

Universidade de São Paulo  
Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

EDUARDO NORIYUKI SAKUMA SHIBATA

Desenvolvimento e aplicação de métodos baseados em cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial na determinação de pesticidas em morangos e tomates de cultivares convencional e orgânico

Versão da Dissertação Corrigida

São Paulo

Data do depósito na SPG: 14 de dezembro de 2020

EDUARDO NORIYUKI SAKUMA SHIBATA

Desenvolvimento e aplicação de métodos baseados em cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial na determinação de pesticidas em morangos e tomates de cultivares convencional e orgânico

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Química*

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

São Paulo  
2020



## Agradecimentos

À minha irmã Alyssa, que sempre me deu apoio emocional durante o meu curso de mestrado.

Ao meu pai Minoru pelo amor e carinho.

Ao Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago, meu orientador, que me aceitou como seu aluno de mestrado e que sempre foi atencioso e paciente comigo. Quando estava passando por dificuldades, sempre me mostrava possíveis soluções ou caminhos para que pudesse chegar onde queria chegar. Sou eternamente grato por ter conseguido realizar o trabalho e pelos ensinamentos passados para a minha formação, além do profissionalismo e comunicação com todos os alunos, fundamentais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro que tive durante o meu curso de mestrado pelo programa de bolsa individual.

À Agilent Technologies pelos materiais fornecidos ao laboratório e pela qualidade dos mesmos para as análises.

À Doutora Daniela Daniel, que além de me acompanhar durante o mestrado junto com o professor orientador me ajudou com o desenvolvimento e aplicação do método, operação dos instrumentos analíticos, aquisição de materiais e amostras a serem analisadas e com dicas e sugestões para análise de dados. Fico muito agradecido pela paciência, atenção e profissionalismo que teve comigo ao ensinar tudo para alguém que nunca teve contato com o que tive durante o meu curso de mestrado. Foi uma honra ter aprendido com uma pessoa que é especialista na área de cromatografia.

Aos colegas, professores e funcionários do laboratório que deixavam o dia e o ambiente mais agradável sempre que era possível. Agradeço à Michele, à Pâmela e ao Professor Doutor Lucio pelas nossas conversas casuais e amizades no laboratório; ao Fernando e à Simone por me ajudar a resolver as partes burocráticas de laboratório, como aquisição de reagentes; à Doutora Zuzana por ensinar sobre o funcionamento dos equipamentos do laboratório e estar sempre à disposição para tirar dúvidas relacionadas à minha dissertação; em especial ao Doutor Eric que me ajudou com a dissertação dando dicas e sugestões para elaboração da dissertação, além da

revisão contínua nos momentos finais à entrega da dissertação e estar sempre à disposição para tirar dúvidas relacionadas ao laboratório, instrumentação e/ou dissertação.

Aos meus amigos Neury, Carolina, Yuri e Gabriel Henrique que sempre se preocuparam comigo e me deram apoio emocional durante o curso de mestrado.

## Resumo

Shibata, E.N.S. **Desenvolvimento e aplicação de métodos baseados em cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial na determinação de pesticidas em morangos e tomates de cultivares convencional e orgânico.** 2020. Numero de Páginas 70. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A crescente população mundial demanda uma crescente produção agrícola, o que acaba com induzir uma crescente produção e utilização de defensivos agrícolas. Há uma grande diversidade de pesticidas produzidos industrialmente, que requerem, no entanto, que sejam aplicados em quantidades adequadas para culturas específicas. Surge daí a necessidade de métodos de monitoramento de resíduos em produtos agrícolas. Foram escolhidos para este trabalho, morango e tomate, que estão entre os vegetais que apresentam irregularidades com frequência, sejam pelos níveis acima dos toleráveis, ou pela utilização inadequada de produtos para estas culturas. Além do mais, há casos de fraudes com produtos orgânicos, que, por definição, não deveriam apresentar níveis detectáveis de pesticidas industriais. Foram desenvolvidos métodos multirresíduo constando de uma etapa inicial de preparo de amostra baseado em QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*) seguido de UHPLC-MS/MS. A identificação dos analitos era feita pelo conjunto tempo de retenção cromatográfico e duas fragmentações específicas no espectrômetro de massas. O método foi validado e aplicado à análise de 21 amostras de morango, sendo 6 delas orgânicas, e 25 amostras de tomates, sendo 9 delas orgânicas. Um total de 27 pesticidas foram quantificados nas amostras de morango e 51 pesticidas nas amostras de tomate. Os limites de detecção e quantificação alcançados para todos os pesticidas foram menores que os valores estabelecidos pela ANVISA. Os resultados revelaram que 71% das amostras de morango apresentaram irregularidades, sendo a irregularidade mais frequente a classificação inadequada como produto orgânico (67%), seguida de uso de pesticida não autorizado para a cultura (19%) e pesticida acima do limite máximo de resíduo (14%). A maioria das amostras de tomate (56%) apresentou alguma irregularidade. Novamente, a irregularidade mais frequente foi a classificação inadequada como produto orgânico (42%), seguida de uso de pesticida não autorizado para a cultura (33%) e pesticida acima do limite máximo de resíduo (25%).

Palavras-chave: cromatografia líquida de ultra alta eficiência, espectrometria de massas sequencial, pesticidas, QuEChERS, alimentos orgânicos.

## Abstract

Shibata, E.N.S. **Development and application of methods based on Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with sequential mass spectrometry in the determination of pesticides in strawberries and tomatoes from conventional and organic cultivars.** 2020. Number of Pages 70. Master Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The growing world population demands an increasing agricultural production, which ends up inducing an increasing production and use of pesticides. There is a great diversity of industrially produced pesticides, which nevertheless must be applied in quantities suitable for specific crops. Hence the need for methods of monitoring residues in agricultural products. Strawberries and tomatoes were chosen for this work, because they are among the vegetables that frequently show irregularities, either due to the levels above tolerable, or due to the inappropriate use of products for these crops. Furthermore, there are cases of fraud with organic products, which, by definition, should not have detectable levels of industrial pesticides. Multiresidue methods were developed consisting of an initial sample preparation step based on QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) followed by UHPLC-MS / MS. The analytes were identified by the chromatographic retention time and two specific fragmentations in the mass spectrometer. The method was validated and applied to the analysis of 21 strawberry samples, 6 of them organic, and 25 samples of tomatoes, 9 of them organic. A total of 27 pesticides were quantified in the strawberry samples and 51 pesticides in the tomato samples. The limits of detection and quantification of all pesticides complied with ANVISA standards. The results revealed that 71% of the strawberry samples showed irregularities, the inadequate classification as an organic product (67%) being the most frequent irregularity, followed by the use of unauthorized pesticide for the crop (19%) and pesticide above the maximum limit of residue (14%). Most tomato samples (56%) showed some irregularity. Again, the most frequent irregularity was the inappropriate classification as an organic product (42%), followed by the use of unauthorized pesticides for the crop (33%) and pesticides above the maximum residue limit (25%).

Keywords: Ultra high performance liquid chromatography, sequential mass spectrometry, pesticides, QuEChERS, organic foods.

## Lista de Siglas e Abreviaturas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

C18 – Octadecilsilano

dSPE – Extração em fase sólida dispersiva (do inglês *dispersive solid phase extraction*)

EPA – Agência de Proteção Ambiental (do inglês Environmental Protection Agency)

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization*)

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

LC – Cromatografia líquida (do inglês *liquid chromatography*).

LMR – Limite Máximo de Resíduo.

LOD – Limite de Detecção (do inglês *limit of detection*).

LOQ – Limite de Quantificação (do inglês *limit of quantification*).

MS – Espectrometria de massas (do inglês *mass spectrometry*).

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos.

PSA – do inglês *primary secondary amine*

QuEChERS – Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*).

SDA – Secretário de Defesa Agropecuária.

SDC – Secretário de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo.

UHPLC-MS/MS – cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês *ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry*).



## Sumário

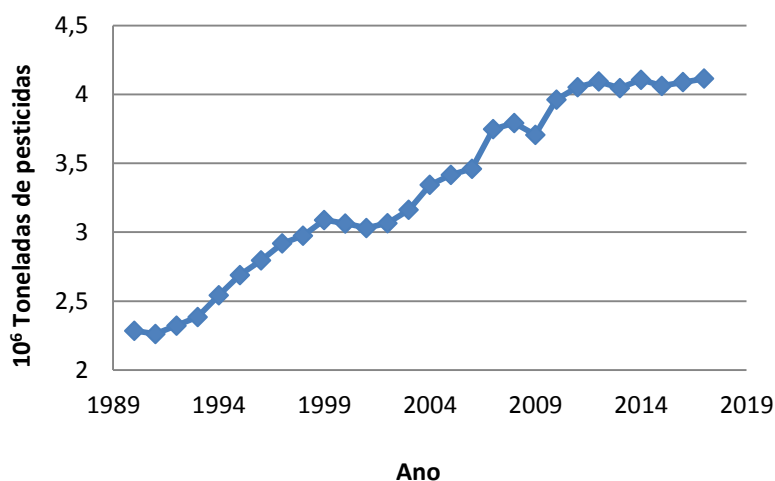
Agradecimentos.....	4
Resumo.....	6
Abstract .....	7
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	8
1. Introdução e Objetivos .....	9
2. Materiais e Métodos.....	16
2.1 Reagentes, solventes e soluções.....	16
2.2 Equipamentos.....	16
2.3 Preparo das amostras de morango.....	17
2.4 Preparo das amostras de tomate .....	33
Instrumentação .....	33
2.6 Validação do Método Analítico .....	34
2.6.1 Seletividade .....	34
2.6.2 Linearidade.....	34
2.6.3 Sensibilidade .....	34
2.6.4 Limite de Detecção e Quantificação .....	35
2.6.5 Efeito da Matriz.....	35
2.6.6 Exatidão (Recuperação) .....	35
2.6.7 Precisão .....	36
3. Resultados e Discussão .....	37
3.1 Otimização do sistema de UHPLC-MS/MS.....	37
3.2 Preparo de amostra.....	43
3.3 Validação do método.....	46
3.4 Análise de amostras reais .....	56
4. Conclusões e perspectivas.....	68
Referências Bibliográficas .....	69
Anexo 1. Curriculum Vitae .....	72
Sumario .....	72

Educacional .....	72
Atividade extracurriculares .....	72
Trabalhos publicados em congressos .....	72

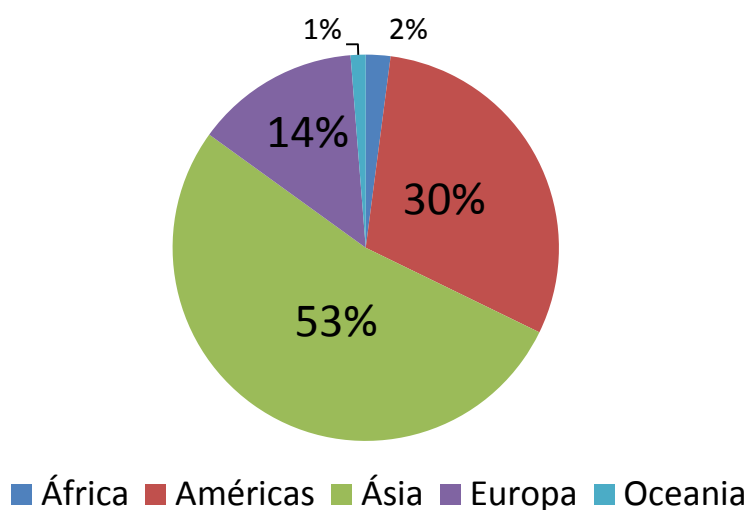
## 1. Introdução e Objetivos

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), pesticidas são substâncias ou mistura de substâncias químicas ou biológicas, com intenção de repelir, destruir ou de controlar o crescimento dos seres vivos considerados nocivos. O mesmo tem uso destinado no armazenamento, produção, proteção de florestas ou de ecossistemas e ambientes de interesse [1].

O consumo de pesticidas para uso na agricultura tem se intensificado ao longo das últimas décadas, como mostrado na Figura 1. A Figura 2 mostra como este consumo se distribui pelos vários continentes.

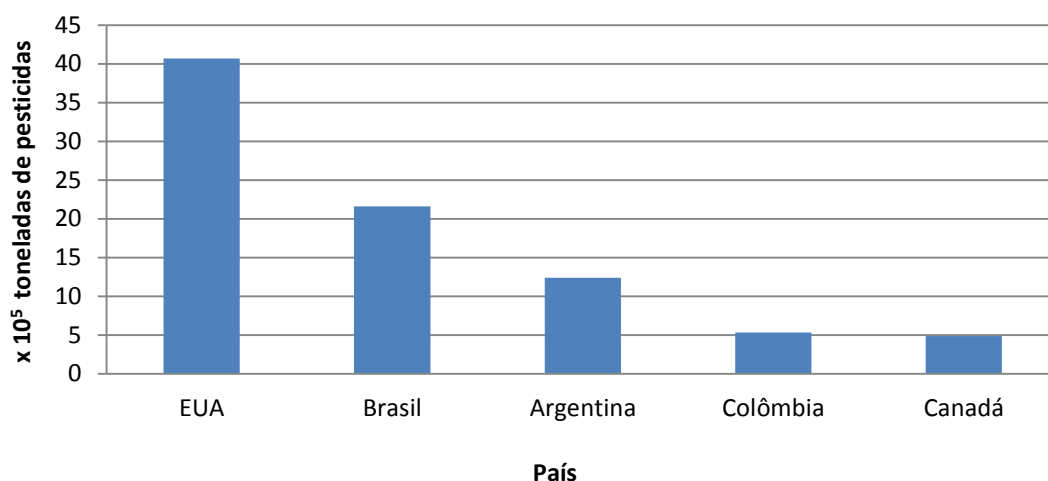


**Figura 1.** Consumo de pesticidas no mundo entre os anos de 1990 e 2017 [2].

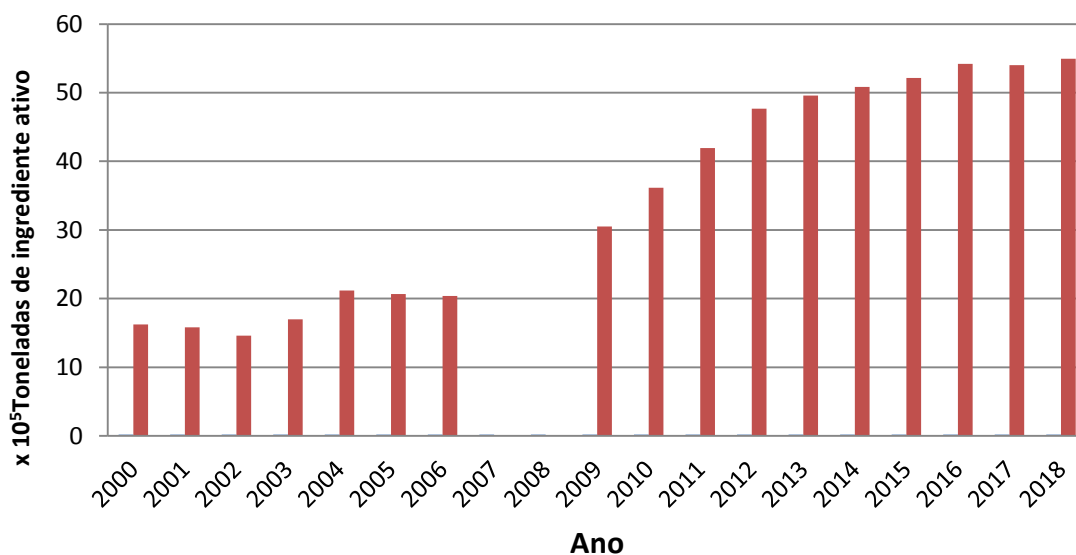


**Figura 2.** Distribuição do consumo de pesticidas do período 1990–2017 por continente [2].

Por representar a maior região em termos de área de plantio e maior população humana, não surpreendentemente a Ásia respondeu por pouco mais da metade do consumo de pesticidas no período 1990–2017. Dentro da parcela consumida pelas Américas, o Brasil é o segundo maior consumidor, como pode ser visto na Figura 3, e segue a tendência mundial de aumento de consumo, como mostrado na Figura 4.



**Figura 3.** Consumo médio de pesticidas pelos principais países da América entre 1990 e 2017 [2].



**Figura 4.** Venda de agrotóxicos no Brasil no período de 2000 a 2018. Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto n° 4.074/2002. Os dados informados pelas empresas referentes aos anos de 2007 e 2008 não foram sistematizados pelo IBAMA. Fonte: IBAMA [3].

Embora de grande importância para atender a demanda por alimentos e outros produtos agrícolas que a atual população mundial demanda, o uso inadequado e indiscriminado de

pesticidas pode acarretar diversos problemas indo do impacto ambiental à saúde humana. Desta forma, torna-se fundamental que, ao passo que novos pesticidas sejam desenvolvidos, estudos sobre o impacto destes, bem como procedimentos de análise de resíduos nos produtos e no meio ambiente sejam continuamente desenvolvidos e aprimorados. Naturalmente, estes estudos devem guiar a criação e atualização da legislação pertinente, bem como de ações governamentais. Esta legislação se faz necessária para coibir o uso abusivo e inadequado de defensivos com vistas a impedir um ganho imediato de produtividade e lucro às custas da degradação ambiental e prejuízo à saúde não só de consumidores, mas de populações que vivem às margens das áreas produtoras.

De acordo com o relatório das análises da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 12.501 amostras de alimentos de origem vegetal monitoradas entre 2013 a 2015, 2.301 (19,7%) foram consideradas insatisfatórias, ou seja, o alimento continha pesticida de uso autorizado acima do limite máximo de resíduo (LMR) permitido, pesticida de uso não autorizado para aquele alimento ou pesticida de uso proibido no Brasil [4]. No relatório entre os anos 2017 a 2018, foram analisadas 4.616 amostras de origem vegetal e a quantidade de amostras consideradas insatisfatórias foram 1.072 (23,0%) [5]. Estes patamares são elevados e contrastam com aqueles de países desenvolvidos. A Tabela 1 mostra os cinco alimentos com maiores índices de irregularidades em dois períodos diferentes de análises pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA. Nota-se que sistematicamente, o pimentão é o produto com maior índice de irregularidades, podendo conter pesticida de uso autorizado com níveis acima do LMR, presença de pesticida de uso não autorizado para o mesmo ou a de uso proibido no Brasil. Nos anos entre 2017 e 2018, os cinco pesticidas que apresentaram maior índice de detecções, em ordem decrescente, foram imidacloprido, tebuconazol, carbendazim, piraclostrobina e ditiocarbamato (mancozebe) [5].

**Tabela 1.** Os cinco alimentos com maiores índices de irregularidades segundo a ANVISA

<b>período 2013–2015</b>		<b>período 2017–2018</b>	
<b>Alimento</b>	<b>Irregulares (%)</b>	<b>Alimento</b>	<b>Irregulares (%)</b>
Pimentão	88,9	Pimentão	81,9
Abobrinha	77,8	Goiaba	42,4
Uva	74,6	Cenoura	39,7
Morango	72,6	Tomate	34,8
Goiaba	45,6	Alface	30,1

No contrafluxo de uma almejada produção e produtividade desenfreadas, ainda que baseada em atividades e atitudes agressivas, surge uma filosofia oposta e um correspondente mercado para produtos que acabaram por serem chamados de orgânicos. Em linhas gerais, produtos orgânicos seriam aqueles oriundos de um sistema sustentável, de baixo impacto para o ambiente e que seriam mais saudáveis. Por exemplo, estudo feito por Hyland et al. [6] demonstrou que a introdução da dieta de alimentos orgânicos reduziu a presença de 13 pesticidas (incluindo metabólitos) na urina, sendo observado as mudanças significativas no clotianidina (-83%) e metabólitos de malationa (-95%) e clorpirifos (-61%).

O contraponto natural à produção orgânica é que, via de regra, o custo de produção seria maior, o que tornaria esses produtos mais caros. Assim, acabam por surgir dois mercados que se contrapõe e se complementam: um de produtos de menor valor econômico e outro de produtos mais caros, mas que seriam mais desejáveis sob a perspectiva da saúde e meio ambiente.

Inevitavelmente, surgem também produtores, intermediadores e comerciantes que procuram indevidamente tirar proveito da venda de produtos não-orgânicos como o sendo e, assim, aumentar a margem de lucro. Torna-se, portanto, necessária uma legislação que coíba esta prática.

No Brasil, o sistema de produção orgânica é regulamentado pela lei 10.831, de 23 de dezembro de 2003 [7], que inclui a produção, a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a certificação, a comercialização e a fiscalização dos produtos, e estabelece no Artigo 1º:

*“Considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente.”*

A legislação brasileira dá tratamento diferenciado ao registro dos insumos destinados à agricultura orgânica. Os insumos que tiverem em sua composição os produtos permitidos na legislação orgânica, depois de registrados, recebem a denominação de “produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica”. Produtos fitossanitários são considerados de

baixo impacto ambiental e de baixa toxicidade. A legislação proíbe o uso de reguladores sintéticos de crescimento na produção vegetal orgânica – exceto similares aos encontrados na natureza e desde que obedeçam ao mesmo modo de ação dos reguladores de origem natural ou biológica – e de agrotóxico sintético no tratamento e armazenagem de sementes e mudas orgânicas.

Nota-se, portanto, que a análise de pesticidas é um tópico em contínuo desenvolvimento e de impacto para a economia, saúde e meio ambiente, já que há uma crescente preocupação mundial com este controle.

Dentre as técnicas analíticas utilizadas para o monitoramento de pesticidas em produtos agrícolas e no meio ambiente, destaca-se a cromatografia, que tem sido amplamente utilizada em suas modalidades gasosa e líquida [8-21]. Devido à complexidade das amostras, a espectrometria de massas se destaca como o modo de detecção, tanto para a cromatografia gasosa, quanto para a líquida. A ortogonalidade da cromatografia com a espectrometria de massas permite uma grande especificidade, e a sensibilidade é, em geral, suficiente para detectar os pesticidas atendendo normas e a legislação. No entanto, na prática, todo esse potencial das técnicas hífenadas de cromatografia e espectrometria de massas ainda demanda um processamento prévio da amostra seja para adequar o estado físico às necessidades do cromatógrafo, para eliminar interferentes ou para pré-concentrar um ou mais analitos.

O primeiro método notável de separação multirresíduo de pesticidas foi proposto por Mills et al. [22], usando acetonitrila para extração e éter de petróleo para fazer uma posterior partição. Neste caso, pesticidas organoclorado apolares são solubilizados mesmo na presença de água graças à acetonitrila e transferidos para a fase contendo éter de petróleo, deixando na fase aquosa sais, açúcares e outros materiais insolúveis. Devido a uso de solvente apolar na partição, pesticidas mais polares como organofosforados eram parcialmente perdidos durante a etapa de separação entre fases aquosa e apolar. Para poder analisar também os pesticidas polares com maior eficiência, o método de Mills foi aperfeiçoado por Becker [23], trocando-se o solvente de extração acetonitrila pela acetona, o solvente de partição éter de petróleo por diclorometano e usando-se solução saturada de NaCl para melhorar a partição entre as duas fases. Luke et al. utilizou o mesmo método de Becker, porém fez o uso de NaCl sódio ao invés de solução saturada, melhorando a partição entre as fases e aumentando a recuperação dos pesticidas mais polares [24, 25].

Devido à crescente demanda pela análise e necessidade de reduzir tanto o uso de solventes orgânicos como resíduos para evitar a poluição ambiental, foram criados métodos alternativos de extração multirresíduo que gere menos resíduos, consuma menos solventes e que seja evitado o uso de solventes halogenados. Infelizmente, nenhuma das técnicas conseguiu

superar as falhas ou limitações práticas para permitir sua ampla implementação, sendo útil em algumas aplicações, mas não são suficientemente simples ou eficazes para o multirresíduo.

No presente trabalho, foi utilizado o método de tratamento de amostra conhecido como QuEChERS, que se origina do termo em inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe* e que foi proposto em 2003 por Anastassiades et al. [26]. Hoje, QuEChERS é provavelmente a abordagem multirresíduo mais utilizada em laboratórios em todo o mundo, com várias versões modificadas publicadas na literatura [27-29]. O método original consiste em iniciar a extração com acetonitrila e adição de  $MgSO_4$  e  $NaCl$ . O extrato é então tratado com mais  $MgSO_4$  e um sorvente contendo cadeias amínicas conhecido como *primary secondary amine* (PSA). Além da remoção de água, esta fase permite a remoção de compostos indesejados, entre eles metais, graças ao poder quelante de PSA [30]. Após este tratamento, a fase orgânica baseada em acetonitrila é introduzida no cromatógrafo.

Assim como qualquer outra técnica de pré-tratamento de amostra, podem ocorrer processos de transferência incompleta do analito para a solução final, bem como alterações não previstas (aleatórias) de concentração. Assim, técnicas auxiliares como a de padrão interno tornam-se usuais. Apesar da etapa de pré-tratamento prover uma significativa limpeza da amostra (*cleanup*) e da separação cromatográfica, não raro ainda componentes da matriz original acabam por interferir na detecção, levando ao uso também da técnica de adição de padrão.

Desta forma, o desenvolvimento de métodos de análise multirresíduo é bastante desafiador, demandando desde adaptações de procedimentos previamente desenvolvidos, até a busca por soluções inovadoras, mas que mantenha o atendimento a normas estabelecidas e permita a obtenção de resultados confiáveis.

Neste contexto, o objetivo da presente dissertação é apresentar o desenvolvimento e a aplicação de métodos baseados em cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) na determinação de pesticidas em tomates e morangos de diferentes cultivares. Estes produtos agrícolas foram escolhidos por estarem no grupo daqueles que são frequentemente vítimas de uso abusivo de pesticidas.

Como os pesticidas mais empregados nestas culturas formam um grupo de 54 substâncias no total, o objetivo seria o de que os métodos permitissem a quantificação do maior número deles.

Dada que a expectativa com relação aos produtos orgânicos é de que baixos níveis sejam encontrados, o objetivo seria que os métodos não apenas permitissem atingir limites de detecção apropriados para produtos de produção convencional, mas que permitissem também avaliar baixos níveis nestes produtos orgânicos. Os valores obtidos seriam comparados aos valores obtidos pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)



da ANVISA e verificar se estão dentro dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos, sendo este um parâmetro relacionado às Boas Práticas Agrícolas.

Considerando o enfoque principal desta dissertação na área de desenvolvimento de métodos analíticos, o objetivo principal não é o acompanhamento e comparação sistemáticos de produtos de diferentes cultivares. Porém, o objetivo é também de aplicar a um significativo número de amostras de modo a permitir não apenas testar a robustez dos métodos, mas também comparar os diferentes produtos agrícolas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Reagentes, solventes e soluções

Neste estudo, foram considerados 27 pesticidas para morango e 51 pesticidas para tomate, de diferentes classes químicas, sendo alguns pesticidas de uso comum entre morango e tomate. Os pesticidas que foram selecionados são os que apareceram na análise do morango e tomate no relatório de monitoramento de amostras de resíduos de pesticidas do PARA [4]. A Tabela 2 apresenta a fórmula estrutural, fórmula molecular, grupo químico, classe de pesticida e LMRs para uso foliar para morango e tomate.

Para o desenvolvimento do método e calibração do sistema, foi utilizado um kit de padrões contendo um total de 253 pesticidas (LC/MS Pesticide Comprehensive Test Mix, 8 x 1 mL, part number 5190-0551, Agilent, Santa Clara, CA, EUA), incluindo dentre eles os analitos desejados. Nesta solução, cada um dos analitos se encontra na concentração de 100 mg/L. Uma solução estoque foi preparada a partir deste padrão para uma concentração de 2 mg/L. A partir desta foi preparada uma outra solução estoque de concentração 100 µg/L. Ambas as soluções estoques foram utilizadas para preparar as devidas concentrações em cada tipo de amostra, com devidas diluições. O solvente usado para a diluição foi acetonitrila. Tanto o kit quanto as soluções estoque eram armazenadas a -18°C para evitar a degradação dos pesticidas.

Para morango foram preparadas soluções padrões de concentrações 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 e 200 µg/L, além do branco analítico (somente solvente). Para tomate foram preparadas soluções padrões de concentrações 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 µg/L, além do branco analítico.

Acetonitrila grau LC-MS, ácido fórmico e ácido acético foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções aquosas foram preparadas com água deionizada 18 MΩ cm (Milli-Q, Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, EUA). O procedimento de extração foi realizado com o kit Agilent 5982-5550CH para as amostras de morango e Agilent 5982-6669 para as amostras de tomate. A etapa de limpeza (*cleanup*) foi realizada com o kit Agilent QuEChERS Dispersive Kit for Fruits and Vegetables, AOAC method (Agilent 5982-5022CH).

### 2.2 Equipamentos

As amostras foram trituradas e homogeneizadas em liquidificador (Arno Pro Perfect Collection, LN85), acondicionadas em tubos de polipropileno Nalgene 500 mL (2350-2355, Nalgon Equipamentos Científicos, Itupeva, SP, Brasil). Foram utilizados tubos de 15 mL em polipropileno para centrifuga (SIAL0791, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As soluções

foram agitadas em vortex (Vortex 1, IKA-Werke, Staufen, Alemanha) e centrifugadas em centrífuga Universal 320 (Andreas Hettich, Tuttlingen, Alemanha). Após o preparo de amostra, as soluções foram acondicionadas em frascos âmbar de 2 mL (Agilent 5182-0716) e levados ao instrumento de análise.

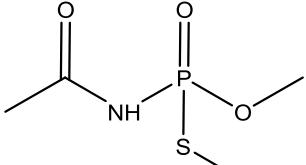
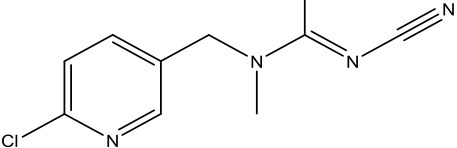
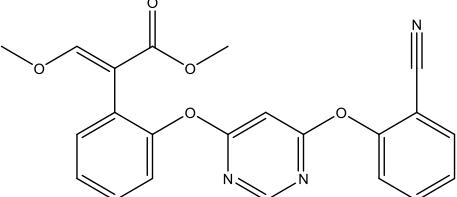
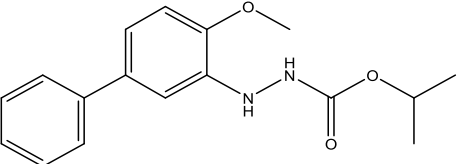
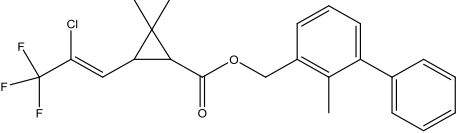
### 2.3 Preparo das amostras de morango

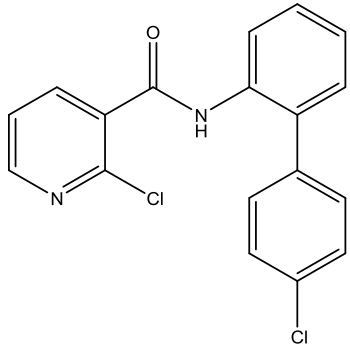
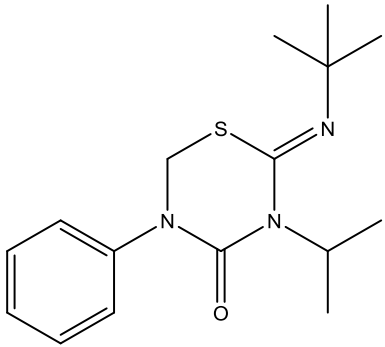
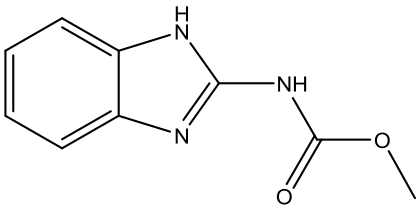
Embora o kit empregado para o preparo de amostras pelo método QuEChERS original preveja a utilização de 10 g de amostra, utilizamos amostras de apenas 2 g e redução proporcional dos reagentes necessários.

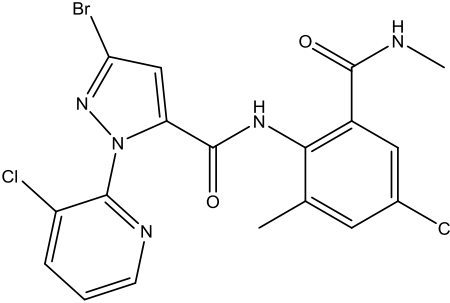
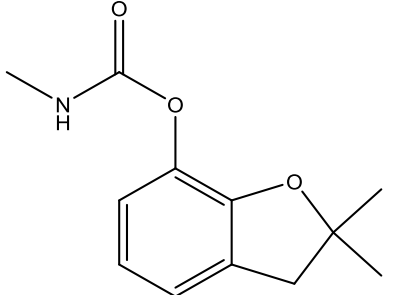
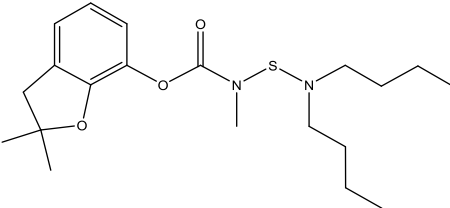
As amostras de no mínimo 200 g de morango adquiridas no comércio local eram congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento de iniciar o procedimento. Toda a amostra era transferida ainda congelada ao liquidificador, previamente limpo, e batida para obter a amostra em forma de pasta. Vale ressaltar que nenhuma parte da poupa, casca ou folhas era removida antes do procedimento.

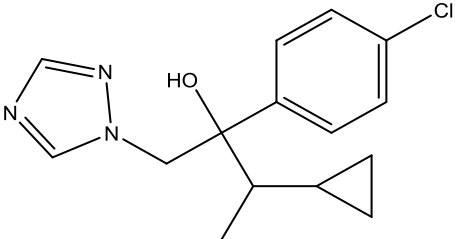
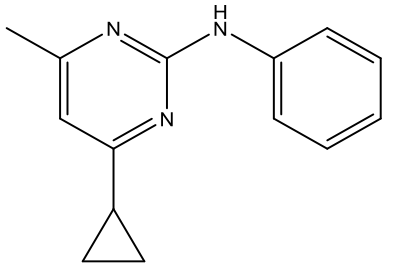
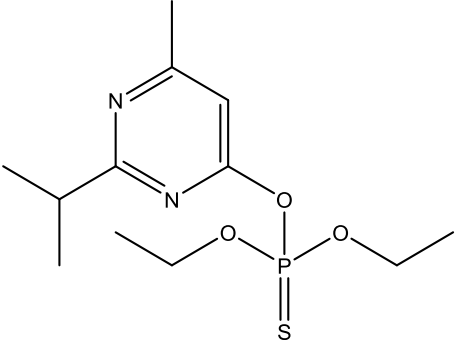
Uma alíquota de 2,00 g da amostra era pesada em tubo de polipropileno de 15 mL, sendo o restante armazenado no congelador novamente. No tubo contendo a amostra, adicionou-se 2 mL de acetonitrila e agitou-se durante 20 segundos usando vortex. Em seguida, foi adicionado 1,00 g de sal de extração ( $\text{MgSO}_4 + \text{NaCl}$ ) e agitou-se durante 30 segundos usando vortex. Após a agitação, o tubo foi centrifugado (centrífuga Universal 320) durante cinco minutos a rotação de 6000 rpm e após a centrifugação o sobrenadante de cor vermelho (fase orgânica de acetonitrila) de aproximadamente 1 mL foi transferido para frasco de 2 mL contendo PSA e  $\text{MgSO}_4$  (etapa de *cleanup*) e então agitado por aproximadamente 30 segundos, até a coloração vermelha clarear e não verificar mais a mudança na aparência da solução. Após a agitação, o frasco foi centrifugado a 6000 rpm (Prism mini C1801, Labnet International, Edison, NJ, EUA) durante um minuto. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e transferiu-se para frasco âmbar de 2 mL e levado para análise. Todas as vidrarias e os tubos de plásticos utilizados no preparo da amostra foram lavados previamente somente com água deionizada  $18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$  (Milli-Q, Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, EUA).

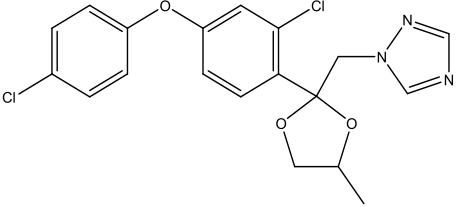
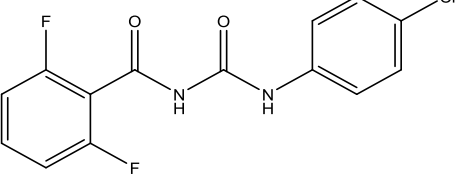
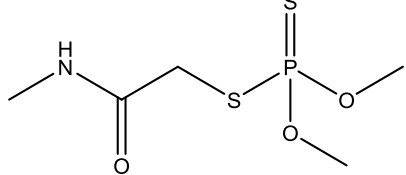
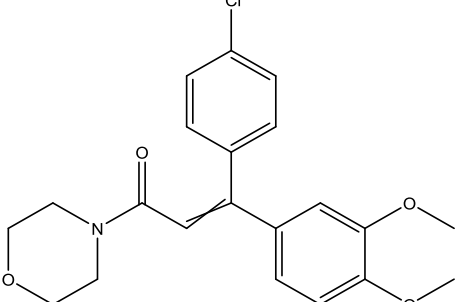
Tabela 2. Analitos considerados no presente estudo

Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Acefato		C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> PS	Organofosforado	I, A	183,20	NA	0,02 <sup>a</sup>
Acetamiprido		C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>	Neonicotinóide	I	222,68	NA	0,5
Azoxistrobina		C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	Estrobilurina	Fu	403,39	0,3	0,5
Bifenazato		C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Carbazato	A	300,36	NA	NA
Bifentrina		C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Piretróide	I, Fo, A	422,87	NA	0,02

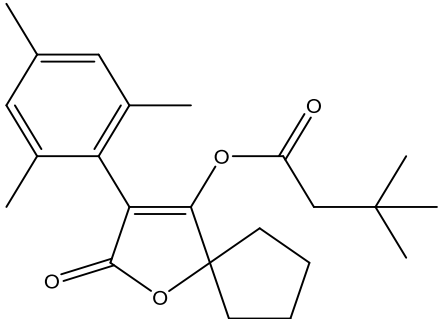
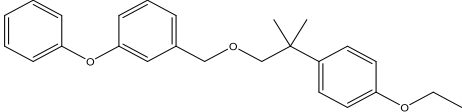
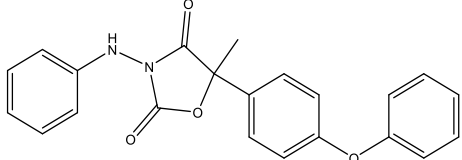
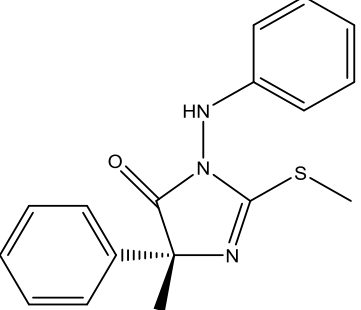
Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Boscalida		$C_{18}H_{12}Cl_2N_2O$	Anilida	Fu	343,21	5,0	0,05
Buprofezina		$C_{16}H_{23}N_3OS$	Tiadiazinona	I, A	305,44	NA	0,5
Carbendazim		$C_9H_9N_3O_2$	Benzimidazol	Fu	191,19	0,5 <sup>e</sup>	0,2

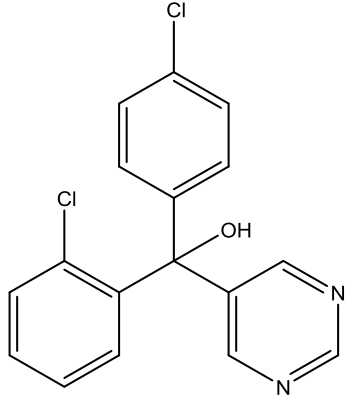
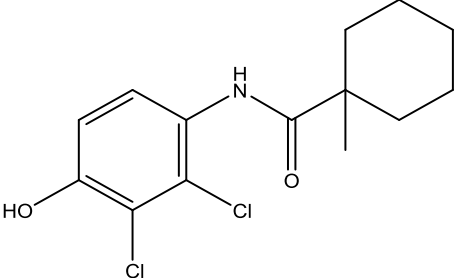
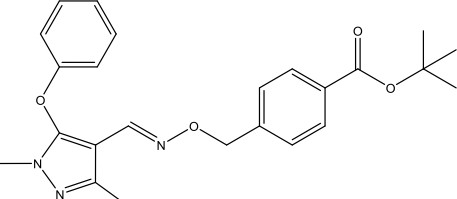
Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Clorantraniliprole		$C_{18}H_{14}Cl_2BrN_5O_2$	Antranilamida	I	483,15	NA	0,3
Carbofurano		$C_{12}H_{15}NO_3$	Metilcarbamato de benzofuranila	I, C, A, N	221,26	NA	NA
Carbosulfano		$C_{20}H_{32}N_2O_3S$	Metilcarbamato de benzofuranila	I, A, N	380,55	NA	NA

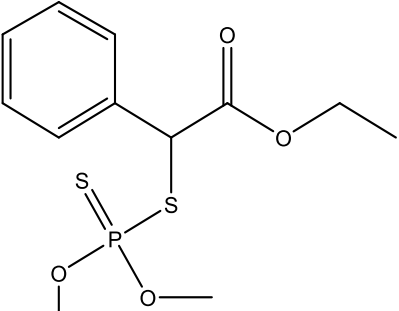
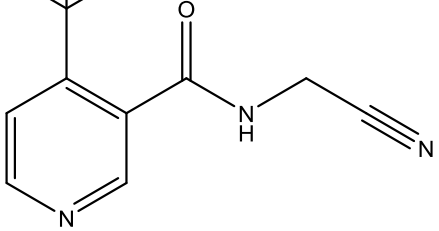
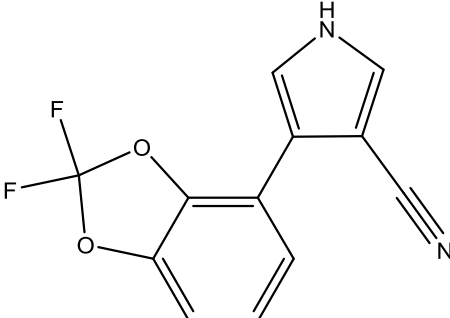
Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Ciproconazol		$C_{15}H_{18}ClN_3O$	Triazol	Fu	291,78	NA	NA
Ciprodinil		$C_{14}H_{15}N_3$	Anilino pirimidina	Fu	225,29	NA	0,5
Diazinona		$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	Organofosforado	I, A	304,35	NA	NA

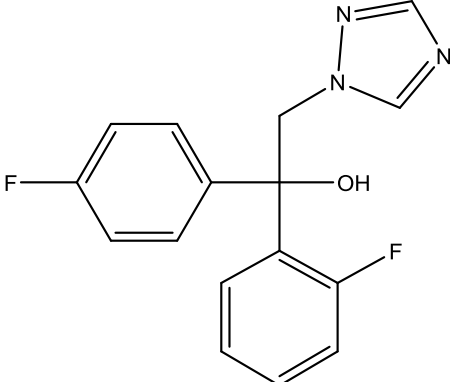
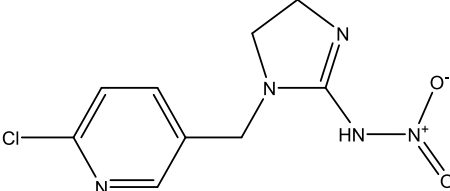
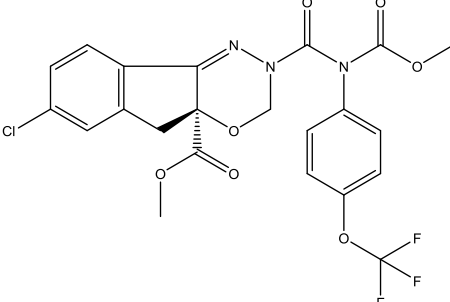
Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Difenoconazol		$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	Triazol	Fu	406,26	0,5	0,1
Diflubenzurom		$C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$	Benzoiluréia	I, A	310,69	NA	0,5
Dimetoato		$C_5H_{12}NO_3PS_2$	Organofosforado	I, A	229,26	NA	1,0
Dimetomorfe		$C_{21}H_{22}ClNO_4$	Morfolina	Fu	387,86	NA	0,5



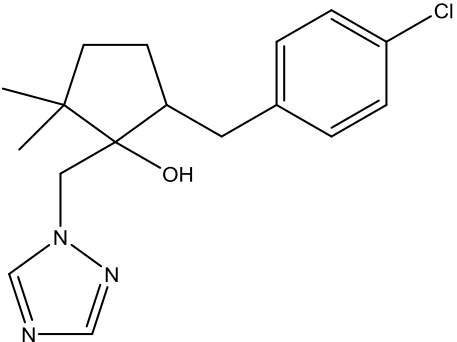
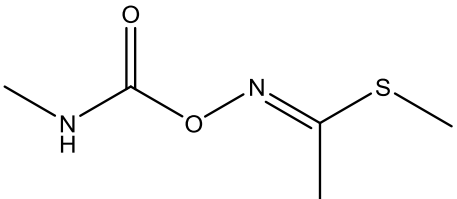
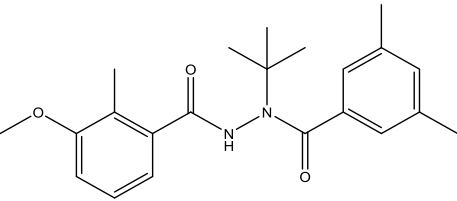
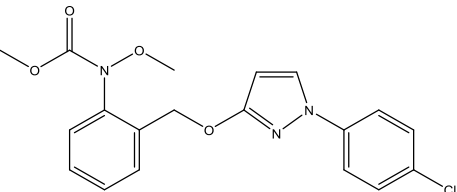
Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Espiromesifeno		$C_{23}H_{30}O_4$	Cetoenol	I, A	370,48	NA	0,3
Etofenproxi		$C_{25}H_{28}O_3$	Éter difenílico	I	376,50	NA	0,5
Famoxadona		$C_{22}H_{18}N_2O_4$	Oxazolidinadiona	Fu	374,39	NA	1,0
Fenamidona		$C_{17}H_{17}N_3OS$	Imidazolinona	Fu	311,40	NA	0,5

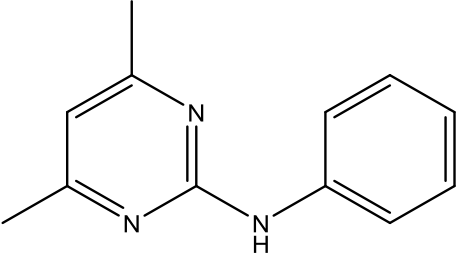
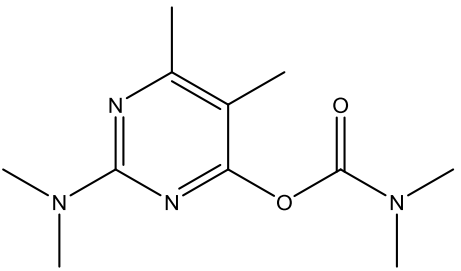
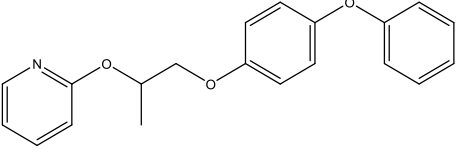
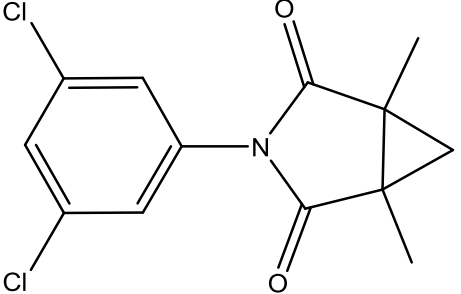
Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Fenarimol		$C_{17}H_{12}Cl_2N_2O$	Pirimidinil carbinol	Fu	331,20	NA	NA
Fenhexamida		$C_{14}H_{17}Cl_2NO_2$	Hidroxianilida	Fu	302,20	NA	NA
Fenpiroximato		$C_{24}H_{27}N_3O_4$	Pirazol	A	421,49	0,01	0,1

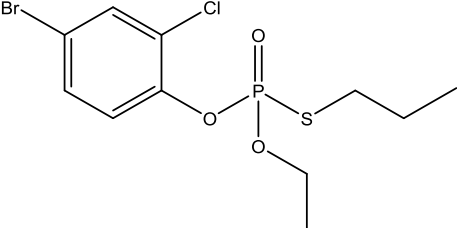
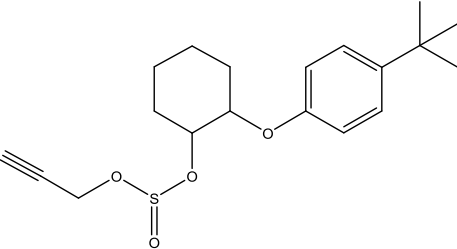
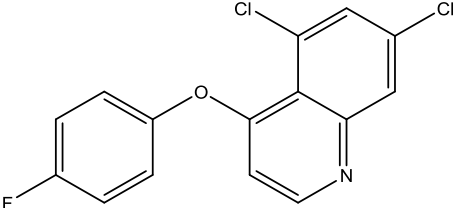
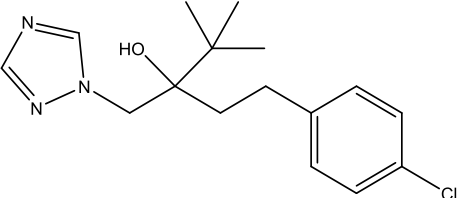
Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Fentoato		$C_{12}H_{17}O_4PS_2$	Organofosforado	I, A	320,36	NA	0,1
Flonicamida		$C_9H_6F_3N_3O$	Nicotinóide	I	229,16	NA	NA
Fludioxonil		$C_{12}H_6F_2N_2O_2$	Fenilpirrol	Fu	248,19	NA	NA

Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Flutriafol		$C_{16}H_{13}F_2N_3O$	Triazol	Fu	301,30	NA	0,1
Imidacloprido		$C_9H_{10}ClN_5O_2$	Neonicotinóide	I	255,66	NA	0,5
Indoxacarbe		$C_{22}H_{17}ClF_3N_3O_7$	Oxadiazina	I, C, Fo	527,84	NA	0,1

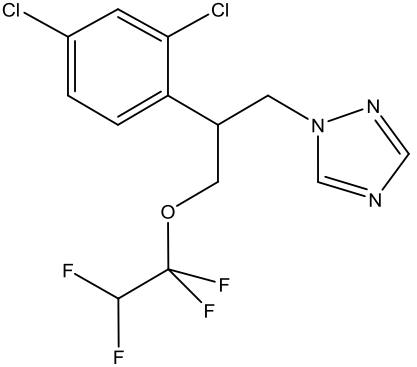
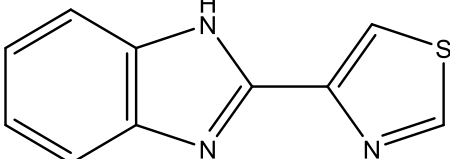
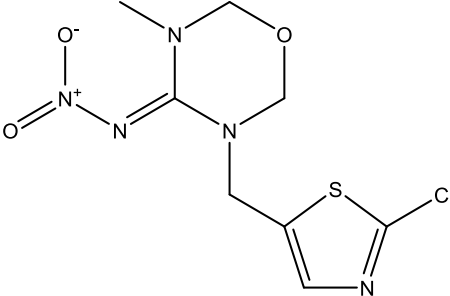
Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Lufenurom		$C_{17}H_8Cl_2F_8N_2O_3$	Benzoiluréia	I, A	511,15	NA	0,5
Malationa		$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	Organofosforado	I, A	330,36	1,0	3,0
Metalaxil		$C_{15}H_{21}NO_4$	Acilalaninato	Fu	279,33	NA	0,05
Metamidofós		$C_2H_8NO_2PS$	Organofosforado	I, A	141,13	NA	NA

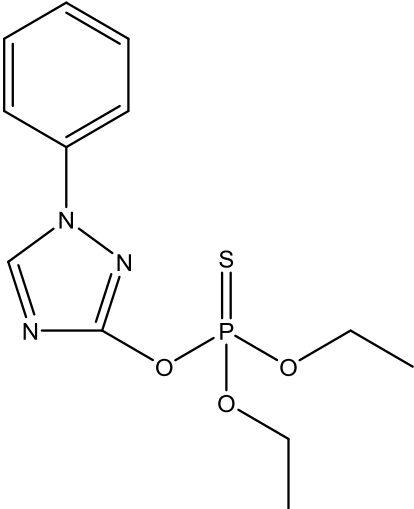
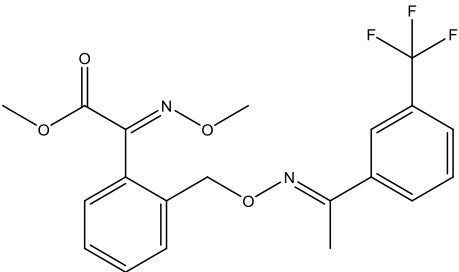
Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Metconazol		$C_{17}H_{22}ClN_3O$	Triazol	Fu	319,83	0,1	0,05
Metomil		$C_5H_{10}N_2O_2S$	Metilcarbamato de oxima	I, A	162,21	NA	1,0
Metoxifenoazida		$C_{22}H_{28}N_2O_3$	Diacilhidrazina	I	368,48	NA	0,1
Piraclostrobina		$C_{19}H_{18}ClN_3O_4$	Estrobilurina	Fu	387,82	NA	0,2

Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Pirimetanil		C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub>	Anilino pirimidina	Fu	199,25	2,0	1,0
Pirimicarbe		C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Dimetilcarbamato	I	238,29	NA	1,0
Piriproxifeno		C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	Éter piridiloxipropílico	I	321,38	NA	0,2
Procimidona		C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	Dicarboximida	Fu	238,14	3,0	2,0

Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Profenofos		$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	Organofosforado	I, A	373,63	NA	1,0
Propargito		$C_{19}H_{26}O_4S$	Sulfito de alquila	A	350,47	0,5	2,0
Quinoxifeno		$C_{15}H_8Cl_2FNO$	Fenoxiquinolina	Fu	308,14	NA	NA
Tebuconazol		$C_{16}H_{22}ClN_3O$	Triazol	Fu	307,82	0,7	0,3



Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Tetraconazol		$C_{13}H_{11}Cl_2F_4N_3O$	Triazol	Fu	372,15	NA	0,2
Tiabendazol		$C_{10}H_7N_3S$	Benzimidazol	Fu	201,25	NA	NA
Tiametoxam		$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	Neonicotinóide	I	291,71	0,1	1,0

Pesticida	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	Grupo Químico <sup>b,c</sup>	Classe <sup>b,c,d</sup>	Massa molar (g/mol)	LMR morango (ppm) <sup>b</sup>	LMR tomate (ppm) <sup>b</sup>
Triazofos		C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	Organofosforado	I, A, N	313,31	NA	0,5
Trifloxistrobina		C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Estrobilurina	Fu	408,38	0,3	0,5

NA – uso não autorizado para a cultura.

<sup>a</sup> Uso autorizado somente para tomate rasteiro, com fins industriais.

<sup>b</sup> De acordo com Anvisa [31].

<sup>c</sup> De acordo com EPA [32].

<sup>d</sup> Legenda: I – Inseticida A – Acaricida Fu – Fungicida Fo – Formicida C – Cupinicida N – Nematicida

<sup>e</sup> Valor do LMR é a soma dos compostos tiofanato-metílico + carbendazim. Tiofanato-metílico se decompõe tornando-se carbendazim. Para fins de monitoramento de resíduos, devem ser considerados os LMRs estabelecidos nas monografias de carbendazim e tiofanato-metílico, cujos resíduos são expressos como carbendazim.

## 2.4 Preparo das amostras de tomate

Embora o kit empregado para o preparo de amostras pelo método QuEChERS original preveja a utilização de 15 g de amostra, utilizamos amostras de apenas 3 g e redução proporcional dos reagentes necessários.

As amostras de no mínimo 200 g de tomate adquiridas no comércio local eram congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento de iniciar o procedimento. Toda a amostra era transferida ainda congelada ao liquidificador, previamente limpo, e batida para obter a amostra em forma de pasta. Da mesma forma que para as amostras de morango, nenhuma parte do produto era descartado antes do procedimento.

Uma alíquota de 3,00 g da amostra era pesada em tubo de polipropileno de 15 mL, sendo o restante armazenado no congelador novamente. No tubo contendo a amostra, adicionou-se 2,7 mL de acetonitrila e 0,3 mL de ácido acético PA e agitou-se durante 20 segundos usando vortex. Em seguida, foi adicionado 1,50 g de sal de extração ( $\text{MgSO}_4$  + Acetato de sódio) e agitou-se durante 30 segundos usando vortex. Após a agitação, o tubo foi centrifugado (centrífuga Universal 320) durante cinco minutos a 6000 rpm e após a centrifugação, o sobrenadante de cor amarelo (fase orgânica de acetonitrila) de aproximadamente 1 mL foi transferido para frasco de 2 mL contendo PSA e  $\text{MgSO}_4$  (etapa de *cleanup*) e então agitado por aproximadamente 30 segundos, até a coloração amarela clarear e não verificar mais a mudança na aparência da solução. Após a agitação, o frasco foi centrifugado a 6000 rpm (Prism C1801) durante um minuto. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e transferiu-se para frasco âmbar de 2 mL e levado para análise. Todas as vidrarias e os tubos de plásticos utilizados no preparo da amostra foram lavados somente com água deionizada  $18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  (Milli-Q, Millipore Corporation, Burlington, Massachusetts, EUA).

## Instrumentação

O instrumento de análise utilizado foi Agilent 1290 Infinity II LC System acoplado com Agilent 6470 Triple Quadrupole MS (Figura 5). A coluna cromatográfica utilizada foi Zorbax Eclipse Plus C18 2,1 x 150 mm,  $1,8\mu\text{m}$  (Agilent, 959759-902) para ambas as análises. As fases móveis usadas na análise do morango foram água e acetonitrila; na análise do tomate foram água com 0,1% (v/v) ácido fórmico e acetonitrila.



**Figura 5.** Agilent 1290 Infinity II LC System (esquerda) e Agilent 6470 Triple Quadrupole MS (direita).

## 2.6 Validação do Método Analítico

O método foi validado segundo as normas da INMETRO (DOQ-CGCRE-008, Revisão 07, Julho 2018) [33]. A validação nesta pesquisa foi avaliada pela determinação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito matriz, limite de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade) e exatidão (recuperação), sendo, no contexto deste trabalho, entendidos como descritos nos tópicos a seguir.

### 2.6.1 Seletividade

Seletividade é a capacidade de o instrumento quantificar o analito de interesse na presença de outras substâncias que podem interferir na análise, como matriz ou outros analitos. Para verificar a seletividade no método, foram feitas as detecções dos pesticidas de interesse em duas situações em conjunto: na presença de outros analitos e na presença de matriz.

### 2.6.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico é a capacidade de se obter resultados (ou respostas) que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro da faixa estabelecida. A linearidade é expressa na forma de uma equação de uma reta que relaciona as duas variáveis.

### 2.6.3 Sensibilidade

Sensibilidade é a variação da resposta de um instrumento de medição (nesse caso, UHPLC-MS/MS) a uma mudança na medida. Para esse método, a sensibilidade é o valor do coeficiente angular da curva analítica. Quanto maior a sensibilidade, maior a variação da resposta à mudança da medida, melhorando a qualidade do resultado e diminuindo o erro da medida.

#### 2.6.4 Limite de Detecção e Quantificação

Limite de detecção (LOD) de um método analítico é a mais baixa quantidade de um analito que é possível ser detectado na presença de interferentes (com certo nível de confiança), mas não necessariamente ser quantificada sob as condições estabelecidas nesse método.

Limite de quantificação (LOQ) de um método analítico é a mais baixa quantidade de um analito que é possível ser quantificado na presença de interferentes, considerando certo nível de confiança.

Existem diversos modos de calcular tanto o LOD quanto o LOQ, porém uma das abordagens do INMETRO é estimar ambos os valores a partir da curva analítica, utilizando as equações:

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{\sigma}{a} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{\sigma}{a} \quad (2)$$

onde  $\sigma$  é desvio-padrão do menor nível da curva analítica do pesticida de interesse e  $a$  é o coeficiente angular da curva analítica do pesticida de interesse.

#### 2.6.5 Efeito da Matriz

O estudo do efeito da matriz faz parte da avaliação da seletividade e depende da disponibilidade dos analitos e da matriz sem analito. Como foi possível a obtenção de matriz sem a presença de analitos de interesse tanto para morango quanto para tomate, o procedimento tomado foi de preparar dois grupos de amostras, sendo um deles com a presença de matriz e outra sem, em igual concentração dos analitos, fazendo o teste em toda faixa de estudo para cada analito.

#### 2.6.6 Exatidão (Recuperação)

A recuperação é feita para verificar a proximidade dos resultados obtidos em estudo em relação ao valor verdadeiro. Para avaliar a recuperação, foi feita um reforço (*spike*) com concentrações conhecidas de padrão em dois grupos, sendo um deles adicionado junto com acetonitrila no início do tratamento da amostra ( $C_1$ ) e a outra diretamente no extrato no final do tratamento da amostra ( $C_2$ ). O cálculo da recuperação (R) para cada analito de interesse foi feita usando a equação 3, em porcentagem:

$$R = \frac{C_1}{C_2} \times 100\% \quad (3)$$

O valor aceitável de R depende da concentração na qual está trabalhando, pois existe uma faixa de aceitação para cada nível de concentração.

### 2.6.7 Precisão

A precisão expressa quão dispersas estão as séries de medidas obtidas de múltiplas amostragens de uma mesma amostra sob condições predeterminadas. Normalmente, ela é expressa por meio de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Para avaliar a repetibilidade do método, foram preparadas oito amostras com *spike* de concentração conhecida de padrão durante três dias consecutivos, preparando as amostras sempre no mesmo horário.

A repetibilidade foi calculada pelo coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio-padrão relativo (DPR):

$$CV = DPR = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100\% \quad (4)$$

Onde:

$\sigma$ : desvio-padrão das medidas.

$\bar{X}$ : média das concentrações medidas.

O valor de CV calculado pela equação 4 foi comparado entre os três dias e foi também calculado a média e CV dos valores dos três dias em conjunto, para verificar a aceitação da repetibilidade.

Neste experimento foi calculado somente a repetibilidade, uma vez que a precisão intermediária requer diferentes analistas e/ou equipamentos e na reprodutibilidade é necessário outro laboratório para comparação interlaboratorial de resultados.

### 3. Resultados e Discussão

Em se tratando de um trabalho sobre o desenvolvimento de método analítico, ocorre naturalmente, em uma ou mais etapas, o aprimoramento por tentativa e erro, até que uma condição apropriada seja obtida. Assim, o que será apresentado não corresponde à totalidade dos experimentos realizados, bem como a cronologia dos estudos não é respeitada.

#### 3.1 Otimização do sistema de UHPLC-MS/MS

Uma inspeção cuidadosa da Tabela 2 mostra que os pesticidas estudados, embora pertençam a classes distintas, possuem algumas características em comum. São compostos orgânicos com massa molar na faixa de 140 a 500 g/mol, com vários heteroátomos e presença frequente de anéis aromáticos, o que cria regiões polares sem, no entanto, produzir regiões iônicas ou ionizáveis nas moléculas. Assim, a escolha de cromatografia líquida é bastante natural, se considerarmos outras opções como cromatografia gasosa e eletroforese capilar. No caso da cromatografia gasosa, poderia ocorrer a decomposição de um ou mais analitos ao se utilizar temperaturas elevadas na tentativa de promover a volatilização das espécies. Já com eletroforese capilar, seria necessária a formação de íons, o que não ocorreria de forma natural para a grande maioria das espécies. Uma alternativa seria o uso de cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), o que, no entanto, iria dificultar o acoplamento com espectrometria de massas.

Sendo os analitos compostos orgânicos não iônicos, a escolha de uma fase estacionária apolar torna-se natural. Inicialmente, foi escolhida uma coluna Agilent ZORBAX Eclipse Plus de 15 cm de comprimento, com diâmetro interno de 2,1mm e fase estacionária octadecilsilano (C18) sobre partículas de 1,8 $\mu$ m.

As tentativas iniciais de separação foram realizadas em modo isocrático com fase móvel água/acetonitrila 1:1 (v/v). Embora tenha sido obtida boa resolução para os picos dos analitos, o tempo total de análise estava muito longo devido à grande retenção dos analitos menos polares. Assim, passamos para o modo de eluição por gradiente, iniciando com a fase móvel descrita anteriormente e aumentando a proporção de acetonitrila, como mostra a Tabela 3, mantendo vazão constante de 0,350 mL/min e volume de amostra injetado de 2  $\mu$ L. Antes de terminar a análise, a fase móvel original era restituída e utilizada por um período de tempo adicional para garantir a remoção de impurezas da próxima análise.

**Tabela 3.** Programação da composição da fase móvel

Tempo final da etapa (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0,00	50	50
0,50	50	50
4,00	5	95
6,00	5	95
6,01	50	50
7,00 (morango) ou 7,50 (tomate)	50	50

A detecção por espectrometria de massas é alcançada ao promover a ionização por electrospray. Esta técnica de ionização permite a transferência para a fase gasosa de íons pré-existentes em solução ou a produção de íons durante a fase de dessolvatação das gotículas geradas sob ação de um intenso campo elétrico. O mecanismo de funcionamento desta estratégia de ionização tem sido detalhado em diversos artigos [34-39].

No caso do instrumento utilizado no presente trabalho, a fonte de íons é a *Jet Stream*, que consiste basicamente em uma fonte convencional de *electrospray* modificada para utilizar um jato superaquecido de nitrogênio. Este jato, com velocidade próxima à do som e com temperatura chegando a centenas de graus Celsius, aumenta a produção de íons durante o processo de dessolvatação das gotículas, o que acarreta em aumento de sensibilidade. Os íons produzidos podem ser positivos ou negativos, dependendo de como o campo elétrico da fonte é programado. Neste estudo, foi utilizado o modo positivo, e a formação das espécies catiônicas ocorre basicamente pela protonação do analito por íons  $H^+$  disponíveis na solução.

A vantagem da utilização de um espectrômetro de massas MS/MS é que, ao invés de monitorar apenas o íon molecular ou um fragmento específico, é possível monitorar um ou mais processos de fragmentação, o que aumenta substancialmente a seletividade do método.

Os processos de fragmentação dos diferentes pesticidas analisados têm sido estudados. De forma que podemos recorrer a informações prévias para a escolha dos processos mais adequados do ponto de vista de quantificação – ou seja, aqueles que produzem íons em maior abundância – e que, na medida do possível, sejam mais exclusivos de cada analito.

A acidificação da fase móvel facilita a formação dos íons  $[M\cdot H]^+$ . Para verificar qual seria o mais adequado entre os ácidos fórmico e acético, foram comparadas as áreas dos picos usando fase móvel aquosa com 0,1% (v/v) de ácido, mantendo todos outros parâmetros iguais. Esse teste foi feito usando-se o extrato de tomate livre de todos os pesticidas da Tabela 2. Esses tomates livres de todos os pesticidas foram cultivados em casa para melhor controle de possíveis exposições a pesticidas. Para comparar o efeito do aumento ou diminuição da área, foram obtidas as razões entre as áreas que são apresentadas a Tabela 4.



**Tabela 4.** Áreas dos picos usando ácidos acético e fórmico na fase aquosa

<b>Composto</b>	<b>Ácido acético 0,1% v/v</b>	<b>Ácido fórmico 0,1% v/v</b>	<b>Razão entre áreas (%)</b>
Acefato	37756 ± 1496	47862 ± 1230	79 ± 4
Acetamiprido	157205 ± 5357	117999 ± 2066	133 ± 5
Azoxistrobina	1688134 ± 67162	2345222 ± 63437	72 ± 3
Bifenazato	371405 ± 28607	852165 ± 31089	44 ± 4
Boscalida	32456 ± 2106	98354 ± 1624	33 ± 2
Buprofezina	803918 ± 33625	4029617 ± 20604	20 ± 1
Carbendazim	53553 ± 2545	90974 ± 1368	59 ± 3
Carbofurano	828727 ± 50206	1189104 ± 24326	70 ± 4
Carbosulfano	62555 ± 2198	212230 ± 7749	29 ± 1
Ciproconazol	139922 ± 5185	478268 ± 4089	29 ± 1
Ciprodinil	1238 ± 78	649996 ± 14286	0,19 ± 0,02
Clorantranilprole	127117 ± 1909	196774 ± 1907	65 ± 1
Clorpirifos	33 ± 4	761 ± 22	4,3 ± 0,7
Diazinona	504497 ± 40530	2877910 ± 80776	18 ± 1
Difenoconazol	154689 ± 15992	560215 ± 6064	28 ± 3
Diflubenzuron	2231 ± 86	14916 ± 203	15 ± 1
Dimetoato	138147 ± 5292	118277 ± 1619	117 ± 5
Dimetomorfo	461662 ± 18929	566094 ± 11052	82 ± 4
Espiromesifeno	2418 ± 102	3142 ± 75	77 ± 4
Etofenproxi	340342 ± 2170	232590 ± 2072	146 ± 2
Famoxadona	104910 ± 1287	121334 ± 1283	86 ± 1
Fenamidona	277415 ± 19720	788565 ± 11629	35 ± 3
Fenarimol	15097 ± 572	38586 ± 425	39 ± 2
Fenhexamida	24706 ± 1355	74977 ± 1453	33 ± 2
Fenpiroximato	54390 ± 5419	277771 ± 6332	20 ± 2
Fentoato	1493630 ± 66951	2141160 ± 35493	70 ± 3
Flonicamida	39712 ± 871	31721 ± 362	125 ± 3
Flutriafol	243959 ± 8539	607928 ± 4754	40 ± 1
Hexitiazoxi	103 ± 7	3834 ± 138	2,7 ± 0,3
Imidacloprido	54537 ± 1387	44222 ± 466	123 ± 3
Indoxacarbe	22363 ± 2945	39536 ± 1400	57 ± 8
Lufenuron	110 ± 11	1878 ± 75	5,9 ± 0,8
Malationa	131497 ± 13517	270760 ± 7630	49 ± 5
Metalxil	2446906 ± 46650	2359901 ± 15065	104 ± 2
Metconazol	113643 ± 5521	461285 ± 4093	25 ± 1
Metamidofós	50132 ± 1869	70199 ± 1633	71 ± 3
Metomil	269148 ± 7685	557916 ± 12586	48 ± 2
Metoxifenoazida	338318 ± 10086	685597 ± 17986	49 ± 2
Pirimicarbe	1700 ± 88	3397618 ± 52418	0,050 ± 0,003
Procimidona	1652710 ± 87365	2016503 ± 33598	82 ± 5
Profenofós	9169 ± 749	30580 ± 516	30 ± 3
Piraclostrobina	244385 ± 8983	735914 ± 17688	33 ± 1
Pirimetanil	184293 ± 8095	795189 ± 10455	23 ± 1
Piriproxifeno	107100 ± 10190	1001674 ± 28200	11 ± 1
Quinoxifeno	16884 ± 1374	280662 ± 4684	6,0 ± 0,6
Tebuconazol	158289 ± 10218	600543 ± 6014	26 ± 2
Tetraconazol	46261 ± 2000	190734 ± 1552	24 ± 1
Tiabendazol	173983 ± 2253	181368 ± 2455	96 ± 2
Tiametoxam	56720 ± 1068	54377 ± 934	104 ± 3
Triazofos	827265 ± 51712	2071350 ± 64304	40 ± 3
Trifloxistrobina	69119 ± 4186	286629 ± 7340	24 ± 2

Como se pode observar, para a maioria dos analitos, houve diminuição do sinal quando se usou ácido acético, sendo que, em alguns casos, houve uma queda drástica. Os casos extremos foram ciprodinil e pirimicarbe que tiveram os sinais reduzidos a menos de 1% quando ácido fórmico é substituído por ácido acético. Estes dois compostos apresentam em comum um agrupamento amino-pirimidina na estrutura, o qual parece ser particularmente melhor protonado na solução de ácido fórmico, que na de ácido acético. Assim, optou-se por ácido fórmico para auxiliar na protonação dos analitos.

A escolha do ácido consiste apenas em uma das várias etapas de otimização. No início foi necessário acertar alguns valores dos parâmetros referentes ao acoplamento HPLC-MS, pois como a análise dos pesticidas é multirresidual, os valores escolhidos para os parâmetros podem afetar a sensibilidade dos outros pesticidas. Para isso, os parâmetros do instrumento foram ajustados para um valor intermediário a fim de não prejudicar a detecção de nenhum dos pesticidas selecionados.

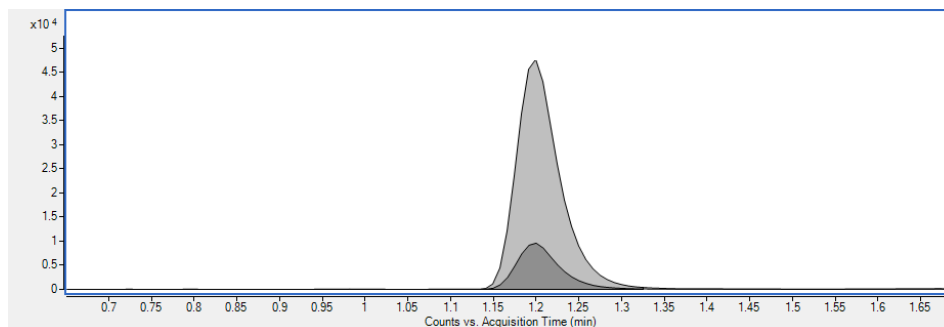
Como a alteração de alguns parâmetros afetam outros, o processo pode se tornar muito laborioso. Felizmente, há um recurso de software do instrumento que permite a otimização de forma semiautomática. Para avaliar os parâmetros, o programa faz uma razão entre os valores das áreas dos picos cromatográficos, sendo no numerador o do parâmetro que teve o valor modificado e no denominador a referência, sendo o resultado mostrado em porcentagem. O programa usa o valor do parâmetro definido pelo usuário como referência. Esse processo é feito para todos os pesticidas. Depois de terminado, o programa gera uma tabela com todos os valores obtidos pelo método citado. A partir desses valores, foi feita as escolhas dos valores dos parâmetros que foram considerados adequados para a análise multirresidual dos pesticidas. A Tabela 5 apresenta os parâmetros utilizados.

**Tabela 5.** Parâmetros utilizados após otimização semiautomática

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Temperatura do N <sub>2</sub>	300 °C
Vazão de gás	10 L/min
Pressão do nebulizador	20 psi
Temperatura do <i>Sheath gas</i>	300 °C
Vazão do <i>Sheath gas</i>	10 L/min
Potencial no capilar	4000 V

Ao final do processo de otimização do sistema UHPLC-MS, foram utilizadas as condições cromatográficas e de ionização apresentadas e o modo de monitoramento conhecido como *Dynamic Multiple Reaction Monitoring* (dMRM). Esta estratégia consiste e alterar alguns parâmetros do espectrômetro de massas durante a corrida cromatográfica de modo a otimizar a detecção. A Tabela 6 e Tabela 7 apresentam as transições monitoradas por MS/MS e o conjunto de parâmetros adotados. Foram sempre monitoradas duas fragmentações por analito: uma para

fins de quantificação e outra para fins de confirmação da identidade do analito. Tanto qualificador quanto quantificador devem possuir o mesmo tempo de retenção para garantir que o aquele pico se refere ao analito de interesse. Como resultado, tem-se dois cromatogramas por conjunto qualificador/quantificador, como mostrado na Figura 6.



**Figura 6.** Cromatogramas obtidos para as transições 192,1  $\rightarrow$  160,1 u (pico mais intenso) e 192,1  $\rightarrow$  132,1 u (pico menos intenso). A presença destas duas transições, na mesma proporção e com o mesmo tempo de retenção, confirma a presença de carbendazim.

**Tabela 6.** Parâmetros dMRM utilizados para a análise de morango

Pesticida	Íon precursor	Íon produzido	Fragmentor (V)	Collision Energy (V)	Cell Accelerator (V)	Tempo de retenção (min)	Janela de retenção (min)	Tipo de fragmento
Acefato	184	95	70	28	3	0,95	0,88	Qualificador
	184	49,1	70	24	3	0,95	0,88	Quantificador
Acetamiprido	223,1	126	80	19	3	1,27	0,82	Quantificador
	223,1	56,1	80	16	3	1,27	0,82	Qualificador
Azoxistrobina	404,1	372,1	110	12	3	3,27	0,86	Quantificador
	404,1	344,1	110	24	3	3,27	0,86	Qualificador
Bifenazato	301,1	198,2	95	8	3	3,55	0,85	Quantificador
	301,1	170,1	95	20	3	3,55	0,85	Qualificador
Boscalida	343	307,1	145	24	3	3,44	0,83	Quantificador
	343	272,1	145	36	3	3,44	0,83	Qualificador
Buprofezina	306,2	201,1	105	8	3	5,30	1,00	Quantificador
	306,2	116,1	105	14	3	5,30	1,00	Qualificador
Carbendazim	192,1	160,1	105	20	3	0,90	1,28	Quantificador
	192,1	132,1	105	36	3	0,90	1,28	Qualificador
Clorantraniliprole	483,9	452,9	105	16	3	2,80	0,85	Qualificador
	483,9	285,9	105	12	3	2,80	0,85	Quantificador
Ciprodinil	226,1	91,1	140	44	3	2,80	0,83	Qualificador
	226,1	76,9	140	58	3	2,80	0,83	Quantificador
Diazinona	305,1	169,1	105	24	3	4,48	0,90	Quantificador
	305,1	97	105	40	3	4,48	0,90	Qualificador
Difenoconazol	406,1	337	120	14	3	4,14	0,88	Qualificador
	406,1	251	120	28	3	4,14	0,88	Quantificador
Dimetomorfe	388,1	301,1	145	20	3	2,86	0,81	Quantificador
	388,1	165,1	145	36	3	2,86	0,81	Qualificador
Fenexamida	302,1	97,1	130	24	3	3,44	0,85	Quantificador
	302,1	55,1	130	44	3	3,44	0,85	Qualificador
Fempiroximato	422,2	366,2	135	12	3	5,37	1,08	Quantificador
	422,2	138,1	135	40	3	5,37	1,08	Qualificador
Flonicamida	230,1	199	110	8	3	1,29	0,97	Quantificador
	230,1	125	110	24	3	1,29	0,97	Qualificador
Fludioxonil	247	169	95	24	3	3,04	0,85	Quantificador
	247	126	95	40	3	3,04	0,85	Qualificador
Flutirafol	302,1	123	90	28	3	2,03	0,88	Quantificador
	302,1	70,1	90	20	3	2,03	0,88	Quantificador
Imidacloprido	256	208,9	80	16	3	1,26	0,84	Quantificador
	256	175	80	28	3	1,26	0,84	Qualificador
Malationa	331	126,9	80	12	3	3,70	0,74	Quantificador
	331	99	80	18	3	3,70	0,74	Qualificador
Metalaxil	280,2	220,1	95	14	3	2,41	0,90	Quantificador
	280,2	45,1	95	36	3	2,41	0,90	Qualificador
Metamidofós	142	125	85	14	3	0,94	0,85	Quantificador
	142	94	85	14	3	0,94	0,85	Qualificador
Metomil	163,1	106	50	8	3	1,14	0,96	Quantificador
	163,1	88	50	8	3	1,14	0,96	Quantificador
Piraclostrobina	388,1	193,8	95	8	3	4,37	0,88	Quantificador
	388,1	163,1	95	24	3	4,37	0,88	Qualificador
Pirimetanil	200,1	106,9	120	28	3	3,10	0,90	Quantificador
	200,1	82	120	29	3	3,10	0,90	Quantificador
Quinoxifeno	308	196,9	115	36	3	4,90	0,98	Quantificador
	308	161,9	115	53	3	4,90	0,98	Qualificador
Tebuconazol	308,1	124,9	100	43	3	3,52	0,83	Quantificador
	308,1	70	100	32	3	3,52	0,83	Quantificador
Tiametoxam	292	211,1	85	8	3	1,11	0,70	Quantificador
	292	181,1	85	24	3	1,11	0,70	Qualificador
Trifloxistrobina	409,1	186	110	16	3	4,65	0,93	Quantificador
	409,1	145	110	56	3	4,65	0,93	Qualificador

**Tabela 7.** Parâmetros dMRM utilizados para a análise de tomate

Pesticida	Íon precursor	Íon produzido	Fragmentor (V)	Collision Energy (V)	Cell Accelerator (V)	Tempo de retenção (min)	Janela de retenção (min)	Tipo de fragmento
Acefato	184	95	70	28	3	0,97	0,9	Qualificador
	184	49,1	70	24	3	0,97	0,9	Quantificador
Acetamiprido	223,1	126	80	19	3	1,3	0,87	Quantificador
	223,1	56,1	80	16	3	1,3	0,87	Qualificador
Azoxistrobina	404,1	372,1	110	12	3	3,27	0,98	Quantificador
	404,1	344,1	110	24	3	3,27	0,98	Qualificador
Bifenazato	301,1	198,2	95	8	3	3,55	1,07	Quantificador
	301,1	170,1	95	20	3	3,55	1,07	Qualificador
Boscalida	343	307,1	145	24	3	3,45	1,04	Quantificador
	343	272,1	145	36	3	3,45	1,04	Qualificador
Buprofezina	306,2	201,1	105	8	3	4,86	1,46	Quantificador
	306,2	116,1	105	14	3	4,86	1,46	Qualificador
Carbendazim	192,1	160,1	105	20	3	0,92	0,94	Quantificador
	192,1	132,1	105	36	3	0,92	0,94	Qualificador
Carbofurano	222,1	123,1	80	30	2	2,13	0,87	Quantificador
	222,1	77,1	79	49	2	2,13	0,87	Qualificador
Carbossulfano	381,2	160,2	105	12	2	6,45	1,94	Quantificador
	381,2	118,1	105	36	2	6,45	1,94	Qualificador
Chlorantraniliprole	483,9	452,9	105	16	3	2,81	0,84	Quantificador
	483,9	285,9	105	12	3	2,81	0,84	Qualificador
Clorpirifós	349,9	198	100	12	3	5,2	1,56	Quantificador
	349,9	197,8	100	20	3	5,2	1,56	Qualificador
Ciproconazol	292,1	125	100	32	2	3,06	0,92	Qualificador
	292,1	70	100	16	2	3,06	0,92	Quantificador
Ciprodinil	226,1	91,1	140	44	3	3,37	1,01	Quantificador
	226,1	76,9	140	58	3	3,37	1,01	Quantificador
Diazinona	305,1	169,1	105	24	3	4,48	1,35	Quantificador
	305,1	97	105	40	3	4,48	1,35	Qualificador
Difenconazol	406,1	337	120	14	3	4,13	1,24	Qualificador
	406,1	251	120	28	3	4,13	1,24	Quantificador
Diflubenzuron	311	158	80	8	2	3,58	1,07	Quantificador
	311	141	80	32	2	3,58	1,07	Qualificador
Dimetoato	230	198,8	70	0	5	1,31	0,8	Qualificador
	230	125	70	16	5	1,31	0,8	Quantificador
Dimetomorfe	388,1	301,1	145	20	3	2,87	0,86	Quantificador
	388,1	165,1	145	36	3	2,87	0,86	Qualificador
Espiromesifeno	371,2	208	73	21	4	4,19	1,26	Qualificador
	371,2	148	73	33	4	4,19	1,26	Quantificador
Etofenprox	377,2	88,1	170	37	4	1,79	0,85	Qualificador
	377,2	64,1	170	17	4	1,79	0,85	Quantificador
Famoxadona	375,1	217,1	71	41	4	3,06	0,92	Qualificador
	375,1	91,1	71	97	4	3,06	0,92	Quantificador
Fenamidona	312	92,2	100	28	2	3,36	1,01	Quantificador
	312	65,1	100	56	2	3,36	1,01	Qualificador
Fenarimol	331	268	130	20	2	3,22	0,97	Quantificador
	331	81	130	28	2	3,22	0,97	Qualificador
Fenhexamida	302,1	97,1	130	24	3	3,45	1,04	Quantificador
	302,1	55,1	130	44	3	3,45	1,04	Qualificador
Fenpiroximato	422,21	366,2	135	12	3	5,36	1,61	Quantificador
	422,21	138,1	135	40	3	5,36	1,61	Qualificador
Fentoato	321	119,1	81	17	4	3,23	0,97	Quantificador
	321	91,1	81	65	4	3,23	0,97	Qualificador
Flonicamida	230,1	199	110	8	3	1,31	0,8	Qualificador
	230,1	125	110	24	3	1,31	0,8	Quantificador
Flutriafol	302,1	123	90	28	3	2,06	0,85	Qualificador
	302,1	70,1	90	20	3	2,06	0,85	Quantificador

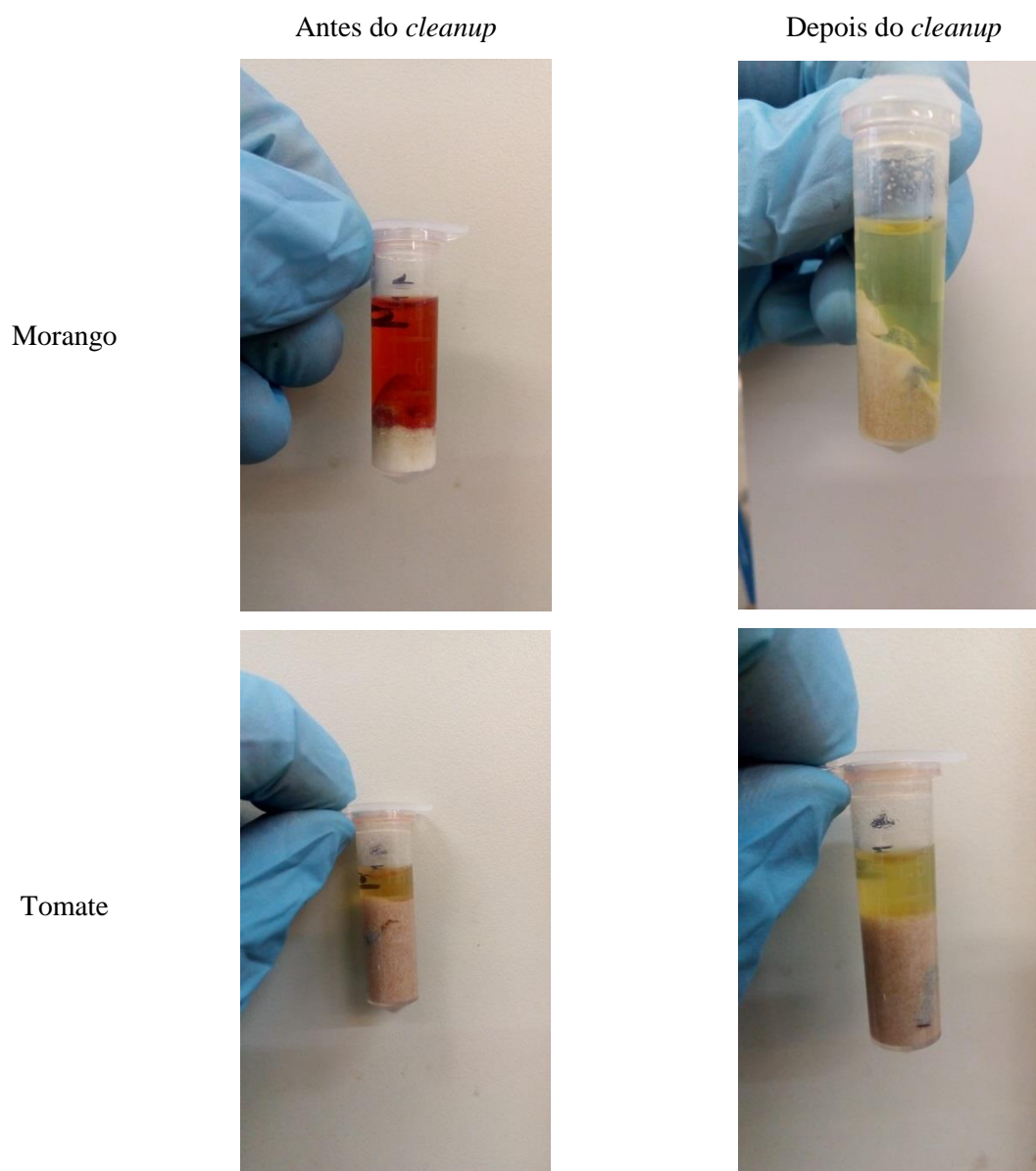
Pesticida	Íon precursor	Íon produzido	Fragmentor (V)	Collision Energy (V)	Cell Accelerator (V)	Tempo de retenção (min)	Janela de retenção (min)	Tipo de fragmento
Hexitiazoxi	353,1	227,9	90	12	3	5,29	1,59	Quantificador
	353,1	168,1	90	28	3	5,29	1,59	Qualificador
Imidacloprido	256	208,9	80	16	3	1,28	0,82	Quantificador
	256	175	80	28	3	1,28	0,82	Qualificador
Indoxacarbe	528,1	203	110	45	3	4,54	1,36	Quantificador
	528,1	150	110	20	3	4,54	1,36	Qualificador
Lufenuron	510,9	158	138	20	2	4,79	1,44	Quantificador
	510,9	141	138	45	2	4,79	1,44	Qualificador
Malationa	331	126,9	80	12	3	3,69	1,11	Quantificador
	331	99	80	18	3	3,69	1,11	Qualificador
Metalaxil	280,2	220,1	95	14	3	2,41	0,87	Quantificador
	280,2	45,1	95	36	3	2,41	0,87	Qualificador
Metconazol	320,1	125	130	48	2	3,77	1,13	Quantificador
	320,1	70,1	130	24	2	3,77	1,13	Quantificador
Metamidofós	142	125	85	14	3	0,96	0,82	Quantificador
	142	94	85	14	3	0,96	0,82	Qualificador
Metomil	163,1	106	50	8	3	1,17	0,9	Quantificador
	163,1	88	50	8	3	1,17	0,9	Quantificador
Metoxifenozida	369,2	313,1	85	0	5	3,58	1,08	Qualificador
	369,2	149	85	10	5	3,58	1,08	Quantificador
Pirimicarbe	239,15	182,1	100	12	2	1,37	0,86	Qualificador
	239,15	72,1	100	20	2	1,37	0,86	Quantificador
Procimidona	284	227,9	66	9	4	2,3	0,92	Qualificador
	284	104	66	29	4	2,3	0,92	Quantificador
Profenofós	374,9	347	120	5	2	4,78	1,44	Qualificador
	374,9	304,9	120	15	2	4,78	1,44	Quantificador
Piraclostrobina	388,11	193,8	95	8	3	4,36	1,31	Quantificador
	388,11	163,1	95	24	3	4,36	1,31	Qualificador
Pirimetanil	200,1	106,9	120	28	3	2,64	0,89	Quantificador
	200,1	82	120	29	3	2,64	0,89	Qualificador
Piriproxifeno	322,2	185	110	20	2	5,11	1,53	Quantificador
	322,2	96	110	12	2	5,11	1,53	Quantificador
Quinoxifeno	308	196,9	115	36	3	4,95	1,49	Quantificador
	308	161,9	115	53	3	4,95	1,49	Qualificador
Tebuconazol	308,1	124,9	100	43	3	3,53	1,06	Quantificador
	308,1	70	100	32	3	3,53	1,06	Quantificador
Tetraconazol	372	159	130	36	2	3,35	1,01	Quantificador
	372	70	130	20	2	3,35	1,01	Qualificador
Tiabendazol	202	175	130	24	2	0,96	1,15	Quantificador
	202	131	130	36	2	0,96	1,15	Qualificador
Tiametoxam	292,03	211,1	85	8	3	1,13	0,69	Quantificador
	292,03	181,1	85	24	3	1,13	0,69	Qualificador
Triazofos	314,1	162,1	110	16	2	3,72	1,12	Quantificador
	314,1	119,1	110	36	2	3,72	1,12	Qualificador
Trifloxistrobina	409,1	186	110	16	3	4,63	1,39	Quantificador
	409,1	145	110	56	3	4,63	1,39	Qualificador

### 3.2 Preparo de amostra

O método QuEChERS utilizado está baseado no emprego de acetonitrila como solvente orgânico que irá permitir a extração dos pesticidas da matriz original. Porém, acetonitrila é miscível com água, o que impediria a separação de fases. Assim, o uso de grandes quantidades de NaCl e MgSO<sub>4</sub> se torna necessário, pois a elevação da força iônica promove a separação de fases e favorece a transferência dos analitos para a fase orgânica pelo efeito *salting out*. O MgSO<sub>4</sub> tem também como função remover a água do meio através da hidratação do composto, pois se trata de um agente secante.

Alguns pesticidas apresentam rápida degradação em pH elevado. Para contornar esse problema, a extração pode ser melhorada pela redução do pH do meio [26]. Por isso, no preparo das amostras de tomate, foi utilizado o método QuEChERS modificado, no qual ácido acético é acrescentado ao meio e NaCl é substituído por acetato de sódio, para garantir um efeito tamponante.

Uma vez obtida a extração dos pesticidas em acetonitrila, procede-se uma etapa de limpeza (*cleanup*) por extração em fase sólida dispersiva (dSPE) com PSA. Esta etapa é importante para aumentar a seletividade no instrumento de análise, pois remove ácidos graxos, açúcares e alguns pigmentos polares [26]. A Figura 7 mostra o efeito desta etapa de limpeza sobre a presença dos corantes naturais das amostras de morango e tomate.

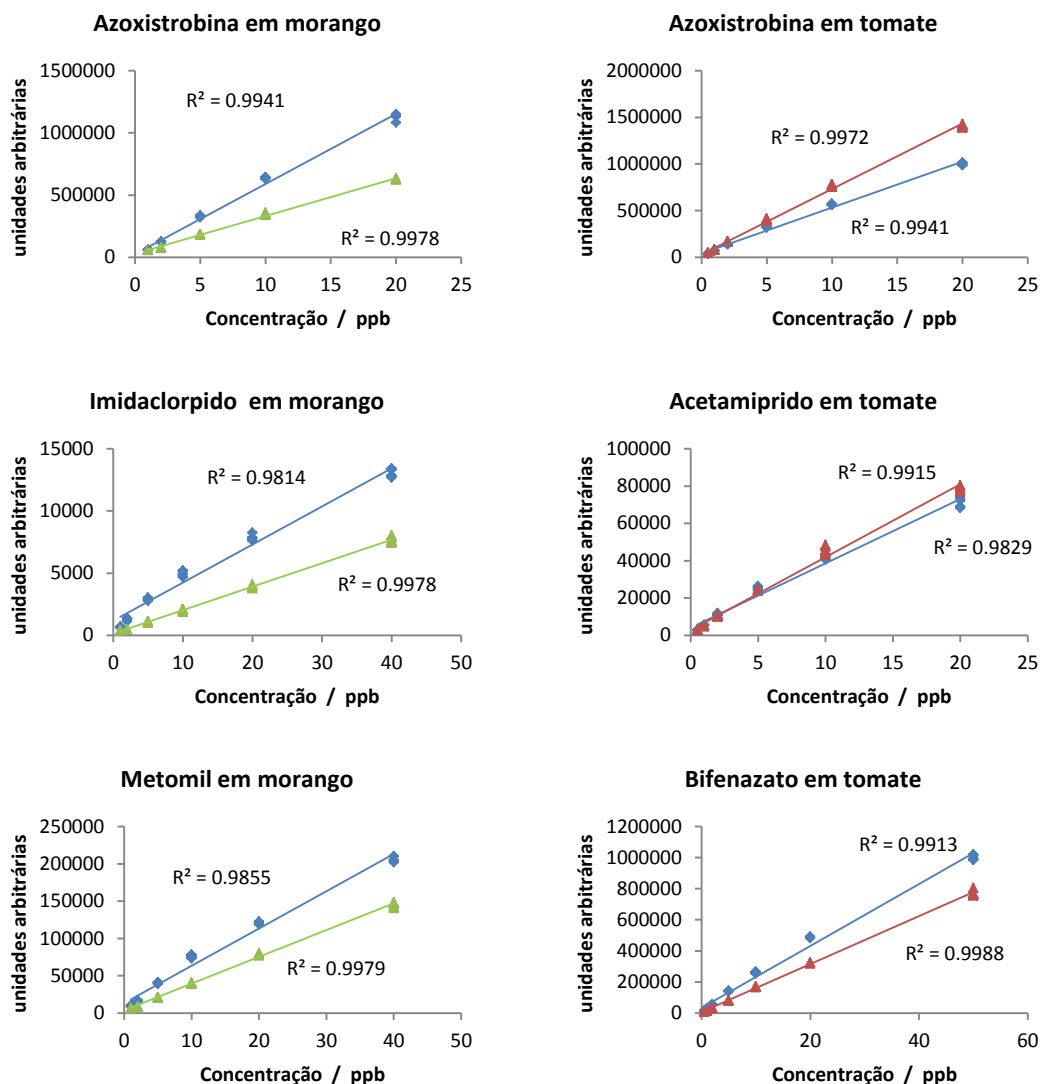


**Figura 7.** Efeito da etapa de limpeza sobre os extratos de tomate e morango em acetonitrila.

### 3.3 Validação do método

O efeito de matriz foi avaliado por meio da comparação dos coeficientes angulares das curvas de calibração com e sem a presença de matriz. Nas análises feitas tanto com morango quanto com o tomate, a presença de matriz interferiu na análise. Ou seja, a inclinação das curvas com e sem a presença da matriz diferem significativamente. A Figura 8 mostra exemplos de curvas de calibração para alguns pesticidas dissolvidos em acetonitrila e nas matrizes de morango e tomate.





**Figura 8.** Curvas de calibração de alguns pesticidas dissolvidos em acetoneitrila (losangos azuis) e nas matrizes de morango (triângulos verdes) e tomate (triângulos vermelhos).

Em geral, houve supressão de sinal devido à matriz – redução da inclinação da curva de calibração. Em alguns casos, como azoxistrobina e acetamiprido em tomate, houve amplificação de sinal. O efeito de supressão ocorre com frequência quando ionização por *electrospray* é utilizada [40-42] e pode estar relacionada à competição de espécies iônicas pela ionização, ou aumento da tensão superficial. Já a amplificação de sinal, provavelmente está relacionada à redução da tensão superficial. É importante notar que, em alguns casos como metomil em morango, a matriz parece afetar a faixa linear.

O resultado mostra que, apesar do processo de preparo de amostra envolvendo extração e limpeza e da alta eficiência do processo cromatográfico, componentes da matriz coeluem com alguns analitos e causa um de dois efeitos possíveis: sendo iônico, ele pode competir com o analito na promoção para a fase gasosa ou causar alterações de tensão superficial que reduzam a

produção de íons na fase gasosa. De qualquer forma, fica claro que a correta quantificação demanda que a calibração seja feita utilizando a matriz (adição de padrão). A Tabela 8 mostra como a matriz influenciou a sensibilidade para todos os analitos.

A Tabela 9 mostra os limites de detecção e quantificação nos dois produtos analisados.

**Tabela 8.** Supressão percentual devido à matriz

<b>tomate</b>		<b>morango</b>	
<b>analito</b>	<b>supressão (%)</b>	<b>analito</b>	<b>supressão (%)</b>
Acetamiprido	86	Acetamiprido	51
Acetamiprido	-13	Azoxistrobina	46
Azoxistrobina	-43	Bifenazato	49
Bifenazato	23	Boscalida	61
Boscalida	38	Buprofezina	73
Buprofezina	47	Carbendazim	68
Carbendazim	71	Clorantraniliprole	59
Carbofurano	29	Ciprodinil	72
Carbossulfano	74	Diazinona	54
Clorantraniliprole	-7	Difenoconazol	75
Clorpirifós	61	Dimetomorfo	50
Ciproconazol	7	Fenhexamida	56
Ciprodinil	34	Fenpiroximato	85
Diazinona	15	Flonicamida	48
Difenoconazol	18	Fludioxonil	26
Diflubenzurom	19	Flutriafol	58
Dimetoato	49	Imidaclorprido	38
Dimetomorfe	-20	Malationa	44
Etofenproxi	-89	Metalaxil	21
Espiromesifeno	78	Metamidofós	76
Famoxadona	-124	Metomil	28
Fenamidona	19	Piraclostrobina	66
Fenarimol	14	Pirimetanil	69
Fenhexamida	30	Quinoxifeno	83
Fenpiroximato	64	Tebuconazol	49
Fentoato	-21	Tiametoxam	67
Flonicamida	53	Trifloxistrobina	49
Flutriafol	14		
Hexitiazoxi	69		
Imidaclorprido	33		
Indoxacarbe	58		
Lufenuron	46		
Malationa	24		
Metalaxil	-13		
Metconazol	8		
Metamidofós	18		
Metomil	26		
Metoxifenoazida	2		
Pirimicarbe	48		
Procimidona	11		
Profenofós	67		
Piraclostrobina	63		
Pirimetanil	39		
Piriproxifeno	70		
Quinoxifeno	-2		
Tebuconazol	7		
Tetraconazol	12		
Tiabendazol	77		
Tiametoxam	39		
Triazofos	7		
Trifloxistrobina	87		

**Tabela 9.** Limites de detecção e quantificação

tomate			morango		
analito	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	analito	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Acefato	0,24	0,73	Acetamiprido	0,30	0,91
Acetamiprido	0,23	0,70	Azoxistrobina	0,33	1,01
Azoxistrobina	0,13	0,38	Bifenazato	0,45	1,37
Bifenazato	0,10	0,29	Boscalida	0,51	1,53
Boscalida	0,24	0,73	Buprofezina	1,85	5,59
Buprofezina	0,21	0,63	Carbendazim	0,37	1,11
Carbendazim	0,26	0,80	Clorantraniliprole	0,25	0,74
Carbofurano	0,09	0,28	Ciprodinil	0,38	1,14
Carbossulfano	0,25	0,76	Diazinona	0,34	1,03
Clorantraniliprole	0,12	0,37	Difenoconazol	0,39	1,17
Clorpirifós	1,13	3,43	Dimetomorfo	0,24	0,73
Ciproconazol	1,16	3,53	Fenhexamida	0,56	1,69
Ciprodinil	0,30	0,92	Fenpiroximato	0,80	2,44
Diazinona	0,27	0,82	Flonicamida	0,50	1,52
Difenoconazol	0,31	0,95	Fludioxonil	0,37	1,12
Diflubenzurom	1,22	3,71	Flutriafol	0,35	1,06
Dimetoato	0,40	1,22	Imidaclorprido	0,49	1,48
Dimetomorfe	0,43	1,30	Malationa	0,42	1,27
Etofenproxi	0,58	1,76	Metalaxil	0,68	2,07
Espiromesifeno	0,46	1,38	Metamidofós	0,80	2,43
Famoxadona	0,30	0,92	Metomil	0,24	0,72
Fenamidona	0,15	0,46	Piraclostrobina	0,31	0,94
Fenarimol	0,24	0,74	Pirimetanil	0,34	1,03
Fenhexamida	0,34	1,03	Quinoxifeno	0,99	2,99
Fenpiroximato	0,44	1,34	Tebuconazol	0,35	1,07
Fentoato	0,22	0,68	Tiametoxam	0,47	1,41
Flonicamida	0,64	1,93	Trifloxistrobina	0,34	1,02
Flutriafol	0,18	0,55			
Hexitiazoxi	0,95	2,86			
Imidaclorprido	0,31	0,93			
Indoxacarbe	0,35	1,05			
Lufenuron	1,28	3,89			
Malationa	0,27	0,80			
Metalaxil	0,16	0,47			
Metconazol	0,17	0,51			
Metamidofós	0,68	2,07			
Metomil	0,17	0,51			
Metoxifenoazida	0,63	1,90			
Pirimicarbe	1,01	3,07			
Procimidona	0,18	0,53			
Profenofós	0,58	1,75			
Piraclostrobina	0,30	0,91			
Pirimetanil	0,36	1,11			
Piriproxifeno	0,29	0,89			
Quinoxifeno	0,17	0,52			
Tebuconazol	0,16	0,50			
Tetraconazol	0,63	1,91			
Tiabendazol	0,30	0,92			
Tiametoxam	0,66	2,01			
Triazofos	0,35	1,07			
Trifloxistrobina	0,27	0,83			

A linearidade da curva foi estabelecida através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) nas curvas de calibração de todos os pesticidas, sendo consideradas linear as curvas com valor do  $R^2 \geq 0,95$ . As curvas de calibração para cada pesticida foram construídas usando-se pelo menos

cinco concentrações diferentes. Para melhor quantificar alguns pesticidas em níveis muito distintos, foram adotadas duas faixas de trabalho: uma para níveis baixos e outra para níveis elevados.

Os testes de recuperação mostram que há perda de analito durante o tratamento de amostra. De certa forma, isto era esperado devido aos processos de partição entre os solventes e adsorção tanto pelo resíduo sólido da amostra, quanto pelo PSA.

Foi feito um teste de precisão com o extrato de tomate, durante três dias consecutivos, para verificar se existiam problemas na preparação das amostras por parte do operador. Esse teste foi feito para garantir que a metodologia usada fosse exata, estável e reprodutível.

Foram analisadas oito amostras de tomate, cada uma com cinco replicatas. Durante os três dias, foram utilizados os mesmos instrumentos para fazer a medição das massas dos tomates, dos volumes dos solventes e da solução de pesticidas, além de se executar o mesmo procedimento experimental em todas as amostras diárias, para evitar qualquer tipo de alteração nos resultados. Para isso, foi preparada uma solução-estoque de pesticidas a 2 mg/L e usada nos três dias de teste.

A concentração dos pesticidas em todos os extratos foi de 100 ppb. Para efeito de comparação, foram calculadas as médias e desvio-padrão das áreas de cada composto nos respectivos dias e a global (média e desvio-padrão dos três dias). Foi calculada a porcentagem de coeficiente de variação (CV) global.

Os valores da média da área de cada composto em cada dia e o valor da média dos três dias são mostrados na Tabela 10. Os valores dessa tabela foram obtidos usando a fase móvel aquosa contendo 0,1% v/v de ácido fórmico.

**Tabela 10.** Médias das áreas dos três dias e a global com CV da global

Composto	1º Dia	2º Dia	3º Dia	Global	% CV
Acefato	47862 ± 1230	50080 ± 1376	48513 ± 1550	48818 ± 798	9
Acetamiprido	117999 ± 2066	126696 ± 2025	127762 ± 829	124109 ± 1258	6
Azoxistrobina	2345222 ± 63437	1925668 ± 30537	1964946 ± 14687	2085262 ± 42588	11
Bifenazato	852165 ± 31089	749638 ± 9372	774861 ± 12586	796092 ± 14657	10
Boscalida	98354 ± 1624	81204 ± 2132	84768 ± 1821	88146 ± 1742	10
Buprofezina	4029617 ± 20604	3834583 ± 20999	3744632 ± 25064	3865327 ± 26899	4
Carbendazim	90974 ± 1368	114115 ± 1620	109780 ± 2213	104878 ± 2105	11
Carbofurano	1189104 ± 24326	985053 ± 28069	968163 ± 24728	1047440 ± 23251	12
Carbosulfano	212230 ± 7749	235294 ± 10959	266000 ± 4693	239422 ± 6188	13
Ciproconazol	478268 ± 4089	430443 ± 6280	392618 ± 7269	433776 ± 7203	9
Ciprodinil	649996 ± 14286	584398 ± 5732	580658 ± 9444	606892 ± 8787	8
Clorantraniliprole	196774 ± 1907	180228 ± 722	171717 ± 2118	182364 ± 2310	7
Clorpirifos	761 ± 22	668 ± 29	699 ± 19	710 ± 15	12
Diazinona	2877910 ± 80776	2774317 ± 27574	2523963 ± 35897	2720949 ± 43442	8
Difenoconazol	560215 ± 6064	479030 ± 7508	428471 ± 11130	486831 ± 11943	13
Diflubenzuron	14916 ± 203	14678 ± 275	12970 ± 177	14233 ± 203	8
Dimetoato	118277 ± 1619	107584 ± 1612	106776 ± 1563	110879 ± 1307	7
Dimetomorfo	566094 ± 11052	532795 ± 4389	494901 ± 5724	531124 ± 7343	7
Espiromesifeno	3142 ± 75	2995 ± 48	2876 ± 51	3001 ± 40	7
Etofenproxi	232590 ± 2072	218648 ± 2308	211333 ± 5140	220509 ± 2750	6
Famoxadona	121334 ± 1283	110506 ± 1933	97997 ± 1592	109946 ± 1956	10
Fenamidona	788565 ± 11629	696352 ± 21398	686723 ± 10570	723880 ± 11968	9
Fenarimol	38586 ± 425	35421 ± 606	31646 ± 519	35218 ± 592	9
Fenhexamida	74977 ± 1453	67950 ± 1499	64651 ± 985	69246 ± 1100	9
Fenpiroximato	277771 ± 6332	293572 ± 9399	312574 ± 5166	294736 ± 4724	8
Fentoato	2141160 ± 35493	1755624 ± 40780	1795751 ± 30907	1897512 ± 37320	11
Flonicamida	31721 ± 362	30938 ± 381	30829 ± 240	31165 ± 200	4
Flutriafol	607928 ± 4754	569774 ± 6420	524303 ± 8023	567335 ± 7205	7
Hexitiazoxi	3834 ± 138	3832 ± 164	4685 ± 124	4093 ± 111	14
Imidacloprido	44222 ± 466	40547 ± 621	38292 ± 393	41020 ± 525	7
Indoxacarbe	39536 ± 1400	51855 ± 1372	51106 ± 1771	47955 ± 1430	14
Lufenuron	1878 ± 75	2076 ± 31	1556 ± 34	1820 ± 51	15
Malationa	270760 ± 7630	214511 ± 5346	212899 ± 6436	234045 ± 6451	15
Metalaxil	2359901 ± 15065	2185492 ± 13656	2050456 ± 46650	2198616 ± 24211	6
Metconazol	461285 ± 4093	413340 ± 5060	368201 ± 7155	414275 ± 7576	10
Metamidofós	70199 ± 1633	67802 ± 1964	66463 ± 1651	68155 ± 1023	8
Metomil	557916 ± 12586	478546 ± 13051	492769 ± 9509	507649 ± 9093	10
Metoxifenozida	685597 ± 17986	622781 ± 3666	620091 ± 5914	644645 ± 8960	7
Pirimicarbe	3397618 ± 52418	3326120 ± 35492	3282033 ± 23366	3335257 ± 23482	4
Procimidona	2016503 ± 33598	1596891 ± 28159	1507021 ± 44875	1706805 ± 45127	15
Profenofós	30580 ± 516	26498 ± 474	25533 ± 1118	27491 ± 634	12
Piraclostrobina	735914 ± 17688	703367 ± 11823	825622 ± 20951	757547 ± 14274	10
Pirimetanil	795189 ± 10455	721284 ± 13062	720075 ± 9903	745516 ± 8957	7
Piriproxifeno	1001674 ± 28200	967040 ± 26802	866771 ± 38770	950816 ± 20806	11
Quinoxifeno	280662 ± 4684	261416 ± 3387	234300 ± 3368	259235 ± 4403	9
Tebuconazol	600543 ± 6014	525461 ± 8171	474350 ± 10579	533451 ± 10535	11
Tetraconazol	190734 ± 1552	175582 ± 2840	157854 ± 2605	174723 ± 2785	9
Tiabendazol	181368 ± 2455	171406 ± 3061	179125 ± 2660	177349 ± 1715	5
Tiametoxam	54377 ± 934	51882 ± 912	52497 ± 965	52709 ± 580	5
Triazofos	2071350 ± 64304	1817937 ± 21480	1903850 ± 21300	1941328 ± 31532	9
Trifloxistrobina	286629 ± 7340	262515 ± 6685	326606 ± 6577	293195 ± 6220	11

De acordo com a orientação sobre validação de métodos analíticos da INMETRO, a porcentagem do coeficiente de variação aceito para repetibilidade nessa concentração (100 ppb) é de no máximo 15%. Como o valor do coeficiente de variação de todos os pesticidas de interesse ficou abaixo de 15%, é possível dizer que o método utilizado é preciso.

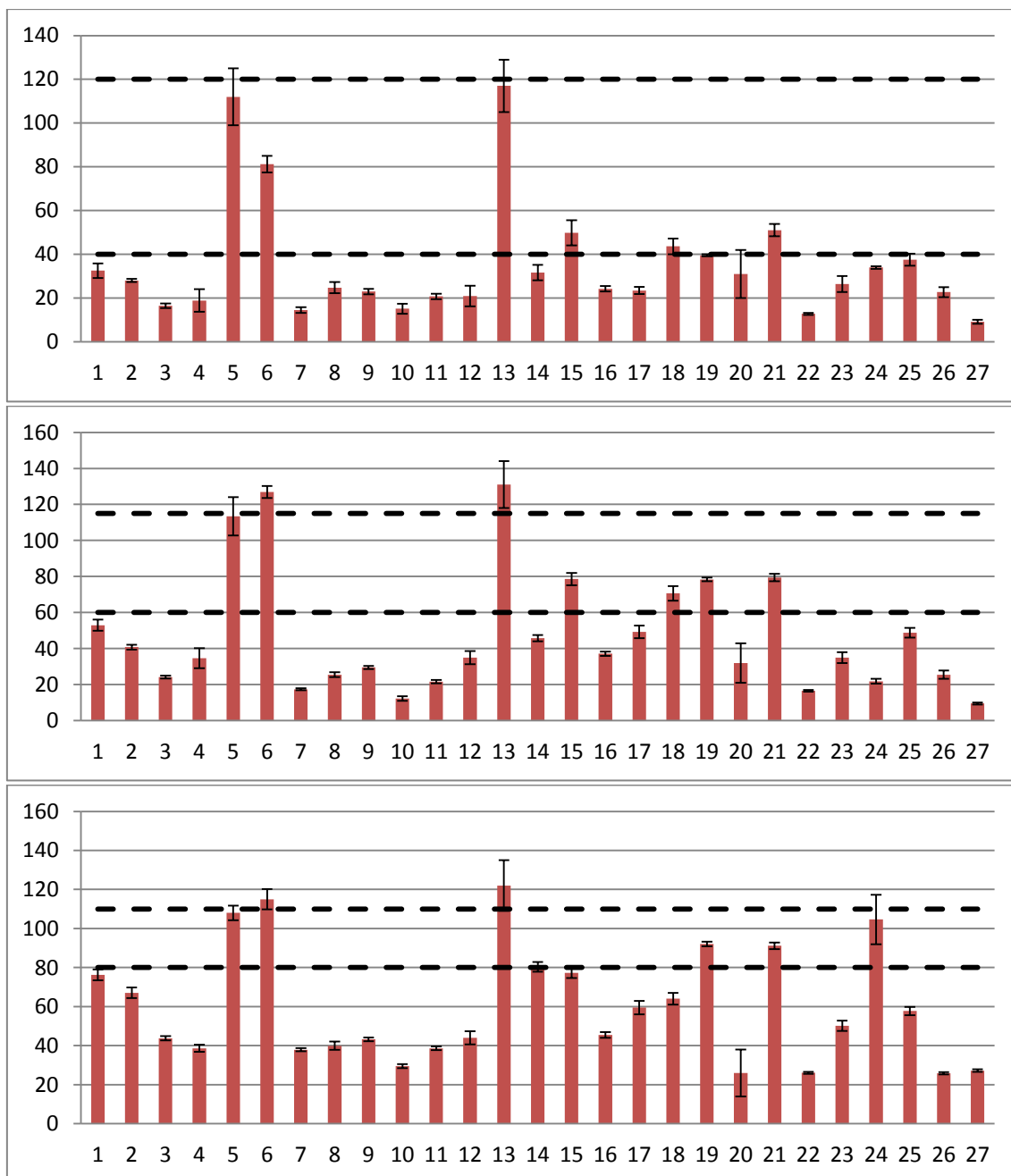
Nesse experimento não foi realizada precisão intermediária e reprodutibilidade, uma vez que havia um único operador fazendo todas as operações (desde a preparação da amostra até a operação do instrumento e análise dos compostos de interesse) e não havia nenhum outro laboratório envolvido na análise de pesticidas.

No caso da recuperação, tanto para morango quanto para tomate foram feitos usando a equação 3 e as concentrações dos padrões empregados foram de 1, 10 e 100 ppb. Nas Figuras 9 e 10 se encontram as mesmas com os valores de porcentagens de recuperação (%) e seus respectivos coeficientes de variação (CV, %) indicados pelas barras de erros.

Pode-se observar na figura 9 que nas três recuperações a maioria fica abaixo da faixa de recuperação recomendado pelo INMETRO (40~120% para concentração de 1 ppb, 60~115% para concentração de 10 ppb e 80~110% para concentração de 100 ppb) [33]. Mesmo fora da faixa, os pesticidas foram mantidos no desenvolvimento do método, pois são grupos de pesticidas encontrados nos monitoramentos realizados pelo PARA.

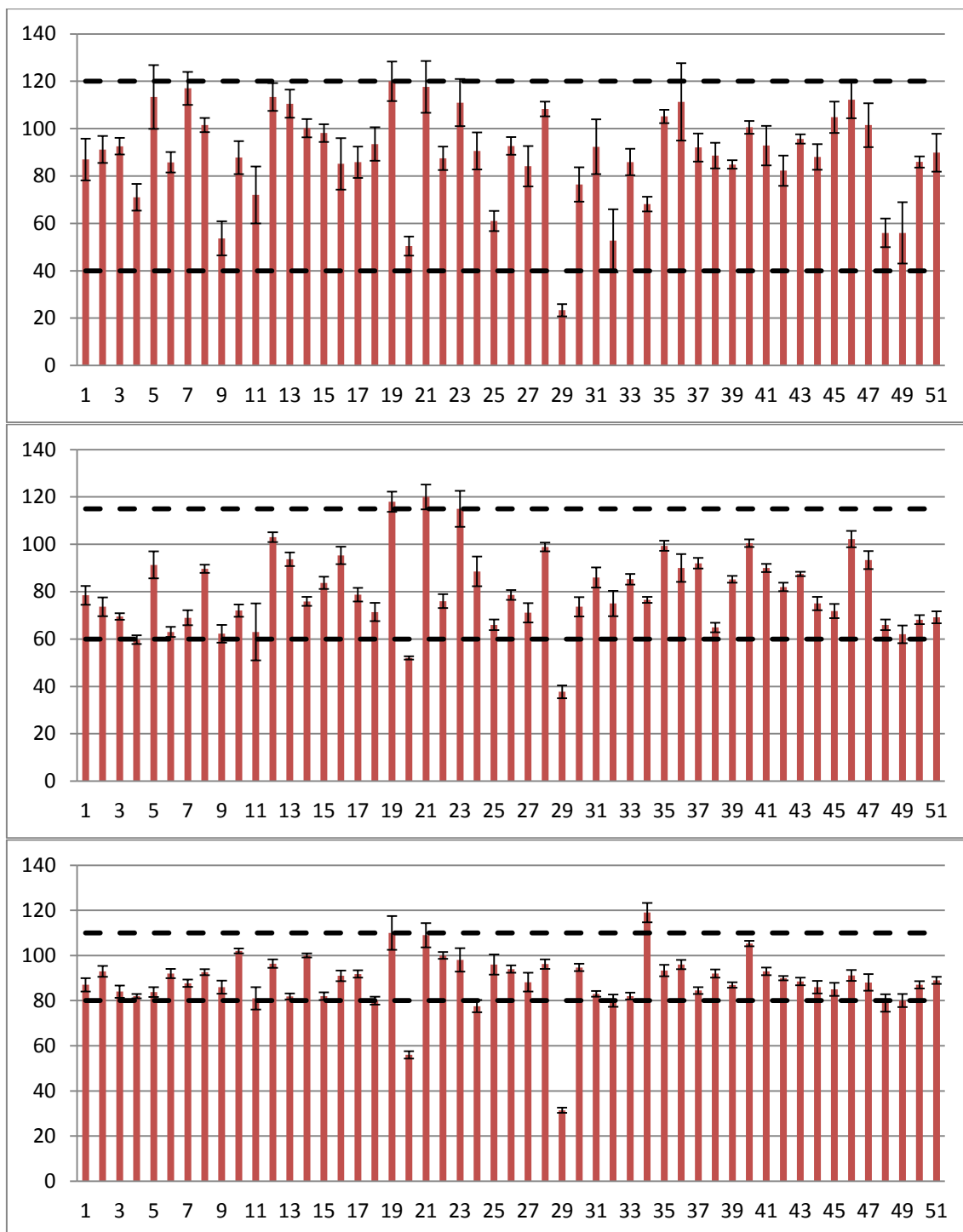
Pela Figura 10 em matriz de tomate os pesticidas apresentaram uma boa recuperação, sendo somente o (20) Espiromesifeno e (29) Hexitiazoxi que ficaram fora da faixa de recuperação recomendado pelo INMETRO (40~120% para concentração de 1 ppb, 60~115% para concentração de 10 ppb e 80~110% para concentração de 100 ppb) [33]. Mesmo fora da faixa, os dois pesticidas foram mantidos no desenvolvimento do método.

Observa-se pelas figuras 9 e 10 que, em geral, as recuperações foram muito melhores no tomate do que no morango. Embora se possa atribuir os diferentes comportamentos à matriz da amostra, cabe destacar que o procedimento QuEChERS foi modificado, no caso do tomate, pela substituição de NaCl pela combinação de acetado de sódio e ácido acético. Aparentemente, esta combinação é mais apropriada.



**Figura 9.** Recuperação das concentrações de 1, 10 e 100 ppb em matriz de morango, respectivamente. A identificação dos pesticidas utilizados em morango encontra-se em ordem alfabética: (1) Acetamiprido, (2) Azoxistrobina, (3) Bifenazato, (4) Boscalida, (5) Buprofezina, (6) Carbendazim, (7) Clorantiraniliprole, (8) Ciprodinil, (9) Diazinona, (10) Difenconazol, (11) Dimetomorfe, (12) Fenhexamida, (13) Fenpiroximato, (14) Flonicamida, (15) Fludioxonil, (16) Flutriafol, (17) Imidacloprido, (18) Malationa, (19) Metalaxil, (20) Metamidofós, (21) Metomil, (22) Piraclostrobrina, (23) Pirimetanil, (24) Quinoxifeno, (25) Tebuconazol, (26) Tiametoxam, (27) Trifloxistrobina.





**Figura 10.** Recuperação das concentrações de 1, 10 e 100 ppb em matriz de tomate, respectivamente. Para tomate, a identificação dos pesticidas utilizados encontra-se em ordem alfabética: (1) Acefato, (2) Acetamiprido, (3) Azoxistrobina, (4) Bifenazato, (5) Boscalida, (6) Buprofezina, (7) Carbendazim, (8) Carbofurano, (9) Carbossulfano, (10) Clorantraniliprole, (11) Clorpirifós, (12) Ciproconazol, (13) Ciprodinil, (14) Diazinona, (15) Difenconazol, (16) Diflubenzurom, (17) Dimetoato, (18) Dimetomorfe, (19) Etofenproxi, (20) Espiromesifeno, (21) Famoxadona, (22) Fenamidona, (23) Fenarimol, (24) Fenhexamida, (25) Fenpiroximato, (26) Fentoato, (27) Flonicamida, (28) Flutriafol, (29) Hexitiazoxi, (30) Imidacloprido, (31) Indoxacarbe, (32) Lufenuron, (33) Malationa, (34) Metalaxil, (35) Metconazol, (36) Metamidofós, (37) Metomil, (38) Metoxifenoazida, (39) Pirimicarbe, (40) Procimidona, (41) Profenofós, (42) Piraclostrobrina, (43) Pirimetanil, (44) Piriproxifeno, (45) Quinoxifeno, (46) Tebuconazol, (47) Tetraconazol, (48) Tiabendazol, (49) Tiametoxam, (50) Triazofos, (51) Trifloxistrobina.

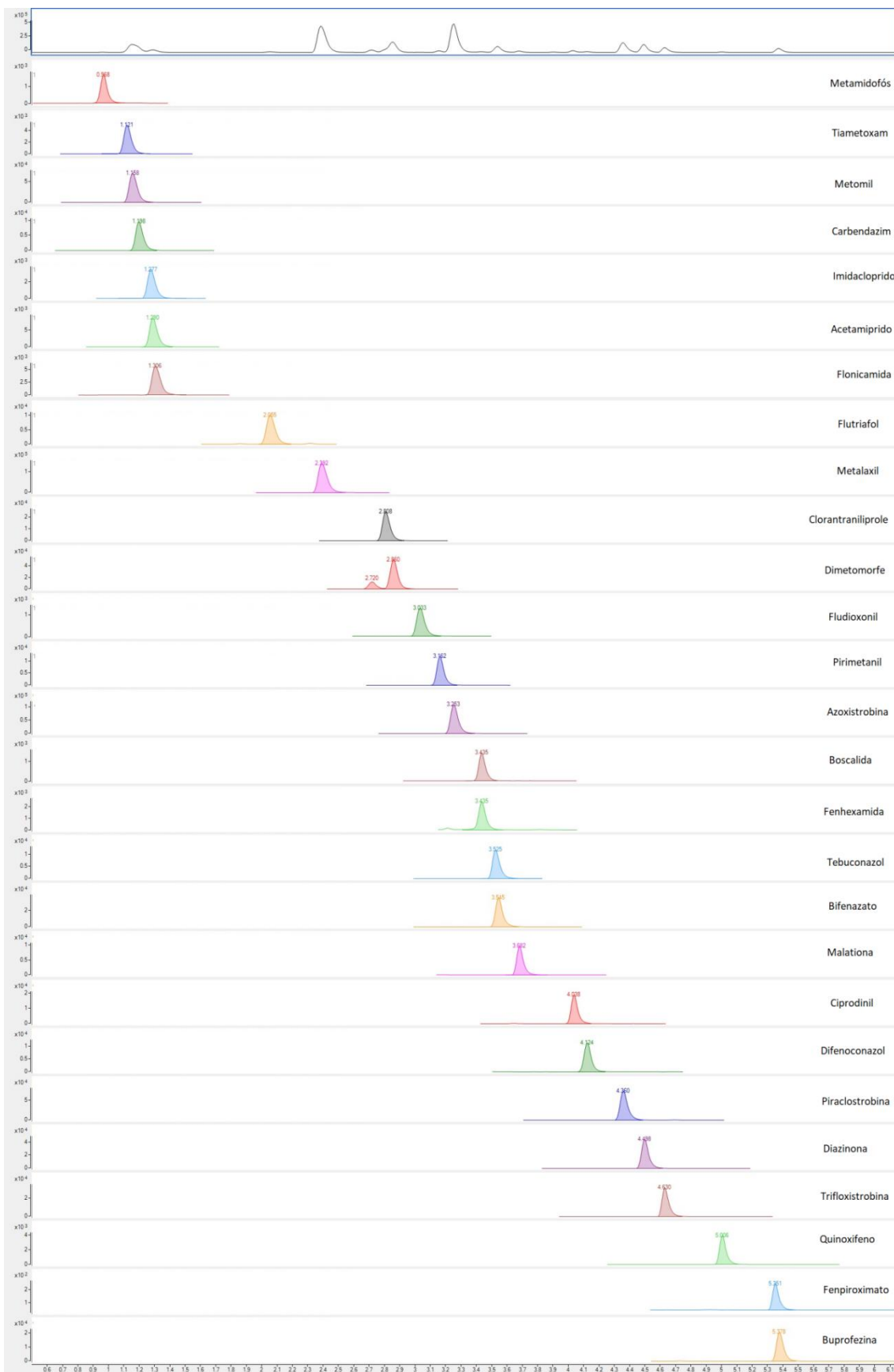
### 3.4 Análise de amostras reais

Uma vez desenvolvido o método e feita sua validação, foram realizadas análises de algumas amostras reais de morango e tomate adquiridos no mercado local. As amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais e feiras livres na cidade de São Paulo, Santo André e São Caetano do Sul. Como o objetivo do trabalho não era monitorar sistematicamente, não foram considerados aspectos como representatividade da região metropolitana, bem como proporção de produção e consumo dos produtos.

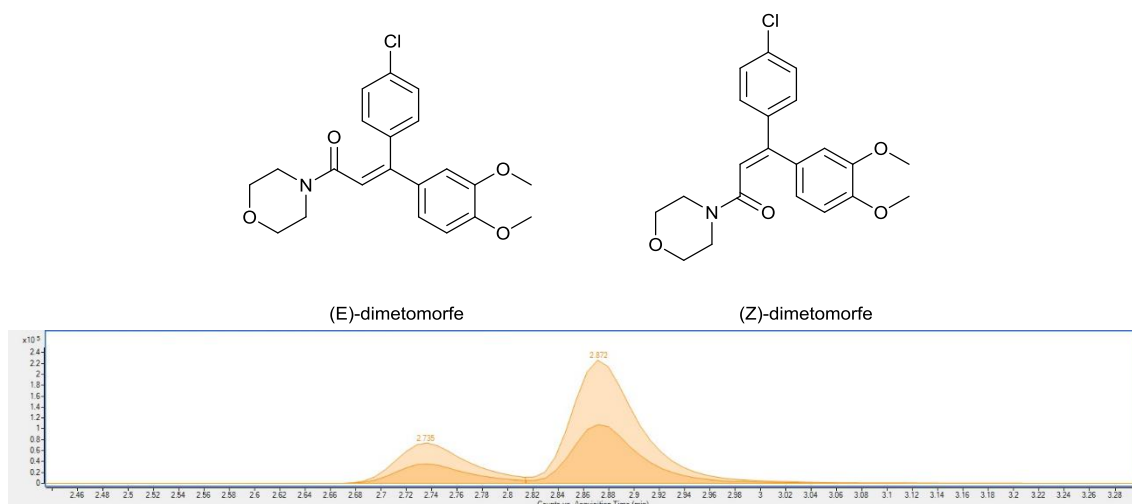
A Figura 11 apresenta um cromatograma típico de amostra de morango após adição de todos os pesticidas analisados. É apresentado o cromatograma de corrente iônica total e, na sequência, os cromatogramas das transições utilizadas para quantificação.

No caso do dimetomorfe, observam-se dois picos cromatográficos, revelando a presença dos estereoisômeros apresentados na Figura 12. Ambos os isômeros são considerados ativos, sendo o isômero Z mais persistente devido à menor solubilidade em água [43]. De acordo com Mayer-Helm et al. [44], a sequência de eluição em fase reversa indica que o primeiro pico corresponde a (Z)-dimetomorfe e o segundo e mais abundante a (E)-dimetomorfe. O estudo sistemático feito pelos autores, mostra que os espectros de massas MS e MS/MS não se diferenciam, o que permite que áreas dos picos sejam somadas para fins de quantificação.

Na Figura 13, apresentada em duas partes devido a sua extensão, é apresentado um cromatograma típico para amostra de tomate. Além do dimetomorfe, o ciproconazol também apresenta dois picos cromatográficos. O ciproconazol apresenta dois centros quirais (Figura 14), resultando em um total de 4 enantiômeros. Como a fase estacionária não é quiral, pode-se observar a separação dos diastereoisômeros. Há evidências de que estes diastereoisômeros sofram alterações no meio ambiente [45], de modo que ambos são monitorados.



**Figura 11.** Cromatograma de corrente iônica total (topo) e para as transições de quantificação dos diversos analitos em amostra de morango.



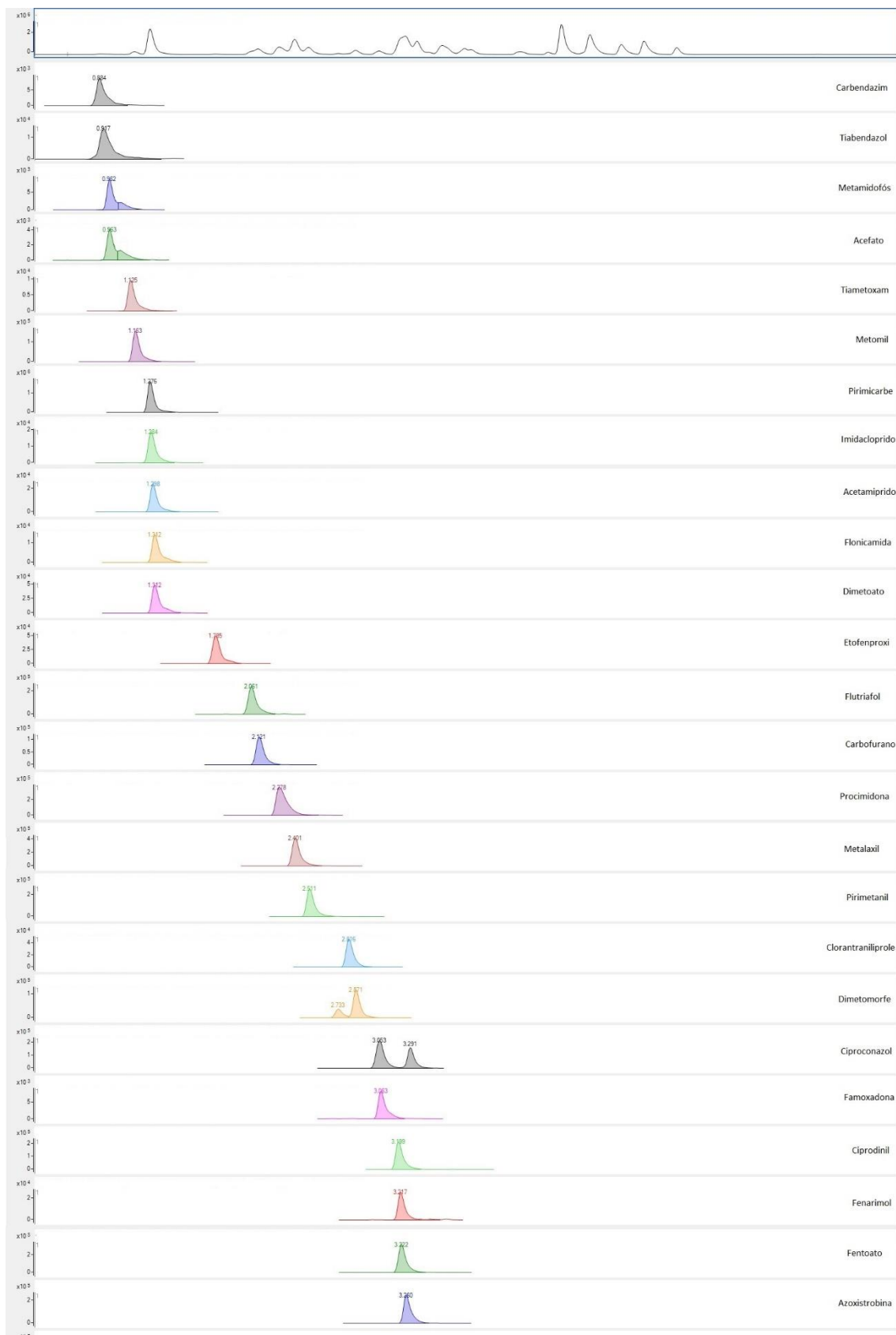
**Figura 12.** Isômeros do dimetomorf detectados e cromatograma das transições de quantificação (mais intensa) e qualificação.

As tabelas 10 e 11 apresentam os resultados para as amostras de morango com produção regular e orgânica, respectivamente. As tabelas 12 e 13 apresentam os resultados para as amostras de tomates com produção regular e orgânica, respectivamente.

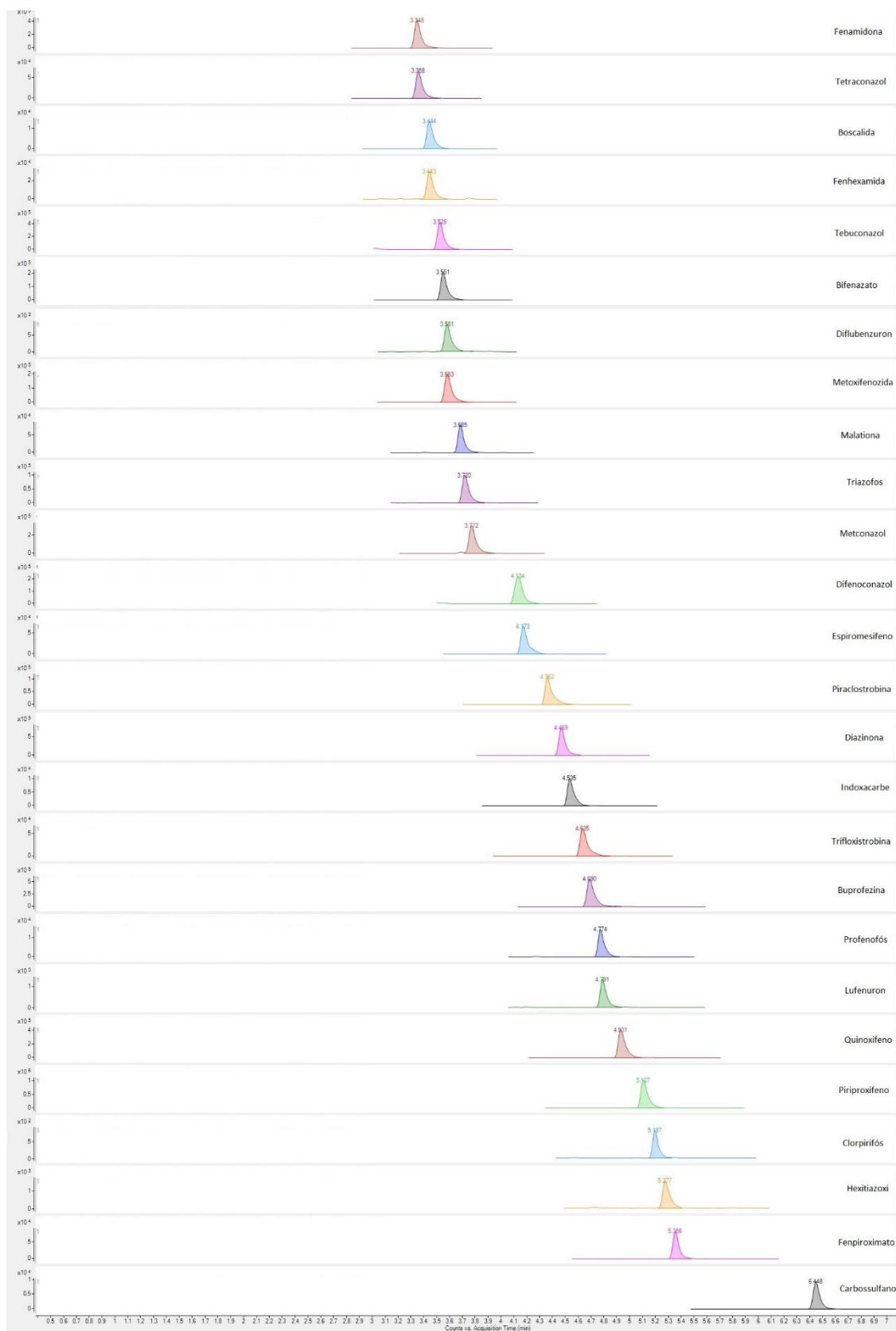
Foram analisadas 21 amostras de morango, sendo 6 delas comercializadas como sendo de produção orgânica. Devido à presença de pesticidas, surpreendentes quatro destes produtos não poderiam receber tal certificação. Igualmente surpreendente é a constatação que a amostra com o maior número de pesticidas detectados e níveis mais elevados de alguns deles é justamente uma amostra deste grupo.

Obviamente, o número de observações é muito restrito, o que impede uma análise estatística apropriada. Ainda assim, não deixa de ser didático o exemplo encontrado, pois esta amostra irregular apresentava tamanho e aparência dos frutos bastante modestos, o que reforça a noção muitas vezes propaladas de que produtos orgânicos seriam menos exuberantes, mas mais saudáveis.

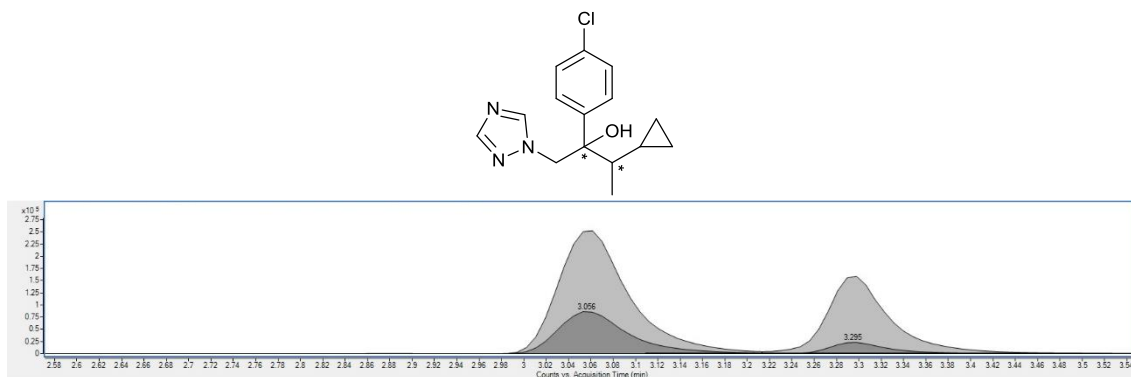
Ainda com relação ao conjunto das amostras de morango, nota-se que 71% delas apresentam alguma irregularidade, o que é bastante preocupante. A irregularidade mais frequente foi a classificação inadequada como produto orgânico (67%), seguida de uso de pesticida não autorizado para a cultura (19%) e pesticida acima do LMR (14%). Cabe ainda destacar que, no caso de amostras de morango, os testes de recuperação (Figura 9) mostraram que parte dos pesticidas se mantem retida na matriz ou em PSA, de modo que os valores finais estão subavaliados. Desta forma, é possível que, utilizando o mesmo procedimento usado para tomate, os resultados seriam ainda maiores.



**Figura 13 (parte 1).** Cromatograma de corrente iônica total (topo) e para as transições de quantificação dos diversos analitos em amostra de tomate.



**Figura 13 (parte 2).** Cromatogramas para transições de quantificação dos diversos analitos em amostra de tomate.



**Figura 14.** Estrutura do ciproconazol, com destaque para os carbonos quirais, e cromatograma das transições de quantificação (mais intensa) e qualificação.

Foram analisadas 25 amostras de tomate, sendo 9 delas (36%) comercializadas como sendo de produção orgânica. Novamente, o número de irregularidades foi significativo, já que 5 delas (56%) não poderiam ser consideradas orgânicas devido à presença de pesticidas.

À semelhança do que se pode observar para os resultados de morango, o uso de mistura de pesticidas para a cultura de tomate parece ser prática comum, já que 8 amostras utilizam cinco ou mais diferentes pesticidas.

Mais uma vez, a maioria das amostras (56%) apresentou alguma irregularidade. Embora com proporções diferentes, a frequência das irregularidades obedece a mesma ordem. A irregularidade mais frequente foi a classificação inadequada como produto orgânico (42%), seguida de uso de pesticida não autorizado para a cultura (33%) e pesticida acima do LMR (25%).

Ressalva-se, uma vez mais, a limitação com relação ao número de amostras e a não sistematização sobre a aquisição destas de modo a representar a produção e consumo na região metropolitana de São Paulo. De qualquer forma, fica demonstrada a viabilidade da aplicação do método desenvolvido e adequação para a análise multirresíduo nas duas culturas estudadas.

**Tabela 11.** Resultados das análises para amostras de morango com produção não orgânica

Analito \ Amostra	M1	M2	M3	M5	M6	M7	M10	M11	M13	M14	M15	M16	M17	M18
Acetamiprido	ND	ND	17 ± 5	3 ± 1	9 ± 2	66 ± 6	5 ± 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Azoxistrobina	ND	17 ± 3	3,1 ± 0,4	ND	ND	ND	26 ± 2	ND	ND	1,3 ± 0,2	ND	ND	ND	ND
Bifenazato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Boscalida	ND	11 ± 3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Buprofezina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Carbendazim	60 ± 9	2 ± 1	ND	ND	116 ± 18	ND	79 ± 10	100 ± 9	295 ± 14	2,4 ± 1,7	2129 ± 144	< LOQ	ND	76 ± 4
Clorantriliprole	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ	ND	ND
Ciprodinil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diazinona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Difenoconazol	ND	ND	17 ± 4	ND	ND	ND	68 ± 11	ND	ND	11 ± 3	ND	ND	ND	ND
Dimetomorfo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenhexamida	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenpiroximato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	43 ± 7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Flonicamida	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	374 ± 27	ND
Fludioxonil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,4 ± 0,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Flutriafol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imidacloprido	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,5 ± 0,2	697 ± 62	< LOQ
Malationa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metalaxil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metamidofós	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metomil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	40 ± 6	ND	ND	ND
Piraclostrobina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pirimetanil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4 ± 1	ND	39 ± 4	ND	ND	185 ± 13	ND	ND
Quinoxifeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tebuconazol	ND	ND	ND	ND	19 ± 5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tiametoxam	ND	10 ± 3	ND	ND	ND	ND	2,6 ± 1,4	ND	ND	ND	ND	84 ± 5	ND	89 ± 4
Trifloxistrobina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND – não detectado, ou seja, abaixo do LOD.



**Tabela 12.** Resultados das análises para amostras de morango com produção orgânica

Analito \ Amostra	M4	M8	M9	M12	M20	M21
Acetamiprido	1,4 ± 0,8	1,3 ± 0,8	ND	ND	394 ± 74	ND
Azoxistrobina	ND	ND	ND	ND	328 ± 27	ND
Bifenazato	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Boscalida	ND	ND	ND	ND	6,9 ± 1,3	ND
Buprofezina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Carbendazim	7 ± 2	13 ± 2	ND	ND	29925 ± 2627	ND
Clorantraniliprole	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ciprodinil	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diazinona	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Difenoconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dimetomorfo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenhexamida	ND	ND	ND	ND	< LOQ	ND
Fenpiroximato	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Flonicamida	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fludioxonil	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Flutriafol	ND	ND	ND	ND	< LOQ	ND
Imidacloprido	ND	ND	9 ± 3	ND	1102 ± 106	ND
Malationa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metalaxil	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metamidofós	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metomil	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Piraclostrobina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pirimetanil	ND	ND	ND	ND	< LOQ	ND
Quinoxifeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tebuconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tiametoxam	ND	ND	ND	ND	9438 ± 907	ND
Trifloxistrobina	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND – não detectado, ou seja, abaixo do LOD.

**Tabela 13.** Resultados das análises para amostras de tomate com produção não orgânica

Analito \ Amostra	T3	T4	T6	T10	T11	T13	T15	T16	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25
Acefato	ND	9,3 ± 2,3	ND	ND	ND	ND	12 ± 3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acetamiprido	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7 ± 1	15 ± 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Azoxistrobina	0,8 ± 0,3	ND	ND	ND	1,3 ± 0,3	ND	0,6 ± 0,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bifenazato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Boscalida	ND	ND	4 ± 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Buprofezina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Carbendazim	13,3 ± 0,5	88 ± 5	ND	305 ± 50	ND	ND	18 ± 6	42 ± 16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Carbofurano	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Carbossulfano	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clorantraniliprole	< LOQ	7,2 ± 0,7	6,1 ± 0,5	2,9 ± 0,2	ND	24,5 ± 6,0	3,5 ± 0,4	3,5 ± 0,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clorpirifós	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ciproconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ciprodinil	ND	ND	113 ± 7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diazinona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Difenoconazol	4,3 ± 0,4	< LOQ	ND	ND	174 ± 10	ND	4,3 ± 0,7	15,8 ± 0,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diflubenzurom	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dimetoato	ND	ND	ND	ND	1,4 ± 0,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,8 ± 0,6
Dimetomorfe	ND	ND	ND	ND	1,4 ± 0,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Etofenproxi	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ	ND	ND
Espiromesifeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Famoxadona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenamidona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenarimol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenhexamida	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenpiroximato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fentoato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fonicamida	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ	ND	ND	ND	ND	1,9 ± 0,6
Flutriafol	ND	ND	ND	ND	< LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hexitiazoxi	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imidacloprido	4,4 ± 0,8	< LOQ	2,6 ± 0,7	ND	ND	ND	ND	1,6 ± 0,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Indoxacarbe	ND	ND	2,5 ± 0,6	ND	ND	7,0 ± 1,2	3,3 ± 0,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,0 ± 0,1	ND

Analito \ Amostra	T3	T4	T6	T10	T11	T13	T15	T16	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25
Lufenuron	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7,0 ± 3,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Malationa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metalaxil	ND	2,8 ± 0,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metamidofós	ND	2,2 ± 0,5	ND	ND	ND	ND	3,3 ± 0,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metomil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metoxifenozida	ND	ND	6,5 ± 0,7	ND	ND	< LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pirimicarbe	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Procimidona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Profenofós	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Piraclostrobina	ND	33 ± 3	ND	ND	ND	ND	35 ± 4	11 ± 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,1 ± 0,1	ND
Pirimetanil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Piriproxifeno	ND	ND	ND	ND	0,9 ± 0,3	ND	15 ± 4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Quinoxifeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tebuconazol	ND	ND	ND	ND	0,6 ± 0,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tetraconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tiabendazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tiametoxam	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5,0 ± 2,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Triazofos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Trifloxistrobina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND – não detectado, ou seja, abaixo do LOD.



<b>Analito \ Amostra</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T5</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>	<b>T12</b>	<b>T14</b>	<b>T17</b>
Malationa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metalaxil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metconazol	ND	ND	ND	ND	ND	1,2 ± 0,3	ND	ND	ND
Metamidofós	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metomil	ND	ND	ND	ND	3,2 ± 1,4	ND	ND	ND	ND
Metoxifenozida	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pirimicarbe	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Procimidona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Profenofós	ND	ND	ND	ND	13 ± 4	ND	ND	ND	ND
Piraclostrobina	ND	ND	ND	ND	4,6 ± 2,1	ND	ND	ND	ND
Primetanil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Piriproxifeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Quinoxifeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tebuconazol	ND	ND	ND	ND	19 ± 2	3,7 ± 0,4	ND	ND	ND
Tetraconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tiabendazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tiametoxam	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Triazofos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Trifloxistrobina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND – não detectado, ou seja, abaixo do LOD.

## 4. Conclusões e perspectivas

A técnica de UHPLC-MS/MS mostrou-se bastante adequada para a análise multirresíduo nas amostras de morango e tomate. O fato de a coluna de UHPLC ser de menor dimensão que as tipicamente utilizadas em HPLC leva a uma redução do volume de amostra injetado e de consumo de solventes orgânicos para a fase móvel, sem reduzir a sensibilidade, já que a fonte de ionização é bastante eficiente. Apesar da complexidade do conjunto de dados – já que dezenas de cromatogramas são adquiridos para cada amostra – o conjunto de programas para aquisição e tratamento de dados facilita o trabalho de rotina.

Apesar do procedimento adotado para o preparo de amostra promover a remoção de impurezas nas etapas de extração e *cleanup*, ainda ocorrem coeluições que afetam a resposta da produção de íons por *electrospray*, o que demanda a calibração sendo feita na presença da matriz. No entanto, o conjunto dos resultados apresentados demonstra que o método pode ser utilizado para a análise de resíduos de pesticidas em morango e tomate atendendo as normas oficiais.

Embora o objetivo deste trabalho não tenha sido o monitoramento sistemático de produtos comercializados, não se pode deixar de destacar que os resultados obtidos para as poucas amostras estudadas sejam motivos de preocupação. Infelizmente, a presença de pesticidas não recomendados é observada, assim como os níveis de um modo geral preocupam. O caso extremo foi de uma amostra de morango comercializada supostamente como produto orgânico e que apresentou uma miríade de pesticidas.

A complexidade da matriz demanda que tanto o procedimento de preparo de amostra, quanto da otimização das condições do cromatógrafo e do espectrômetro de massas seja realizado para cada produto agrícola. No entanto, nota-se que a experiência adquirida com um determinado produto agiliza o desenvolvimento de um método para um outro, o que sugere que a expansão de métodos UHPLC-MS/MS para análise multirresíduo poderia ser realizada ampliando as possibilidades de monitoramento de produtos agrícolas em nosso país.

## Referências Bibliográficas

- [1] FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations - Environmental and social management Guidelines, Rome, 2015.
- [2] <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>, 30/11/2020.
- [3] <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>, 29/11/2020.
- [4] ANVISA, Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015, PARA, in, 2016.
- [5] ANVISA, Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2017-2018, PARA, in, 2019.
- [6] C. Hyland, A. Bradman, R. Gerona, S. Patton, I. Zakharevich, R.B. Gunier, K. Klein, Organic diet intervention significantly reduces urinary pesticide levels in U.S. children and adults, *Environmental Research*, 171 (2019) 568-575.
- [7] [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/2003/110.831.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/110.831.htm), 01/12/2020.
- [8] F. Hernandez, J.V. Sancho, O.J. Pozo, Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (2005) 934-946.
- [9] L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth, Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS?, *Mass Spectrometry Reviews*, 25 (2006) 838-865.
- [10] W.M.A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli, Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 25 (2006) 881-899.
- [11] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, A. Cannavan, S.A. Hewitt, Use of liquid chromatography mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk, *Journal of Chromatography A*, 812 (1998) 77-98.
- [12] Y. Pico, G. Font, J.C. Molto, J. Manes, Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 882 (2000) 153-173.
- [13] G. Balizs, A. Hewitt, Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 492 (2003) 105-131.
- [14] K. Mastovska, S.J. Lehotay, Practical approaches to fast gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1000 (2003) 153-180.
- [15] V. Di Stefano, G. Avellone, D. Bongiorno, V. Cunsolo, V. Muccilli, S. Sforza, A. Dossena, L. Drahos, K. Vekey, Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis, *Journal of Chromatography A*, 1259 (2012) 74-85.
- [16] P.A.S. Tette, L.R. Guidi, M.B.D. Gloria, C. Fernandes, Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods, *Talanta*, 149 (2016) 124-141.
- [17] J.M. Soriano, B. Jimenez, G. Font, J.C. Molto, Analysis of carbamate pesticides and their metabolites in water by solid phase extraction and liquid chromatography: A review, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31 (2001) 19-52.
- [18] M. Kuster, M.L. de Alda, D. Barcelo, Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques, *Mass Spectrometry Reviews*, 25 (2006) 900-916.
- [19] J.V. Sancho, O.J. Pozo, M. Ibanez, F. Hernandez, Potential of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the determination of pesticides and transformation products in water, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386 (2006) 987-997.
- [20] A.G. Frenich, R. Romero-Gonzalez, M.D. Aguilera-Luiz, Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 63 (2014) 158-169.
- [21] A. Masia, C. Blasco, Y. Pico, Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography-mass spectrometry, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2 (2014) 11-24.

- [22] P.A. Mills, J.H. Onley, R.A. Gaither, Rapid Method for Chlorinated Pesticide Residues in Nonfatty Foods, *J Assoc Off Agr Chem*, 46 (1963) 186-+.
- [23] G. Becker, Multi-Method for Simultaneous Coverage of 75 Plant Treatment Preparations on Vegetable Basis, *Deut Lebensm-Rundsch*, 75 (1979) 148-152.
- [24] M.A. Luke, J.E. Froberg, H.T. Masumoto, Extraction and Cleanup of Organochlorine, Organophosphate, Organonitrogen, and Hydrocarbon Pesticides in Produce for Determination by Gas-Liquid-Chromatography, *J Assoc Off Ana Chem*, 58 (1975) 1020-1026.
- [25] M.A. Luke, G.M. Doose, A Modification of the Luke Multiresidue Procedure for Low Moisture, Nonfatty Products, *B Environ Contam Tox*, 30 (1983) 110-116.
- [26] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, 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*, 86 (2003) 412-431.
- [27] S.J. Lehotay, K.A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W.S. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, N. Leepipatpiboon, Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 2548-2560.
- [28] A. Wiilkowska, M. Biziuk, Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology, *Food Chem.*, 125 (2011) 803-812.
- [29] R. Perestrelo, P. Silva, P. Porto-Figueira, J.A.M. Pereira, C. Silva, S. Medina, J.S. Câmara, QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends, *Analytica Chimica Acta*, 1070 (2019) 1-28.
- [30] O.D. Prestes, C.A. Friggi, M.B. Adaime, R. Zanella, QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas, *Química Nova*, 32 (2009) 1620-1634.
- [31] <http://antigo.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>, 01/12/2018.
- [32] <https://www.epa.gov/safepestcontrol/search-registered-pesticide-products>, 29/11/2020.
- [33] INMETRO, DOQ-CGCRE-008, 2020, [http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc\\_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio](http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio)
- [34] L. Konermann, E. Ahadi, A.D. Rodriguez, S. Vahidi, Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization, *Anal. Chem.*, 85 (2013) 2-9.
- [35] D.J. Weston, Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas, *Analyst*, 135 (2010) 661-668.
- [36] P. Kebarle, L. Tang, FROM IONS IN SOLUTION TO IONS IN THE GAS-PHASE - THE MECHANISM OF ELECTROSPRAY MASS-SPECTROMETRY, *Anal. Chem.*, 65 (1993) A972-A986.
- [37] S.J. Gaskell, Electrospray: Principles and practice, *Journal of Mass Spectrometry*, 32 (1997) 677-688.
- [38] P. Kebarle, A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 35 (2000) 804-817.
- [39] P. Kebarle, U.H. Verkerk, ELECTROSPRAY: FROM IONS IN SOLUTION TO IONS IN THE GAS PHASE, WHAT WE KNOW NOW, *Mass Spectrometry Reviews*, 28 (2009) 898-917.
- [40] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta*, 115 (2013) 104-122.
- [41] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3929-3937.
- [42] H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglioni, A. Cappiello, AN OVERVIEW OF MATRIX EFFECTS IN LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY, *Mass Spectrometry Reviews*, 30 (2011) 491-509.



- [43] C.Y. Liu, K. Wan, J.X. Huang, Y.C. Wang, F.H. Wang, Behavior of mixed formulation of metalaxyl and dimethomorph in grape and soil under field conditions, *Ecotox. Environ. Safe.*, 84 (2012) 112-116.
- [44] B. Mayer-Helm, L. Hofbauer, J. Pani, Different responses of E:Z-isomers of pesticides in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 45 (2010) 715-721.
- [45] B.J. Konwick, A.W. Garrison, J.K. Avants, A.T. Fisk, Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicology*, 80 (2006) 372-381.

## Anexo 1. Curriculum Vitae

### Sumario

EDUARDO NORIYUKI SAKUMA SHIBATA é bacharel em Química pela Universidade de São Paulo (2014). Durante a graduação (2011), ele estagiou sob orientação do professor Prof. Dr. Rubens Cesar Lopes Figueira do Instituto de Oceanografia da USP na determinação de metais pesados por ICP-OES em testemunhos coletados no estuário do rio Caravelas (BA – Brasil). Além disso, ele tem experiência no desenvolvimento de métodos de separação baseados cromatográficos como HPLC, UPLC e em espectrometria de massas aplicados na detecção de pesticidas em alimentos. Ele lê, compreende, fala e escreve razoavelmente japonês. Fala e compreende pouco inglês e lê e escreve satisfatoriamente em inglês.

Endereço do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2711861839654993>

### Educacional

(2018) minicurso: HPLC - Teoria Básica e Prática (30 horas), Universidade de São Paulo, SP, Brasil

(2014) Superior: Bacharel em Química, Universidade de São Paulo, SP, Brasil

(2005) Ensino Médio: ETEC Getúlio Vargas, São Paulo, SP, Brasil.

### Atividade extracurriculares

(Abril/2016 a julho/2017) Plantonista de Química no colégio Poliedro Sociedade LTDA

(Agosto/2012 a agosto/2017) Plantonista de Química no Cursinho Preparatório Hexag

### Trabalhos publicados em congressos

Eduardo N. S. Shibata, Claudimir L. do Lago, Daniela Daniel, “Pesticide multiresidue determination in strawberries sold in São Paulo city by QuEChERS and LC-MS/MS”. LAPRW: Food and Environment, 2019, Brazil.

Daniela Daniel, Eduardo N. S. Shibata, Claudimir L. do Lago. “Determinação multiresíduos de pesticidas em amostra de morango por QuEChERS e LC-MS/MS”. 19º ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica e 7º CIAQA – Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2018 Caldas Novas, GO.