre as indicadas para uso terapêutico no Brasil, e as folhas secas são utilizadas como droga vegetal na produção de fitoterápicos e no preparo de chás. Avaliar a qualidade dessa matéria prima vegetal quanto à presença de resíduos de pesticidas é necessária, uma vez que a aplicação para maioria dos pesticidas autorizados para cultura é foliar. Este trabalho tem como objetivo validar um método multirresíduos em folha de *P. edulis* utilizando LC-MS/MS e analisar amostras de folhas de diferentes produtores do Brasil. Um total de 53 amostras de folhas de *P. edulis* foi obtido de produtores nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Goiás e no Distrito Federal. O método foi validado satisfatoriamente para 49 dos 50 analitos avaliados, com recuperações entre 70% e 120% e desvios padrões relativos (RSD) < 20% para a maioria dos compostos, com LOQ de 5 µg kg⁻¹. Pelo menos um analito foi detectado em 60,4% das amostras analisadas, principalmente carbendazim, difenoconazol e tebuconazol, em concentrações até 12, 0,6 e 0,7 mg kg⁻¹, respectivamente. Organofosforados somam cerca de 80% de frequência nas amostras positivas e são responsáveis por mais da metade dos analitos detectados sem autorização para uso no maracujá, indicando que as boas práticas agrícolas não estão sendo respeitadas pelos agricultores no campo. O processo de secagem das folhas aumenta a concentração inicial do pesticida, com mediana dos fatores de processamento variando entre 4,5 e 6 para organofosforados, metomil, carbendazim, imidacloprido, triazois e trifloxistrobina. Esse estudo indica que folhas secas de maracujá proveniente da agricultura convencional não poderiam ser utilizadas como droga vegetal devido à presença de resíduos ilegais e elevada concentração dos pesticidas detectados. Esses dados indicam a importância de se ter um controle da utilização de pesticidas nesse tipo de planta medicinal.

1. Introdução

Existe uma grande preocupação relacionada à qualidade de matérias-primas vegetais utilizadas na produção de medicamentos fitoterápicos ou no preparo de infusões (Kosalec et al., 2009; WHO, 2007). Vários resíduos e contaminantes podem estar presentes em produtos fitoterápicos, inclusive pesticidas (Gondo et al., 2016; WHO, 2007). No entanto, a crença de que produtos naturais são inofensivos prevalece em uma grande parcela da população, levando a um aumento no consumo desses produtos (Kosalec et al., 2009; WHO, 2007).

O uso de *Passiflora* como planta medicinal é bastante tradicional em diversos países, por apresentar propriedades terapêuticas bem estabelecidas relacionadas a distúrbios nervosos (Barbosa et al., 2008; Deng et al., 2010; Li et al., 2011; Gutierrez, 2014; Otify et al., 2015; Ayres et al., 2015), efeitos anti-inflamatórios (Montanher et al., 2007; Zucolotto et al., 2009; Vargas et al., 2007), e ações anti-hipertensivas (Konta et al., 2014). *P. alata*, *P. incarnata* e *P. edulis* são listadas com indicação de uso terapêutico pela farmacopeia brasileira, e a parte vegetal com ação terapêutica ou a droga vegetal, são as folhas secas (Brasil, 2011).

A legislação brasileira exige que dados de resíduos de pesticidas e contaminantes em medicamentos fitoterápicos registrados no País (Brasil, 2014) sejam disponibilizados pelo fabricante. Porém, dados quanto à presença de pesticidas são raros em espécies de *Passiflora*. Um estudo realizado por Zuin et al. (2003a) desenvolveu método para determinar 6 organofosforados e 7 organoclorados em amostras de folhas de *Passiflora* utilizando extração com fluido supercrítico (SFE) e quantificação por GG-ECD-FPD. Também foi reportado o uso de dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) para determinação desses mesmos grupos em folhas secas de *P. alata* e *P. edulis* por CG-ECD (Zuin et al., 2003b).

Diversos métodos de preparo de amostra em outras espécies medicinais têm sido desenvolvidos para melhorar a determinação de pesticidas multiclases, os quais incluem o uso de extração sólido-líquido (Rodrigues et al., 2006), extração em fase sólida (SPE) (Chen et al., 2012; Hou et al., 2016; Li et al., 2017; Park et al., 2006; Tong et al., 2013), dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) (Liu et al., 2015; Aquino et al., 2011; Cao et al., 2015), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (Chen et al., 2013) e extração assistida por micro-ondas (MAE) (Pareja et al., 2015). A identificação e quantificação dos pesticidas podem ser feita por

cromatografia gasosa acoplada a detectores de massas (GC-MS, GC-MS/MS), captura de elétrons (ECD, Electron Capture Detector), fotométrico de chama (FPD, Flame Photometric Detector), nitrogênio e fósforo (NPD, Nitrogen Phosphorus Detector) e cromatografia líquida acoplada a detectores de massas (LC-MS, LC-MS/MS).

O método de preparo de amostra QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) é largamente utilizado, e se baseia na extração com acetonitrila, seguida de partição com sais (sulfato de magnésio, $MgSO_4$ e cloreto de sódio, $NaCl$) e purificação por extração dispersiva (SPE dispersivo, dSPE) utilizando PSA (amina primária secundária) e $MgSO_4$ (Anastassiades et al., 2003). Esse método foi desenvolvido para aplicação em matrizes com mais de 75% de umidade, como frutas e vegetais. Para matrizes secas, torna-se necessário uma redução na quantidade de amostra, seguida de hidratação (Kolberg et al., 2011). O uso de QuEChERS modificado têm sido aplicado para análises multirresíduos em matrizes de folhas frescas (Slowik-Borowiec, 2015) e secas (Steiniger et al., 2010; Machado et al., 2017), com uso de acetonitrila ou acetato de etila como solvente de extração e PSA, $MgSO_4$ e GCB para limpeza.

Este estudo tem como objetivo validar um método multirresíduos em folhas de *Passiflora edulis* por LC-MS/MS e analisar amostras coletadas em diferentes regiões do Brasil quanto aos níveis de pesticidas multiclases. Adicionalmente, fatores de processamento para folha seca de *P. edulis* foram estimados.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes e padrões

Solventes grau-HPLC acetato de etila, acetonitrila e metanol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Grau-HPLC tolueno foi obtido da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, USA); Ácido acético e acetato de sódio anidro (99.5 %) da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ). Sulfato de magnésio anidro foi obtido da Sigma-Aldrich (≥ 99.5 %) (St. Louis, MO). PSA (primary-secondary amine) foi obtido da Supelco (Bellefonte, PA), e formiato de amônio da Fluka (Buchs, Switzerland). Padrões analíticos de 50 compostos (94 -100% de pureza) foram adquiridos da Accu Standard (USA) (Tabela S1, Material Suplementar). Soluções mãe individuais dos pesticidas (1 mg mL^{-1}) foram preparadas em 10 mL (balões volumétricos calibrados com certificação “A”)

em tolueno, metanol, acetona ou acetato de etila, de acordo com a solubilidade e estabilidade de cada composto.

2.2 Amostras

Para fins de validação da metodologia analítica, foram coletados cerca de 3 kg de folhas das espécies *P. edulis* e *P. alata*, produzidos em sistema de cultivo orgânico no Distrito Federal. No total, 53 amostras de folhas (*P. edulis*) foram coletadas diretamente de 51 produtores de maracujá brasileiros, com áreas de produção nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Goiás e Distrito Federal (Mozzaquatro et al., 2019; Anexo 1). Todos são produtores do sistema convencional, e as amostras foram coletadas no período de fevereiro de 2016 a fevereiro de 2018. As amostras foram identificadas, pesadas e posteriormente armazenadas a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior processamento e análise.

2.3 Preparo das amostras

Cerca de 100 g de amostra de folha fresca congelada foi homogeneizada e processada em liquidificador. O preparo da amostra foi baseado no estudo de Jardim et al. (2014). Em resumo, 15 g de amostra foi pesado em tubo falcon de 50 mL, foram adicionados 15 mL de acetato de etila (ácido acético, 1%), seguido de agitação em vortex por 1 minuto. Logo, foi acrescentado 6 g de (MgSO_4) e 1,5 g de H_3COONa , agitando-se manualmente por 1 minuto e centrifugando-se (3500 rpm/5min.). Foram transferidas 6 mL de fase orgânica para tubo falcon de 15 mL contendo PSA e MgSO_4 (300 e 900 mg, respectivamente), agitou-se por mais 1 minuto. 1,5 mL do extrato foram transferidos para *vial*, que foram evaporados sob N_2 , ressuspensos com $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (50:50) e filtrados com filtro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ para injeção no LC-MS/MS.

Inicialmente, todas as amostras de folha fresca foram analisadas em duplicata. Para àquelas com concentrações superiores ao último ponto da curva de calibração, foram realizadas diluições, quantas vezes necessárias, até atingir valores dentro da faixa linear de trabalho. Amostras controle (QC) fortificadas contendo todos os analitos do escopo, com duas replicatas autênticas em pelo menos um nível de fortificação ($10\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$), e amostra branco foram analisadas durante os batches de injeções das amostras reais no sistema LC-MS/MS.

2.4 Fator de processamento

Amostras positivas de folhas frescas foram selecionadas, e uma porção foi submetida ao processo de secagem em secadora industrial com circulação de ar quente a uma temperatura média de 40 °C por cerca de 24 horas. As folhas secas foram trituradas em liquidificador, 2 g foi submetida à hidratação com 13 mL de água Milli-Q por 30 minutos antes de ser processada para análise como descrito no ítem 4.2.3. O fator de processamento (FP) folha fresca → folha seca, definido como a razão entre as concentrações do pesticida na amostra depois e antes do processamento foi calculado (FAO, 2003; Hamilton et al., 2016). Resíduos detectados em níveis abaixo do LOQ foram considerados como ½ LOQ.

2.5 LC-MS/MS

As amostras foram analisadas no sistema Shimadzu LC (Kyoto, Japan), acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo 4000QTRAP (SCIEX, Framingham, MA, USA), com fonte TurboIonSpray com ionização ESI (*Electrospray Ionization*) no modo positivo foi utilizado e os dados adquiridos pelo software de controle Analyst® V 1.5.2 (SCIEX). Os parâmetros ótimos do equipamento foram determinados como descrito no capítulo anterior (3.2.3. LC-MS/MS) e estão mostrados na Tabela S2, incluindo os tempos de retenção, os potencial de desagregação (DP), energia de colisão (CE), potencial de saída da célula de colisão (CXP), transições de qualificação e quantificação e razão de íons para cada composto. Os dados foram adquiridos no modo Scheduled MRM (*Multiple-Reaction-Monitoring*).

2.6 Validação

A validação do método foi realizada de acordo com as recomendações preconizadas por SANTE 11813/2017, descritos em detalhe na Seção 3.2.5 Validação do método. Foram avaliados a seletividade (existência de interferentes com mesmo tempo de retenção que os pesticidas de interesse) e linearidade (cinco níveis de concentração, três repetições, calibração externa em matriz). Diferentes fatores de ponderação foram testados ($1/x$, $1/x^2$, $1/y$, $1/y^2$) para analitos cujos dados da curva dos

mínimos quadrados se mostraram heterocedásticos. As concentrações da curva de calibração em matriz variaram entre 20 e 500 ng mL⁻¹.

Recuperações dos analitos em cada matriz (em %) foram avaliadas em 4 níveis de concentração no mesmo dia (n=5), pelo mesmo analista, de onde também foi estimado a repetibilidade (% RSD_r). A precisão intermediária foi avaliada repetindo o mesmo experimento em outro dia (% RSD_p, n=8-10). Para cada pesticida, o LOQ foi definido como o nível mais baixo para o qual o método foi validado de forma satisfatória (recuperação entre 70 e 120% e RSD_r e RSD_p ≤ 20%). Todas as replicatas usadas para validação foram preparadas a partir de soluções de trabalho de mistura.

3. Resultados

3.1 Validação

Os cromatogramas dos brancos não mostraram nenhum pico de interferência eluindo no mesmo tempo de retenção para 49 analitos dos 50 avaliados, o que indica boa seletividade do método. Apenas para o analito malaoxon foi detectada a presença de interferente eluindo no mesmo tempo de retenção do branco de *P. alata*, impedindo a inclusão deste pesticida no método. A Figura 4.1 mostra um cromatograma contendo 49 pesticidas do método multirresíduos desenvolvido em LC-MS/MS, onde são monitorados dois íons produtos para cada um dos analitos (Figura 4.1A) e cromatogramas de duas amostras reais (Figura 4.1B e 4.1C).

A grande maioria dos compostos avaliados obtiveram dados homocedásticos ($F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}, 5; 3$) com exceção de aldicarbe sulfóxido, carbendazim, metiocarbe e pirimicarbe, que obtiveram comportamento heterocedásticos ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}, 5; 3$), para os quais foram utilizadas ponderações que obtiveram os menores valores de somatório de erros ($1/x^2$, $1/x$, $1/x^2$ e $1/x$, respectivamente).

A Figura 4.2 apresenta resumidamente os resultados dos ensaios de recuperação (%), repetibilidade (RSD_r, %) e precisão intermediária (RSD_p, %) obtidas durante a validação em 4 diferentes concentrações para 49 analitos em folha de *P. edulis* analisados por LC-MS/MS. Os dados gerais podem ser vistos na Tabela S1 (Material suplementar).

A maioria dos analitos obteve recuperações entre 70 e 120% (Figura 4.2A). Doze analitos apresentaram recuperações menores que 70% em pelo menos um nível

de fortificação (63 – 69%). Metamidofós foi o pesticida que apresentou os menores valores de recuperação nos três primeiros níveis (entre 63 e 66%, Tabela S1). Clorpirifós, aldicarbe e pirimicarbe obtiveram as maiores recuperações no maior nível, 145, 139 e 137%, respectivamente. A repetibilidade (RSD_r) foi menor que 20% em todos analitos nos três menores níveis e para dez analitos os percentuais variaram de 21 a 28% no nível $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 4.2B; Tabela S1). A RSD_p foi inferior a 20% para maioria dos analitos nos quatro níveis avaliados (Figura 4.2C e Tabela S1). Os percentuais de RSD_p para carbofurano, aldicarbe sulfóxido e epoxiconazol foram de 21 e 28% nos níveis 10 e/ou $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Apesar dos desvios pontuais relacionados aos parâmetros de validação, o LOQ foi definido como $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ para todos os analitos avaliados.

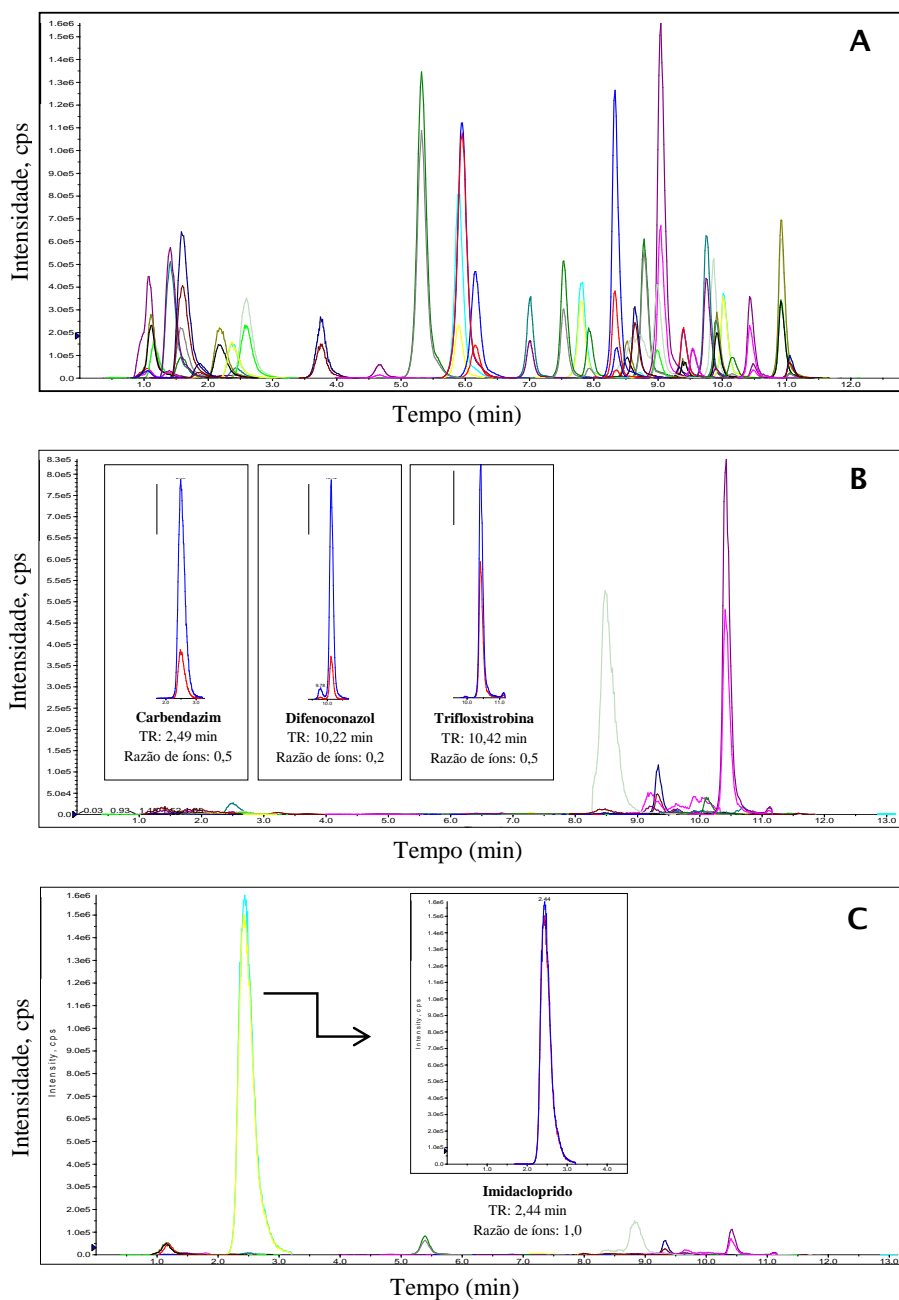


Figura 4.1. A: Cromatograma do método Scheduled MRM (multiple-reaction-monitoring) no sistema LC-MS/MS de uma solução de trabalho de mistura com 49 analitos na concentração de 100 ng mL^{-1} em matriz folha de *P. edulis*; B: Amostra real de folha fresca contendo carbendazim, difenoconazol e trifloxistrobina; C: Amostra real de folha seca contendo imidacloprido.

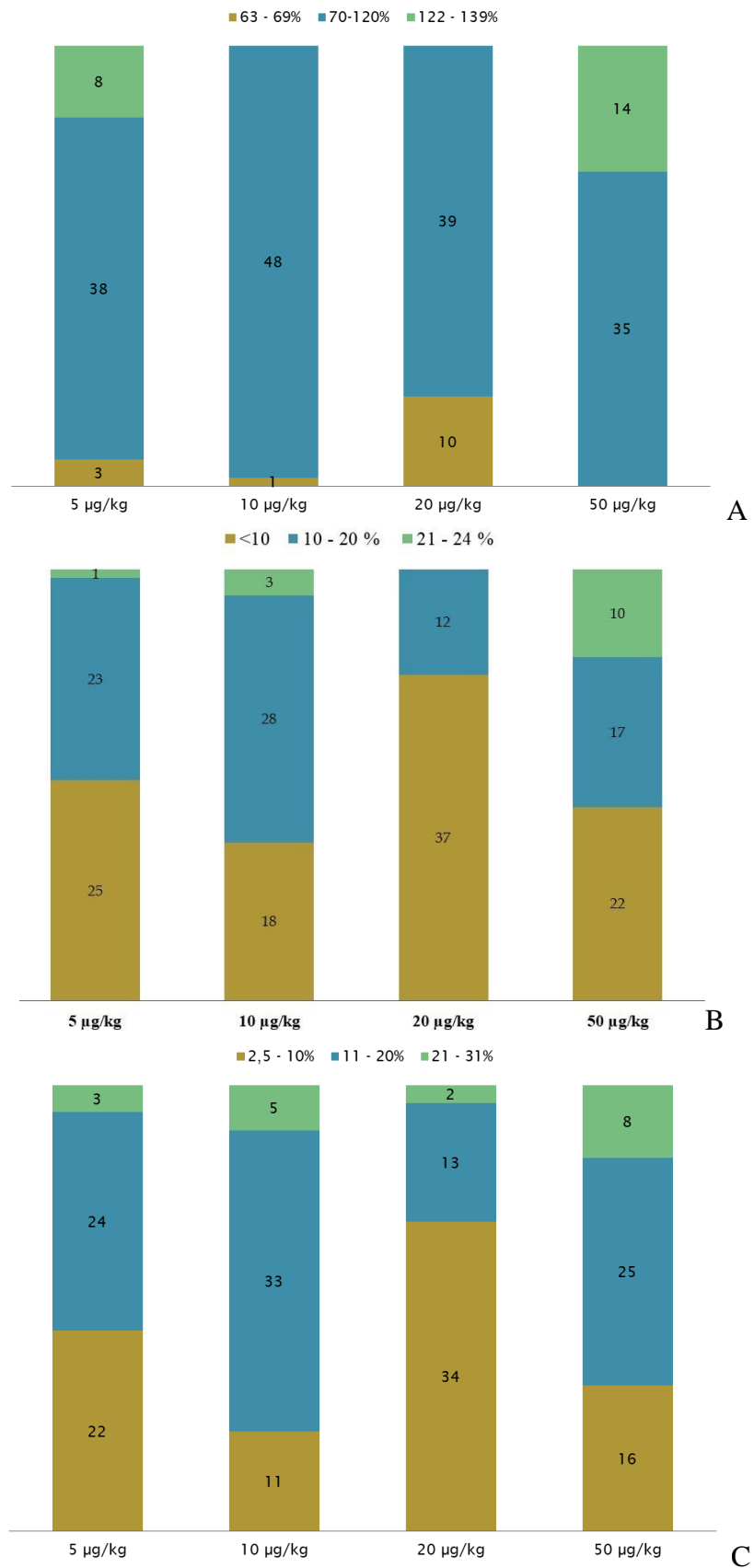


Figura 4.2. Resultados da validação do método para determinação de 49 analitos em folha de *P. edulis* por LC-MS/MS, em quatro níveis de fortificação. Percentagem de

analitos em cada faixa de A: Recuperação; B: Repetibilidade; C: Precisão intermediária.

3.2 Amostras reais e fatores de processamento

A Tabela 4.2 resume os resultados dos pesticidas detectados nas amostras de folhas frescas e secas de *P. edulis*. Os resultados para cada amostra estão detalhados na Tabela S13 (Material suplementar). Dos 49 analitos monitorados, 13 foram detectados nas amostras analisadas. O fator de processamento na folha seca foi calculado para cada analito. A mediana dos grupos organofosforados e triazois foi usada para estimar a concentração nas demais amostras não submetidas à secagem.

No total, foi detectada a presença de pelo menos um analito em 32 amostras de folha analisadas (60.4%). Carbendazim foi o mais frequente, detectado em 59% das amostras positivas, seguido de difenoconazol e tebuconazol, presentes em 44% das folhas, respectivamente. O nível máximo de 12 mg kg⁻¹ foi quantificado em uma amostra de folha fresca para carbendazim, que após o processo de secagem a concentração chegou a 40 mg kg⁻¹.

Os fungicidas triazois juntos representam 87,5% das detecções nas amostras positivas. As concentrações máximas nas folhas frescas e secas variaram de 0,6 e 0,7 mg kg⁻¹ e 4,9 e 3,5 mg kg⁻¹ para difenoconazol e tebuconazol, respectivamente (Tabela S2). O maior fator de processamento foi obtido para tebuconazol, cuja concentração inicial aumentou cerca de 9 vezes (FP=9,3).

Inseticidas pertencentes ao grupo dos organofosforados foram o segundo grupo mais frequente (75%), com concentrações que variaram de 0,01 a 2,5 mg kg⁻¹ e 0,06 a 6,0 mg kg⁻¹ nas folhas frescas e secas, respectivamente. Os fatores de processamento obtidos nesse grupo variaram de 2,1 a 6,2, com mediana de 4,9. A mediana de todos os fatores de processamento estimados foi de 5,4.

Dentro dos pesticidas detectados nas amostras de folha, mais da metade (69,2%) não tem uso autorizado para cultura do maracujá no Brasil, e correspondem aos inseticidas organofosforados (acefato, clorpirifós, metamidofós, ometoato, dimetoato, profenofós e malationa), carbamatos (metomil) e ao carbendazim, que sozinho foi o mais frequente, e também não tem uso permitido na cultura da *Passiflora* pela legislação brasileira, porém sua presença pode ter sido devido ao uso de tiofanato-metílico que possui autorização para aplicação no maracujá.

Tabela 4.1. Pesticidas detectados em amostras de folhas de *P. edulis* (N=53) por LC-MS/MS e fatores de processamento (FP) para diferentes grupos químicos

Analito	Folha fresca, faixa mg kg⁻¹ (n° positivas)	FP, faixa; mediana (n^a)	Folha seca, faixa^b mg kg⁻¹
Acefato	0,02 – 1,3 (6)	3,7 – 5,2; 4,4 (4)	0,09 – 4,9
Clorpirifós	(10) 0,01 – 1,6 (2)	2,1 – 5,6; 3,8 (2)	0,1 – 6,0
Dimetoato	2,5 (1)	4,9	12
Malationa	0,2 (1)	4,9	1,0
Metamidofós	0,6 (1)	4,0	2,2
Ometoato	0,02 – 0,3 (2)	3,9 (1)	0,07 – 1,2
Profenofós	0,01 – 0,06 (3)	5,5 – 6,2; 5,2 (3)	0,06 – 0,3
<i>Organofosforados</i>	<i>0,01 – 2,5 (24)</i>	<i>2,1 – 6,2; 4,9 (13)</i>	<i>0,06 – 6,0</i>
Difenoconazol	traços – 0,6 (14)	5,0 – 8,4; 6,6 (9)	0,02 – 4,9
Tebuconazol	traços – 0,7 (14)	2,0 – 9,3; 5,8 (11)	0,02 – 3,5
<i>Triazóis</i>	<i>Traços – 0,7 (28)</i>	<i>2,0 – 9,3; 6,0 (20)</i>	<i>0,02 – 4,9</i>
Metomil	0,02 – 0,8 (3)	3,2 – 5,0; 4,0 (3)	0,05 – 3,8
Carbendazim	0,01 – 12 (19)	3,0 – 7,7; 5,4 (13)	0,06 – 40
Imidacloprido	0,008 – 2,2 (8)	4,1 – 6,3; 5 (4)	0,04 – 9,3
Trifloxistrobina	0,01 – 0,07	2,9 – 8,6; 4,5 (6)	0,08 – 0,2

^a Valores de FP calculados; ^b concentrações estimadas na folha fresca para todas as amostras positivas de folha fresca a partir da mediana do FP. No caso dos compostos organofosforados e triazóis, foi utilizado o FP do grupo;

4. Discussão

Um método multirresíduos para 49 pesticidas de diferentes classes por LC-MS/MS em folha de *Passiflora* foi satisfatoriamente validado nesse trabalho. Outros autores também publicaram métodos para análise pesticidas em plantas medicinais. Zuin et al. (2003a; 2003b) e Bicchi et al. (2003) validaram métodos para análise de 13 inseticidas organoclorados e organofosforados em *Passiflora* por GC-ECD-FPD e outros autores utilizaram GC-MS/MS para analisar pesticidas em outras plantas medicinais (Tong et al., 2014; Hou et al., 2016; Taha e Gadalla, 2017). Nenhum estudo foi encontrado na literatura que tenha utilizado LC-MS/MS, técnica mais indicada para determinação de pesticidas mais polares, que não se comportam bem na cromatografia gasosa, como os triazóis (Machado et al., 2017).

Estudo anterior do nosso grupo (Mozzaquatro et al., 2019) reportou que 43,4% das mesmas 53 amostras de folha analisadas nesse estudo continham resíduos de fungicidas ditiocarbamatos, percentual menor que aquele para pesticidas incluídos no método multirresíduos (60%). Carbendazim foi o pesticida detectado com maior frequência nas amostras de folha, em níveis que chegaram a 12 mg kg^{-1} . O carbendazim não é permitido para uso em maracujá no Brasil, mas é um metabólito do tiofanato-metílico, que possui autorização de uso nessa cultura e não foi incluído nesse estudo. Nos frutos das mesmas plantas, o carbendazim foi o segundo pesticida mais detectado na casca (18,2%), mas foi detectado em apenas uma amostra de polpa em níveis traços (Capítulo 3; Tabela S7). Clorpirifós e imidacloprido foram detectados com frequência de 31 e 25% dentre as amostras de folhas positivas, e também detectados nos frutos (Capítulo 3; Tabela S7). Estes três pesticidas estão entre os mais detectados em amostras comerciais de chás e plantas medicinais coletadas na União Europeia e outros países, presentes em quase metade das 75 amostras analisadas (Lozano et al., 2012). Apesar da elevada frequência de detecção dos fungicidas triazóis nas folhas (53%), estes pesticidas foram detectados em apenas duas amostras de casca (Capítulo 3; Tabela S7).

A presença de pesticidas em plantas medicinais geralmente é proibida, mas se tratando de espécies de *Passiflora*, esses resíduos podem estar presentes nas folhas utilizadas como matéria-prima vegetal devido ao uso de pesticidas durante o manejo agrícola dos frutos (Bicchi et al., 2003). Zuin et al. (2003a) encontraram resíduos de pesticidas organoclorados e/ou organofosforados em 23% das 26 amostras comerciais

brasileiras de passiflora, inclusive tetradifon (0,07 mg kg⁻¹), clorotalonil (0,021 mg kg⁻¹) e malation (0,060 mg kg⁻¹). No Brasil, a falta de identificação da espécie de *Passiflora* é bastante comum nas passifloras comerciais e investigações quanto à presença de resíduos de pesticidas nessas espécies são escassas no mundo todo. Pesticidas organoclorados e organofosforados foram os mais detectados em amostras comerciais de ervas medicinais chinesas, em concentrações que chegaram a 0,2 mg kg⁻¹ (Tong et al., 2014). Taha e Gadalla (2017) encontram todas as 9 amostras de camomila seca (*Matricaria recutita*) contendo resíduos de pesticidas, incluindo clorpirifós, fentoato e tebuconazol (máximo de 0,13 mg kg⁻¹).

Nesse estudo, o fator mediano de processamento da folha fresca → folha seca foi de 5,4, maior que aquele reportado para ditiocarbamatos (1,3; Mozzaquatro et al., 2019). A concentração dos resíduos pela perda de água das amostras frescas é esperada, mas a estimativa dos fatores de processamento é inédita na literatura.

5. Conclusão

Um método multirresíduos para determinação de 49 pesticidas e metabólitos usando LC-MS/MS em folha de *Passiflora edulis* foi validado com sucesso, e 60,4 % das amostras continham pelo menos um analito. Os dados de resíduos presentes nas amostras analisadas indicam que boas práticas agrícolas não estão sendo realizadas por parte dos produtores brasileiros, uma vez que mais da metade dos analitos detectados não tem uso autorizado para cultura no País. No Brasil, só é permitido o uso de pesticidas em plantas medicinais que também são utilizadas como alimento, como é o caso da *Passiflora edulis*. O processo de secagem da folha eleva a concentração inicial do pesticida em até nove vezes, sendo importante que a produção agrícola para utilização da folha para fins medicinais (passiflora) tenha um manejo diferenciado daquele utilizado para produção de frutos, devido não apenas às concentrações elevadas, como também ao uso de pesticidas não autorizados para cultura.

Este é o primeiro trabalho que reporta dados de pesticidas em matéria-prima vegetal de *P. edulis* por LC-MS/MS. Estudos futuros deverão ser conduzidos para validar o método por GC-MS/MS para essa matriz, analisar amostras comerciais de passiflora e avaliar o potencial risco da exposição ao pesticida pelo uso desse medicamento.

Material Suplementar

Tabela S4.1. Recuperação, repetibilidade e precisão intermediária de 49 analitos na matriz folha de maracujá em LC-MS/MS em 4 níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Pesticida	Recuperação (RSD_r), % (n=5)				Precisão intermediária (RSD_p), % (n=8 ou 10)			
	5	10	20	50	5	10	20	50
Acefato	77 (10)	74 (16)	66 (8.8)	71 (2.0)	12	15	26	10
Aldicarbe	108 (13)	92 (7.5)	83 (6.0)	139 (26)	10	7.0	5.5	31
Aldicarbe sulfona	93 (12)	87 (19)	74 (4.5)	78 (14)	13	16	14	16
Aldicarbe sulfóxido	128 (4.5)	100 (24)	77 (11)	115 (21)	23	20	11	20
Atrazina	109 (6.5)	90 (5.5)	75 (7.0)	97 (5.0)	8.2	8.5	8.2	11
Azoxistrobina	81 (12)	74 (21)	80 (4.0)	110 (21)	18	17	4.0	17
Boscalida	94 (10)	99 (9)	76 (10)	118 (11)	7.5	19	8.5	10
Buprofezina	88 (3.0)	83 (18)	76 (6.0)	122 (10)	7.0	17	6.5	10
Carbaril	78 (4.0)	98 (6.0)	84 (4.0)	138 (20)	10	8.2	4.0	21
Carbendazim	96 (8.0)	84 (18)	78 (8.0)	101 (9.0)	13	15	8.0	17
Carbofurano	99 (13)	101 (5.0)	88 (5.5)	137 (22)	21	10	6.0	29
Carbofurano-3-OH	65 (14)	83 (11)	-	-	18	10	-	-
Clorpirifós	126 (3.5)	83 (20)	103 (11)	145 (4.0)	3.5	23	18	29
Clorpirifós metílico	109 (15)	70 (21)	67 (14)	95 (14)	16	19	23	14
Cresosim-metílico	107 (9.0)	85 (9.1)	69 (3.7)	108 (18)	8.3	9.7	4.6	14
Diazinona	100 (6.0)	91 (16)	78 (1.8)	128 (2.0)	5.2	21	3.0	2.5
Diclotofós	94 (12)	74 (7.0)	69 (4.0)	125 (3.0)	18	19	17	13
Difenoconazol	100 (12)	81 (7.7)	68 (4.3)	105 (3.1)	11	21	3.8	2.8
Dimetoato	89 (9.8)	90 (4)	91 (5.8)	110 (12)	18	10	5.6	11
EPN	127 (15)	99 (11.9)	73 (10.1)	114 (6.7)	12	18	10	7
Epoxiconazol	82	104	71	95	25	28	15	24

Pesticida	Recuperação (RSD _r), % (n=5)				Precisão intermediária (RSD _p), % (n=8 ou 10)			
	5	10	20	50	5	10	20	50
e	(24)	(5.0)	(6.0)	(22)				
Etiona	137 (3.0)	80 (5.5)	77 (6.0)	123 (7.0)	13	11	7.0	17
Etoprofós	125 (7.8)	98 (13)	77 (2.8)	73 (10)	20	15	10	9.0
Fenamifós	75 (12)	77 (19)	71 (7.0)	117 (3.0)	15	21	8.0	2.0
Fentoato	115 (16)	97 (12)	70 (6.0)	108 (4.0)	5.0	14	7.0	4.0
Fluquinconazole	125 (2.5)	97 (14)	72 (7.0)	105 (3.0)	5.5	17	7.6	13
Heptenofós	131 (3.1)	99 (5.3)	100 (4.3)	132 (7.0)	8.0	15	12	26
Imidacloprido	69 (10)	82 (12)	78 (18)	130 (28)	16	12	15	24
Fosmete	125 (6)	93 (7.6)	-	-	18	17	-	-
Malationa	123 (10)	110 (8.5)	69 (5.0)	128 (6.0)	8.6	19	7.6	6.6
Metamidofós	64 (6.0)	63 (15)	66 (5)	71 (2.0)	12	20	4.0	1.8
Metidationa	96 (6.0)	87 (12)	76 (7.0)	79 (20)	8.8	8.8	9.0	24
Metiocarbe	106 (14)	109 (20)	74 (14)	119 (15)	11	17	12	16
Metomil	94 (3)	94 (8.3)	79 (12.8)	124 (19)	7.6	10	11	18
Miclobutanil	99 (8)	87 (14)	68 (13)	108 (4)	11	14	14	4.5
Monocrotofós	94 (6.8)	80 (16)	72 (6.8)	125 (1.8)	12	19	8.5	15
Ometoato	84 (1)	78 (17)	70 (5.5)	80 (5.0)	6.0	12	6.5	8.0
Paraoxometílico	108 (8.8)	116 (8.9)	79 (12)	118 (17)	10	17	13	18
Piraclostrobina	98 (6.3)	82 (13.1)	72 (5)	109 (21)	12	12	4.5	16
Pirimicarbe	92 (11)	110 (13)	87 (4.5)	137 (18)	14	17	4.4	2.5
Pirimifós etílico	92 (3.3)	93 (13)	76 (7.5)	96 (19)	11	19	7.0	17
Pirimifós metílico	106 (2.5)	80 (15)	74 (4.4)	120 (19)	5.5	13	4.5	15
Procloraz	96 (18)	90 (15)	70 (2)	113 (3)	17	1.8	3.0	3.5

Pesticida	Recuperação (RSD _r), % (n=5)				Precisão intermediária (RSD _p), % (n=8 ou 10)			
	5	10	20	50	5	10	20	50
Profenofós	110 (11)	79.5 (13)	75 (2.8)	110 (6.1)	10	18	3.4	11
Quinalfós	107 (1)	97 (13)	71 (4)	108 (3)	6.0	18	3.5	3.6
Tebuconazol	116 (11)	91 (12)	66 (3.5)	99 (22)	16	17	5.0	17
Tiobencarbe	104 (12)	99 (9)	79 (5)	116 (22)	10	20	5.0	20
Triclorfon	79 (7)	83 (10)	68 (2)	117 (3.4)	8.1	8.3	6.7	9.7
Trifloxistrobina	90 (13)	72 (6)	72 (4)	106 (21)	10	5.2	4.4	16

EPN= O-Ethyl O-(4-nitrophenyl) phenylphosphonothioate

Tabela S4.2. Resíduos de pesticidas em amostras de folhas de *P. edulis* por LC-MS/MS

Amostra	Folha fresca (mg kg⁻¹)	Folha Seca * (mg kg⁻¹)
03/16	carbendazim (0,01), difenoconazol (0,02)	carbendazim (0,06), difenoconazol (0,13)
05/16	carbendazim (0,12), trifloxistrobina (0,04), tebuconazol (0,07)	carbendazim (0,44), trifloxistrobina (0,16), tebuconazol (0,44)
07/16	carbendazim (0,03)	carbendazim (0,16)
10/16	clorpirifós (0,01), malationa (0,2)	clorpirifós (0,05), malationa (0,95)
125/16	clorpirifós (1,59)	clorpirifós (6,03)
127/16	carbendazim (0,81), clorpirifós (0,02)	carbendazim (3,42), clorpirifós (0,10)
129/16	difenoconazol (0,01)	difenoconazol (0,06)
133/16	clorpirifós (0,02), dimetoato (2,46), ometoato (0,3)	clorpirifós (0,07), dimetoato (12,05), ometoato (1,2)
138/16	carbendazim (0,28), difenoconazol (0,01)	carbendazim (1,39), difenoconazol (0,10)
197/16	acefato (0,04)	acefato (0,17)
204/16	acefato (1,3), carbendazim (12,03), difenoconazol (<LOQ), metamidofós (0,6)	acefato (4,9), carbendazim (35,85), difenoconazol (0,02), metamidofós (4,0)
211/16	carbendazim (0,15), clorpirifós (0,01)	carbendazim (0,83), clorpirifós (0,05)
07/17	difenoconazol (<LOQ)	difenoconazol (0,02)
11/17	acefato (0,02), carbendazim (0,86), trifloxistrobina (0,05), tebuconazol (0,06)	acefato (0,13), carbendazim (5,59), tebuconazol (0,39), trifloxistrobina (0,14)
13/17	acefato (0,02), carbendazim (0,74), trifloxistrobina (0,04), tebuconazol (0,08), metomil (0,7)	acefato (0,09), carbendazim (2,92), tebuconazol (0,52), trifloxistrobina (0,24), metomil (3,84)
17/17	carbendazim (6,15), clorpirifós (0,09), difenoconazol (<LOQ), tebuconazol (<LOQ), metomil (0,08)	carbendazim (40,13), clorpirifós (0,20), difenoconazol (0,03), tebuconazol (0,02), metomil (0,35)
19/17	carbendazim (0,71), clorpirifós (0,05), tebuconazol (<LOQ)	carbendazim (3,84), clorpirifós (0,20), tebuconazol (0,02)
31/17	tebuconazol (0,006), trifloxistrobina (0,01)	tebuconazol (0,05), trifloxistrobina (0,08)
33/17	carbendazim (1,62), difenoconazol (0,2), profenofós (0,06)	carbendazim (8,66), difenoconazol (1,89), profenofós (0,32)
35/17	carbendazim (0,94), difenoconazol (0,6), profenofós (0,02)	carbendazim (5,51), difenoconazol (4,88), profenofós (0,10)
90/17	tebuconazol (<LOQ), imidacloprido (0,01)	imidacloprido (0,04), tebuconazol (0,02)
92/17	difenoconazol (<LOQ), tebuconazol (<LOQ)	difenoconazol (0,03), tebuconazol (0,03)
116/17	carbendazim (0,15), tebuconazol (0,008)	carbendazim (0,79), tebuconazol (0,02)

Amostra	Folha fresca (mg kg⁻¹)	Folha Seca * (mg kg⁻¹)
119/17	acefato (0,13), carbendazim (0,07), difenoconazol (<LOQ), tebuconazol (0,01)	acefato (0,51), carbendazim (0,40), difenoconazol (0,03), tebuconazol (0,06)
02/18	carbendazim (0,04), difenoconazol (0,1), tebuconazol (0,77), imidacloprido (0,02)	carbendazim (0,18), difenoconazol (0,74), imidacloprido (0,08), tebuconazol (3,48)
04/18	carbendazim (0,07), difenoconazol (0,01), imidacloprido (0,009)	carbendazim (0,33), difenoconazol (0,05), imidacloprido (0,06)
06/18	carbendazim (0,02), difenoconazol (0,01), trifloxistrobina (0,07), tebuconazol (0,07)	carbendazim (0,14), difenoconazol (0,08), trifloxistrobina (0,25), tebuconazol (0,30)
08/18	clorpirifós (0,01), imidacloprido (0,1)	clorpirifós (0,05), imidacloprido (0,87)
10/18	clorpirifós (0,01), imidacloprido (0,1)	clorpirifós (0,05), imidacloprido (0,77)
14/18	acefato (0,48), clorpirifós (0,01), imidacloprido (0,1)	acefato (2,10), clorpirifós (0,05), imidacloprido (0,81)
16/18	carbendazim (1,80), difenoconazol (0,006), imidacloprido (0,5), metomil (0,02), profenofós (0,01), tebuconazol (0,02)	carbendazim (10,03), difenoconazol (0,04), imidacloprido (2,94), metomil (0,05), profenofós (0,06), tebuconazol (0,09)
18/18	imidacloprido (2,2), trifloxistrobina (0,06), ometoato (0,02), tebuconazol (0,14)	imidacloprido (9,34), trifloxistrobina (0,26), ometoato (0,07), tebuconazol (0,53)

LOQ: 5 µg kg⁻¹. * amostras de folha fresca contendo resíduos < LOQ foram considerados como ½ LOQ

V. CONCLUSÕES FINAIS

A validação do método espectrofotométrico UV-Vis para determinação de fungicidas ditiocarbamatos, em termos de CS₂, nas matrizes de maracujá (casca, polpa e folhas) se mostrou satisfatória, com LOQ de 0,05 mg kg⁻¹ CS₂. Um total de 108 amostras de *P. edulis* (55 frutos e 53 folhas) de 51 produtores brasileiros (Bahia, Rio de Janeiro, Goiás e Distrito Federal) foi analisado pelo método validado. Cerca de um quarto das amostras foram positivas, mas nenhum resíduo foi encontrado nas amostras de frutos coletados de produtores baianos. A lavagem dos frutos reduziu os resíduos presentes (mediana do FP=0,5), e o processo de secagem das folhas (usada como droga vegetal) aumentou o nível de resíduos (mediana do FP=1,3). Nenhuma amostra continha resíduos para ditiocarbamatos acima do LMR para o maracujá (1,0 mg kg⁻¹ CS₂), indicando a aplicação de boas práticas agrícolas pelos agricultores com relação a essa classe de pesticidas.

Um método multirresíduos foi validado para determinação de 80 pesticidas multiclases em LC-MS/MS e GC-MS/MS nas matrizes casca e polpa de maracujá com LOQs de 5 a 10 µg kg⁻¹. Cerca de 60 % das 55 amostras de cascas analisadas foram positivas, com imidacloprido e carbendazim os mais detectados, mas apenas 25% das amostras de polpa continham resíduos, principalmente em níveis traços (< LOQ). Dezenove analitos foram detectados (pelo menos traços) em pelo menos uma amostra, mas apenas seis têm uso permitido para cultura do maracujá, e dois são proibidos no Brasil, o que indica o uso ilegal de pesticidas pelos produtores de maracujá. O processo de lavagem dos frutos reduziu os níveis de pesticidas em até 90%, mas a preparação da farinha da casca por desidratação aumentou os resíduos, com valor mediado de FP de 5,4, o que é esperado pela perda de água. A presença de pelo um pesticida foi detectada em 63% das 30 polpas congeladas comerciais, principalmente carbendazim, imidacloprido e acefato, indicando contaminação cruzada pela transferência de resíduos presentes na casca para a polpa durante o processo industrial. Cerca de 1/3 das 12 amostras de farinha de maracujá comercial analisadas continham resíduos, principalmente metamidofós. As exposições crônica e aguda estimadas pelo consumo de suco ou farinha não indicaram preocupação à saúde dos consumidores brasileiros.

Um método analítico para determinação de 49 pesticidas multiclases em folha de *P. edulis* por LC-MS/MS foi validado com LOQ de 5 µg kg⁻¹. A presença de pelo

menos um analito foi detectado 60.4% das amostras, principalmente carbendazim, difenoconazol e tebuconazol, percentual semelhante ao das amostras de casca dos mesmos cultivos, como indicado anteriormente. Os resultados indicam a aplicação de pesticidas não autorizados durante o manejo agrícola, inferindo que boas práticas agrícolas não estão sendo respeitadas por parte dos produtores brasileiros. Como esperado, houve redução dos níveis de pesticidas presentes após a lavagem da folha e aumento considerável desses níveis após a desidratação, processo utilizado para produção de passiflora.

O maracujá é uma cultura de grande importância no Brasil, devido ao seu alto consumo pela população, principalmente da *Passiflora edulis*, seja como suco preparado no domicílio a partir da fruta ou a partir da polpa de fruta congelada disponível comercialmente. O uso da casca do maracujá como alimento funcional tem se mostrado benéfico à saúde, principalmente na forma de farinha, pode ser utilizado como ingrediente de vários alimentos. Finalmente, a passiflora, droga vegetal preparada a partir da folha de *Passiflora* sp, é largamente utilizada pela população devido às suas propriedades farmacológicas.

A abrangência do uso do maracujá no contexto alimentar e medicinal mostra o quanto relevante é investigar esta cultura quanto à presença de resíduos de pesticidas, já que o manejo agrícola no campo para o controle de pragas se dá principalmente com uso de pesticidas. Os resultados deste trabalho podem subsidiar as autoridades governamentais, principalmente a ANVISA, para auxiliar nas decisões de autorização de registro de novos pesticidas para a cultura e extensionistas agrícolas para orientar os produtores quanto ao uso adequado desses produtos no campo.

Quanto às perspectivas futuras desse estudo, planeja-se validar o método por GC-MS/MS para folhas, aumentar o escopo de analitos, incluindo tiofanato-metílico, ampliar a coleta e análise de amostras de polpa de suco congelada, farinha e coletar amostras de passiflora comercial para consolidar os resultados da avaliação de risco à saúde.

REFERÊNCIAS

- Anastassiades, M.; Scherbaum E, T.; Stajnbaher, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis, pesticide chemistry. Crop Protection, Public Health, Environmental Safety. Edited, H Ohkawa, H Miyagawa, PW Lee. Eds. Wiley-VCH: Weinheim, Germany; P. 439. 2007.
- Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and 'Dispersive Solid-Phase Extraction' for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, 2003, 86, 412–431.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/registrosautorizacoes/agrotoxicos/produtos/avaliacao-toxicologica>. Acesso em 16/01/2021.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Instrução Normativa N° 02 de 13 de maio de 2014. Ministério da Saúde, 2014. Acesso em 02/04/2021.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução - RE n° 899, de 29/05/2003. Acesso em 02/04/2021.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2002. Resolução n° 347, de 16 de dezembro de 2002.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2011. Resolução n° 1, de 14 de janeiro de 2011. Regulamento técnico para o ingrediente ativo Metamidofós em decorrência da reavaliação toxicológica.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2014. Resolução da diretoria colegiada - RDC n° 26, de 13 de maio de 2014. Ministério da Saúde, 2014. Acesso em 02/04/2021.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2016. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 105, de 31 de agosto de 2016. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2016/rdc0105_31_08_2016.pdf Acesso em 02/04/2021.
- ANVISA, 2017. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/consulta-publica-sobre-avaliacao-toxicologi-1/219201/pop_up?inheritRedirect=false. Acesso em 11/01/2021.
- ANVISA, 2019a (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Análise de resíduos de agrotóxicos em fitoterápicos - perguntas e respostas. 3ª edição, 2019. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/FAQpublicar_limpo.pdf/e4596a7f-c00f-4700-8a04-a529bd95ee51. Acesso em: 10/03/2021.
- ANVISA, 2019b. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA Plano Plurianual 2017-2020 – Ciclo 2017/2018. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acesso em 11/01/2021.
- ANVISA, 2019c. Resolução da diretoria colegiada – RDC N° 294 de 29 de julho de 2019. Disponível em <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-294-de-29-de-julho-de-2019-207941987>. Acesso em 07/05/2021.
- ANVISA, 2019d. Resolução da diretoria colegiada – RDC N° 295 de 29 de julho de 2019. Disponível em <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-295-de-29-de-julho-de-2019-207944205>. Acesso em 07/05/2021.

- ANVISA, 2019e. Resolução da diretoria colegiada – RDC N° 296 de 29 de julho de 2019. Disponível em <https://alimentusconsultoria.com.br/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-no-296-de-29-de-julho-de-2019-anvisa/>. Acesso em 07/05/2021.
- ANVISA, 2021. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Limite Máximo de Resíduos (LMR); ANVISA: Brasília, DF, Brasil, 2021.
- ANVISA. Metiram. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M15%2B%2BMetiram.pdf/447ebf57-d6ec-482e-8302-cd599829bc73>>. Acesso em 19/01/2021.
- ANVISA. Monografias autorizadas. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/registros-eautorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>. Acesso em 02/03/2021.
- Aquino, A.; Souza, M. R. R.; Maciel, S. T. A.; Alexandre, M. da R.; Navickiene, S. Multiclass MSPD method for pesticide determination in dehydrated Hyptis pectinata (sambacaitá) medicinal plant by GC-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2011**, 22(8), 1525–1530.
- Ayres A. S. F. S. J.; Santos, W. B.; Junqueira-Ayres D. D.; Costa, G.M.; Ramos, F. A.; Castellanos, L.; Alves, J. S. F.; Asth, L.; Medeiros, I. U.; Silvana M. Zucolotto, S.M.; Gavioli, E.C. Monoaminergic neurotransmission is mediating the antidepressant-like effects of *Passiflora edulis* Sims fo. Edulis. *Neurosci. Lett.* **2017**, 660, 79–85.
- Ayres, A. S. F. S. J.; Araújo, L. L. S.; Soares, T. C.; Costa, G. M.; Reginatto, F. H.; Ramos, F.A.; Castellanos, L.; Schenkel, E. P.; Soares-Rachetti, V. P.; Zucolotto, S. M.; Gavioli, E. C. Comparative central effects of the aqueous leaf extract of two populations of *Passiflora edulis*, *Rev. Bras. Farmacogn.* **2015**, 25, 499–505.
- Aysal, P.; Ambrus, A.; Lehotay, S. J.; CannaVan, A. Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. *J Environ Sci Heal B.* **2007**, 42, 481–490.
- Banerjee, K.; Oulkar, D. P.; Dasgupta, S.; Patil, S. B.; Patil, S. H.; SaVant, R.; Adsule, P. G. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2007**, 1173, 98–109.
- Barbosa, P. R.; Valvassori, S. S.; Bordignon, C. L.; Kappel, V. D.; Martins, M. R.; Gavioli, E. C.; Quevedo, J.; Reginatto, F. H. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. *J. Med. Food.* **2008**, 11, 282–288.
- Bernacci L. C.; Soares-Scott M. D.; Junqueira, N. T. V.; Passos, I. R. S.; Meletti, L. M. M.; *PASSIFLORA edulis* SIMS: The correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Rev. Bras. Frutic.* **2008**, 30, 566–576.
- Bernacci, L. C.; Vitta, F. A.; Bakker, Y. V. Passifloraceae. In: Wanderley, M. G. L.; Shepherd, G. J.; Giulietti, A. M.; Melhem, T.S. (Ed.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo* **2003**, 3, 247–274.
- Bernardi, G.; Kemmerich, M.; Ribeiro, L. C.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; Prestes, O. D. An effective method for pesticide residues determination in tobacco by GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS employing acetonitrile extraction with low-temperature precipitation and d-SPE clean-up. *Talanta*, **2016**, 161, 40–47.

- Berrada, H.; Fernández, M.; Ruiz, M. J.; Moltó, J. C.; Mañes, J.; Font, G. Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty month (2004/05). *Food Control*, **2010**, 21, 36–44.
- Bicchi, C.; Cordero, C.; Iori, C.; Rubiolo, P.; Sandra, P.; Yariwake, J. H.; Zuin, V. G. SBSE-GC-ECD/FPD in the Analysis of Pesticide Residuos in Passiflora alata Dryander Herbal Teas. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 27–33.
- Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y.; Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1028, 267–276.
- Boonchiangma, S.; Ngeontae, W.; Srijaranai, S. Determination of six pyrethroid insecticides in fruit juice samples using dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. *Talanta*, **2012**, 88, 209 – 215.
- Botero-Coy, A. M.; Marín, J. M.; Ibáñez, M.; Sancho, J. V.; Hernández, F. Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 402, 2287–2300.
- Botero-Coy, A.M.; Marín, J.M.; Serrano, R.; Sancho, J.V.; Hernández, F. Exploring matrix effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of pesticide residues in tropical fruits. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, 407, 3667–3681.
- Brasil, 1984. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm. Acesso em 11/01/2021.
- Brasil, 2002. Decreto Nº 4074, de 04 de janeiro de 2002. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em 11/01/2021.
- Brasil, 2011. . Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2011.
- Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuaria. – Brasília: MAPA/ACS, 2011.
- Caldas, E. D. Introduction to Dietary Risk Assessment of Pesticides, Chapter 1, In: Ambrus A.; Hamilton D. Food Safety Assessment of Pesticide Residues. New Jersey: World Scientific, **2017**.
- Caldas, E. D.; Conceição, M. H.; Miranda, M. C., Souza, L. C. K. R.; Lima, J. F. Determination Of Dithiocarbamate Fungicide Residues In Food By A Spectrophotometric Method Using A Vertical Disulfide Reaction System. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (10), 4521-4525.
- Caldas, E. D.; Boon, P. E.; Tressou, J. Probabilistic assessment of the cumulative acute exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Brazilian diet. *Toxicology*. **2006**, 222, 132–142.
- Cao, Y.; Tang, H.; Chen, D.; Li, L. A novel method based on MSPD for simultaneous determination of 16 pesticide residues in tea by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, **2015**, 998-999, 72–79.
- Carneiro, R. P.; Oliveira, F. A.; Madureira, F. D.; Silva, G.; de Souza, W. R.; Lopes, R. P. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis. *Food Control*. **2013**, 33(2), 413–423.

- Casida, J. E.; Durkin, K. A. Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chem. Biol. Interact.*, **2013**, 203 (1), 221–225.
- Castro, J. S. M.; Confalonieri, U. Uso de Agrotóxicos no Município de Cachoeiras de Macau (RJ). *Cien. Saude Colet.*, **2005**, 10, 473–482.
- Cazarin, C. B.; Silva, J. K.; Colomeu, T. C.; Batista, A. G.; Vilella, C. A.; Ferreira, A. L.; Junior, S. B.; Fukuda, k.; Augusto, F.; Meirelles, L. R.; Zollner, R. L.; Junior, M. R. M. Passiflora edulis peel intake and ulcerative colitis: approaches for prevention and treatment. *Exp. Biol. Med.* **2014**, 51, 239–542.
- Cerqueira, M. B. R.; Caldas, S. S.; Primel, E. G. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. *Journal of Chromatography A*, **2014**, 1336, 10–22.
- Cervi, A. C. O gênero Passiflora L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. Adumbrationes ad Summae Editionem, Madrid, v. 16, p. 1-5, **2006**.
- Chau, C. F.; Huang, Y. L. Characterization of passion fruit seed fibres - A potential fibre source. *Food Chem.* **2004**, 85, 189–194.
- Chen, C., Qian, Y., Chen, Q., Tao, C., Li, C., & Li, Y. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China. *Food Control*, **2011**, 22, 1114–1120.
- Chen, G.; Cao, P.; Liu, R. A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. *Food Chem.* **2011**, 125, 1406–1411.
- Chen, L.; Song, F.; Liu, Z.; Zheng, Z.; Xing, J.; Liu, S. Multi-residue method for fast determination of pesticide residues in plants used in traditional chinese medicine by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2012**, 1225, 132–140.
- Chen, L., Yin, L., Song, F., Liu, Z., Zheng, Z., Xing, J., & Liu, S. Determination of pesticide residues in ginseng by dispersive liquid–liquid microextraction and ultra 78 high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **2013**, 917–918, 71–77.
- Chen, Y.; Guo, Z.; Wang, X.; Qiu, C.; Sample preparation. *J. Chromatogr. A*. **2008**, 1184, 191–219.
- Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim. Nova*, **2008**, 31 (3), 623–636.
- Claeys, W. L.; Schmit, J. F.; Bragard, C.; Maghuin-Rogister G.; Pussemier, L.; Bruno Schifffers, B. Exposure of several Belgian consumer groups to pesticide residues through fresh fruit and vegetable consumption. *Food Control* **2011**, 22, 508–516.
- Collimore, W. A.; Bent, G. A. A newly modified QuEChERS method for the analysis of organochlorine and organophosphate pesticide residues in fruits and vegetables. *Environmental Monitoring and Assessment*, **2020**, 192(2), 128.
- COMEXSTAT, Comércio exterior brasileiro, 2019. Consultado em 14/01/2021
- Concha-meyer, A., C.; Grandon, S.; Sepúlveda, G.; Diaza, R.; Yurib, J. A.; Torres, C. Pesticide residues quantification in frozen fruit and vegetables in Chilean domestic market using QuEChERS extraction with ultra-high-performance liquid chromatography electrospray ionization Orbitrap mass spectrometry Anibal. *Food Chemistry*, **2019**, 295, 64–71.

- Córdova, K. R. V.; Gama, T. M. M. T. B.; Winter, C. M. G.; Neto, G. K.; Freitas, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. *B. CEPPA*. **2005**, 23, 221–230.
- Costa, A. M.; Tupinambá, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. (Eds.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: *Embrapa Cerrados*. **2005**, 475-506.
- Crnogorac G.; Schmauder, S.; Schwack, W. Trace analysis of dithiocarbamate fungicide residues on fruits and vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, 22, 2539–2546.
- Crnogorac, G.; Schwack, W. Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. *Trends in Analytical Chemistry*, **2009**, 28, 40-50.
- Cullen, T. E. Spectrophotometric Determination of Dithiocarbamate Residues in Food Crops. *Anal. Chem.* 1964, 36, 221–224.
- Cunha, M. A. P.; Barbosa, L.V.; Junqueira, N.T.V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A.A. (Ed.). Maracujá Produção: Aspectos Técnicos. Brasília: *Embrapa Informação Tecnológica*, **2002**, 15, 104.
- Dankyi, E.; Carboo, D.; Gordon, C.; Fomsgaard, I. S. Application of the QuEChERS procedure and LC–MS/MS for the assessment of neonicotinoid insecticide residues in cocoa beans and shells. *J. Food Compos. Anal*, **2015**, 44, 149–157.
- Deng, J.; Zhou, Y. J.; Bai, M. M.; Li, H. W.; LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, 128, 148–153.
- Dhawan, K.; Dhawan, S.; Chhabra, S. Attenuation of benzodiazepine dependence in mice by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus: a non-habit forming anxiolytic. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2003, 6, 215–222.
- Directiva 2002/657/EC. Decisão da Comissão das Comunidades Europeias de 12 de Agosto de 2002. Disponível em <http://eur-lex.europa.eu/eli/dec/2002/657/oj>. Acesso em 12/01/2021.
- Doerge D. R.; Takazawa R. S. Mechanism of thyroid peroxidase inhibition by ethylenethiourea. *Chem. Res. Toxicol.* 1990, 3, 98–101.
- Dórea, H. S.; Lanças, F. M. Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction of Organophosphorus and Synthetic Pyrethroid Pesticides in Cashew Nut and Passion Fruit. *J. Microcolumn Separations*. **1999**, 15, 367 – 375.
- Dubey, J. K.; Patyal, S. K.; Sharma, A. Validation of QuEChERS analytical technique for organochlorines and synthetic pyrethroids in fruits and vegetables using GC-ECD. *Environ. Monit. Assess.*, **2018**, 190, 231–242.
- Ecobichon, D. J. Toxic effects of pesticides. In: Amdur, M. O. & Klaassen C. D., editors. Casarett and Doll's toxicology: the basis of poisons. 6º Edição. New York: Mc Graw Hill; **2001**.
- EFSA, 2009 (European Food Safety Authority). Scientific opinion on risk assessment for a selected group of pesticides from the triazole group to test possible methodologies to assess cumulative effects from exposure through food from these pesticides on human health. EFSA panel on plant protection products and their residues (PPR Panel). Parma, Italy. *EFSA Journal* **2009**; 7 (9); 1167.
- EFSA, 2018 (European Food Safety Authority). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance thiophanatemethyl. CONCLUSION ON PESTICIDES PEER REVIEW. *EFSA Journal* 16(1): 5133. 2018.

- Embrapa Cerrados. Rede Passitec Etapa II: Desenvolvimento tecnológico para uso funcional das *passifloras* silvestres. Disponível em <http://www.cpac.embrapa.br/Passitec/>. Acesso em 11/01/2021.
- Embrapa, 2000. A Cultura do maracujazeiro. Belo Horizonte: EPAMIG, 21, **2000**.
- Embrapa, 2016. Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Fábio Gelape Faleiro, Nilton Tadeu Vilela Junqueira, editores técnicos. Brasília, DF. 341 p.: il.; 16 cm x 22 cm. *Coleção 500 perguntas, 500 respostas*. 1, 1-348, **2016**.
- EPA, 2011 (Environmental Protection Agency). Pyrethrins/pyrethroid cumulative risk assessment. U.S. Environmental protection agency office of pesticide programs. October 4. 2011. Disponível em <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2011-0746-0003>. Acesso em 11/01/20182021.
- European Commission. 2021. "EU Pesticides Database." Regulation (EC) No 1107/2009.
- Faleiro, F. G. Avanços e perspectivas do melhoramento genético das *Passifloras* no Brasil, Capítulo 5, *in* Maracujá: dos recursos geneticos ao desenvolvimento tecnologico/ Marisol Parra Morera, Ana Maria Costa; Fábio Gelape Faleiro; Adalberto Rodríguez Carlosama; Carlos Carranza - Brasília, DF, **2018**.
- Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Fávero, A. P.; Lopes, M. A. Pré-melhoramento de Plantas: experiências de sucesso. In: Faleiro, F. G.; Fariasneto, A. L.; Ribeiro Junior, W. Q. (Eds). Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios. Planaltina: Embrapa Cerrados; Brasília: *Embrapa Informação Tecnológica* **2008**, 45-62.
- Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Jesus, O. N.; Costa, A. M.; Machado, C. F.; Junqueira, K. P.; Araújo, F. P.; Junghans, T. G. Espécies de maracujazeiro no mercado internacional. JUNGHANS, T.G.; JESUS, O.N. (Eds.) Maracujá: do cultivo à comercialização. Brasília, DF: Embrapa, **2017**. p. 15-37.
- FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). **Joint Meeting on Pesticide Residues"** (JMPR). Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/jmpr/en/>. Acesso em 16/01/2021.
- FAO, 2003. Dietary risk assessment for pesticide residues in food. Pesticide residues in food 2003. Report of the Joint Meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO expert group on pesticide residues. URL <<http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>>Acesso em 15/01/2021.
- FAO, 2011 (Food and Agricultural Organization). TROPICAL FRUITS COMPENDIUM Disponível em: <http://www.fao.org/3/am481t/am481t.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2021.
- FAO/WHO (2020). Pesticide residues in food 2019 - Report 2019 - Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Rome.
- Farajzadeh, M. A.; Yadeghari, A.; Khoshmaram, L. Combination of dispersive solid phase extraction and dispersive liquid–liquid micro-extraction for extraction of some aryloxy pesticides prior to their determination by gas chromatography. *Microchem. J.*, **2017**, 131, 182–191.
- Farajzadeh, M. A.; Yadeghari, A.; Khoshmaram, L. Combination of dispersive solid phase extraction and dispersive liquid–liquid micro-extraction for extraction of some aryloxy pesticides prior to their determination by gas chromatography. *Microchem. J.*, **2017**, 131, 182–191.

- Ferreira, F. R. Recursos Genéticos de Passiflora. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, **2005**, 41-51.
- Ferreira, J. A.; Ferreira, J. M. S.; Talamini, V.; de, J.; Facco, F.; Rizzetti, T. M.; Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; Bottoli, C. B. G. Determination of pesticides in coconut (*Cocos nucifera* Linn.) water and pulp using modified QuEChERS and LC-MS/MS. *Food Chem.* **2016**, 213, 616–624.
- Ferrer, C. M. J.; Martinez-Bueno, A. L.; Fernandez-Alba, A. R. Pesticide residue analysis of fruit juices by LC-MS/MS direct injection. One year pilot survey. *Talanta*, **2011**, 83, 1552–1561.
- Fischer, I. H.; Arruda, M. C.; Almeida, A. M.; Garcia, M. J. M.; Jeronimo, E. M.; Pinotti, R. N.; Bertani, R. M. A. Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em maracujá amarelo de cultivo convencional e orgânico no centro oeste paulista. *Revista Brasileira de Fruticultura.* **2007**, 29 (2), 254–259.
- Fleury, F. N.; Nascimento, C. A.; Faria, E. O.; Cruvinel, A. R.; Oliveira, J. M. Within-laboratory validation of a multiresidue method for the analysis of 98 pesticides in mango by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam., Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* **2012**, 29(4), 641-56.
- Friedrichs, K.; Winkeler, H. D.; Gerhards, P. Determination of Dithiocarbamate Residues in Foodstuff by Headspace Gas Chromatography and Flame Photometric Detection. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, 201, 69-73.
- Gonzalez-Rodríguez, R. M.; et. al. A Review on the Fate of Pesticides during the Processes within the Food-Production Chain. Critical Reviews, *Food Science and Nutrition*, **2011**, 51, 99-114.
- Grande-Martinez, A., Arrebola-Liebanas, F.J., Martinez-Vidal, J.L., Hernandez-Torres, M.E., Garrido-Frenich, A. Optimization and validation of a multi-residue pesticide method in rice and wheat flour by modified QuEChERS and GC-MS/MS. *Food Anal. Methods*, **2016**, 9, 548–563.
- Gustafsson, K. H.; Fahlgren, C. H. Determination of Dithiocarbamate Fungicides in Vegetable Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31(2).
- Gutiérrez, S. L. G.; Chilpa, R. R.; Jaime, H. B. Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2014**, 24, 591-608.
- Gutiérrez, S. L. G.; Chilpab, R. R.; Jaimea, H. B. Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2014**, v. 24, p. 591-608.
- Harrington, P.; Horner, J.; Hird, S.; Griffiths, T.; Reynolds, S. L. Modification of the Method for Measurement of Dithiocarbamate Residues as Carbon Disulfide in Fruit and Vegetables. *Central Science Laboratory*, **1998**, 1-34.
- Hayama, T.; Takada, M. Simple and rapid method for the determination of ethylenebisdithiocarbamate fungicides in fruits and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 392, 969–976.
- Hercegová, A.; Dömötöróvá, M.; Matisová, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. *J. Chromatogr. A.* **2007**, 1153, 54–73.
- Hernández, F.; Sancho J. V.; Pozo O. J. An estimation of the exposure to organophosphorus pesticides through the simultaneous determination of their

- main metabolites in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **2004**, 808, 229–239.
- Hernandez-Santos, B.; Vivar-Vera M. A.; Rodriguez-Miranda, J.; Herman-Lara, E.; Torruco-Uco, J. G.; Acevedo-Vendrell, O.; Martínéz-Sánchez, C. E. Dietary fibre and antioxidant compounds in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel and depectinised peel waste. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2015**, 50, 268–274.
- Hill, A. R. C. Headspace Methods for Dithiocarbamates. Modern Methods for Pesticide Analysis. Emerging Strategies for Pesticide Analysis, *CRC Press Inc*, **1992**, 213-231.
- Hjorth, K.; Johansen, K.; Holen, B.; Andersson, A.; Christensen, H. B.; Siivinen, K.; Toome, M. Pesticide residues in fruits and vegetables from South America – a Nordproject. *Food Control*, **2011**, 22, 1701–1706.
- Hou, X.; Lei, S.; Guo, L.; Qiu, S. Optimization of a multi-residue method for 101 pesticides in green tea leaves using gas chromatography tandem mass spectrometry. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2016**, 26(4), 401–407.
- Húšková, R. et al. Analysis of pesticide residues by fast gas chromatography in combination with negative chemical ionization mass spectrometry. *J. ChromatogrChromatogr. aphy A.* **2009**, V. 1216, p. 6326–6334.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa de orçamentos familiares 2008/2009, Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Microdados. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, 20112.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa de orçamentos familiares 2017/2018, Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Microdados. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, 2020.
- IBGE, 2019. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal.
- IBGE, 2020. Pesquisa de orçamentos familiares 2008/2009. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Microdados. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro.
- IBGE, 2020. Pesquisa de orçamentos familiares 2008/2009. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Microdados. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro.
- IBGE, 2021. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/0>
- Ichimura, T.; Yamanaka, A.; Ichiba, T.; Toyokawa, T.; Kamada, Y.; Tamamura, T.; Maruyama, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. *Biosci, Biotechnol. and Biochemi.* **2006**, 70(3), 718–721.
- Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Documento de caráter orientativo – revisão 09. 2020. 30p.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS), 2009. Environmental Health Criteria 240 - Principles and methods for the Risk Assessment on Chemicals in Food. Disponível em

- http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc240_index.htm. Acesso em 17/01/2021.
- International Programme on Chemical Safety; *Risk Assessment Terminology*. Harmonization Project. WHO, Geneva, 2004. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/harmproj/harmproj/harmproj1.pdf>. Acesso em 17/01/2018.
- IPCS (International Program on Chemical Safety). Pesticide residues in food-1993 evaluations. Part II. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v93pr01.htm>>.
- Ishimoto, F. Y.; Harada, A. I.; Branco, I. G.; Conceição, W. A. S.; Coutinho, M. R.; Alternative Use of Yellow Passionfruit Skin (*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg.) for the Production of Cookies. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, **2007**, 9, 280 – 292.
- Jafari, A.; Shoeibib, Sh.; Aminic, M.; Amirahmadib, M.; Rastegar, H.; Ghaffariana A.; Ghazi-khansaria, M.; Monitoring dithiocarbamate fungicide residues in greenhouse and non-greenhouse tomatoes in Iran by HPLC-UV. *Food Addit. Contam.* **2012**, 5 (2), 87–92.
- Janebro, D. I.; Queiroz, M. S. R.; Ramos, A. T.; Sabaá-Srur, A. U.O., Cunha, M. A. L.; Diniz, M. F.F.M. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, 18, 724-732.
- Jardim, A. N. O. Resíduos de pesticidas em alimento: validação de metodologia analítica, análise em frutas e avaliação da exposição da população brasileira pelo método probabilístico. **2012**. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- Jardim, A. N. O.; Brito, A. P.; Donkersgoed, G.; Boon, P. E.; Caldas, E. D. Dietary cumulative acute risk assessment of organophosphorus, carbamates and pyrethroids insecticides for the Brazilian population. *Food Chem Toxicol.* **2018a**, 112, 108-117.
- Jardim, A. N. O.; Caldas, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. *Food Control* **2012**, 25, 607-616.
- Jardim, A. N. O.; Mello, D. C.; Goes, F. C. S.; Frota, E. F.; Caldas, E. D. Pesticide Residues in Cashew Apple, Guava, Kaki and Peach: GC-MECD, GC-FPD and LC-MS/MS Multiresidue Method Validation, Analysis and Cumulative Acute Risk Assessment. *Food Chemistry*, **2014**.
- Jardim, A. N. O.; Mello, D. C.; Brito, A. P.; Voed H. Boon, P. E.; Caldas, E. D. Probabilistic dietary risk assessment of triazole and dithiocarbamate fungicides for the Brazilian population. *Food and Chemical Toxicology.* **2018b**, 118, 317–327.
- Jardim, A.N.O.; Caldas, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Quim. Nova* **2009**, 32, 1898-1909.
- Jeschke, P.; Nauen, R. Neonicotinoids from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science*, v. 64, p. 1084-1098, **2008**.
- Jesus, O. N., et al. Recursos Genéticos de *Passiflora* L. na Embrapa: pré-melhoramento e melhoramento genético, Capítulo 1, in Maracujá: dos recursos geneticos ao desenvolvimento tecnologico/ Marisol Parra Morera, Ana Maria Costa; Fábio Gelape Faleiro; Adalberto Rodríguez Carlosama; Carlos Carranza - Brasília, DF, **2018**.

- Jianren, Y.; Yongquan, Z.; Shuzhen, J.; Zhengguo, W.; Fuzhen, Z. Gas Chromatographic Headspace Determination of Dithiocarbamate Fungicide Residues on Vegetables. *Sci. Agric. Sin.* **1989**, *22*, 76-80.
- JMPR, 2007. Pesticide Residues in Food - 2007 (JMPR Evaluations. Part II Toxicological) Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Junqueira-Guertzenstein, S. M.; Srur, A. Uso da casca de maracujá (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*, Deg.) cv amarelo na alimentação de ratos (*rattus norvegicus*) normais e diabéticos. *Revista Cadernos do Centro Universitário São Camilo*. **2002**, *10*, 213–218.
- Juraske, R.; Fantke, P.; Ramírez, A. C. R.; González, A. Pesticide residue dynamics in passion fruits: Comparing field trial and modelling results. *Chemosphere*, **2012**, *89*, 850-855.
- Kazos, E. A.; Stalikas, C. D.; Nanos, C. G.; Konidari, C. N. Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. *Chemosphere*, **2007**, *68*, 2104–2110.
- Kemmerich, M.; Bernardi, G.; Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; Zanella, R. Comprehensive Method Validation for the Determination of 170 Pesticide Residues in Pear Employing Modified QuEChERS Without Clean-Up and Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods*, **2018**, *11*, 556–577.
- Kemmerich, M.; Demarco, M.; Bernardi, G. Balls-in-tube matrix solid phase dispersion (BiT-MSPD): An innovative and simplified technique for multiresidue determination of pesticides in fruit samples. *Journal of Chromatography A*, **2020**, *1612*, 460640.
- Keppel, G. E. Modification of the carbon disulfide evolution method for dithiocarbamate residues. *J. assoc. Off. anal. Chem.* **1969**, *52*, 162–167.
- Kolberg, D. I.; Prestes, O. D.; Adaime, M. B.; & Zanella, R. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. *Food Chemistry*, **2011**, *125*(4), 1436–1442.
- Konta, E. M.; Almeida, M. R.; Amaral, C. L.; Darin, J. D.; Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z.; Antunes, L. M.; Bianchi, M. L. Evaluation of the antihypertensive properties of yellow passion fruit pulp (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) in spontaneously hypertensive rats. *Phytother. Res.* **2014**, *28*, 28–32.
- Kosalec, I.; Cvek, J.; Tomirtensive rats. .; Darin, J. D.; Rosso, V. V.; Mercadante, *Aarh Hig Rada Toksikol.* **2009**, v. 60, p. 485-501.
- Kwon, H.; Kim, T.K.; Hong, S. M.; Se, E. K.; Cho, N. J. Kyung, K. S. Effect of Household Processing on Pesticide Residues in Field-sprayed Tomatoes. *Food Sci. Biotechnol.*, **2015**, *24*(1), 1-6.
- Lee, J.; Shin, Y.; Lee, J.; Lee, J.; Kim, B. J.; Kim, J. H. Simultaneous analysis of 310 pesticide multi-residues using UHPLC-MS/MS in brown rice, orange, and spinach. *Chemosphere*, **2018**, *207*, 519–526.
- Lehotay, S. J.; Kok, A.; Hiemstra, M.; Bodegraven, P. V. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* **2005a**, *88*(2), 595–614.
- Lehotay, S. J.; Maštovská, K.; Lightfield, A. R. Use of buffering to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.* **2005b**, *88*(2), 615–629.

- Lehotay, S. J.; Son, K. A.; Kwon, H.; Koesukwiwat, U.; Fu, W.; Mastovska, K.; et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, **2010**, 1217, 2548–2560.
- Lesueur, C.; Knittl, P.; Gartner, M.; Mentler, A.; Fuerhacker, M. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control* **2008**, 19, 906-914.
- Li, H.; Zhou, P.; Yang, Q.; Shena, Y.; Deng, J.; Li, L.; Zhao, D. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, 133, 1085–1090.
- Li, J.; Gu, Y.; Xue, J.; Jin, H. Y.; Ma, S. Analysis and Risk Assessment of Pesticide Residues in a Chinese Herbal Medicine, *Lonicera japonica* Thunb. *Chromatographia*, **2017**, 80(3), 503–512.
- Lima, C. C. Aplicação das farinhas de linhaça (*Linum Usitatissimum* L.) e maracujá (*Passiflora Edulis* Sims F. *Flavicarpa* Deg.) no processamento de pães com propriedades funcionais. 2007. 148f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, **2007**.
- Liu, H.; Kong, W.; Gong, B.; Miao, Q.; Qi, Y.; Yang, M. Rapid analysis of multipesticides in *Morinda officinalis* by GC–ECD with accelerated solvent extraction assisted matrix solid phase dispersion and positive confirmation by GC–MS. *Journal of Chromatography B*, **2015**, 974, 65–74.
- Lopes, R. P.; Freitas, E. E.; Filho, J. F. A.; Vargas, E. A.; Augusti, D. V.; Augusti, R.. Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LCeMS/MS analysis. *Food Control*. **2012a**, 28, 192 – 198.
- Lopes, R. P.; Reyes, R. C.; González, R. R.; Vidal, J. L.; Frenich, A. G. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **2012b**. 895e 896, 39e47.
- López-Fernández, O.; Rial-Otero, R.; González-Barreiro C.; Simal-Gándara, J. Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. *Food Chem.* **2012**, 134, 366-374.
- Lozano, A.; Rajski, Ł.; Belmonte-Valles, N.; Uclés, A.; Uclés, S.; Mezcua, M.; Fernández-Alba, A. R. Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: validation and pilot survey in real samples. *J Chromatogr A*, **2012**, 1268:109–122.
- Łozowicka, B.; Rutkowska, E.; Jankowska, M. Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. *Environmental Science and Pollution Research*. **2017**, 24(8), 7124–7138.
- Machado, I.; Gerez, N.; Piston, M.; Heinzen, H.; Cesio, M. V. Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC–MS and LC–MS/MS using the same QuEChERS procedure. *Food Chemistry*, **2017**, 227, 227–236.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), **2017**. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtosvegetal/copy_of_pncrc-vegetal. Acesso 11/01/2021.

- Maštovská, K.; Lehotay, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1040, 259-272.
- Medeiros, J. S.; Diniz, M. F. F. M.; Srur, S. O.; Pessoa, M. B.; Cardoso, M. A. A. Carvalho, D. F. Ensaios toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*), como alimento com propriedade de saúde. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **2009**, 19(2A), 394-399.
- Medeiros, J. S.; Srur, A. U. O. S.; Pessoa, M. B.; Diniz, M. F. F. M. Avaliação das atividade hipoglicemiantes e hipolipemiantes da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*). *Rev. bras. anal. Clin.*, **2009**, 41, 99-101.
- Medina, S.; Collado-González, J.; Ferreres, F.; Londoño-Londoño, J.; Jiménez-Cartagena, C.; Guy, A.; Durand, T.; Galano, J. M.; Gil-Izquierdo, A. “Quantification of Phytoprostanes – Bioactive Oxylipins – and Phenolic Compounds of *Passiflora Edulis* Sims Shell Using UHPLC-QqQ-MS/MS and LC-IT-DAD-MS/MS.” *Food Chemistry*, **2017**.
- Meletti, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Rev. Bras. Frutic.* **2011**, 083-091.
- Meletti, L. M. M.; Brückner, C.H. Melhoramento Genético. In: BRÜCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. *Porto Alegre: Cinco Continentes*, **2001**, 345-385.
- Mello, D. C. (2014). Determinação de Fungicidas Ditiocarbamatos e Etilenobisditiocarbamatos (EBDC) em Alimentos por HPLC-UV. *Dissertação* Master, Universidade de Brasília, 2014.
- Miller, J. N.; Ambrus, A. Chapter 9 – Statistics in calibration analysis. Manual on Basic Statistics, FAO/IAEA Training and Reference Centre for Food and Pesticide Control: Vienna, Australia **2000**; 1-18p.
- Ministério Da Saúde, Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, **2009**.
- Miranda, A. A.; Caixeta, A. C. A.; Flávio, E. F.; Pinho, L. Fibras da farinha da casca do maracujá. *Alim. Nutr.* **2013**, 24 (2).
- Mol, H. G. J.; Rooseboom, A.; Dam, R.; Roding, M.; Arondeus, K.; Sunarto, S. Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2007**, 389, 1715-1754.
- Montanher, A. B.; Zucolotto, S. M.; Schenkel, E. P.; Fröde, T. S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, 109, 281-288.
- Mozzaquatro, J. O.; Mello, D. C.; Oliveira, R. C. S.; Rosa, R. C. C.; Costa, A. M.; Caldas, E. D. Dithiocarbamate Residues in Fruits and Leaves of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) from Different Brazilian Regions. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2019**, 30 (9) 1834-1840.
- Mujawar, S.; Utture, S. C.; Fonseca, E.; Matarrita, J.; Banerjee, K. Validation of a GC-MS method for the estimation of dithiocarbamate fungicide residues and safety evaluation of mancozeb in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, **2014**, 150, 175-181.
- Munaretto, J. S.; Viera, M. S.; Martins, M. L.; Adaime, M. B.; Zanella, R. Quantitative multiclass pesticide residue analysis in apple, pear, and grape by modified QuEChERS and liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **2016**, 99, 1426-1435.
- Muñoz, N. C.; Floriano, L.; de Souza, M. P.; Bandeira, N. M. G.; Prestes, O. D.; Zanella, R. Determination of Pesticide Residues in Golden Berry (*Physalis*

- peruviana L.) by modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole mass spectrometry. *Food Anal. Methods*, **2017**, 10, 320–329.
- Musarurwaa, H.; Chimukab, L.; Pakadec, V. E.; Tavengwa, N. T. Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2019**, 84, 103314.
- Narenderan, S.; Meyyanathan, S.; Karri, V. V. S. R.; Babu, B.; Chintamaneni, P. Multivariate response surface methodology assisted modified QuEChERS extraction method for the evaluation of organophosphate pesticides in fruits and vegetables cultivated in Nilgiris, South India. *Food Chemistry*, **2019**, 300, 125188.
- Nauen, R.; Ebbinghaus-Kintscher, U.; Elbert, A.; Jeschke, P.; Tietjen, K. Acetylcholine receptors as sites for developing neonicotinoid insecticides. In *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*. 1^ªed., New York, Springer, **2001**, p. 77-105.
- Nguyen, T. D. et al. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS simple preparation method and gas chromatography mass spectrometry. *Food Chemistry* **2008**, 110, 207–213.
- Oliveira, L. F.; Nascimento, M. R. F.; Borges, S. V.; Ribeiro, P. C. D. N.; Ruback, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2002**, 22, 259–262.
- Opacka, J.; Baranski, B.; Wrońska-Nofer, T. Effect of alcohol intake on some disturbances induced by chronic exposure to carbon disulphide in rats. II. Behavioural alterations. *Toxicol. Lett.* **1984**, 23, 91-97.
- Otify A.; George, C.; Elsayed, A.; Farag, M. A. Mechanistic evidence of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) anxiolytic activity in relation to its metabolite fingerprint as revealed via LC-MS and chemometrics. *Food Funct.* **2015**, 6, 3807–3817.
- Panelli, M. F.; Pierine, D. T.; Souza, S. L. B.; Ferron, A. J. T.; Garcia, J. L.; Dos Santos, K. C.; Belin, M. A. F.; Lima, G. P. P.; Borguini, M. G.; Minatel, I. O.; Cicogna, A. C.; Francisqueti, F. V.; Corrêa, C. R.. Bark of *Passiflora edulis* Treatment Stimulates Antioxidant Capacity, and Reduces Dyslipidemia and Body Fat in Db/Db Mice. *Antioxidants*, **2018**, 7(9):1–11.
- Pareja, L.; Niell, S.; Vryzas, Z.; González, J.; Cesio, M. V.; Mourkidou, E. P.; Heinzen, H. Comparison and evaluation of two methods for the pesticide residue analysis of organophosphates in yerba mate. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2015**, 25(2), 98–104.
- Park, Y. S.; Abd El-Aty, A. M.; Choi, J. H.; Cho, S. K.; Shin, D. H.; Shim, J.H. Pesticide multiresidue analysis in *Panax ginseng* (C. A. Meyer) by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection. *Biomedical Chromatography*, **2006**, 21(1), 29–39.
- Paz, M.; Correia-Sá, L.; Becker, H.; Longhinotti, E.; Domingues, V. F.; Delerue-Matos, C. Validation of QuEChERS method for organochlorine pesticides analysis in tamarind (*Tamarindus indica*) products: Peel, fruit and commercial pulp. *Food Control*, **2015**, 54, 374-382.
- Pereira, T. A. (2011). Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2011.

- Petha, N. H.; Lokhande, R. S.; Seshadri, D. T.; Patil, R. M.; Bhagat, T. S.; Patil, J. G. A simple pre-column derivatization method for the determination of mancozeb technical (fungicide) by reverse phase HPLC-UV. *Anal. Methods*, **2017**, 9, 4702–4708.
- Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Österdahl, B. G.; *Anal. Bional. Chem.* **2007**, 389, 1773.
- PMRA. Pest Management Regulatory Agency. Proposed Re-evaluation decision. Thiophanate-Methyl and Its Associated End-use Products. Consultation document. PRVD2019-07.
- Pinheiro, E. R.; Silva, I. M. D. A.; Gonzaga, L. V.; Amante, E. R.; Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C.; Amboni, R.D.M.C. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresour. Technol.*, **2008**, 99 (13), 5561–5566.
- Pizzutti, I. R.; de Kok, A.; Cardoso, C. D.; Reichert, B.; de Kroon, M.; Wind, W.; Righi, L. W.; da Silva, R. C. A multi-residue method for pesticides analysis in green coffee beans using gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry in selective ion monitoring mode. *J. Chromatogr A.* **2012**, 1251, 16-26.
- PRC, 2007. Pesticide Residues Committee. Pesticide Residues Monitoring Report. First Quarter Report 2007.
- Prestes, O. D.; Friggi, C. A.; Adaime, M. B.; Zanella, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim. Nova* **2009**, 32 (6), 1620-1634.
- Queiroz, M. R. S. et al. Effect of the yellow passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* deg.) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutrition Journal*, **2012**, 11 (89), 1-7.
- Queiroz, S. C. N.; Ferracini, V. L.; Rosa, M. A.; Multiresidue method validation for determination of pesticides in food using QuEChERS and UPLC-MS/MS. *Quím. Nova.* **2012**, 35(1), 185-192.
- Ramos, A. T.; Cunha, M. A. L.; Sabaa-Srur, A. U. O.; Pires, V. C. F.; Cardoso, M. A. A.; Diniz, M. D. F. M.; Medeiros, C. C. M. Uso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na redução do colesterol. *Rev. Bras. Pharmacogn.* **2007**, 17 (4), 592–597.
- Ramos, A. T.; Cunha, M. A. L.; Sabaa-Srur, A. U. O.; Pires, V. C. F.; Cardoso, M. A. A.; Diniz, M. D. F. M.; Medeiros, C. C. M. Uso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na redução do colesterol. *Rev. Bras. Pharmacogn.* **2007**, 17 (4), 592–597.
- Ray D. E.; Fry J. R. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacol Ther.* **2006**, 111 (1), 174-193.
- Reichert, B.; Pizzutti, I. R.; Costabeber, I. H.; Uclés, A.; Herrera, S.; Fernández-Alba, A. R. Validation and application of micro flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams. *Talanta* **2015**, 134, 415-424.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins C. H.; Jardim I. C. S. F. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Quim. Nova*, **2004**, 27, 771-780.
- Ribeiro T. H. S.; Bolanho B. C.; Montanuci F. D.; Ruiz S. P. Physicochemical and sensory characterization of gluten-free fresh pasta with addition of passion fruit peel flour. *Ciência Rural*, **2018**, 48, 12.

- Rocha, L.; Lucio, E. M. A.; França, H. S.; Sharapin, N. *Mikania glomerata* Spreng: desenvolvimento de um produto fitoterápico. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, *18*, 744-747.
- Rodrigues, M. V. N., Magalhães, P. M., Reyes, F. G. R., & Rath, S. GC–MS determination of organochlorine pesticides in medicinal plants harvested in Brazil. *Toxicology Letters*, **2006**, *164S*, S1–S324.
- Rubino, F. M.; Mrema, E. J.; Colosio, C. Pesticide Residues: Dithiocarbamates. *Encyclopedia of Food Safety*, **2014**, *3*, 5-10.
- Sahoo, S. K. R.; Battu, S.; Singh, B.; *Am. J. Anal. Chem.* **2011**, *2*, 26.
- Salgado, J. M.; Bombarde, T. A. D.; Mansi D. N.; Piedade S. M. S.; Meletti L. M. M. Effects of different concentrations of passion fruit peel (*Passiflora edulis*) on the glicemic control in diabetic rat. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **2010**, *3* (30), 784-789.
- Santana, F. C.; Silva, J. V.; Santos, A. J. A. O.; Alves, A. R.; Wartha, E. R. S. A.; Marcellini, P. S.; Silva, M. A. A. P. Desenvolvimento de biscoito rico em fibras elaborado por substituição parcial da farinha de trigo, por farinha da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) e fécula de mandioca (*Manihot esculenta crantz*). *Alim. Nutr.* **2011**, *22*, 391-399.
- SANTE, 2018. “Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. (SANTE/11813/2017). Directorate General for Health and Food Safety (Rev.0).” European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General.
- Schmidt, B.; Christensen, H. B.; Peterse, A., Sloth, J. J; Poulsen, M. E. Method validation and analysis of nine dithiocarbamates in fruits and vegetables by LCMS/ MS, *Food Addit. Contam. Part. A*, **2013**, *30* (7) 1287-1298.
- Shafer, T. J.; Meyer, D. A.; Crofton, K. M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ. Health Perspect.*, **2005**, *113*(2), 123-136.
- Słowik-Borowiec, M. Validation of a QuEChERS-Based Gas Chromatographic Method for Multiresidue Pesticide Analysis in Fresh Peppermint Including Studies of Matrix Effects. *Food Anal. Methods*. **2015**, *8*, 1413–1424.
- Soderlund D. M.; Clark J. M.; Sheets P. P.; Mullin L. S.; Piccirillo V. J.; Sargent D, Stevens, J. T.;, Weiner, M. L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*. **2002**, *171*, 03–59.
- Soderlund, D.M. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticideneurotoxicity: recent advances. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86* (2), 165–181.
- Sousa, J. S. I.; Meletti, L. M. M. Maracujá: espécies, variedades e cultivos. Piracicaba: Editora FEALQ, **1997**, 179.
- Souza, M.V. (2006). Resíduos de Agrotóxicos Ditiocarbamatos e Organofosforados em Alimentos Consumidos no Restaurante Universitário – UnB: Avaliação da Exposição Humana. *Dissertação* (Mestrado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- Srur, A. U. O. S., inventor, Srur A. U. O. S., depositante. Farinha de casca de maracujá. BR patente PI 0304911-6 A2, 2003.
- Steiniger, D.; Lu, G.; Butler, J.; Phillips, E.; Fintschenko, Y. Determination of Multiresidue Pesticides in Green Tea by Using a Modified QuEChERS Extraction and Ion-Trap Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, **2010**, *93*(4), 1169–1179.

- Stertz, S. C.; Freitas, R. J. S. Teor de dissulfeto de carbono em agrião d'água (Nasturtium officinale R. BE.) obtido pelos sistemas de cultivo orgânico, convencional e hidropônico. *Ecotox. E M. Amb.* **2003**, 13, 45-52.
- SWwalorczyk, S.; Drożdżyński, D.; Kierzek, R. Determination of pesticide residues in samples of green minor crops by gas chromatography and ultra performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry. *Talanta*. **2015**, 132, 197–204.
- Taha, S. M., Gadalla, S. A. Development of an efficient method for multi residue analysis of 160 pesticides in herbal plant by ethyl acetate hexane mixture with direct injection to GC-MS/MS. *Talanta*, **2017**, 174, 767–779.
- Tette, P. A. S.; da Silva Oliveira, F. A.; Pereira, E. N. C.; Silva, G.; de Abreu Gloria, M. B.; Fernandes, C. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS. *Food Chem.* **2016**, 211, 130–139.
- Tong, H.; Tong, Y.; Xue, J.; Liu, D.; Wu, X. Multi-residual Pesticide Monitoring in Commercial Chinese Herbal Medicines by Gas Chromatography–Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, **2014**, 7(1), 135–145.
- Ulmer, T.; Macdougall, J. M. Passiflora: passion flowers of the world. Portland: Timber Press, **2004**. 430p
- USEPA, 2014 (United States Environmental Protection Agency). Thiophanate-Methyl and Carbendazim (MBC). Human Health Assessment Scoping Document in Support of Registration Reviews. Memorandum.
- Valera-Tarifa, N. M.; Santiago-Valverde, R. Hernández-Torresb, E. Martínez-Vidala, J.L. Garrido-Frenicha, A. Development and full validation of a multiresidue method for the analysis of a wide range of pesticides in processed fruit by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, **2020**, 315, 126304.
- Varela-Martínez, D. A.; González-Curbelo, A. A.; González-Sálamo, J.; Hernández-Borges, J. Analysis of multiclass pesticides in dried fruits using QuEChERS-gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, **2019**, 297, 124961.
- Vareli, C. S.; Pizzutti, I. R.; Gebler, L.; Cardoso, C. D.; Gai, D. S. H.; Fontana, M. E. Z.; *Talanta*, **2018**, 184, 202.
- Vargas, A. J.; Geremias, D. S.; Provensi, G.; Fornari, P. E.; Reginatto, F. H.; Gosmann, G.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S.; *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. *Fitoterapia*, **2007**, 78, 112–119.
- Vianna-Silva, T.; Resende, E. D.; Viana, A. P.; Pereira, S. M. F.; Almeida Carlos, L.; Vitorazi, L. Qualidade do suco de maracujá-amarelo em diferentes épocas de colheita. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **2008**, 28, 545-550.
- Vidal, J. L. M.; Arrebola, F. J.; Mateu-Sánchez, M.; Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*. **2002**, 959, 203–213.
- Vieira, M. L. C.; Carneiro, M. C. Passiflora spp. Passionfruit. In: LITZ, R. (Ed) Biotechnology of Fruit and Nut Crops. Oxford: CABI Publishing, **2004**, 436-453.
- Volpatto, F.; Wastowski, A. D.; Bernardi, G.; Prestes, O. D.; Zanella R.; Adaime, M. B. Evaluation of QuEChERS Sample Preparation and Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry for the Determination of Pesticide Residues in Grapes. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, 27 (9), 1533-1540.

- WHO (World Health Organization) (2007a). WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues.105p. (<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14878e/s14878e.pdf>). Acesso em: 10/03/2021.
- WHO (World Health Organization). Framework for the provision of scientific advice on food safety and nutrition. Geneva, 2007. Disponível em <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1296e/a1296e00.pdf>. Acesso em 11/01/2021.
- Who (World Health Organization); *Risk Management and Food Safety*. FAO Food and Nutrition Paper, nº 65. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Rome, 1997. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-w4982e.pdf>. Acesso em 15/01/2021.
- Wilkowska, A.; Biziuk, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*. **2011**, 125, 803–812.
- Wosch, L.; Santos, K. C.; Imig, D. C.; Santos, C. A. M. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2017**, 27, 40–49.
- Wyckhuys, K. A. G.; Acosta, F .L.; Rojas, M.; Ocampo, J. The relationship of farm surroundings and local infestation pressure to pest management in cultivated *Passiflora* species in Colombia? *Int. J. Pest Manage* **2011**, 57, 1–10.
- Zarn, J. A.; Brüsweiler, B. J.; Schlatter, J. R. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 2003, 111, 255-261.
- Zeraik, M. L.; Pereira, C. A. M.; Zuin, V. G.; Yariwake, J. H. Maracujá: um alimento funcional? *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, 20, 459-471.
- Zeraik, M. L.; Serteyn, D.; Deby-Dupont, G.; Wauters, J. N.; Tits, M.; Yariwake, J. H.; Angenot, L.; Franck, T. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. *Food Chemistry*. **2011**, 128, 259–265.
- Zucolotto, S. M.; Goulart, S.; Montanher, A. B.; Reginatto, F. H.; Schenkel, E. P.; Fröde, T. S. Bioassay-Guided Isolation of Anti-Inflammatory C-Glucosylflavones from *Passiflora edulis*. *Planta Med.* **2009**, 75, 1221–1226.
- Zuin, V. G., Yariwake, J. H., Lanças, F. M. Analysis of pesticide residues in Brazilian medicinal plants: matrix solid phase dispersion versus conventional (European Pharmacopoeia) methods. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2003b**, 14(2), 304–309.
- Zuin, V.; Yariwake, J.; Bicchi, C. Fast supercritical fluid extraction and high-resolution gas chromatography with electron-capture and flame photometric detection for multiresidue screening of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazil's medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, **2003a**, 985(1-2), 159–166.

ANEXO I

Tabela A1.1. Analito, grupo químico, classe, classificação toxicológica, culturas de alimentos autorizadas no Brasil pela ANVISA, propriedades físico-químicas, pureza do padrão analítico e solvente de preparo das soluções mãe dos analitos utilizados neste estudo.

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
Acephate	Organophosphate	I, Ac	Sim	Algodão, amendoim, batata, citros, feijão, melão, milho, soja e tomate	C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS	183,2	79	98	AcOEt
Aldicarb	Carbamate	I, Ac, N	Não	-	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	190,3	4930	100	Tol
Aldicarb sulfona	Carbamate		M	-	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	222,3	10000	100	MeOH
Aldicarb sulfóxido	Carbamate		M	-	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	206,3	0,136	99.4	MeOH
Atrazine	Chlorotriazine	H	Sim	Abacaxi, cana-de-açúcar, milho	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,7	35	100	MeOH
Azynphos ethyl	Organophosphate	I	Não	-	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	345,4	4,5	100	AcOEt
Azinphos-methyl	Organophosphate	I	Não	-	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	317,3	28	97.2	AcOEt
Azoxystrobin	Methoxyacrylate strobilurin	F	Sim	Algodão, arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, soja, trigo, tritcale, maracujá e outras frutas e hortaliças.	C ₂₂ H ₁₇ NO ₅	403,4	11,61	100	AcOEt

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
Bifenthrin	Pyrethroid	I, F e Ac	Sim	Algodão, amendoim, arroz, aveia, café, canola, centeio, cevada, feijão, milho, soja, trigo, triticales e várias frutas e hortaliças.	<u>C₂₃H₂₂ClF₃O₂</u>	422,9	0,001	100	Tol
Boscalid	Anilide	F	Sim	Algodão, café, feijão, girassol, soja, maracujá e outras frutas e hortaliças.	<u>C₁₈H₁₂Cl₂N₂O</u>	343,21	2,61	100	AcOEt
Buprofezin	Thiadiazinan	I, Ac	Sim	Soja, algodão, maracujá e outras frutas e hortaliças.	<u>C₁₆H₂₃N₃OS</u>	305,4	2,43	100	AcOEt
Carbaryl	Carbamate	I	Sim	Abacaxi, abóbora, algodão, alho, banana, batata, cebola, couve-flor, feijão, maçã, pepino, repolho e tomate.	<u>C₁₂H₁₁NO₂</u>	201,2	416,2	99.3	MeOH
Carbendazim	Benzimidazole		Sim	algodão, arroz,	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191,2	29	100	MeOH

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
				cevada, citrus, feijão maçã, milho, soja e trigo					
Carbofuran	Carbamate	I, C, Ac, N	Não	-	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221,3	322	100	MeOH
Carboburan 3-OH			M	-					
Cyfluthrin	Pyrethroid	I	Sim	Algodão, amendoim, arroz, café, feijão, milho, soja, tomate e trigo.	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃	434,3	0,0066	94.2	Tol
Cypermethrin	Pyrethroid	I, F	Sim	Algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, citros, ervilha, feijão-vagem, maracujá , mandioca, melancia, milheto, milho, pepino, repolho, soja, e tomate	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	416,3	0,009	95	Tol
Chlorfenapyr	Pyrroles	I, Ac	Sim	Algodão, alho, amendoim, batata, cebola, couve, feijão,	C ₁₅ H ₁₁ BrClF ₃ N ₂ O	407,62	0,112	100	AcOEt

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
				milho, pimentão, repolho, soja e tomate, maracujá e outras frutas.					
Chlorfenvinphos	Organophosphate	I	Não	-	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	359,6		99,9	AcOEt
Chlorothalonil	Isoftalonitrila	F	Sim	Algodão, amendoim, arroz, aveia, centeio, cevada, milheto, milho, soja, trigo, triticales e diversas frutas, hortaliças	C ₈ C ₁₄ N ₂	265,9	0,81	98,9	Tol
Chlorpyrifos	Organophosphate	I, F, Ac	Sim	Algodão, banana, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, soja, tomate e trigo.	C ₉ H ₁₁ C ₁₃ NO ₃ PS	350,9	1,05	99,6	Tol
Chlorpyrifos methyl	Organophosphate	I, Ac	Não	-	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	322,5	2,74	100	Tol
Chlorthiophos	Organophosphate	I, Ac	Não	-	C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ O ₃ PS ₂	361,2	-	100	AcOEt
Kresoxim-methyl	Methoxyiminoacetate strobilurin	F	Sim	Algodão, arroz, café, cevada,		313,45	2	100	AcOEt

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
				soja, trigo, maracujá e outras frutas e hortaliças.					
Deltamethrin	Pyrethroid	I, F	Sim	Algodão, amendoim, arroz, cacau, café, soja, trigo, maracujá e outras frutas e hortaliças.	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	505,2	0,0002	100	Tol
Diazinon	Organophosphate	I, Ac	Sim	Citros e maça.	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	304,35	60	100	Tol
Diclotophos	Organophosphate	I, Ac	Não	-	C ₈ H ₁₆ NO ₅ P	237,19		99.8	Tol
Difenoconazole	Triazole	F	Sim	Algodão, amendoim, cevada, feijão, soja e trigo, maracujá e outras frutas e hortaliças	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	406,26	15,0	100	AcOEt
Dimethoate	Organophosphate	I, Ac	Sim	Algodão, citros, maçã, tomate e trigo.	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	229,26	25900	100	Tol
EPN	Organophosphate	I, Ac	Não	-	C ₁₄ H ₁₄ NO ₄ PS	323,30	0,5		
Epoxiconazole	Triazole	F	Sim	Algodão, amendoim, arroz, aveia,	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	329,76	7,1	100	AcOEt

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
				banana, cacau, café, cana-de-açúcar, cevada, feijão, girassol, mandioca, milho, soja e trigo					
Esfenvalerate	Pyrethroid	I	Sim	Algodão, arroz, batata, café, cebola, citros, feijão, milho, soja, tomate e trigo	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	419,91	0,001	99.5	Tol
Ethion	Organophosphate	I, Ac	Não	-	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	384,48	-12	97	Tol
Etofenprox	Éter difenílico	I	Sim	Algodão, arroz, aveia, café, cevada, dendê, marmelo, pepino, soja, trigo e várias frutas e hortaliças.	C ₂₅ H ₂₈ O ₃	376,49	0,0225	100	AcOEt
Etoprophos	-	N, I	Sim	Batata	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂	242,3	1300	97.6	MeOH
Fenamiphos	Organophosphate	N	Sim	Algodão, banana, batata, cacau, café, melão e tomate.	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS	303,36	345	95.9	Tol
Fenitrothion	Organophosphate	I, For	Sim	Algodão, cebola,	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	277,2	14000	97.1	Tol

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
				crisântemo, maçã, milho, trigo e soja					
Fenpropathrin	Pyrethroid	I, Ac	Sim	Algodão, aveia, berinjela, café, cebola, centeio, cevada, feijão, trigo, soja, triticales, citros, diversas frutas e hortaliças	C ₂₂ H ₂₃ NO ₃	349,42	0,33	100	Tol
Fenthion	Organophosphate	I, For, Ac, C	Não	-	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278,33	4,2	98.4	Tol
Fenthoate	Organophosphate	I, Ac	Não	-	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ PS ₂	320,39	11	95.5	Tol
Fenvalerate	Pyrethroid	I, Ac	Sim	Emprego domissanitário	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	419,90	0,001	100	Tol
Fluquinconazol	Triazole	F	Sim	Feijão, maçã, melão, pêssego, soja e trigo.	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	376,17	1,15	100	AcOEt
Phorate	Organophosphate	I, Ac, N	Não	-	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃	260,4	50	97.2	Tol
Heptenophos	Organophosphate	I	Não	-	C ₉ H ₁₂ ClO ₄ P	250,6	2200	97.7	AcOEt
Imidacloprid	Neonicotinoid	I	Sim	milho, soja, trigo, maracujá e outras frutas e hortaliças.	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255,66	610	99.5	AcOEt
Fosmet	Organophosphate	I	Não	-	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	317,33	15,2	100	AcOEt
λ-cihalothrin	Pyrethroid	I	Sim	Arroz, cevada, milho, milheto,	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃	449,85	0,005	99.2	Tol

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
				soja, trigo, <u>maracujá</u> e outras frutas e hortaliças					
Malaoxon	Organophosphate		M	-	C ₁₀ H ₁₉ O ₇ PS	314,29		98.7	AcOEt
Malathion	Organophosphate	I, Ac	Sim	Arroz, alface, algodão, soja, milho e trigo armazenados, cacau, café, feijão, berinjela, diversas frutas e hortaliças	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,36	148	100	Tol
Metamidophos	Organophosphate	I, Ac	Não	-	C ₂ H ₈ NO ₂ PS	141,13	2,0x10 ⁵	99.7	AcOEt
Methidathion	Organophosphate	I, Ac	Sim	Algodão e maçã.	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	302,3	240	98.5	Tol
Metiocarbe	MetilCarbamate de fenila	I	Sim	Berinjela, pimentão e tomate	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	302,3	240	99.9	MeOH
Metomil	Carbamate	I, Ac	Sim	Algodão, arroz, aveia, batata, brócolis, café, centeio, cevada, couve, dendê, feijão, milho, repolho, soja, tomate, trigo e triticale.	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	162,21	55000	99.9	MeOH
Mevinphos	Organophosphate	I, Ac	Não	-	C ₇ H ₁₃ O ₆ P	224,1	6,0x10 ⁵	95.5	Tol

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
Myclobutanil	Triazole	F	Sim	Arroz, batata, café, maçã, melão, soja e uva.	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	288,78	132	100	AcOEt
Monocrotophos	Organophosphate	I	Não	-	C ₇ H ₁₄ NO ₅ P	223,16		100	Tol
Omethoate	Organophosphate		Não	-				96.8	Acet
Oxyfluorfen	Éter difenílico	H		Algodão, arroz, café, cana-de-açúcar, cebola, citros, soja.	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	361,7	0,116	99.2	AcOEt
Paraoxon-methyl	Organophosphate	M	-	-				98.8	AcOEt
Parathion-methyl	Organophosphate	I, Ac	Não	-	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	263,2	55	97.8	Tol
Phendimetalin	Dinitroaniline	H	Sim	Algodão, alho, amendoim, arroz, batata, café, cana-de-açúcar, cebola, feijão, milho, soja e trigo	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	281,3	0,33	100	Tol
Permethrin	Pirethroid	I	Sim	Algodão, arroz, café citrus, uva, couve, couve flor, tomate, trigo, milho, feijão, soja	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	391,3	0,006	100	AcOEt
Pyraclostrobin	Methoxycarbanilate strobilurin	F	Sim	Algodão, amendoim, cevada, soja, trigo, triticale,	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	387,82	1,9	100	AcOEt

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
				<u>maracujá</u> e outras frutas e hortaliças.					
Pyrazophos	Thionophosphate	F	Não	-	<u>C₁₄H₂₀N₃O₅PS</u>	373,37	4,2	100	AcOEt
Pirimicarbe	Carbamate	I	Sim	Alface, batata, berinjela, couve, couve-flor, feijão, pepino, pimenta, repolho, tomate e trigo.	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238,39	3100	98.5	MeOH
Pirimiphos Ethyl	Organophosphate	I, Ac	Não	-	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305,34	2,3	100	AcOEt
Pirimiphos Methyl	Organophosphate	I,Ac	Sim	Arroz, milho e trigo	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305,33	5	96.3	Tol
Procymidone	Dicarboximide	F	Sim	Alface, algodão, batata, cebola, cenoura, feijão, maçã, melancia, melão, morango, pêssego, soja, tomate e uva.	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	284,14	2,46	98.6	AcOEt
Prochloraz	Imidazolilcarboximida	F	Não	-	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	376,7	26,5	99.4	AcOEt
Profenophos	Organophosphate	I, Ac	Sim	Algodão, amendoim,	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	373,63	28	99.2	Tol

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
				café, canola, girassol, soja, trigo e diversas frutas e hortaliças.					
Prothiophos	Organophosphate	I	Não	-	C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ O ₂ PS ₂	345,25	0,07	97.6	Tol
Quinalphos	Organophosphate	I, Ac	Não	-	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	298,3	17,8	100	AcOEt
Tebuconazole	Triazole	F	Sim	Cana-de-açúcar, centeio, cevada, soja, trigo, triticale, maracujá diversas frutas e hortaliças	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	307,82	36	100	AcOEt
Terbufos	Organophosphate	I, N	Sim	Algodão, amendoim, banana, café, cana-de-açúcar, feijão e milho.	C ₉ H ₂₁ O ₂ PS ₃	288,4	4,5	99	Tol
Tetradifon	Diphenylsulfone	Ac	Sim	Algodão, berinjela, citros, feijão, mamão, pimentão, rosa e tomate	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S	356,06	0,078	99.8	AcOEt
Thiobencarb	Carbamate	H	Sim	Arroz	C ₁₂ H ₁₆ ClNOS	257,78	16,7	99.5	MeOH
Triazophos	Organophosphate	I, Ac, N	Sim	Algodão, batata, café, citros, crisântemo,	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	313,31	35	100	Tol

Pesticida	Grupo químico	Classe (s)	Registrado	Culturas de alimentos	Fórmula molecular	MM (g mol ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	Pureza (%)	Solvente
				feijão, milho, repolho, soja, tomate e trigo					
Trichlorfon	Phosphonate		Não	-	<u>C₄H₈Cl₃O₄P</u>	257,43		95.8	AcOEt
Trifloxystrobin	Methoxyiminoacetate strobilurin	F	Sim	Algodão, cana-de-açúcar, girassol, maracujá e outras frutas e verduras	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	408,4	0,61	100	AcOEt
Trifluralin	Dinitroaniline	H	Sim	Algodão, arroz, girassol, soja, trigo, cana-de-açúcar, trigo e várias hortaliças.	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335,5	0,221	98.5	Tol
Vinclozolin	Dicarboximide	F	Não	-	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₃	286,11	3,4	100	AcOEt

I = Inseticida, F = Fungicida; For= Formicida, H = Herbicida, Ac = Acaricida, C= Cupicida N = Nematicida. M= metabólito; Sim = Autorizado. MM = Massa molar. Solubilidade: em água a 20°C. EPN= O-Ethyl O-(4-nitrophenyl) phenylphosphonothioate; **Fonte:** ANVISA (2020); <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>

ANEXO II

Dithiocarbamate residues in fruits and leaves of passion fruit (*Passiflora edulis*) from different Brazilian regions

Journal of Brazilian Chemical Society, 1834-1840, 2019

Dithiocarbamate Residues in Fruits and Leaves of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) from Different Brazilian Regions

Joseane O. Mozzaquatro,^a Denise C. Mello,^a Reginaldo C. S. Oliveira,^a Raul C. C. Rosa,^b
Ana M. Costa^c and Eloisa D. Caldas^{id}*,^a

^aLaboratório de Toxicologia, Departamento de Farmácia, Universidade de Brasília,
70910-900 Brasília-DF, Brazil

^bEmbrapa Agrobiologia (CNPAB), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa),
23891-000 Seropédica- RJ, Brazil

^cEmbrapa Cerrados (CPAC), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa),
73310-970 Planaltina- DF, Brazil

Dithiocarbamates are widely used fungicides, including in passion fruit, whose fruits are mainly used for juice production, the leaves for the preparation of herbal tea and medicines. Also, the use of the peel in the food industry has been proposed. In this study, the spectrophotometric method for determination of dithiocarbamate residues, as CS₂, in passion fruit (*Passiflora edulis*) was validated at a limit of quantification (LOQ) of 0.05 mg kg⁻¹ CS₂, and 108 samples (55 fruits and 53 leaves) collected from Brazilian growers were analyzed. About 25% of the fruit peel samples were positive (0.06 to 1.4 mg kg⁻¹) and only one sample had residues in the pulp (0.09 mg kg⁻¹), 43.4% of leaf samples contained residues. Washing of fruit reduced the residues in the peel by up to 100%, and drying the leaves increased residue levels by up to 60%. This is the first study that reports dithiocarbamate residues in passion fruit in Brazil, and the results are important for government authorities when planning monitoring programs, and for food and herbal medicine industries.

Keywords: dithiocarbamates, CS₂, passion fruit, *Passiflora edulis*, peel, leaf, Brazil

Introduction

Dithiocarbamates (DTCs) are non-systemic pesticides widely used to control fungal diseases in food / feed crops and ornamental plants.¹ Some are small organic molecules, e.g., thiram, with a strong chelating ability towards inorganic species, and are formed by the reaction between carbon disulfide (CS₂) and either ammonium or a primary / secondary amine in the presence of sodium hydroxide or excess amine.² The major concern regarding the health of the population consuming food sourced from dithiocarbamate-treated crops is in the degradation products of ethylene-bis-dithiocarbamates (EBDC, including mancozeb and metiram) and propineb (ethylene-thiourea and propylene-thiourea, respectively), which have been shown to cause thyroid cancer in rats.¹⁻³

Five DTCs are registered in Brazil.⁴ Mancozeb, the most used DTC in the world, is the third pesticide most commercialized in Brazil, following the herbicides glyphosate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D),⁵ being registered for foliar or post-harvest treatment in 50 crops. Metiram is registered for use in 20 crops as foliar and / or soil treatment (only potato), propineb for foliar application in 9 crops, thiram for seed treatment in 12 crops and soil treatment in potato, and metam-sodium for soil treatment in 6 crops. Because of their non-systemic properties, residues of dithiocarbamates are not expected in mature crops after soil or seed treatment. Mancozeb and metiram are registered for foliar application to passion fruit.⁴

DTCs are the most commonly detected pesticides in residue monitoring programs in Brazil,^{6,7} and elsewhere.⁸⁻¹⁰ They are not analyzed by multi-residue methods because of chemical characteristics very different from those of other pesticides, including their low solubility in

*e-mail: eloisa@unb.br

most organic solvents and low stability.¹¹ The classic method for the determination of dithiocarbamates quantifies the CS₂ generated by the acid degradation of the compound present in the sample, which can be spectrophotometrically determined after complexation,^{7,12-14} or by gas chromatography using different detectors.^{11,12-15} However, since all DTCs produce CS₂, none of these methods allow the identification of the compound applied to the crop, and the results are expressed in mg kg⁻¹ CS₂. In Brazil, the maximum residue level (MRL) for DTCs in passion fruit (whole fruit) is 1 mg kg⁻¹ CS₂.

Brazil is the world's largest producer of passion fruit (*Passiflora* sp.), with approximately 700,000 tons cultivated in an approximate area of 50,000 hectares. The Northeastern region, mainly the Bahia State, is responsible for about 70% of the national production, followed by the Southeast region (14.5%).¹⁶ *P. edulis* Sims is the main commercial species, cultivated all year around in Bahia because of the warm temperature, and from September to May in the other Brazilian regions. The pulp is destined mainly for the production of concentrated juice,¹⁷ and the leaves used for the preparation of tea¹⁸ and as raw material in the herbal industry, being included in the Brazilian List of Medicinal Plants of Interest to the SUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS)).¹⁹ There is also a growing interest to use passion fruit peel, which

accounts for about 60 to 70% of the whole fruit weight, as an ingredient in the food industry due to its high soluble and insoluble fiber contents and other nutritional properties.²⁰⁻²³

DTC residue data on passion fruit are limited in the world and are nonexistent in Brazil. The objective of this study was to determine these fungicides in peel, pulp and leaf of passion fruit (*P. edulis*) samples collected directly from producers of different regions of the country using a validated spectrophotometric (CS₂) analytical method. Additionally, processing factors were estimated for peel from washed fruit compared with peel from unwashed fruit and for dry leaf produced from fresh leaf.

Experimental

Samples

A total of 108 passion fruit (55 fruits and 53 leaves) samples were collected directly from 51 Brazilian conventional growers from February 2016 to February 2018 in the Rio de Janeiro State (18 growers), Goiás State and the Federal District (16 growers) and Bahia State (17 growers) (Figure 1). In addition, samples of fruits and leaves from organic growers from Bahia State and the Federal District were collected for method validation. About 2 kg of passion fruit and 300 g of leaves were provided by each grower.

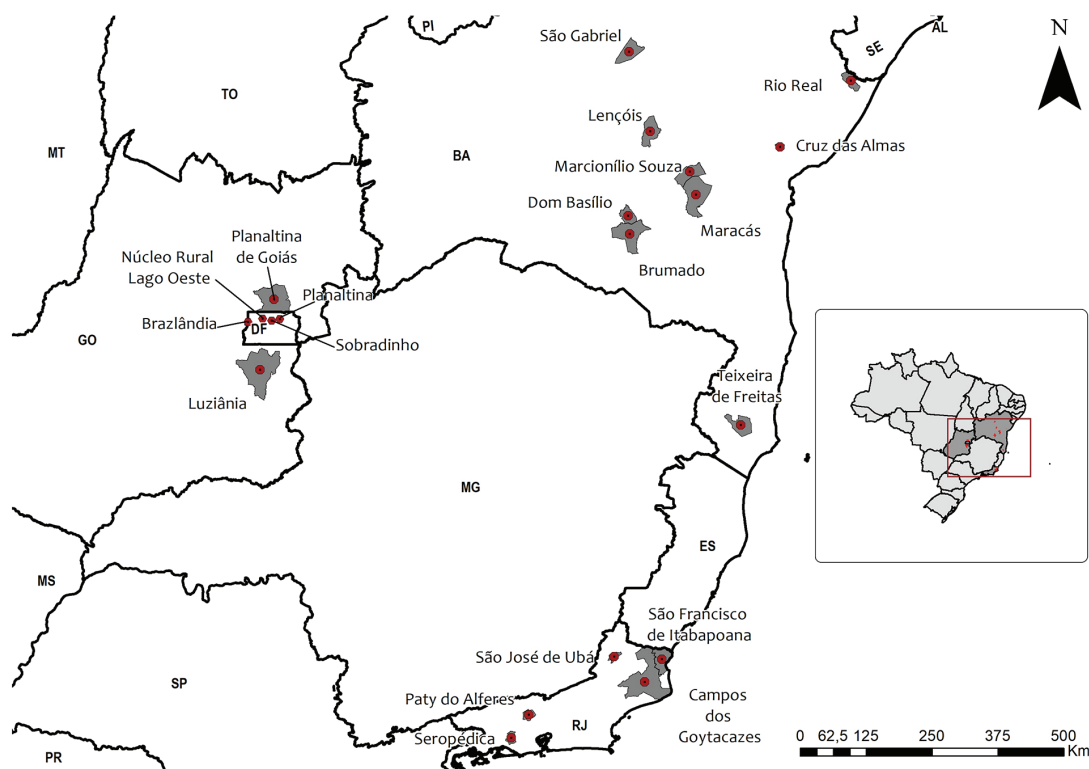


Figure 1. Collecting points of passion fruit (*Passiflora edulis*) samples from growers from Goiás, Bahia and Rio de Janeiro States and Federal District.

Sample processing

Half of the passion fruit units in each sample provided was washed in running water for about 1 min; washed and unwashed passion fruits were frozen, and then processed still frozen into peel, pulp and seed. The peel was cut into small pieces, homogenized and stored at $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis, as well as the seedless pulp. Portions of four passion fruit fresh leaf samples were submitted to the drying process using an industrial dryer with hot air circulation at an average temperature of $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for about 20 h, which mimics the process for dry leave production to be used as tea or herbal medicine.²⁴ The other leaf samples were frozen, cut into smaller pieces and stored at $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Processing the samples under frozen conditions is essential to prevent enzymatic degradation of dithiocarbamates.^{12,13}

Reagents and instrumentation

Carbon disulfide (CS_2 , UV-HPLC grade), stannous chloride dehydrated ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and copper(II) acetate ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$) were obtained from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Diethanolamine and ethanol were

obtained from Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brazil), 35–38% HCl from Anidrol (Diadema, SP, Brazil) and NaOH from Neon (Suzano, SP, Brazil). Thiram analytical standard (97.1% purity) was obtained from AccuStandard (Connecticut, USA). UV-Spectrophotometer used (1650 PC) was from Shimadzu (Japan). The digestion and vertical system for dithiocarbamate analysis, as CS_2 , is shown in Figure 2.

Determination of dithiocarbamates, as CS_2

The spectrophotometric determination of DTCs followed the method developed by Caldas *et al.*¹² using the system shown in Figure 2a. In summary, 150 g of sample were transferred to a two-necked flask, the acid digestion solution (20% HCl and 1.25% SnCl_2) was added and the flask placed in a heating system. One mouth of the flask was connected to N_2 and another to the vertical system containing 10% NaOH solution (trap 1) and the complexation ethanolic solution (trap 2; 0.48% copper acetate and 10% diethanolamine), which was stable for 3 months in the refrigerator. After 45 min of heating the flask, the complexation reaction product (trap 2; Figure 2b) was transferred to a calibrated 25 mL volumetric flask, the

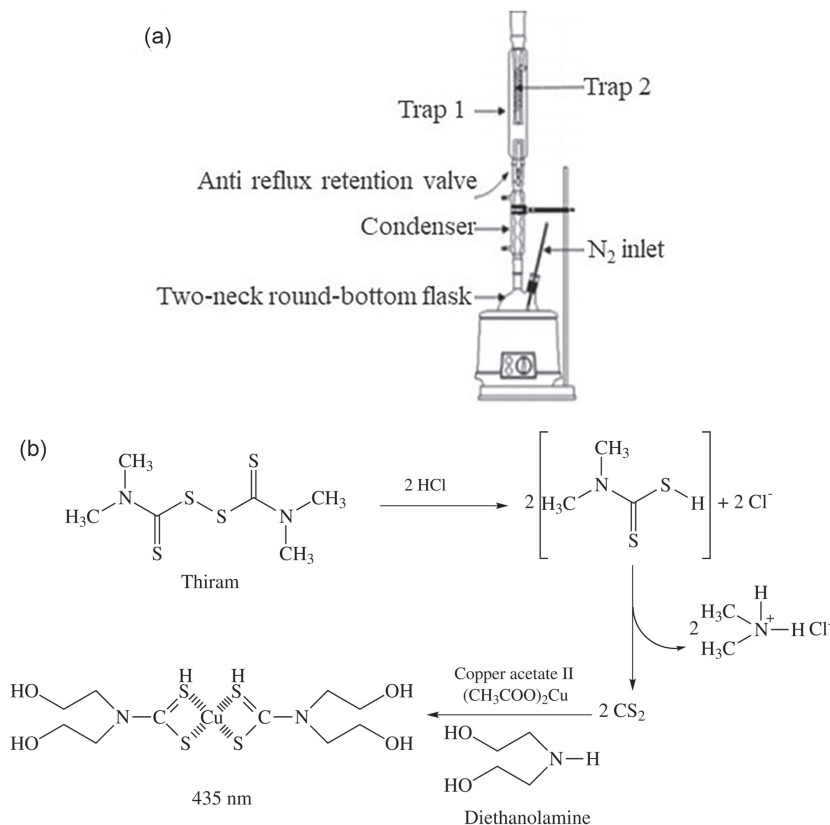


Figure 2. (a) Digestion and vertical systems for the analysis of dithiocarbamates in food samples.¹² The CS_2 generated by the acid hydrolysis in the flask is passed through a NaOH solution (trap 1) and is complexed with copper acetate/diethanolamine solution in trap 2. (b) Acid hydrolysis and complexation reactions for the dithiocarbamate thiram.

volume filled with ethanol, and the yellow complex was measured in the spectrophotometer at 435 nm against an analytical curve of CS₂, which was subjected to the same complexation reaction in 25 mL calibrated volumetric flasks. The hydrolysis and complexation reactions for thiram are shown in Figure 2b. The Laboratory of Toxicology is accredited by INMETRO (Brazilian Institute of Metrology, Quality and Technology) under ISO 17025 for this assay (CRL 0447).

Method validation

The validation parameters of the method were linearity of the analytical curve, limit of quantification (LOQ), accuracy (recovery in %), repeatability and intermediate accuracy (expressed as % of relative standard deviation, RSD), according to the European Commission criteria (SANTE/11813/2017).²⁵ The linearity was evaluated by linear regression and correlation coefficient (*r*), by means of analytical curve with standard solution of CS₂ at eight concentrations, from 0.21 to 8.4 µg mL⁻¹ CS₂, corresponding to 0.04 to 1.4 mg kg⁻¹ CS₂. Thiram was the dithiocarbamate used during method validation, considering that 1 mol of thiram (240 g) yield 2 mols of CS₂ (152 g). A thiram (AccuStandard, USA) stock solution prepared in acetone and corresponding to 0.63 mg mL⁻¹ CS₂ was used for the preparation of a working solution at 0.15 mg mL⁻¹ CS₂ in ethanol, which was used to fortify passion fruit control matrices (peel, seedless pulp and leaf) at 0.05, 0.1, 0.2 and 1 mg kg⁻¹ CS₂ levels, with five replicates for each level (*n* = 5). The repeatability was evaluated in the recovery trial (same day, same analyst), and expressed as RSD (%). Additionally, fortified samples at 0.05 and 1.0 mg kg⁻¹ CS₂ levels (*n* = 5) were analyzed by another analyst on another day to estimate the intermediate precision (total *n* = 10). The limit of quantification (LOQ) of the method was defined as the lowest level of fortification that met the validation criteria (recovery between 70 and 120% and RSD lower than 20%).²⁵ Samples whose concentration exceeded the upper limit of the standard curve were diluted to be

estimated in the linear concentration range validated in the method. All control samples (from organic growers) showed negative results for dithiocarbamates, as CS₂.

Sample analysis and processing factor estimation

First, peel samples of unwashed fruits were analyzed and those samples that presented concentration higher than the LOQ value had the peel samples from washed fruits and seedless pulp also analyzed. Pulp samples with negative results were not further analyzed. All leaf samples were analyzed. The processing factor (PF), defined as the ratio of pesticide concentration in the sample after and the concentration before processing,²⁶ was estimated for the peel, pulp and dry leaf, considering the processes of fruit washing, fruit fractionation and leaf drying. The CS₂ concentration in the whole fruit was estimated for each sample from the concentrations of CS₂ detected in the peel and in the pulp, and the weights of the peel and the whole fruit. When the concentration in the pulp was lower than LOQ, the level at the LOQ was used in the calculation.²⁶

Results and Discussion

Method validation

The calibration curves of CS₂ showed satisfactory results for linearity (*r* > 0.99) in the concentration range evaluated (0.21 to 8.4 µg mL⁻¹ CS₂, corresponding to 0.04 to 1.4 mg kg⁻¹ CS₂). Table 1 shows the results of the method validation, with recoveries varying from 69.5 to 120%, 79.6 to 112% and from 71 to 120% for peel, pulp (seedless) and leaf, respectively. The repeatability and intermediate precision were acceptable in all concentration ranges, with RSD lower than 12.6% in the three matrices. The LOQ value of the method was established at 0.05 mg kg⁻¹ CS₂.

Table 2 shows the dithiocarbamate residues, in terms of CS₂, of the passion fruit and leaf samples collected in the

Table 1. Recovery (*n* = 5), repeatability (RSD_r, *n* = 5) and intermediate precision (RSD_p, *n* = 10) of the spectrophotometric method for the analysis of dithiocarbamate (as CS₂), in passion fruit matrices fortified at 3 or 4 concentration levels

Matrix	Peel				Pulp			Leaf			
	0.05	0.10	0.20	1.0	0.05	0.10	0.20	0.05	0.1	0.2	1.0
Level / (mg kg ⁻¹ CS ₂)	0.05	0.10	0.20	1.0	0.05	0.10	0.20	0.05	0.1	0.2	1.0
Recovery / %	120	84.9	69.5	90.4	112	83.5	79.6	120	87	71	78
RSD _r / %	0.7	2.1	12.2	6.0	4.8	1.9	2.2	10	8.7	12.6	3.1
RSD _p / %	6.0	–	–	7.6	1.4	–	3.8	10.3	–	–	4.0

RSD: relative standard deviation.

three regions of the country (Figure 1). In total, 14 samples of passion fruit peel were positive for CS₂ (25.4% of the samples analyzed). Lower incidence of dithiocarbamate positive samples was found in Brazil for banana, cashew apple, grape, guava, mango, orange, pineapple and strawberry (1.8 to 16.3%), while apple, kaki, peach and papaya had higher incidence (32-59%).⁷

Samples from the Middle West region (Goiás State and Federal District) were the most positive for dithiocarbamates (39.1%). The levels in the whole fruit ranged from < LOQ to 0.7 mg kg⁻¹ CS₂, below the established MRL for dithiocarbamates in Brazil (1 mg kg⁻¹ CS₂).⁴ No residues were found in passion fruit samples collected from the 17 producers of Bahia State, which are responsible for more than half of the country's passion fruit production,¹⁶ and only 2 of the 14 leaf samples were positive (Table 2), showing a limited use of dithiocarbamates by the passion fruit growers from this region.

The origin of CS₂ determined in the sample could not be identified, which is a limitation of the indirect methods to quantify dithiocarbamates, regardless of the detection method used.¹¹⁻¹⁵ Another limitation of the indirect methods is the possibility of false positive results in crops containing sulfur compounds, such as brassica (e.g., broccoli and cabbage), allium species (e.g., leek and onion)²⁷ and papaya,¹³ a limitation that does not affect the analysis of passion fruit. Although there are specific methods for the determination of some dithiocarbamates in foods, mainly by high performance liquid chromatography (HPLC) using UV or mass spectrometric detectors,²⁸⁻³² none can discriminate all the dithiocarbamate compounds, including mancozeb from metiram.

Due to the non-systemic characteristic of the dithiocarbamates, no residues are expected in fruit pulp. Indeed, only one sample (unwashed fruit) had CS₂ in the pulp (0.09 mg kg⁻¹), with an estimated processing factor

(pulp / whole fruit) of 0.13 for this sample. In this study, care was taken not to mix the peel and the pulp during fruit fractionation, although cross contamination cannot be disregarded during industrial processing of passion fruit for juice production, considering that washing the fruit does not always remove all the residues (Table 2).

These are the first data of dithiocarbamate residues in Brazilian passion fruit, a crop that is not included in the Brazilian national monitoring programs for pesticide residues.^{33,34} Passion fruit is included in the European Food Safety pesticide monitoring program, being among the imported fruits with higher frequency of MRL exceedance.^{8,35} In 2009, about 70% of the samples analyzed within the European program exceeded the MRL for dithiocarbamates (0.05 mg kg⁻¹ CS₂), mostly samples from Kenya.³⁵ Very limited data are available elsewhere. Hjorth *et al.*³⁶ found 2 of the 18 passion fruit samples produced in Colombia containing residues of 0.34 and 1.9 mg kg⁻¹ CS₂, above the European Union's MRL.

The use of passion fruit peel, rich in soluble fibers, as a food ingredient has been shown to have a positive effect in the glycemic and lipid levels of type 2 diabetes patients.³⁷ In this study, a processing factor for passion fruit peel was estimated after the washing the fruit, a procedure performed in the juice industry. Of the 14 CS₂-positive peel samples from washed fruits, 4 had non-quantifiable residues (lower than LOQ), and the estimated median processing factor was 0.5, representing 50% reduction of pesticides (Table 2). This estimate is close to that estimated by the German Federal Institute for Risk Assessment for dithiocarbamates in fruits and vegetables (0.11 to 0.62).³⁸ Reduction of dithiocarbamate residues after washing is expected since most residues of a non-systemic compound remain on the fruit surface.

Passion fruit leaves, including those of *P. edulis*, are used in the preparation of tea and as raw material in the herbal

Table 2. Dithiocarbamate residues (CS₂) in passion fruit samples and processing factors (PF) for washed peel and dried leaf

	Rio de Janeiro State	Goiás State and Federal District	Bahia State	Total
Peel, ^a p (N)	5 (15)	9 (23)	0 (17)	14 (55)
Level ^b / (mg kg ⁻¹ CS ₂)	0.06-0.3	0.06-1.4	–	0.06-1.4
PF, ^{c,d} range (median), N = 14	–	–	–	0.1-1 (0.5)
Whole fruit, ^c level / (mg kg ⁻¹ CS ₂)	< LOQ-0.2	< LOQ-0.7	–	< LOQ-0.7
Fresh leaf, p (N)	8 (16)	13 (23)	2 (14)	23 (53)
Level ^b / (mg kg ⁻¹ CS ₂)	0.07-7.6	0.1-8.5	0.06-4.9	0.06-8.5
PF, ^{c,e} range (median), N = 4	–	–	–	1.1-1.6 (1.3)

LOQ: limit of quantification; p: number of samples ≥ LOQ of 0.05 mg kg⁻¹ CS₂; N: number of analyzed samples; ^afrom unwashed fruits; ^brange of positive samples; ^csample at < LOQ were considered at the LOQ in the calculation; ^dPF for peel from washed fruit compared with peel from unwashed fruit; ^ePF for dry leaf produced from fresh leaf.

industry, being included in the Brazilian List of Medicinal Plants of Interest to the SUS.¹⁸ However, the Brazilian legislation proposed that medicinal plants be free from pesticide residues.³⁹ The dried leaves of *Passiflora* sp. are included in the Brazilian Pharmacopeia⁴⁰ and are used as a plant drug, mainly for its anxiolytic and sedative properties.⁴¹ More than 40% of passion fruit leaf samples analyzed in this study contained residues of dithiocarbamates, mainly samples from the Rio de Janeiro State (50% of the samples), Goiás State and Federal District (56%), indicating the frequent use of these fungicides by farmers in those regions. Although this use is allowed by the Brazilian legislation, in principle, products destined for the herbal medicine industry should not be treated with pesticides, even if the leaves are washed before drying. The level of CS₂ present in the fresh leaves of *P. edulis* increased during the drying process, with a median processing factor of 1.3 (Table 2).

In addition to the dithiocarbamates, Brazilian growers have a limited number of pesticides registered in passion fruit, including kasugamycin, cartap and chlorfenapyr (MRL of 0.05 mg kg⁻¹), difenoconazole and imidacloprid (MRL of 0.2 mg kg⁻¹).⁴ The presence of these pesticides in passion fruit and the potential illegal use of other compounds should be further investigated.

Conclusions

The validation of the UV-Vis spectrophotometric method for the determination of dithiocarbamates in leaf, pulp and passion fruit peel matrices was satisfactory, with a LOQ of 0.05 mg kg⁻¹ CS₂. About 25% of passion fruit samples and 43% of fresh leaf samples were positive, and no passion fruit samples contained residues above the Brazilian MRL (whole fruit). As expected for a non-systemic compound, washing the fruit removed up to 100% of the surface residues; drying the fresh leaves increased the residue levels by up to 60%.

This is the first study in the country that evaluated the levels of dithiocarbamates in passion fruit, and residue data from other pesticides in this crop are still lacking. The results of this work should be considered by the governmental authorities to include passion fruit in the pesticide monitoring programs, as well as to control the raw materials destined for the pharmaceutical industry (dry leaves) and food industry (peel as a by-product of juice production).

Acknowledgments

The authors would like to thank the passion fruit producers for providing the samples, and the Brazilian

National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support.

References

1. Rubino, F. M.; Mrema, E. J.; Colosio, C.; *Encycl. Food Saf.* **2014**, 3, 5.
2. Kanchi, S.; Singh, P.; Bisetty, K.; *Arabian J. Chem.* **2013**, 7, 11.
3. Belpoggi, F.; Soffritti, M.; Guarino, M.; Lambertini, L.; Cevolani, D.; Maltoni, C.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, 982, 123.
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), <http://portal.anvisa.gov.br/documents/1111215/117782/M02%2B%2BMancozebe.pdf/975fdd18-65fd-477c-ab85-217bcb9a0110>, accessed in April 2019.
5. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2017/01.Os_10_IAs_vendidos_2017.xlsx, accessed in April 2019.
6. Jardim, A. N. O.; Caldas, E. D.; *Food Control* **2012**, 25, 607.
7. Jardim, A. N. O.; Brito, A. P.; van Donkersgoed, G.; Boon, P. E.; Caldas, E. D.; *Food Chem. Toxicol.* **2018**, 112, 108.
8. European Food Safety Authority (EFSA), The 2016 European Union Report on Pesticide Residues in Food; *EFSA J.* **2018**, 16, 5348.
9. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), <http://www.agriculture.gov.au/ag-farm-food/food/nrs/nrs-results-publications/plant-product-monitoring-2017-18#horticulture-datasets>, accessed in April 2019.
10. Valcke, M.; Bourgault, M. H.; Rochette, L.; Normandin, L.; Samuel, O.; Belleville, D.; Blanchet, C.; Phaneuf, D.; *Environ. Int.* **2017**, 108, 63.
11. Crnogorac, G.; Schwack, W.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2009**, 28, 40.
12. Caldas, E. D.; Conceição, M. H.; Miranda, M. C.; Souza, L. C. K. R.; Lima, J. F.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4521.
13. Abakerli, R. B.; Sparrapan, R.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.; Jara, J. L. P.; Rodrigues, N. R.; Fay, E. F.; Luiz, A. J. B.; Galvão, T. D. L.; Martins, D. S.; Yamanishi, O. K.; Toledo, H. H. B.; *Food Chem.* **2015**, 188, 71.
14. Pizzutti, I. R.; de Kok, A.; da Silva, R. C.; Rohers, G. N.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, 28, 775.
15. Vareli, C. S.; Pizzutti, I. R.; Gebler, L.; Cardoso, C. D.; Gai, D. S. H.; Fontana, M. E. Z.; *Talanta* **2018**, 184, 202.
16. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2016_v43_br.pdf, accessed in April 2019.
17. <http://www.ceplac.gov.br/radar/maracuja.htm>, accessed in April 2019.
18. Pineli, L. L.; Rodrigues, J. S.; Costa, A. M.; de Lima, H. C.; Chiarello, M. D.; Melo, L.; *J. Sci. Food Agric.* **2015**, 95, 1500.

19. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>, accessed in April 2019.
20. Oliveira, L. F.; Nascimento, M. R. F.; Borges, S. V.; Ribeiro, P. C. N.; Ruback, V. R.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2002**, *22*, 259.
21. Ishimoto, F. Y.; Harada, A. I.; Branco, I. G.; Conceição, W. A. S.; Coutinho, M. R.; *RECEN* **2007**, *9*, 280.
22. de Santana, F. C.; da Silva, J. V.; Santos, A. J. A. O.; Alves, A. R.; Wartha, E. R. S. A.; Marcellini, P. S.; da Silva, M. A. A. P.; *Aliment. Nutr.* **2011**, *22*, 391.
23. Miranda, A. A.; Caixeta, A. C. A.; Flávio, E. F.; Pinho, L.; *Braz. J. Food Nutr.* **2013**, *24*, 225.
24. Rocha, L.; Lucio, E. M. A.; França, H. S.; Sharapin, N.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, *18*, 744.
25. European Commission Directorate General for Health and Food Safety; Guidance document on *Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and Feed*, SANTE/11813/2017, 21 and 22 November 2017 rev.0, https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf, accessed in April 2019.
26. Hamilton, D.; Yoshida, M.; Wolterink, G.; Solecki, R.; *Food Safety Assessment of Pesticide Residues*; World Scientific: New Jersey, USA, 2017, ch. 4.
27. Perz, R.C.; van Lishaut, H.; Schwack, W.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 792.
28. Crnogorac, G.; Schmauder, S.; Schwack, W.; *Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 2539.
29. Hayama, T.; Takada, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 969.
30. López-Fernández, O.; Rial-Otero, R.; González-Barreiro C.; Simal-Gándara, J.; *Food Chem.* **2012**, *134*, 366.
31. Schmidt, B.; Christensen, H. B.; Peterse, A.; Sloth, J. J.; Poulsen, M. E.; *Food Addit. Contam., Part A* **2013**, *30*, 1287.
32. Pheta, N. H.; Lokhande, R. S.; Seshadri, D. T.; Patil, R. M.; Bhagat, T. S.; Patil, J. G.; *Anal. Methods.* **2017**, *9*, 4702.
33. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); *Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal, PNCRC/VEGETAL*, http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/copy_of_pncrc-vegetal, accessed in April 2019.
34. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)*, <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>, accessed in April 2019.
35. European Food Safety Authority (EFSA), The 2009 European Union Report on Pesticide Residues in Food; *EFSA J.* **2011**, *9*, 2430.
36. Hjorth, K.; Johansen, K.; Holen, B.; Andersson, A.; Christensen, H. B.; Siivinen, K.; Toome, M.; *Food Control* **2011**, *22*, 1701.
37. Janebro, D. I.; de Queiroz, M. S. R.; Ramos, A. T.; Sabaá-Srur, A. U. O.; da Cunha, M. A. L.; Diniz, M. F. F. M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, *18*, 724.
38. The German Federal Institute for Risk Assessment; *Pesticide Processing Factors*, <http://www.bfr.bund.de/en/search.html?search%5Bquery%5D=processing+factor>, accessed in April 2019.
39. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução da Diretoria Colegiada - RDC No. 26, de 13 de maio de 2014; *Dispõe sobre o Registro de Medicamentos Fitoterápicos e o Registro e a Notificação de Produtos Tradicionais, Fitoterápicos*, http://bvsm.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf, accessed in April 2019.
40. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira*, <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259456/Suplemento+FFFfB.pdf/478d1f83-7a0d-48aa-9815-37dbc6b29f9a>, accessed in April 2019.
41. Deng, J.; Zhou, Y.; Bai, M.; Li, H.; Li, L.; *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *128*, 148.

Submitted: January 11, 2019

Published online: May 14, 2019

