



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ÁLVARO VIEIRA DOS SANTOS

**USO DO MÉTODO QUECHERS (VERSÃO CEN) MODIFICADO
NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM
TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA/ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

***USE OF THE QUECHERS METHOD (CEN VERSION) MODIFIED
IN THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN
TOMATOES (*Solanum lycopersicum* L.) BY LIQUID
CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY***





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ÁLVARO VIEIRA DOS SANTOS

**USO DO MÉTODO QUECHERS (VERSÃO CEN) MODIFICADO NA
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM TOMATE
(*Solanum lycopersicum* L.) POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA/ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação de Mestrado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Química, da Universidade Federal de
Sergipe, para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Navickiene

Coorientador: Dr. Luis Fabrício Santana Santos

***USE OF THE QUECHERS METHOD (CEN VERSION) MODIFIED IN THE
DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN TOMATOES (*Solanum
lycopersicum* L.) BY LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS
SPECTROMETRY***

*Master's Thesis presented to the
Graduate Program in Chemistry,
Federal University of Sergipe, to obtain
the title of Master in Chemistry.*



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S237u Santos, Álvaro Vieira dos
 Uso do método QuEChERS (versão cen) modificado na
determinação de resíduos de pesticidas em tomate (*Solanum
lycopersicum* L.) por cromatografia líquida/espectrometria de
massas = Use of the QuEChERS method (cen version)
modified in the determination of pesticide residues in
tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) by liquid
chromatography/mass spectometry / Álvaro Vieira dos Santos
; orientador Sandro Navickiene. – São Cristóvão, SE, 2021.
95 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade
Federal de Sergipe, 2021.

1. Química. 2. Tomate. 3. Pesticidas. I. Navickiene, Sandro.
II. Título.

CDU 543.54:635.64



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Alvaro Vieira dos Santos apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 29/10/2021.

Prof. Dr. Sandro Navickiene
Departamento de Química - UFS

Prof.ª Dr.ª Lisiane dos Santos Freitas
Departamento de Química- UFS

Prof. Dr. Jemmyson Romário de Jesus
Departamento de Química - UFS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Deus que creio por toda força durante todo esse processo e a oportunidade única e singular que foi. Sei também que minha mãe Nossa Senhora sempre esteve ao meu lado cobrindo-me com o teu manto nas horas mais difíceis.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Sandro Navickiene por sua incrível orientação, paciência sempre que eu aparecia em sua sala, dedicação, cuidado com todos os orientando e disposição a todo momento. Só confirmam o profissional excelente que é sem deixar nenhuma margem para dúvida. Tenho certeza de que lembrarei de todos os valiosos ensinamentos até meu último dia de vida.

Também agradeço ao Dr. Luis Fabrício Santana Santos, o qual esteve comigo dia após dia durante todo esse processo. Tamanha paciência para ter me orientado e sempre mostrando o lado lógico das coisas. Um exímio profissional que estimo imensamente e sei posso aprender muito mais com seus ensinamentos.

Agradeço a minha família que sempre me deu suporte para trilhar esse destino. Sei que seria muito mais difícil sem a presença deles.

Lembro também, aqui, dos meus estimados amigos que fiz durante esse processo. Maria Danielly e Lucas Lima: tão pouco tempo passamos juntos, mas tenho-os não só como colegas, mas verdadeiros amigos que quero levá-los para sempre perto de mim. A Alysso por me acolher com o coração imenso e com ótimas comidas.

Aproveito também para agradecer Miliana, a IC que tem uma vasta e imensa experiência e pôde me auxiliar desde o início até final do curso. Estimo agradecimentos também para Michael, o qual se tornou bastante especial e alguém que admiro imensamente.

Agradeço também aos amigos que fortaleceram os laços comigo agora no finzinho do curso como Pricilia e Roseane, vocês são incríveis.

E por fim, mas de tamanha importância também, agradeço aos amigos externos à UFS que me incentivaram, apoiaram e ajudaram inconcebivelmente. Pessoal da banda, amigos de jogatina, meu grupo Sódio, a todos: OBRIGADO POR TUDO!

À Universidade Federal de Sergipe, o Departamento de Química, o Programa de Pós-Graduação em Química e o Centro de Laboratórios de Química Multiusuários pelo suporte administrativo e estrutural para o desenvolvimento do projeto.

RESUMO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma hortaliça classificada de hortaliça-fruto, que é muito suscetível ao ataque de pragas. As formulações de pesticidas são aplicadas para controlar agentes nocivos que possam causar danos a cultura. O presente trabalho objetiva o desenvolvimento um método de extração por QuEChERS para a determinação de resíduos de pesticidas em tomate e análise pela técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Foram realizadas otimizações das condições instrumentais e do procedimento de extração a fim de analisar 18 pesticidas, sendo eles, esfenvalerato, abamectina, lufenurom, metomil, piraclostrobina, teflubenzurom, tiacloprido, tiofanato-metílico, carbaril, dimetoato, pirimicarbe, malationa, flutriafol, bromuconazol, deltametrina, azoxistrobina e tiametoxam. Os analitos foram analisados por cromatografia no modo reverso, utilizando uma fase estacionária C18 e fase móvel constituída por MeOH:Água com 5 mM de formiato de amônio. O conjunto de analitos apresentaram melhor resposta utilizando a ionização por Electrospray. No procedimento QuEChERS foram testadas diferentes quantidades de sais, sendo que a quantidade de 1,62 g apresentou resultados mais consistentes com valores de recuperação médios de $87\pm 14\%$ com os analitos na concentração de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para o clean-up da amostra foram avaliados adsorventes C18, Florisil, Alumina Neutra, Biocarvão (BC-500), Carvão Ativado e Sílica, no qual o Florisil mostrou melhor desempenho. Também foi avaliado a quantidade de adsorventes presentes na etapa do *clean-up*, utilizando 450 mg Biocarvão (BC-500) com C18, C18, Florisil, Alumina e Sílica. Verificou-se também o desempenho entre duas quantidades de adsorventes: 150 mg e 450 mg de Florisil. Foi percebido que o método se mantém efetivo mesmo utilizando uma quantidade menor de adsorvente, utilizando assim o 150 mg de Florisil como adsorvente da etapa de clean-up do método. Também foi avaliado a eficiência do processo de diluição do extrato com a finalidade de redução de efeito matriz, entretanto os ensaios não apresentaram eficácia significativa. O método foi validado e aplicado em amostras de tomates comercializados em São Cristóvão/SE, as quais não apresentaram resíduos de pesticida.

Palavras-chave. *Solanum lycopersicum* L. Tomate. Pesticidas. QuEChERS. LC-MS.

ABSTRACT

Tomato (Solanum lycopersicum L.) is a vegetable classified as vegetable-fruit, which is highly susceptible to the attack of pests. Ergo, formulations of pesticides are applied to control pests that can cause harm to the crop. Therefore, this work aims to develop a method of extraction through QuEChERS for pest residue determination in tomatoes and the analysis through the technique of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Optimizations of instrumental conditions and of the extraction procedure were carried out to analyze 18 pesticides, namely esfenvalerate, abamectin, lufenuron, methomyl, pyraclostrobin, teflubenzuron, thiacloprid, thiophanate-methyl, carbaryl, dimethoate, pirimicarb, malathion, flutriafol, bromuconazole, deltamethrin, azoxystrobin, and thiamethoxam. The analytes were studied through reversed-phase chromatography, using a stationary phase C18 and mobile phase composed by MeOH:Water with 5 mM of ammonium formate. The set of analyses showed better response using electrospray ionization. In the QuEChERS procedure, different amounts of salts were tested, and the amount of 1.62 g presented more consistent results with mean recovery values of $87\pm 14\%$ with analytes at the concentration of $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$. After that, possible adsorbents for clean-up were evaluated using C18, Florisil, Alumina Neutra, Biochar, Activated Carbon and Silica, in which Florisil showed better performance. We also evaluated the amount of adsorbents present in the dSPE stage, using 450 mg Biochar with C18, C18, Florisil, Alumina and Silica. Florisil also stood out with better recovery intervals between 70%-120%. Aiming at a lower expenditure of reagents maintaining a good efficiency, it was verified the performance between two amounts of adsorbents: 150 mg and 450 mg of Florisil. It was perceived that the method remains effective even using a smaller amount of adsorbent. The pertinence of the clean-up was also evaluated and thus apply a dilution process after extraction. However, dilution proved to be ineffective and with strong matrix effect. The method was valid and applied in tomato samples sold in São Cristóvão/SE, which did not present pesticide residues.

Keywords: *Solanum lycopersicum L. tomato. Pesticides. QuEChERS. LC-MS.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas moleculares, nomes comerciais e científicos dos pesticidas em estudo.....	23
Figura 2. Cromatograma no modo SCAN da solução padrão conjunta dos pesticidas a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, utilizando 0,1% de ácido fórmico como aditivo da fase móvel. Considerar as condições de análise descritas na Tabela 5.....	48
Figura 3. Cromatograma no modo SCAN da solução padrão conjunta dos pesticidas a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, utilizando 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio como aditivo da fase móvel. Considerar as condições de análise descritas na Tabela 5.....	49
Figura 4. Cromatograma no modo SCAN da solução conjunta dos pesticidas a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando acetonitrila com 0,1% v/v de ácido fórmico como fase móvel. Considerar as condições de análise descritas na Tabela 5.	52
Figura 5. Cromatograma obtido a partir da análise de uma solução conjunta dos pesticidas a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3) com a fonte APCI utilizando MeOH:Água com 0,1% Ácido Fórmico.....	54
Figura 6. Cromatograma da Abamectina na fonte APCI (A1) e na fonte ESI (A2). Solução feita em metanol, concentração dos analitos em $1 \mu\text{g mL}^{-1}$	55
Figura 7. Cromatograma obtido com o gradiente otimizado da solução conjunta dos analitos utilizando MeOH:H ₂ O com 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio no modo SIM. Solução conjunta na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Considerar as condições de análise descritas na Tabela 5.	57
Figura 8. Valores percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas na concentração de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ em tomate utilizando o procedimento BS EN 15662:2008 variando a quantidade de sais.	61
Figura 9. Aspecto visual dos extratos obtidos utilizando 37,6 mg de sulfato de magnésio e 6,2 mg de carvão ativado e 6,2 mg de Biocarvão.	64
Figura 10. Cromatogramas referentes as análises das amostras sem fortificação utilizando 1,625 g dos sais CEN e com modificações no clean-up, sendo 1) sem dSPE, 2) Carvão Ativado, 3) Sílica, 4) Alumina Neutra, 5) C18, 6) Biocarvão e 7) Florisil.....	66
Figura 11. Avaliação da eficiência de limpeza utilizando 450 mg dos adsorventes, sendo 1) Florisil, 2) C18, 3) C18 + Biocarvão, 4) Sílica e 5) Alumina neutra + 150 mg de sulfato de magnésio.....	67
Figura 12. Cromatogramas obtidos das amostras de tomate sem fortificação utilizando 450 mg de 1) Florisil, 2) C18 e 3) C18 + Biocarvão.....	68
Figura 13. Comparação dos cromatogramas das amostras de tomate em branco no estudo da eficiência do processo de clean-up utilizando 1) 150 mg de Florisil + 150 mg de sulfato de magnésio e 2) 450 mg de Florisil + 150 mg de sulfato de magnésio	69

Figura 14. Extrato de tomates obtido utilizando a diluição de 10x (a) e extrato obtido utilizando 150 mg de Florisil (b).	71
Figura 15. Cromatogramas de amostra em branco adquirido no método a) utilizando 150 mg de Florisil e b) utilizando a diluição com fator de 10x;.....	71
Figura 16. Cromatogramas da análise em (a) modo SCAN e (b) modo SIM das amostras de tomates e c) Solução conjunta dos padrões estudados em metanol. Considerar as condições cromatográficas da Tabela 5.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Explicação geral dos sintomas causados pelos principais agentes patológicos na cultura do tomate.....	18
Tabela 2. Informações gerais sobre os pesticidas em estudo.	21
Tabela 3. Características físico-químicas dos pesticidas em estudo.....	22
Tabela 4. Procedimentos padrão propostos pela CEN Methods e AOAC Methods [35].....	29
Tabela 5. Condições de análise do LC/MS para os analitos em estudo.	44
Tabela 6. Picos molecular para a determinação de cada compostos usando MeOH:H ₂ O ambos com 0,1% de ácido fórmico como fase móvel.	47
Tabela 7. Área dos analitos em ácido fórmico e em formiato de amônio e porcentagem da área do MeOH:ácido formiato de amônia em relação as áreas do MeOH:Ácido Fórmico.....	50
Tabela 8. Comparação das áreas (média) obtidas na avaliação da vazão da fase móvel.	58
Tabela 9. Quantidade individuais de sais utilizados em cada teste utilizando o método CEN.	60
Tabela 10. Valores de Recuperações e Desvio Padrão Relativo (n=3) obtidos nos ensaios de recuperação com o nível de fortificação em 0,3 µg mL ⁻¹ utilizando duas quantidades de sais.....	62
Tabela 11. Avaliação da eficiência dos adsorventes comparando as recuperações (%) e desvio padrão relativo (n=3) utilizando 6,2 mg dos adsorventes na etapa do clean-up.....	65
Tabela 12. Valores de recuperação, desvio padrão e efeito matriz referentes ao método utilizando a diluição após a etapa da extração em amostra de tomate fortificados na concentração de 100 µg L ⁻¹ do método.	72
Tabela 13. Curvas analíticas para os pesticidas em metanol (n=3) com intervalo de concentração, coeficiente de determinação e equação da reta.....	74
Tabela 14. Intervalos de concentração, equações da reta, coeficientes de determinação e razão dos coeficientes angulares para os pesticidas estudados.	75
Tabela 15. Resultados de recuperação média (%) e desvios padrão relativos para os três níveis de concentração testados (n=3);.....	76
Tabela 16. Valores percentuais de recuperação e desvio padrão relativo (n=5) do método otimizado para os ensaios do interdica e intradica com o nível de fortificação em 30 µg L ⁻¹	78
Tabela 17. Valores do limite de quantificação (LOQ) para o método otimizado em ug mL ⁻¹	79

Tabela 18. Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de pesticidas em matrizes de tomate	81
---	----

LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos (<i>Association of analytical chemists</i>)
APCI	Ionização Química sob Pressão Atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18	Octadecilsilano
CEN	Comitê Europeu de Padronização
d-SPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva (<i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	Ionização por Electrospray (<i>Electrospray Interface</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IHC	Conferência Internacional sobre Harmonização (<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MeOH	Metanol
NaOAC	Acetato de Sódio
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRM	Monitoramento de Múltiplas Reações (<i>Multiple-Reaction Monitoring</i>)
MS	Espectrometria de Massa (<i>Mass Spectrometry</i>)
SIM	Monitoramento de Íon Selecionado (<i>Selected Ion Monitoring</i>)
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto, Seguro (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i>)
PSA	Amina Primária Secundária (<i>Primary Secondary Amine</i>)
ESI-MS/MS	Electrospray-Espectrometria de massas em modo tandem

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Tomate	17
1.2	Pesticidas	19
1.3	QuEChERS	25
1.3.1	Etapa de extração (Particionamento e efeito salting-out)	27
1.3.2	Etapa de limpeza (Clean-up)	29
1.4	Cromatografia Líquida de acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS)	31
1.5	Validação do Método Analítico	32
1.5.1	Linearidade e sensibilidade	33
1.5.2	Seletividade	34
1.5.3	Exatidão e Precisão	35
1.5.4	Limites de Quantificação	35
2	REVISÃO DA LITERATURA	37
3	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo Geral	41
3.2	Objetivos Específicos	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	Materiais e Reagentes	42
4.2	Padrões Analíticos	42
4.3	Equipamentos	42
4.4	Obtenção e preparo da amostra	43
4.5	Preparo das soluções padrão dos pesticidas	43
4.6	Condições instrumentais de análise	44
4.7	Procedimento de extração QuEChERS	45
4.8	Limpeza de Materiais	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Obtenção das condições instrumentais de análise	46
5.1.1	Avaliação da resposta dos analitos a técnica instrumental	46
5.1.2	Avaliação do aditivo da fase móvel	47
5.1.3	Avaliação da composição da fase móvel	51
5.1.4	Avaliação da Fonte de ionização	53
5.1.5	Desenvolvimento do método LC/MS no modo de monitoramento de íons selecionado (SIM) e otimização do gradiente	56

5.1.6 Avaliação da Vazão da Fase Móvel.....	57
5.3 Otimização do processo de extração QuEChERS	59
5.3.1 Avaliação da quantidade de sais da etapa de extração.....	59
5.4 Avaliação do Procedimento de Clean-up (α-SPE).....	63
5.4.1 Tipo de adsorvente para o clean-up do extrato	63
5.4.2 Avaliação da quantidade de adsorventes	66
5.4.3 Avaliação da diluição do extrato	70
5.5 Validação do Método Analítico	72
5.5.1 Linearidade e Sensibilidade.....	73
5.6.2 Seletividade (Efeito Matriz)	74
5.6.3 Precisão e Exatidão	76
5.6.4 Limite de Quantificação (LOQ)	79
5.6 Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de pesticidas em tomates	80
5.7 Aplicação em amostras de tomates comercial	82
6 CONCLUSÕES	85
7 PERSPECTIVAS DO TRABALHO	87
8 REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

As hortaliças são vegetais cultivados em hortas e desempenham um papel importante na alimentação humana. O tomate é uma hortaliça delicada e com textura macia que contém um alto teor de água em sua composição, em torno de 90-95% [1]. Em geral possui um baixo teor calórico, o que ajuda a compor uma alimentação mais regrada e adequada, provendo compostos, como vitaminas, minerais e outros que contribuem para o bem da saúde humana.

A cultura do tomate tem grande influência na agricultura brasileira e é importante tanto no espaço familiar quanto para no setor da agroindústria do país, segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). O tomate é bastante presente na economia brasileira. Para tanto, a Embrapa desenvolveu o programa TOMATEC (Tomate em Cultivo Sustentável) em 2005 que tem como objetivo o melhoramento do cultivo do tomate de mesa por meio de boas práticas agrícolas. No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), são mais de 55 mil hectares com cultura de tomate, sendo produzidos mais de 3,5 milhões de toneladas. Essa produção representa um rendimento médio de 69 mil kg/ha. Em Sergipe, existem 459 pequenos produtores que estão envolvidos na cultura do tomate, os quais produziram aproximadamente 110 toneladas do fruto por mês no ano de 2017, segundo IBGE. A região central do estado é a que retém grande parte desses pequenos produtores, os quais optam por trabalhar com um sistema orgânico com o intuito de atribuir maior valor ao produto sem o uso de pesticidas [2,3,4].

O cultivo de hortaliças necessita de bastante cuidado, visto que muitos fatores podem influenciar e afetar no desenvolvimento do fruto, como o clima [5] e a quantidade de água na irrigação [6], por exemplo. Além desses fatores, as hortaliças também são bastante suscetíveis ao ataque de pragas que podem causar prejuízos a cultura. Essa suscetibilidade à ação de organismos nocivos ao plantio instiga os agricultores a fazerem uso de compostos que controlem a ação das destas pragas. O uso de pesticidas pode ser empregado a fim de prevenir as culturas da ação danosa dessas pragas.

Por esse motivo as organizações internacionais definiram normas para limitar a quantidade permitida de resíduos desses compostos. Para avaliar essa quantidade permitida foi estabelecido o Limite Máximo de Resíduos (LMR) para pesticidas em alimentos. Devido a importância de monitorar a quantidade desses compostos nas matrizes alimentares, busca-se o desenvolvimento de metodologias analíticas que tenham eficiência, que sejam de baixo custo e simples para serem aplicadas na avaliação dos pesticidas em alimentos [7].

O método de extração QuEChERS é amplamente aplicado em análises de pesticidas em alimentos. Resumidamente, o procedimento conta com duas etapas. Primeiramente a extração com solvente e particionamento das fases com sais. Logo após há o *clean-up* do extrato utilizando a d -SPE. Ao comparar com outros métodos, QuEChERS se destaca na simplicidade do procedimento, da rapidez e ainda oferece ótimos valores de recuperação para a extração dos analitos. Além disso, há uma boa compatibilidade com as técnicas cromatográficas, seja ela líquida ou gasosa [8].

Para fazer a determinação desses compostos em matrizes complexas como alimentos, é utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas, a qual apresenta capacidade de separação, qualificação e quantificação satisfatória para esses compostos presentes nas matrizes. Em suma, o presente trabalho visa o desenvolvimento de um método QuEChERS associada a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para a determinação de resíduos de pesticidas de diferentes classes químicas em tomate comercializados em São Cristóvão.

1.1 Tomate

O tomate (*Solanum lycopersicum L.*) é uma hortaliça classificada como hortaliça-fruto, assim como pimentões, melancias e quiabo. Apresenta baixo teor calórico, é rico em sódio, potássio, fósforo, ferro e vitaminas A e B. Desta forma, o fruto tem grande importância na dieta humana. De modo geral, esse fruto contém uma composição bastante rica em compostos que desempenham funções que favorecem um bom funcionamento do metabolismo humano. Logo, passa a ser fonte de substâncias que favorece o bom estado da saúde humana, como os carotenoides, sendo eles o licopeno, fitoeno, luteína, vitaminas, como a vitamina C entre outros. Dentre estas destaca-se o licopeno, um carotenoide encontrado em grande abundância nos tomates e que é responsável pela cor característica dos tomates [9,10, 11].

Há uma grande variedade do fruto, contando com uma variedade de formato e cores, podendo ser tomate cereja, sendo pequenos e com coloração vermelha a amarela; tomate santa cruz, sendo esse o mais conhecido no mercado, com o preço mais baixo e ligeiramente ácido; italiano, frutos mais compridos e com coloração mais intensa; salada, que apresenta pouca acidez, com coloração vermelha ou rosada [12,13].

No mundo, a China lidera a produção de tomate com aproximadamente 56,5 milhões de toneladas no ano de 2016. O Brasil ficava em nono lugar com aproximadamente 4,2 milhões de toneladas. Esse percentual se manteve no Brasil, sendo registrado em 2019 uma queda para 3,9 milhões, segundo o IBGE. No Nordeste o sistema de plantio predominante é o sistema orgânico de produção, o qual os produtores são cultivados sem uso de defensivo agrícola. Em Sergipe, em 2019, foram produzidas 3,6 mil toneladas, representando 10% da produção brasileira [14].

Entretanto, o cultivo do tomateiro (*Lycopersicum esculentum*) no modo de cultivo orgânico é um desafio. Isso porque a plantação de tomate é bastante suscetível ao ataque de fungos e insetos que, ao se alojarem no fruto ou na planta, causam danos e perda econômica que pode ser significativa. Normalmente os grandes responsáveis por prejuízos na tomaticultura são os fungos, os quais demandam 15% dos custos para o combate com fungicidas

[15].

As principais doenças foliares e de podridões de frutos são mancha-bacteriana ouurchadeira (*Xanthomonas capestris pv. vesicatoria*), pinta-bacteriana (*Pseudomonas syringae pv. tomato*), talo-oco ou podridão mole (*Erwinia spp.*), pinta-preta (*Alternaria solani*) e requeima ou mela (*Phytophthora infestans*) [16]. Os sintomas de cada uma delas na Tabela 1.

Tabela 1. Explicação geral dos sintomas causados pelos principais agentes patológicos na cultura do tomate.

Doença (Organismo Causador)	Sintomas
Mancha-bacteriana ou Murchadeira (<i>Xanthomonas capestris pv. vesicatoria</i>)	Manifesta de início nas folhas mais velhas como manchas marrons irregulares podendo apresentar perfurações no centro.
Pinta-bacteriana (<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>)	Os sintomas são primeiramente observados nas folhas mais velhas, sob a forma de manchas arredondadas de Coloração marrom-escura
Talo-oco ou Podridão mole (<i>Erwinia spp.</i>)	Amarelecimento da planta e murcha total ou parcial. Apresentam escurecimento externo no caule como resultado do apodrecimento dos tecidos próximos.
Pinta-preta (<i>Alternaria solani</i>)	Manifesta a partir e inóculo no solo ou semente infestada. Lesões escuras no caule e podem resultar na morte das plantas ainda jovens. Mancha circulares nas folhas mais velhas, podendo ser delimitadas ou não por um halo amarelado. São formados anéis à medida que as lesões crescem na área necrótica.
Requeima ou Mela (<i>Phytophthora infestans</i>)	Se inicia com manchas grandes de aparência úmida. As lesões são grandes e podem secar todo o folíolo, aparentando uma "queima" nas plantas.

Fonte. LOPES, 2005 [15].

1.2 Pesticidas

Pesticidas são produtos químicos sintéticos utilizados no combate de pragas nocivas para a plantação [17]. Eles podem ser classificados de diversas formas, como o tipo de praga alvo: herbicida pode ser usado como regulador de crescimento de plantas, bactericidas para defensivos que atuam contra bactérias que são prejudiciais a integridade do plantio, acaricidas quando combatem ácaros, fungicidas no controle de fungos e inseticidas para o controle de insetos etc. [18,19,20].

Além desse tipo de classificação, os pesticidas podem ser classificados de acordo com a composição: botânicos quando a composição é a base de nicotina, piretrina e outros, orgânicos quando contêm na estrutura molecular grupos carbamatos, clorados, clorofosforados entre outros, e inorgânicos, quando na sua composição contêm ferro, arsênio, cobre, zinco e outros [17].

O uso indiscriminado dessas formulações pode acarretar problemas de intoxicação aos consumidores daquela cultura. Esses problemas são causados pela presença desses compostos. Desse modo, a necessidade de monitorar tais resíduos motivou os órgãos governamentais a elaborar regulamentações para normatizar a aplicação dos pesticidas [21].

Os limites máximos de resíduos (LMR) e a ingestão diária aceitável (IDA) são dois parâmetros que determinam a quantidade máxima de resíduos nos alimentos e o quanto podem ser ingeridos por dia, respectivamente [22]. Esses limites são importantes, pois estabelecem o máximo de resíduos de pesticidas permitidos em cada cultura. Essas determinações são estabelecidas por agências regulamentadoras no mundo. Tais órgãos são importantes para monitorar e assegurar a qualidade dos alimentos. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) é uma dessas organizações que tem ações por todo o mundo e elaborou programas de desenvolvimento agrícola. Em junho de 2013 foi aprovado código de Conduta Internacional sobre Gerenciamento de Pesticidas que prevê normas que servem como referência para a prática com pesticidas. Além da FAO, a União Europeia também estabeleceu normativas para controle de qualidade de alimentos voltado para o monitoramento de resíduos de pesticidas, por meio do guia de Validação de

Métodos e Procedimentos de Controle de Qualidade para Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos [23,24].

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável pela regulamentação do monitoramento desde o manuseio até a fiscalização de possíveis resíduos desses pesticidas a fim de impedir que haja a contaminação da população por conta da alta concentração nos alimentos [25,26]. A ANVISA disponibiliza e regulariza os LMR para os alimentos por meio de relatórios anuais referente ao Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Para o tomate, o relatório de 2019 avaliou mais de 300 amostras de tomate, nas quais 39 amostras não apresentaram resíduos de pesticidas e 167 amostras apresentaram resíduos inferiores ao limite estabelecido. Nesta versão do relatório, a ANVISA avaliou 151 pesticidas nas amostras, detectando 45, sendo os mais recorrentes o imidacloprido, a fenpropatrina e o carbedazim [7].

Com base no relatório PARA disponibilizado pela ANVISA e a própria base de dados foram utilizados na escolha dos analitos. Sendo assim, 18 pesticidas foram selecionados com o intuito de abranger diferentes classes permitidas pela ANVISA [27]. Além disso, alguns pesticidas foram selecionados por aparecerem de forma recorrente em alguns trabalhos analisados (Tabela 2). As propriedades físico-químicas destes pesticidas estão disponíveis na Tabela 3 e as estruturas moleculares na Figura 1.

Tabela 2. Informações gerais sobre os pesticidas em estudo.

Princípio Ativo	Grupo Químico	Modo de ação	Toxicidade	LMR (mg Kg ⁻¹)
Carbaril	Carbamato	Inseticida	II	0,1
Bromuconazol	Triazol	Fungicida	III	0,1
Dimetoato	Organofosforado	Inseticida, Acaricida	II	1,0
Malationa	Organofosforado	Inseticida	III	3,0
Pirimicarbe	Carbamato	Inseticida	II	1,0
Flutriafol	Triazol	Fungicida	-	0,3
Azoxistrobina	Estrobilurina	Fungicida	*	0,5
Deltametrina	Piretróide	Inseticida	*	0,03
Tiametoxam	Neonicotinóide	Inseticida	*	1,0
Abamectina	Avermectina	Acaricida Inseticida	*	0,01
Acetamiprido	Neocotinóide	Inseticida	*	0,5
Esfenvalerato	Piretróide	Inseticida	II	0,05
Lufenuron	Benzoiluréia	Inseticida Acaricida	*	0,5
Metomil	Metilcarbamato de oxima	Inseticida Acaricida	*	1
Piraclostrobina	Estrobilurina	Fungicida	*	0,2
Teflubenzuron	Benzoiluréia	Inseticida	*	0,1
Tiacloprido	Neocotinóide	Inseticida	II	0,1
Tiofanato-Metílico	Benzimidazol	Fungicida	*	0,2

Fonte: IUPAC PPDB; ANVISA; [28,29].

I- Extremamente Tóxico, II- Altamente Tóxico, III- Moderadamente Tóxico, IV- Pouco tóxico.

* específica para cada produto, conforme art. 38 da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. / ND – Não determinado

Tabela 3. Características físico-químicas dos pesticidas em estudo.

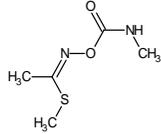
Princípio Ativo	MM (g mol ⁻¹)	Fórmula molecular	Solubilidade		pKa	Log K _{ow}
			Água (mg L ⁻¹)	Solvente (mg L ⁻¹)		
Flutriafol	301,29	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O	95	Metanol (1,15x10 ⁵)	2,3	2,3
Carbaril	201,22	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	120	Metanol (8,75x10 ⁴)	10,4	2,36
Dimetoato	229,26	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	2,59x10 ⁴	Metanol (1,59x10 ⁶)	NA	0,75
Deltametrina	505,2	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	0,0002	Metanol (8,1x10 ³)	NA	4,6
Bromuconazol	377,06	C ₁₃ H ₁₂ BrCl ₂ N ₃ O	48,3	Acetona (269,2)	2,75	3,24
Malationa	330,36	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	1,48	Metanol (2,5x10 ⁵)	NA	2,75
Azoxistrobina	403,4	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	6,7	Metanol (2x10 ⁴)	1,07	2,5
Tiometoxam	291,71	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	4,1x10 ³	Hexano (1)	8,35	-0,13
Abamectina	873,1	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄	-	-	-	3,8
Acetamiprido	222,67	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	2,95 x 10 ³	Hexano (6,54)	0,7	0,8
Esfenvalerato	419,1	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	0,001	Metanol (8,2x10 ⁵)	NA	6,24
Lufenuron	511,16	C ₁₇ H ₈ Cl ₂ F ₈ N ₂ O ₃	0,046	Hexano (100)	10,2	5,12
Metomil	162,21	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	5,5x10 ⁴	Metanol (1,0x10 ⁷)	NA	0,09
Teflubenzuron	381,11	C ₁₄ H ₆ Cl ₂ F ₄ N ₂ O ₂	0,01	Metanol (1060)	9,2	4,3
Tiacloprido	252,72	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	184	Acetato de Etila	NA	1,26
Tiofanato-Metílico	342,39	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	18,5	Metanol (7,8x10 ³)	7,28	1,40
Piraclostrobina	387,82	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	1,9	Metanol (1,0x10 ⁵)	NA	3,99
Pirimicarbe	238,39	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	3,1x10 ³	Metanol (3,5x10 ⁶)	4,4	1,7

Fonte: IUPAC PPDB; ANVISA [28,29].

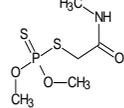
NA – Não aplicado (Não há dissociação)

Figura 1. Estruturas moleculares, nomes comerciais e científicos dos pesticidas em estudo.

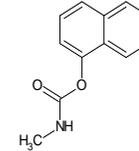
Metomil - Metil (1E)-N-(metilcarbamoiloxi) Etanimidotoato



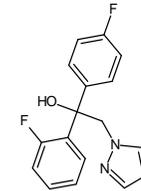
Dimetoato - O,O-dimetil S-fosforoditoato de metilcarbamoilmetil



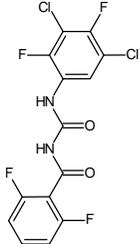
Carbaril - 1-naftil metil carbamato



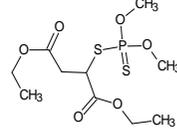
Flutriafol - 1- (2-fluorofenil) -1- (4-fluorofenil) -2- (1,2,4-triazol-1-il) etanol



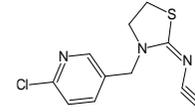
Teflubenzurom - N - [(3,5-dicloro-2,4-difluorofenil) carbamoil] -2,6-difluorobenzamida



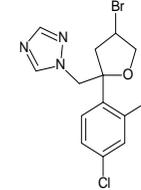
Malationa - succinato de dietil (dimetoxitiofosforil)y



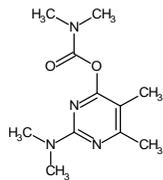
Tiacloprido - (Z)-3-(6-cloro-3-piridilmetil)-1,3-tiazolidin-2-ilidene(cianamida).



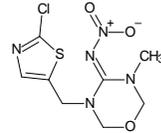
Bromuconazol - 1 - [[4-bromo-2- (2,4-diclorofenil) oxolan-2-il] metil] -1,2,4-triazol



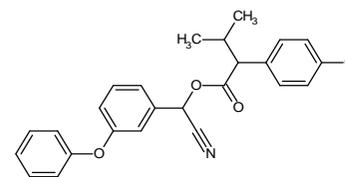
Pirimicarbe - [2- (dimetilamino) -5,6-dimetilpirimidin-4-il] N, N-dimetilcarbamato



Tiametoxam - 3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilidene(nitro)amina.



Esfenvalerato - [(S) -ciano- (3-fenoxifenil) metil] (2S) -2- (4-clorofenil) -3-metilbutanoato



Azoxistrobina - metil (E) -2- [2- [6- (2-cianofenoxi) pirimidin-4-il] oxifenil] -3-metoxiprop-2-enoato

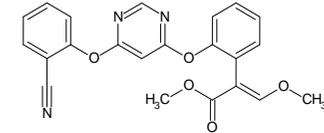
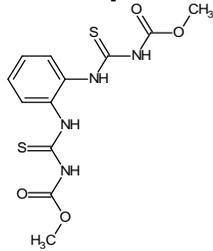
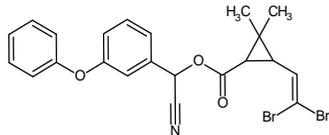


Figura 1. Continuação

Tiofanato-metilico - metil N - [[2-(metoxicarbonilcarbamotioilamino) fenil] carbamotioil] carbamato

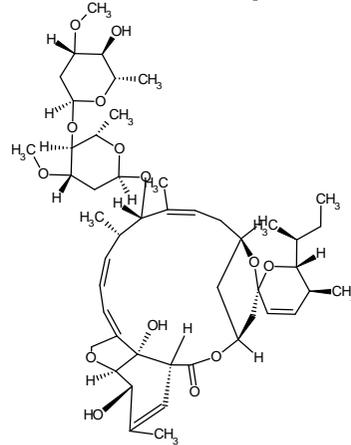


Deltametrina - [(S) -ciano- (3-fenoxifenil) metil] (1R, 3R) -3- (2,2-dibromoetenil) -2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilato

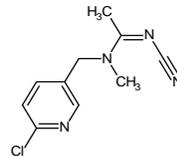


Fonte: ANVISA [28].

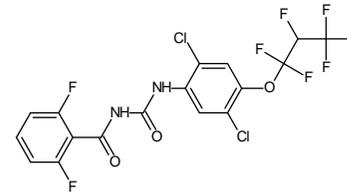
Abamectina - (1'R, 2R, 3S, 4'S, 6S, 8'R, 10'E, 12'S, 13'S, 14'E, 16'E, 20'R, 21'R, 24'S) -2 - [(2S) -butan-2-il] -21', 24'-di-hidroxi-12' - [(2R, 4S, 5S, 6S) -5 - [(2S, 4S, 5S, 6S) -5-hidroxi-4- metoxi-6-metiloxan-2-il] oxi-4-metoxi-6-metiloxan-2-il] oxi-3,11', 13', 22'-tetrametilespiro [2,3-dihidropiran-6,6'- 3,7,19-trioxatetraciclo [15.6.1.14,8.020,24] pentacosa-10,14,16,22-tetraeno] -2'-ona



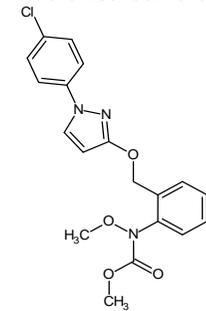
Acetamiprido - N - [(6-cloropiridin-3-il) metil] -N'-ciano-N-metiletanimidamida



Lufenurona - N-[[[2,5-dicloro-4- (1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi) fenil] carbamoil] -2,6-difluorobenzamida



Piraclostrobina - metil N- [2 - [[1- (4-clorofenil) pirazol-3-il] oximetil] fenil] -N-metoxicarbamato



A análise de pesticidas em matrizes alimentares é bastante difundida. Entretanto ainda requer métodos de extração rápidos, de fácil execução, com uma boa eficiência, uma vez que tais matrizes podem apresentar um grande número de compostos contaminantes. Desta maneira, essas matrizes são submetidas ao processo de extração QuEChERS, o qual se destaca pela simplicidade e boa eficiência para tais fins [8,28]

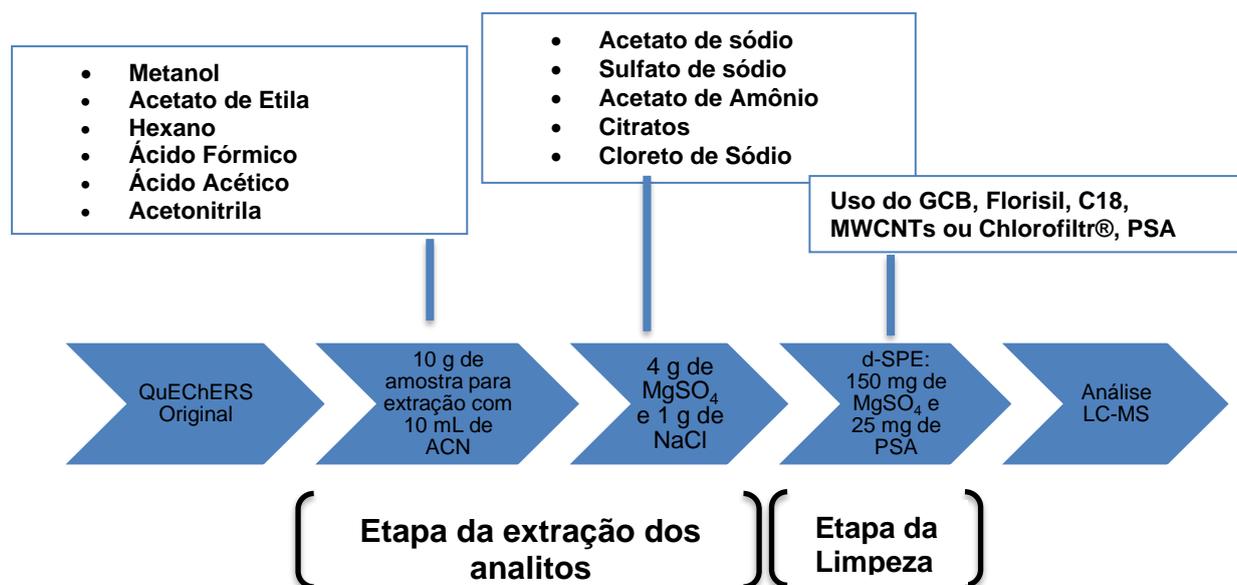
1.3 QuEChERS

Desenvolvido em 2003 por Anastassiades e colaboradores, QuEChERS, sigla que significa “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe” (Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto, Seguro) é um procedimento analítico de extração Sólido-Líquido muito eficiente para compostos como pesticidas em matrizes alimentares, água e solo [30]. Com desenvolvimento original para monitoramento de resíduos de pesticidas multiclasse em alimentos, o método QuEChERS original continua sendo modificado para a extração de uma ampla gama de pesticidas que variam de compostos polares a não polares em matrizes alimentares [28].

Diferente de outros métodos convencionais, QuEChERS tem um procedimento simples no sentido de ter poucas etapas e tempo de extração reduzido para facilitar a análise dos pesticidas [31]. Além disso, monitoramento de resíduos pesticidas em alimentos, o método QuEChERS tem sido empregado nas extrações de outros poluentes como metabólitos de parabenos e fármacos em lodo [32], plastificantes em amostras de peixes [33], alcanos em sedimentos [34] entre outros. Segundo Kim e colaboradores [35], a facilidade de analisar compostos tão diferentes é devido à compatibilidade das amostras preparadas com o mesmo solvente orgânico da fase móvel usada na cromatografia líquida. Isso se dá pela miscibilidade desse solvente, seja acetonitrila ou metanol, em relação a água.

De modo geral, o procedimento QuEChERS é simples, contando com 2 etapas principais: 1) extração sólido-líquido/particionamento com o efeito *salting out*, 2) etapa de limpeza d-SPE (Extração em fase sólida dispersiva) [36], como pode ser visto no Esquema 1.

Esquema 1. Método de QuEChERS com algumas possíveis modificações.



Fonte: Baseado de Rodriguez e colaboradores, 2017. [37]

GCB – Carbono grafitizado

PSA – Amina primária-secundária (N-Propiletlenodiaminossilano)

MWCNTs - Nanotubos de carbonos de paredes múltiplas

Assim como visto no Esquema 1, a primeira etapa do procedimento é a extração pelo solvente acetonitrila auxiliado por sais promovendo o efeito *salting-out*. Com relação ao solvente orgânico, a acetonitrila é o mais utilizado devido a sua elevada capacidade de extração de ampla variedade de compostos orgânicos sem a co-extração de possíveis interferentes [38]. Contudo é possível encontrar estudos com a utilização de outros solventes como metanol em conjunto com acetonitrila na etapa da extração, como relatado por Choochuay e colaboradores [39], acetonitrila com acetato de etila [40], hexano [41], acetonitrila acidificada com ácido fórmico [42] e com ácido acético [43]

Os sais desempenham um papel importante na etapa de extração, saturando o meio aquoso possibilitando a migração dos analitos para o solvente orgânico [38]. Originalmente, os sais empregados para o efeito *salting-out* são os sais sulfato de magnésio e o cloreto de sódio [30]. Contudo existem várias propostas para essa combinação de sais, como acetato de sódio (NaO_2CCH_3), sulfato de sódio (Na_2SO_4), acetato de amônio ($NH_4CH_3CO_2$), o sistema citrato de sódio tribásico di-hidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) e citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado ($C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$) [38].

A segunda etapa é constituída pela técnica de extração em fase sólida dispersiva na qual um adsorvente é adicionado no sistema para que interaja e remova os interferentes da solução e uma pequena alíquota seja retirada do sobrenadante contendo os analitos para a análise [44]. A proposta original é o mais utilizada com o adsorvente n-propiletenodiaminossilano (PSA) [30]. Entretanto, vários outros sorventes foram testados para substituir o PSA nas aplicações QuEChERS, como o C18, Carbono Grafitizado, Terra Diatomácea, Florisil, Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) etc [45, 38].

1.3.1 Etapa de extração (Particionamento e efeito salting-out)

Os solventes em QuEChERS têm papel fundamental na extração dos analitos. Alguns solventes se tornaram mais usuais na técnica QuEChERS, como a acetonitrila e metanol [36,38]. Assim, a extração se faz quando o solvente percola toda a estrutura da amostra, retirando os analitos da fase sólida para a fase líquida. Levando em consideração a miscibilidade da acetonitrila em água, há a formação de uma parte líquida em uma única fase, ocorrendo uma extração monofásica, como afirma Anastassiades e colaboradores [36]. Esse fato ainda é benéfico na extração por não co-eluir compostos lipofílicos junto com os analitos, tornando a seletividade do método mais elevada. Shabeer e colaboradores testaram a eficiência da acetonitrila quando comparada a outros solventes, como acetato de etila, relatando que os compostos lipofílicos presentes na amostra foram mais solúveis em solvente de caráter apolar, como o acetato de etila, do que em solvente de caráter mais polar, como a acetonitrila [45].

A acetonitrila apresenta melhores valores de recuperação quando é comparada a outros solventes extratores. No trabalho de Moraes e colaboradores, que avaliaram 13 pesticidas em pimentões, dentre eles tiametoxam, metomil, acefato e carbaril, demonstra a superioridade dos resultados do método com acetonitrila frente ao metanol, acetato de etila e acetona. Isso se dá pela polaridade dos solventes, no qual o acetato de etila não consegue extrair compostos mais polares, como acefato, por exemplo [46].

Para que a efetividade da extração seja a maior possível, é adotado o uso de sais secantes para: a) retirar o excesso de água e b) saturar a fase aquosa e forçar a migração dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica, a

acetonitrila. Quando um sal inorgânico é adicionado a uma mistura entre água e um solvente orgânico miscíveis ocorre uma separação do sistema monofásico (água + solvente) para um sistema bifásico, podendo ser chamado de separação de fase induzida por sal. Nesse sentido, o uso dos sais em QuEChERS são utilizados para formar esse sistema bifásico entre a água e a acetonitrila na etapa extratora, diminuindo a solubilidade na fase aquosa de substâncias parcialmente solúveis em solventes orgânicos e induzindo a precipitação dos compostos interferentes [47, 48].

O sulfato de magnésio é excelente na ação de particionamento de fases, uma vez que há uma alta capacidade de se ligar a grande quantidade de água remanescente, o que resulta na diminuição significativa de fase aquosa. Como afirmado por Kim e colaboradores [35], a reação de hidratação do sulfato de magnésio é exotérmica, atingindo a temperatura de 45 °C, aproximadamente. Essa temperatura pode favorecer a extração eficiente dos pesticidas não polares. Testes mostraram que a eficiência da partição é acrescida com o cloreto de sódio junto com o sulfato de magnésio, aumentando a efetividade na separação dos analitos e ter menos compostos interferentes co-extraídos [27,35].

Juntamente com os sais para o efeito *salting-out*, há a adição também de sais para formar um sistema tamponado a fim de prevenir a degradação de analitos dependentes do pH. Desta forma, é possível controlar a forma dos analitos de acordo com o pH do meio. Por exemplo, o tampão feito com o acetato estabiliza o pH da solução em 4,8, já o tampão citrato confere o pH do sistema em 5,5, aproximadamente. Esse conhecimento é útil para tentar prever o sistema que terá melhor recuperação, como no estudo feito por Lehotay e colaboradores [49], os quais verificaram que as recuperações de alguns pesticidas, dentre eles o Clorotalonil, foram superiores quando foi utilizado o tampão acetato. O tampão acetato foi adotado pela AOAC Methods e amplamente empregado nos Estados Unidos. O tampão citrato foi adotado pela CEN Methods para compor o procedimento padrão e estabelecido na Europa, Tabela 4.

Tabela 4. Procedimentos padrão propostos pela CEN Methods e AOAC Methods [35].

	Método CEN		Método AOAC	
Extração				
Quantidade de amostra	10 g		15 g	
Solvente	Acetonitrila	10 mL	Acetonitrila/Ác. Acético 1%	15 mL
Sais	MgSO ₄	4 g	MgSO ₄	6 g
	NaCl	1 g		
	Sais de Citrato ^a	1 g; 0,5 g	NaOAc	1,5 g
d-SPE				
Sal de secagem	MgSO ₄	150 mg	MgSO ₄	150 mg
Adsorvente	PSA	25 mg	PSA	50 mg

^a - o sistema citrato de sódio tribásico di-hidratado e citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado

1.3.2 Etapa de limpeza (Clean-up)

A aplicação da técnica *d*-SPE é a etapa final do procedimento QuEChERS e tem o objetivo de limpar o extrato de possíveis interferentes presentes na solução. Tradicionalmente, a técnica de extração em fase sólida (SPE) consiste em eluir uma solução por uma fase sólida (adsorvente) que retém os analitos que são retirados posteriormente pela eluição de um outro solvente em um tubo para a coleta dessa nova solução [50]. Na *d*-SPE o adsorvente é dispersado na solução para a remoção de interferentes que possam causar danos ao equipamento ou que possam ser prejudiciais para a quantificação e qualificação dos analitos [31].

Sendo assim, os adsorventes devem ser selecionados de acordo com a complexidade da matriz que está sendo trabalhada. Há uma grande variedade de adsorventes na literatura. Em QuEChERS alguns são usados com uma maior

recorrência, sendo eles C18 [51], CloroFiltr® [52], Carbono Grafitizado (GCB) [53] e PSA [54].

O adsorvente C18, octadecilsilano, é comumente utilizado em matrizes ricas em compostos lipofílicos, esteróides e interferentes apolares [31]. Quando uma matriz com um alto teor de gordura é submetida ao processo de extração por QuEChERS, é normal que haja a formação de uma camada de lipídios no extrato resultante da primeira etapa, o que acarreta um problema para a análise uma vez que analitos mais lipofílicos ficarão retidos nessa camada e não serão extraídos. Desta forma, a C18 pode ser utilizada para aumentar a eficiência da remoção de lipídios, retirando da solução os interferentes não polares [55].

O PSA é um adsorvente para matrizes que apresentam açúcares, pigmentos polares e ácidos orgânicos polares. O PSA é um trocador aniônico, o qual interage com os compostos mais polares por ligação de hidrogênio ou do tipo dipolo-dipolo. Por conter grupos aminos primários e secundários em sua estrutura, o PSA contém um elevado efeito quelante, o que resulta na retenção dos compostos mais polares [56].

O processo de extração por QuEChERS apresenta a vantagem de ser combinada as mais variadas técnicas instrumentais de análise, inclusive a cromatografia, seja ela a cromatografia gasosa ou a cromatografia líquida [35,57].

1.4 Cromatografia Líquida de acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS)

Para a análise de pesticidas a modalidade desta técnica mais habitual é a cromatografia em fase reversa. Neste, o cromatógrafo contém, de forma geral, uma coluna com fase estacionária de carácter apolar, como a C18, e uma fase móvel com carácter polar, como uma composição Acetonitrila/Água ou Metanol/Água [58].

O emprego dessa técnica em conjunto com a Espectrometria de Massas se mostrou satisfatório para a análise de resíduos de pesticidas, na qual é contém a presença de diversas classes químicas, como nos estudos realizados por Bakirci e colaboradores [59], no qual foi possível analisar 143 pesticidas como atrazina (triazina), imidacloprido (neonicotinóide) entre outros por um sistema de UPLC-MS/MS (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas em modo tandem) e ainda analisar, como é apresentado por Narendran e colaboradores [60], em que foi realizado um estudo analisando 6 pesticidas, dentre eles acefato e malationa, em várias matrizes alimentares. Há estudos que analisaram um número maior de compostos, como mostrado por Xiu-Ping e colaboradores [61], no qual foi realizado a análise simultânea de 54 pesticidas como imidacloprido em matrizes alimentares utilizando também a modalidade UHPLC-MS/MS e com por Huang e colaboradores [62] ao analisar 102 pesticidas utilizando o QuEChERS e a técnica HPLC-MS/MS

Entretanto, a instrumentação da cromatografia líquida é voltada para a separação dos compostos. Sendo assim, a quantificação e qualificação dos analitos são direcionados ao acoplamento da técnica de espectrometria de massas (MS). Normalmente, o espectrômetro de massas quando utilizado em conjunto com a cromatografia líquida contém uma fonte de ionização do tipo electrospray ou Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI). Na fonte de ionização electrospray, os analitos recebem uma descarga elétrica no capilar para que haja a ionização e posteriormente levados para o analisador de massas [63]. Essa fonte de ionização pode ionizar tanto em modo positivo (protonação $[M+H]^+$) quanto no modo negativo (desprotonação $[M-H]^-$), como apresentado por Tian e colaboradores [64], no qual foi estudado fungicidas em matrizes

alimentares. Nesse estudo foi utilizado um sistema UHPLC-MS/MS, no qual o espectrômetro de massas contava com uma fonte de ionização eletrospray operando no modo positivo.

A fonte APCI é uma fonte de ionização usada na análise de resíduos de pesticidas. Nesta há a evaporação da fase móvel primeiro liberando os analitos na interface da fonte onde existe um eletrodo que liberará uma descarga elétrica no meio promovendo o efeito corona, no qual ionizará os analitos presentes no meio [63]. Costa e colaboradores definem o efeito corona como um fenômeno gerado quando o campo elétrico nas proximidades do condutor excede a um valor crítico relacionado à rigidez dielétrica do ar provocando sua ionização [65].

Contudo, a fonte de ionização eletrospray costuma ser mais aplicada para esses analitos. Masiá e colaboradores relataram 26 estudos de análises de pesticidas em matrizes alimentares, dos quais apenas 1 estudo relata o uso da fonte APCI [66]. Silva e colaboradores [67] estudaram a eficiência das fontes de ionização eletrospray e APCI analisando pesticidas como dimetoato e malationa em matriz alimentar e relataram a eficiência dessa fonte com base nos parâmetros de validação no quais foram superiores quando comparados aos valores para APCI, como melhores limites de quantificação (LOQ), menor efeito matriz e melhores valores de recuperação para a fonte electropray.

1.5 Validação do Método Analítico

A validação do método analítico é uma etapa de importante na análise química, para certificar a veracidade dos resultados oriundos da aplicação desse método nas amostras. Dessa forma, essas instituições, normalmente agências governamentais, ditam parâmetros os quais são importantes para a validação do método científico. Dentre elas é possível citar algumas agências como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sendo as principais atuantes no Brasil; Já internacionalmente pode-se citar a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA - *United States Environmental Protection Agency*), Agência de Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (US-FDA - *United States Food and Drug Administration*), Guia de Procedimentos de Controle de

Qualidade Analítica e Validação de Métodos para Análises de Resíduos e Pesticidas em Alimentos da União Europeia (EU-SANTE - *Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed*), Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH - *International Conference on Harmonisation*), União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*) e Organização Mundial da Saúde (WHO - *World Health Organization*) [68 – 73]

Mesmo havendo várias agências distintas, alguns pontos são comumente utilizados para o procedimento de validação de um método analítico, tais como linearidade, seletividade, precisão, exatidão, recuperação, repetibilidade, limite de detecção e limite de quantificação [74].

1.5.1 Linearidade e sensibilidade

A linearidade para análises utilizando LC/MS tem dois significados: 1) a relação linear entre sinais de analito e concentrações desses analitos em soluções com solvente e 2) relação linear entre os sinais de analitos e as concentrações deles nas soluções com o extrato da matriz. De forma geral, a linearidade diz respeito à capacidade do método produzir uma relação linear entre a área do sinal do composto e a concentração dele nas soluções, seja no solvente puro ou na amostra, os quais devem ser proporcionais. [70]

A linearidade pode ser determinada através de uma correlação matemática utilizando a intensidade ou área do pico cromatográfico e a concentração do analito, formulando assim uma equação da reta $y = ax + b$, a qual pode ser denominada com curva analítica. A partir então da curva analítica se obtém o coeficiente de correlação (R) e o coeficiente de determinação (R^2). Assim, a partir desses valores é possível estimar o grau de linearidade da curva analítica. Desta forma, os valores ideais são estabelecidos por meio de normativas que devem ser atendidas, comumente no valor de 0,999, como para a SANCO e FDA, 0,99 para a ANVISA e 0,90 para o INMETRO [69,70,75]

Além do uso dos coeficientes, correlação e/ou determinação, para avaliar a linearidade do método, há também a possibilidade da estimativa da sensibilidade utilizando a equação da reta. A sensibilidade é, por definição, a

capacidade de resposta sob a variação significativamente pequenas de concentração do analito de estudo. Ela é determinada pela inclinação da curva de calibração. Para uma reta seja dada como aceitável coeficiente de determinação, mais sensível o método será quanto maior o ângulo de inclinação for [75].

1.5.2 Seletividade

Normalmente uma amostra apresenta um de grande número de compostos. Esses compostos são intrínsecos da estrutura da matriz, podendo ser específico ou não. Desta forma, o monitoramento de analitos em nível traço pode ser bastante desafiador, caso o método analítico não consiga promover uma boa seletividade nas extrações dos compostos em estudo. Por definição, a seletividade de um procedimento analítico pode ser definida como a capacidade que o método em questão possui de mensurar com a maior fidedignidade um analito na presença de muitos outros componentes oriundos da própria matriz ou até impurezas que possam estar presentes no meio. Assim, um método com uma boa seletividade deve assegurar que os efeitos de possíveis interferentes do sinal cromatográfico sejam relativamente insignificantes [70,75].

Conseqüentemente, um parâmetro importante que permite a avaliação da seletividade do método é o efeito matriz, porque com esse parâmetro é possível expressar numericamente se há ou não uma supressão de sinal (<-20%) ou um enriquecimento (+20%) do sinal analítico por meio da equação 1 [75].

$$EM = \left(\frac{\text{Sinal do analito na matriz} - \text{Sinal do analito no solvente}}{\text{Sinal do analito no solvente}} \right) * 100 \quad (Eq. 1)$$

Além dessa possibilidade, a influência da matriz também pode ser calculada na construção de duas curvas analíticas, sendo uma preparada utilizando os analitos no extrato da matriz e outra solubilizando os analitos no solvente. A partir dos resultados obtidos nas curvas calcula-se, então, a razão entre os coeficientes angulares, a qual obtendo razões superiores a 1 aponta para o enriquecimento do sinal e valores abaixo de 1 denota o efeito de supressão de sinal [69].

1.5.3 Exatidão e Precisão

Para a que seja possível avaliar o quanto o valor encontrado experimentalmente se aproxima do valor verdadeiro utilizando soluções padrão dos analitos utiliza-se do parâmetro da exatidão. Normalmente a exatidão de um método analítico é estimada pela recuperação analítica. Para isso é utilizado então o sinal do analito na matriz após contaminar a amostra com uma concentração conhecida antes de todo o processo de extração. Então, compara-se a área do sinal do analito na solução da matriz (amostras fortificadas) com a área da resposta do analito na solução de referência, comumente chamada de solução de comparação, a qual os analitos são adicionados na mesma concentração após todo o processo de extração, como visto na equação 2.

$$REC (\%) = \frac{\text{Valor obtido nos fortificados}}{\text{Valor obtido na comparação}} * 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Nesse sentido, as normativas trazem os valores entre 70% e 120% como aceitáveis para tal parâmetro quando aplicadas em amostras complexas, como FDA, SANCO/SANTE, ANVISA etc. Entretanto a exatidão não é e nem deve ser expressa sozinha. Uma vez que o método deve ter uma exatidão entre o valor de área do analito na solução de fortificação quando comparada a solução de comparação, a precisão surge como um artifício para caracterizar os erros aleatórios das replicatas dessas análises do estudo de exatidão. A precisão é expressa por meio da fórmula do desvio padrão relativo (RSD – *Relative Standard Deviation*). As principais normativas de validação de um método analítico estabelecem o valor de 20% como aceitável para os estudos de precisão. Comumente o número necessário de replicatas para determinar a precisão varia de acordo com as diretrizes adotadas para a validação do método, porém é bastante comum a aplicação de 5 ensaios (quintuplicatas) [76, 77].

1.5.4 Limites de Quantificação

É comum que os métodos aplicados na determinação e monitoramento de pesticidas sejam voltados para as análises desses compostos em nível residual. Desta forma, limite de quantificação (*Limit Of Quantification* – LOQ) são parâmetros que visam elucidar as concentrações que o método consegue

quantificar os analitos. Por definição, o LOQ é a menor concentração de um analito na amostra que pode ser quantificada com confiabilidade [69,70]

Existem alguns métodos para a determinação do limite de quantificação: Método visual, a relação entre sinal e ruído, método que se baseia na curva analítica; entretanto a escolha deles deve levar em consideração a técnica analítica empregada, além do grau de confiabilidade estatística desejada. O método mais conceituado e estatisticamente confiável para a determinação dos limites de quantificação e detecção é baseado na curva analítica na qual as técnicas cromatográficas são aplicadas, como defendido por Ribani e colaboradores, aplicando a equação 3, onde s é referente ao desvio padrão da reta e S refere-se à inclinação da reta:

$$LOQ = 10 \cdot \frac{s}{S} \quad (Eq. 3)$$

2 REVISÃO DA LITERATURA

Com base na literatura foi possível realizar uma revisão de trabalhos publicados que utilizam o procedimento de extração QuEChERS juntamente com a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para a determinação de resíduos de pesticidas em tomate.

Originalmente, o procedimento QuEChERS foi desenvolvido para a análise de resíduos de pesticidas em alimentos. Anastassiades e colaboradores mostraram a versatilidade em uma revisão completa de possíveis alterações onde há a modificação das quantidades de alguns componentes no processo de extração em matrizes como hortaliças e frutas como tomate, maçã, laranja e outros. Foram utilizados 10 g da amostra com 10 mL de acetonitrila, seguido da adição de 4 g sulfato de magnésio anidro e 1 g de NaCl. Para a limpeza do sistema foram usados 150 mg de sulfato de magnésio e 25 mg de PSA que foram misturados com 1 mL de extrato de acetonitrila. O extrato foi submetido a análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foram obtidas recuperações entre 85 e 101% [78].

Lesueur e colaboradores avaliaram 146 pesticidas em quatro matrizes alimentares, sendo uma delas o tomate. Somente 46 analitos, como tiametoxam, dimetoato e carbaril, foram submetidos a análises por LC-MS. Para isso foram utilizadas 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila. Nesta avaliação foi utilizado o método proposto pela União Europeia utilizando o sistema tamponado com os sais de citrato. Para isso, foram usadas 4 g de sulfato de sódio, 1 g de cloreto de sódio, 1 g de citrato de sódio tribásico di-hidratado e 0,5 g de citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado. Foram utilizadas 950 mg de sulfato de magnésio e 150 mg de PSA. Foram obtidas recuperações entre 70-120% [79].

Além das alterações em quantidades dos reagentes, esse método ainda permite a alteração de alguns componentes como a substituição dos adsorventes na etapa do d-SPE. Essa alteração foi estudada por Han e colaboradores e determinaram resíduos de 70 pesticidas, como dimetoato, acetamiprido, tiacloprido e imidacloprido em 3 tipos de matrizes, dentre elas a

alface, modificando o procedimento QuEChERS com nanotubos de carbono de paredes múltiplas na etapa do d-SPE. Os autores utilizaram 10 g da amostra homogeneizada. Em seguida, foram adicionados 10 mL de MeCN. Foram adicionados 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio. Uma alíquota do sobrenadante foi transferido para um tubo de centrifuga que continha 10 mg de adsorvente MWCNTs (Multi-walled carbon nanotubes – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas) e 150 mg de sulfato de magnésio. Depois disso as amostras foram levadas para análise em UHPLC-MS/MS. Neste trabalho foi avaliado principalmente a redução do efeito matriz. Em 77% (alho), 55% (alface) e 44% (crisântemo) não indicaram efeito matriz. Recuperação média 74-119% para todos os pesticidas e %RSD <15%, apresentando uma boa eficiência na remoção dos coextrativos [80].

Montiel-Léon e colaboradores investigaram 22 pesticidas em quatro culturas diferentes: alface, maçã, uvas e tomate de agricultura convencional e agricultura orgânica. Entre os pesticidas analisados encontraram-se o imidacloprido, tiacloprido, tiametoxam, atrazina, carbaril e dimetoato. Se basearam no método QuEChERS e na utilização da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas no modo tandem (UHPLC-MS/MS). A condição de extração fez uso de 5 g de amostra. Ela foi homogeneizada e colocada em um tubo de centrifugação. Foi adicionado 5 mL de acetonitrila e foi levada para o vortex a 1 min, 3200 rpm. Assim, 2,0 g de MgSO₄, 0,5 g de NaCl, 0,5 g de citrato de sódio tribásico di-hidrato e 0,25 g de citrato de sódio dibásico sesqui-hidrato foram adicionados. Após submeter a um vortex, o tubo foi levado a centrifugação por 15 min. Uma alíquota de 4 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo com sulfato de magnésio e PSA, sendo analisado posteriormente. Foram obtidos valores de recuperação entre 70 e 120% e %RSD <20%, se mostrando eficiente mesmo reduzindo a quantidade dos reagentes [81].

Konatu e colaboradores desenvolveram um método analítico para determinação multirresíduo de 16 pesticidas, entre eles imidacloprido, tiacloprido, carbaril, malationa e tiometoxam, em alface. Para isso foi adicionado na amostra 10 mL de ACN como parte da primeira etapa da extração. Para promover o efeito *salting-out*, uma mistura dos sais MgSO₄,

NaCl, citrato de sódio tribásico di-hidrato e citrato de sódio dibásico sesqui-hidrato foram adicionados ao meio. Para a última etapa, a d-SPE foi adicionado PSA, MgSO₄ e carbono grafitizado (GCB). Feito isso as amostras foram levadas para análise em UHPLC-MS/MS. Esse procedimento forneceu resultados satisfatórios. Foram obtidas curvas analíticas $r^2 = 0,99$ e resíduos < |20%|, confirmando a linearidade do método. O método proporcionou também recuperações satisfatórias entre 75% e 119%, e desvio padrão relativo <20% [82].

Martínez-Piernas estudaram duas variantes do processo QuEChERS, na qual uma é o processo base do Oficial AOAC 2007.07 e o outro do método padrão europeu EN Code 15.662 da Comitê Europeu de Normalização (CEN). Foram analisados 74 contaminantes, sendo compostos farmacêuticos e seus metabólitos e pesticidas em culturas irrigadas com água residual, na qual uma dessas culturas foi a alface. No primeiro, as amostras, após tratamento prévio, foram misturadas com 10 mL de ACN com ácido acético 1%. Logo em seguida foram adicionados MgSO₄ e NaOAc. Para a etapa de limpeza foram utilizados MgSO₄ e C18 para atuar na remoção de interferência de compostos não polares. Para o método europeu foi usado apenas 10 mL de ACN. Para o efeito do *salting-out* foram utilizados MgSO₄, NaCl, citrato de sódio tribásico di-hidratado e citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado. Para a limpeza foi adicionado MgSO₄, C18 e PSA. Em seguida, as amostras foram analisadas por um HPLC-MS/MS [83].

Andrade e colaboradores desenvolveram um método para a determinação de 57 pesticidas, como clorpirifós e difenoconazol, em tomates utilizando LC-MS/MS, com a ionização por *electrospray*. Para isso foram utilizados 15 g de amostra e 15 mL de acetonitrila com 1% de ácido acético. Foram usados 6 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de acetato de sódio. Para a etapa da limpeza utilizou 150 mg de MgSO₄ e 50 mg de PSA. Foram alcançadas recuperações satisfatórias para a maioria dos pesticidas analisados. Entretanto, 11 pesticidas ficaram fora da faixa de 70-120% (valores não informados). Dentre os 11 analitos se encontram difenoconazol e clorpirifós [84].

Martins e colaboradores propuseram um adsorvente, denominado de

adsorvente fluorado, alternativo para a etapa de limpeza baseada em d-SPE. Foram avaliados 21 pesticidas em tomate, entre eles dimetoato e atrazina. O procedimento proposto requer 10 g de amostra. São adicionados 10 mL de acetonitrila com 1% de ácido acético para a primeira etapa do QuEChERS. Após isso é adicionado sulfato de magnésio e acetato de sódio. Na etapa d-SPE é utilizado sulfato de magnésio com o adsorvente fluorado. Após isso as amostras foram levadas e condicionadas para a análise por um UHPLC-MS/MS. A aplicação desse adsorvente proporcionou bons resultados de exatidão e precisão sem necessitar do auxílio de adsorventes de elevado custo como PSA e C18 [85].

Em suma, o procedimento QuEChERS se mostrou eficaz mesmo modificado. Na etapa em que ocorre a extração, o solvente foi a acetonitrila. Recentes trabalhos utilizaram entre 5 e 10 mL de acetonitrila, sendo adicionado em alguns trabalhos o ácido acético 1%. Nesta mesma etapa adiciona-se sais para o efeito *salting-out*. Sendo assim, há uma melhor extração por excluir os analitos da fase aquosa por aumentar a força iônica do meio aquoso, diminuindo a solubilidade de alguns compostos. A maior recorrência de uso são os sais sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio ($NaCl$), requerendo quantidades de 4 g para o $MgSO_4$ e 1 g para o $NaCl$. Contudo, há outros sais que são empregados, como o acetato de sódio (utilizando 6 g $MgSO_4$ e 1,5 g de acetato de sódio) e os sais citrato de sódio tribásico di-hidratado e citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado (usando 4 g de $MgSO_4$, 1 g de $NaCl$, 0,5 g de $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ e 1 g $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$). Na etapa da limpeza há a remoção dos possíveis interferentes que estejam presentes no extrato. O adsorvente mais usado é o PSA, que normalmente é utilizado 25 mg. Contudo vários outros vêm sendo testados, como o carbono grafitizado e nanotubos de carbono, C18 e um adsorvente chamado ChloroFiltr que é direcionado para a remoção de clorofila. Para a análise dos compostos, a solução pode ser submetida a análise em um cromatógrafo líquido no modo reverso contando com um espectrômetro de massas com uma fonte electrospray e um analisador de massas do tipo quadrupolo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Otimização do método QuEChERS para determinação de resíduos de pesticidas em tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

3.2 Objetivos Específicos

- Obter as condições instrumentais de análise para determinação dos pesticidas por LC-MS.
- Otimizar um procedimento analítico rápido, seletivo e sensível para a determinação dos pesticidas em tomate aplicando a técnica de extração QuEChERS.
- Validar o procedimento desenvolvido por QuEChERS e LC/MS.
- Aplicar o método QuEChERS em tomates comercializados em São Cristóvão/SE

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e Reagentes

Metanol grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha), Água ultrapura obtida em sistema de ultrapurificação Milli-Q, modelo Gradient (Milipore – Merck, Darmstadt, Alemanha), Acetonitrila grau HPLC (J.T Baker), C18 50 µm (Sigma-Aldrich), Acetato de Sódio Anidro, Kit QuEChERS da Phenomenex® contendo os seguintes sais: Sulfato de magnésio, Cloreto de sódio anidro, citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado, citrato de sódio tribásico di-hidratado, Florisil® 100-200 Mesh (J.T Baker), Alumina Neutra 50-200 µm (Sorbents Technologies), Formiato de Amônio (Fluka Analytical, 99,0% de pureza), Sílica 70-230 Mesh (Sigma-Aldrich), Sulfato de Magnésio Anidro (ACS Científica), Biocarvão de aguapé (BC-500).

4.2 Padrões Analíticos

Abamectina (Accustandard, pureza 99,8%), Acetamiprido (Accustandard, pureza 99%), Azoxitrobina (Riedel-de Haen, pureza 99,5%), Bromuconazol (Fluka Analytical, pureza 99,8%), Carbaril (Fluka Analytical, pureza 99,8%), Deltametrina (Fluka Analytical, pureza 99,7%), Dimetoato (Fluka Analytical, pureza 99,7%), Esfenvalerato (Fluka Analytical, pureza 95,9 %), Flutriafol (Accustandard, pureza 97 %), Lufenuron (Chem Service, pureza 98%), Malationa (Accustandard, pureza 99,1%), Metomil (Fluka Analytical, pureza 98 %), Piraclostrobina (Riedel-de-Haen, pureza 99,9%), Pirimicarbe (Fluka Analytical, pureza 99%), Teflubenzuron, Tiacloprido (Accustandard, pureza 99%), Tiofanato-Metílico (Fluka Analytical, pureza 99,3%), Tiametoxam (Accustandard, pureza 99,3%).

4.3 Equipamentos

- Balança Analítica Ay 220 (Shimadzu);
- Triturador de alimentos modelo 63201003 da Britânia;
- Micropipetas KASVI Basic
- Centrífuga CentriLab 80-2B
- Vortex QL-901
- Cromatógrafo líquido modelo Nexera UC (Shimadzu, Quioto,

Japão) composto por: Módulo de comunicação CBM-20A, Sistema binário de bombas LC-20ADXR, Bomba para CO₂ LC-30ADSF, Desgaseificador DGU-20A5R, Auto injetor SIL30AC, Controlador de Pressão SFC-30, Forno de colunas CTO-20AC, Detector PDA SPD-M20A, Espectrômetro de massas MS-2020, Coluna Analítica Luna C18 (100 x 3 mm x 2,5 µm, Phenomenex, Califórnia, EUA) com coluna de guarda contendo a mesma fase estacionária da coluna e software de gerenciamento Lab Solution.

4.4 Obtenção e preparo da amostra

Amostras de tomates orgânicos foram adquiridas na rede de agroecologia Planta Para a Vida – SE, em São Cristóvão e transferidas ao laboratório de análises de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP). As amostras foram cortadas com uma faca de aço inoxidável esterilizada, transferidas em um béquer e homogeneizadas usando um triturador de alimentos até uma consistência pastosa. Posteriormente foi transferida para um frasco de vidro de tampa rosqueável, limpo e identificado, sendo armazenado sob congelamento a -5 °C e uma atmosfera de N₂.

4.5 Preparo das soluções padrão dos pesticidas

A partir de padrões sólidos, soluções estoque de cada pesticida foram preparadas na concentração de 1000 µg mL⁻¹ em metanol grau HPLC. As soluções foram agitadas por um vortex para auxiliar na solubilização, sendo transferida para um vial de 40 mL para armazenamento, tampado e lacrado com Parafilm M[®] e armazenado no freezer a -5 °C. Após o preparo das soluções-estoque, foi feita uma diluição de cada padrão a fim de obter soluções de trabalho em vials. As soluções de trabalho foram renovadas após um período de duas semanas.

4.6 Condições instrumentais de análise

As condições de análise otimizadas para o cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas (LC/MS) estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições de análise do LC/MS para os analitos em estudo.

Cromatógrafo líquido		
Fase Móvel	Metanol:Água (5 mmol de formiato de amônio)	
vazão da Fase Móvel	0,5 mL min ⁻¹	
Tempo de análise	20 min	
Gradiente	0,01 min 30%B; 0,01-10 min 100%B; 10-15 min 100%; 15-18 min 30%B 18-20 min 30%B	
Coluna	Luna C18 (100 x 3 mm d.i. x 2,5 µm)	
Volume de injeção	5 µL	
Temperatura do forno da coluna	40°C	
Espectrômetro de Massas		
Interface	ESI (+/-)	APCI
Voltagem da fonte de ionização	3,5 kV	4,5 kV
Modo de operação	Modo SIM	
Temperatura da i.s.	350°C	
Temperatura da dl	250°C	
gás de secagem	N ₂	
fluxo de gás de secagem	10 L min ⁻¹	
fluxo do gás de nebulização	1,5 L min ⁻¹	

4.7 Procedimento de extração QuECHERS

- Pesar 5 g da amostra de tomate homogeneizadas em um tubo de centrifuga de polietileno (15 mL);
- Adicionar 5 mL de acetonitrila no tubo que contém a matriz;
- Homogeneizar todo conteúdo do tubo em um agitador vórtex por 30 seg;
- Adicionar 1,65 g da mistura dos sais ($MgSO_4$, NaCl, sais citrato de sódio tribásico di-hidratado e citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado);
- Agitar no vortex por 30 seg;
- Centrifugar por 5 min sob uma rotação de 4000 rpm;
- Retirar uma alíquota de 3 mL do sobrenadante e adicionar em um tubo de centrifuga de polietileno (15 mL);
- Adicionar 150 mg de Florisil® juntamente com 150 mg do $MgSO_4$;
- Agitar no vortex por 30 seg;
- Centrifugar por 5 min a uma rotação de 4000 rpm;
- Retirar uma alíquota de 1 mL, passar por um filtro seringa de 0,22 μm em um vial e analisar por LC/MS;

4.8 Limpeza de Materiais

A lavagem das vidrarias seguiu o procedimento padrão estabelecido pelo Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP). As vidrarias são submetidas a enxágue em água ultrapura por três vezes e depois enxaguadas com acetona. Por fim, as vidrarias foram levadas para secagem na estufa a 40 °C, exceto vidrarias volumétricas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das condições instrumentais de análise

5.1.1 Avaliação da resposta dos analitos por LC-MS

Para que seja possível conhecer o comportamento dos analitos estudados, eles foram submetidos a uma análise exploratória de forma individual, gerando informações que são importantes, dentre elas o tempo de retenção, para a otimização dos parâmetros do método de análise [87]. Sendo assim, uma análise exploratória foi realizada primeiramente com os padrões analíticos individualmente, gerando dados sobre o comportamento dos 18 padrões selecionados para estudo: esfenvalerato, abamectina, acetamiprido, lufenurom, metomil, piraclostrobina, teflubenzurom, tiacloprido, tiofanato-metílico, carbaril, dimetoato, pirimicarbe, malationa, flutriafol, bromuconazol, deltametrina, azoxistrobina e tiametoxam.

Assim, com o resultado das análises exploratórias no modo *SCAN*, foi possível conhecer os tempos de retenção e obter os espectros de massas dos princípios ativos no sistema LC/MS, Tabela 6.

Tabela 6. Picos Base para a determinação de cada compostos usando MeOH:H₂O ambos com 0,1% de ácido fórmico como fase móvel.

Composto	Modo da Resposta	Pico Base (m/z)	Tempo de Retenção (t_R; min)
Abamectina	+	895*	22,99
Azoxistrobina	+	426*	20,49
Acetamiprido	+	223	17,11
Bromuconazol-1	+	378	21,11
Bromuconazol-2	+	378	21,54
Carbaril	+	202	19,48
Deltametrina	+	527*	17,83
Dimetoato	+	230	17,06
Esfenvalerato	+	442*	21,20
Flutriafol	+	302	19,92
Lufenuron	-	509	22,15
Malationa	+	331	20,88
Metomil	+	163	14,90
Piraclostrobina	+	388	21,68
Pirimicarbe	+	239	16,90
Teflubenzurom	-	379	22,33
Tiacloprido	+	253	17,83
Tiametoxam	+	292	15,23
Tiofanato-Metílico	+	343	19,00

*Compostos com formação de aduto (Nesse caso, formação de aduto com sódio [M+Na]⁺).

Com os resultados apresentados, foi possível perceber que alguns analitos apresentaram um pico base com valores acima que uma protonação. Alguns compostos apresentaram um pico base com 23 unidades a mais que a massa molecular. Esse é um processo comum e é denominado de formação de aduto, no qual o analito é detectado junto com um íon de sódio, sendo representado como [M+Na]⁺.

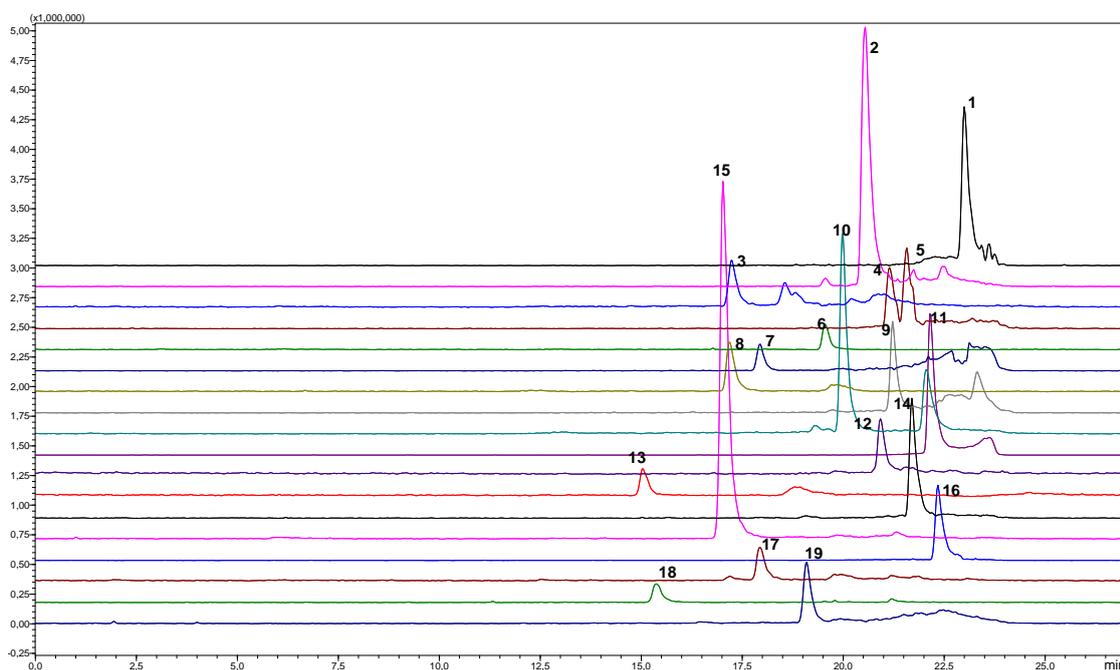
5.1.2 Avaliação do aditivo da fase móvel.

Primeiramente foi avaliado a composição da fase móvel, uma vez que pode ser determinante para a ionização dos analitos. Aditivos na fase móvel são comumente usados na cromatografia líquida com o intuito de melhorar a reprodutibilidade do método bem como a simetria do pico. Esses incrementos

ocorrem principalmente pelas diferentes estabilidades na dispersão de cargas pela fase móvel que é intrínseco de cada aditivo [88]. Outrossim, o tipo e concentração do aditivo influenciará na ionização dos analitos. Entretanto, como mostrado por Constantopoulos e colaboradores, a fonte de ionização por *electrospray* tolera baixas concentrações de aditivos na fase móvel, não podendo ultrapassar 10 mmol, uma vez que acima desse limite pode ocasionar perda na eficiência da transmissão de íons [89].

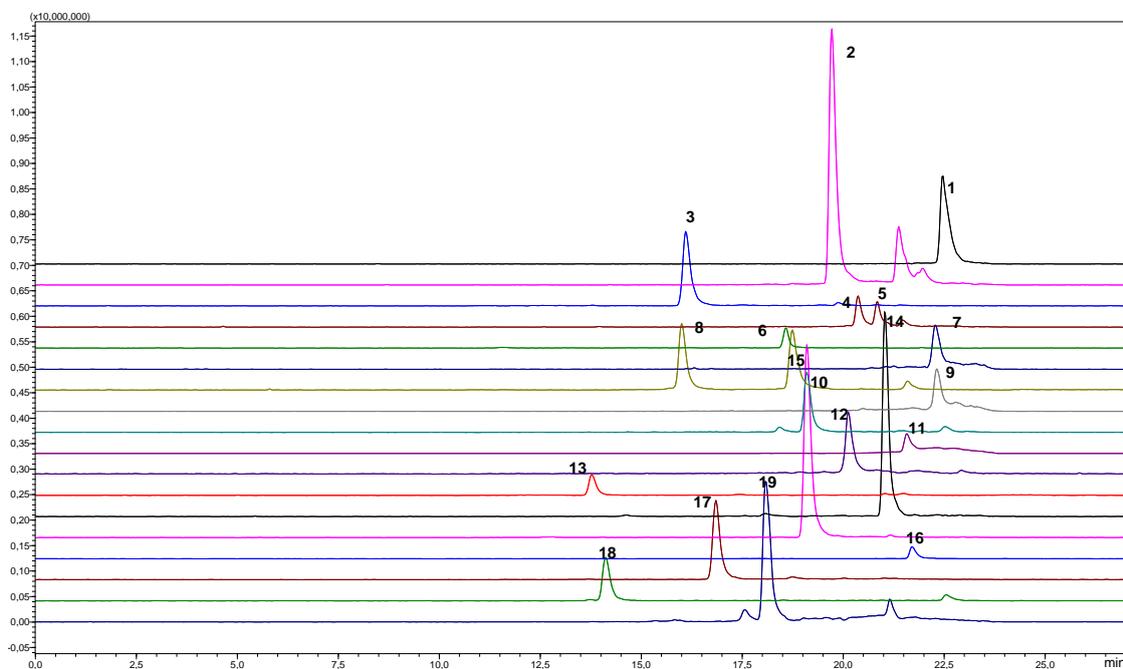
Diante disso, foi avaliado o desempenho da resposta dos analitos frente ao aditivo presente na fase móvel, sendo testados o ácido fórmico (HCOOH) a 0,1% v/v e o formiato de amônio (NH₄HCO₂) a 5 mmol, Figuras 2 e 3 respectivamente, ambos em MeOH:Água.

Figura 2. Cromatograma no modo SCAN da solução padrão conjunta dos pesticidas a 1 µg mL⁻¹ em metanol, utilizando 0,1% de ácido fórmico como aditivo da fase móvel. Considerar as condições de análise descritas na Tabela 5.



1 Abamectina; 2 Azoxistrobina; 3 Acetamiprido; 4 Bromuconazol-1; 5 Bromuconazol-2; 6 Carbaril; 7 Deltametrina; 8 Dimetoato; 9 Esfenvalerato; 10 Flutriafol; 11 Lufenuron; 12 Malationa; 13 Metomil; 14 Piraclostrobina; 15 Pirimicarbe; 16 Teflubenzurom; 17 Tiacloprido; 18 Tiametoxam; 19 Tiofanato-metílico.

Figura 3. Cromatograma no modo SCAN da solução padrão conjunta dos pesticidas a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, utilizando 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio como aditivo da fase móvel. Considerar as condições de análise descritas na Tabela 5.



1 Abamectina; 2 Azoxistrobina; 3 Acetamiprido; 4 Bromuconazol-1; 5 Bromuconazol-2; 6 Carbaril; 7 Deltametrina; 8 Dimetoato; 9 Esfenvalerato; 10 Flutriafol; 11 Lufenuron; 12 Malationa; 13 Metomil; 14 Piraclostrobina; 15 Pirimicarbe; 16 Teflubenzurom; 17 Tiacloprido; 18 Tiametoxam; 19 Tiofanato-metílico.

Comparando os cromatogramas da Figura 2 e 3 é possível notar uma diferença no perfil do sinal entre o uso do ácido fórmico e o formiato de amônio, no qual o teste realizado com ácido fórmico foi observado um perfil com mais interferência e co-eluição. O contrário foi observado na análise utilizando formiato de amônio, no qual houve melhor separação e definição dos picos dos analitos. Na tabela 7 é possível ver a diferença de área entre os sinais obtidos nos dois ensaios realizados, sendo o desempenho do formiato de amônio superior em termos de área quando comparado ao ácido fórmico.

Tabela 7. Área dos analitos em ácido fórmico e em formiato de amônio e porcentagem da área do MeOH:ácido formiato de amônia em relação as áreas do MeOH:Ácido Fórmico.

Analito	Ácido Fórmico	Formiato de Amônia	%AreaFormiato
Abamectina	1,59E+07	2,49E+07	156
Azoxistrobina	3,32E+07	6,59E+07	199
Acetamiprido	5,43E+06	2,17E+07	400
Bromuconazol-1	5,98E+06	4,99E+06	83
Bromuconazol-2	7,32E+06	5,86E+06	65
Carbaril	2,26E+06	4,19E+06	185
Deltametrina	2,64E+06	9,74E+06	368
Dimetoato	6,04E+06	1,73E+07	286
Esfenvalerato	8,43E+06	1,81E+06	22
Flutriafol	2,02E+07	1,47E+07	72
Lufenuron	1,46E+07	1,21E+06	9
Malationa	5,66E+06	1,42E+07	251
Metomil	3,04E+06	5,14E+06	169
Piraclostrobina	1,22E+07	4,56E+07	374
Pirimicarbe	4,44E+07	5,13E+07	115
Teflubenzurom	7,66E+06	3,06E+06	40
Tiacloprido	4,16E+06	2,04E+07	490
Tiametoxam	2,39E+06	1,19E+07	498
Tiofanato-metílico	6,58E+06	3,94E+07	600

Desta forma, frente os resultados dos testes, optou-se pelo uso do metanol com formiato de amônio. É evidente o melhor desempenho do aditivo formiato de amônio quando comparado ao ácido fórmico, uma vez que a resposta desses analitos nessas condições é superior, como é possível ver na coluna %AreaFormiato de amônio, a qual mostra área do sinal no formiato de amônio em comparação a área do sinal em ácido fórmico, percentualmente [90]. Para essa avaliação foi utilizada a seguinte equação 4:

$$\%Área = \left(\frac{ÁreaFormiato\ de\ Amônio}{ÁreaÁc.Fórmico} \right) * 100 \quad (Eq. 4)$$

Além disso, foi possível notar que ao utilizar formiato de amônio como aditivo, houve uma diminuição na formação do aduto $[M+Na]^+$ em relação a formação $[M+H]^+$, por exemplo, ou para a formação do aduto $[M+NH_4]^+$, como a

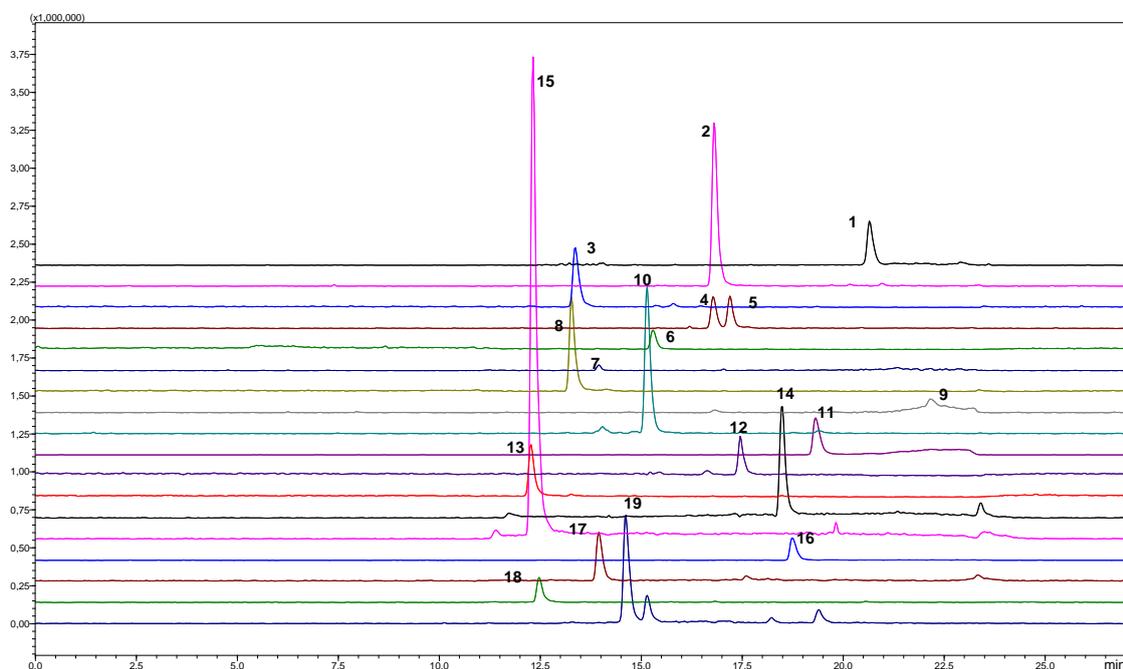
deltametrina que antes era analisada com m/z 527 ($[M+Na]^+$) e, utilizando o formiato de amônio, com m/z 523 ($[M+NH_4]^+$). A adição de sais de amônio na fase móvel promove um favorecimento para a intensidade dos sinais $[M+H]^+$, exceto para triazinas, as quais permaneceram sem alteração nas intensidades, como relatado em estudos anteriores [91]. Isso pode ser explicado pela diferença de propriedades físico-químicas dos solventes e aditivos utilizados para compor a fase móvel, os quais têm influência direta na ionização das moléculas, alterando o perfil dos picos cromatográficos, uma vez que a eficiência da separação da carga pode ser medida como uma corrente de pulverização, a qual depende da condutividade de solventes [92,93]. Logo, uma vez que o desempenho do formiato de amônio é superior ao desempenho do ácido fórmico, manteve-se o formiato de amônio como aditivo da fase móvel.

5.1.3 Avaliação da composição da fase móvel

Foi avaliado a efetividade da separação dos analitos alterando o solvente orgânico. Portanto, foram testados metanol e acetonitrila sob as mesmas condições de análise. No entanto, apenas foi avaliado a acetonitrila com o ácido fórmico, uma vez que o formiato de amônio não solubilizou o suficiente, apresentando uma turbidez na solução da fase móvel, inviabilizando a análise.

A acetonitrila proporcionou uma boa separação dos analitos, mostrando boa reprodutibilidade e apresentando picos bem definidos, Figura 4. Entretanto, os picos apresentaram áreas menores frente as áreas obtidas ao utilizar metanol com formiato de amônio.

Figura 4. Cromatograma no modo SCAN da solução conjunta dos pesticidas a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando acetonitrila com 0,1% v/v de ácido fórmico como fase móvel. Considerar as condições de análise descritas na Tabela 5.



1 Abamectina; 2 Azoxistrobina; 3 Acetamiprido; 4 Bromuconazol-1; 5 Bromuconazol-2; 6 Carbaril; 7 Deltametrina; 8 Dimetoato; 9 Esfenvalerato; 10 Flutriafol; 11 Lufenuron; 12 Malationa; 13 Metomil; 14 Piraclostrobrina; 15 Pirimicarbe; 16 Teflubenzurom; 17 Tiacloprido; 18 Tiametoxam; 19 Tiofanato-metílico.

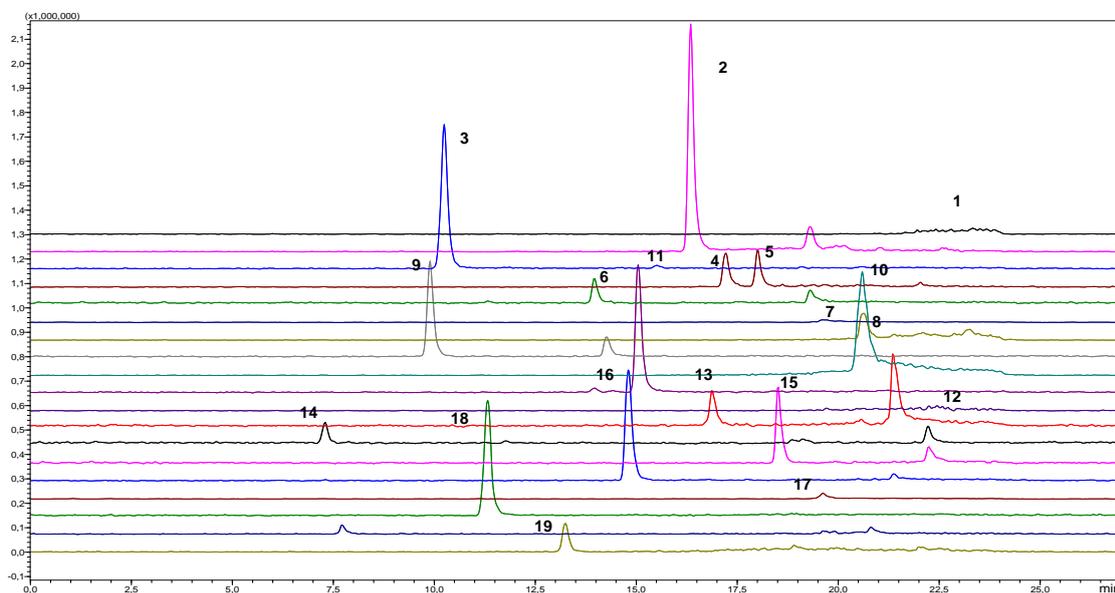
As áreas apresentadas no metanol sobressaíram-se mediante as áreas apresentadas quando utilizou acetonitrila. O tipo de solvente empregado na composição da fase móvel influencia diretamente na ionização dos compostos. Assim, a diferença na intensidade vista nos perfis cromatográficos pode ser atribuída a polaridade do solvente. Como afirmado por Kostianen e colaboradores [88], os melhores solventes para a fonte de ionização por *electrospray* variam entre polar-mediane polar, promovendo melhores sinais como resposta. Isso acontece porque solvente mais polar estabiliza os íons de forma mais eficiente na solução [88, 92]. Desta forma, a acetonitrila que tem a uma polaridade levemente inferior é menos eficiente do que o metanol para estabilizar os íons. Mesmo apresentando uma boa separação dos analitos, o uso da acetonitrila foi descartado.

5.1.4 Avaliação da Fonte de ionização

Nesse estudo foram avaliadas as fontes de ionização por *electrospray* (ESI) e fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI). Em uma breve contextualização, as fontes partem de princípios distintos para a ionização dos analitos. A fonte ESI produz os íons a partir de uma descarga elétrica presente no capilar em que a solução contendo os analitos e produzindo o spray no qual os compostos estão presentes no estado gasoso e são direcionados para o analisador de massas. A fonte de ionização por *electrospray* é amplamente utilizada para a ionização de pesticidas, uma vez que tal ferramenta ioniza de forma satisfatória a maioria desses compostos em uma ampla faixa de polaridade e é capaz de ionizar desde compostos com baixa massa molar até compostos com elevadas massas molares [63, 88].

A fonte de ionização APCI ioniza primeiramente as moléculas do solvente para que então os analitos sejam ionizados. Para isso, o eluente percorre um capilar aquecido para que possa volatilizar tanto os analitos quanto o solvente. Assim, um spray é formado frente a uma agulha na qual é submetida um potencial de milhares de volts, fornecendo o efeito corona, o qual provoca uma descarga parcial na região em que se encontra os analitos [88,92]. A figura 5 apresenta o cromatograma referente ao teste com a fonte APCI.

Figura 5. Cromatograma obtido a partir da análise de uma solução conjunta dos pesticidas a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($n=3$) com a fonte APCI utilizando MeOH:Água com 0,1% Ácido Fórmico.



1 Abamectina; 2 Azoxistrobina; 3 Acetamiprido; 4 Bromuconazol-1; 5 Bromuconazol-2; 6 Carbaril; 7 Deltametrina; 8 Dimetoato; 9 Esfenvalerato; 10 Flutriafol; 11 Lufenuron; 12 Malationa; 13 Metomil; 14 Piraclostrobrina; 15 Pirimicarbe; 16 Teflubenzurom; 17 Tiacloprido; 18 Tiametoxam; 19 Tiofanato-metílico.

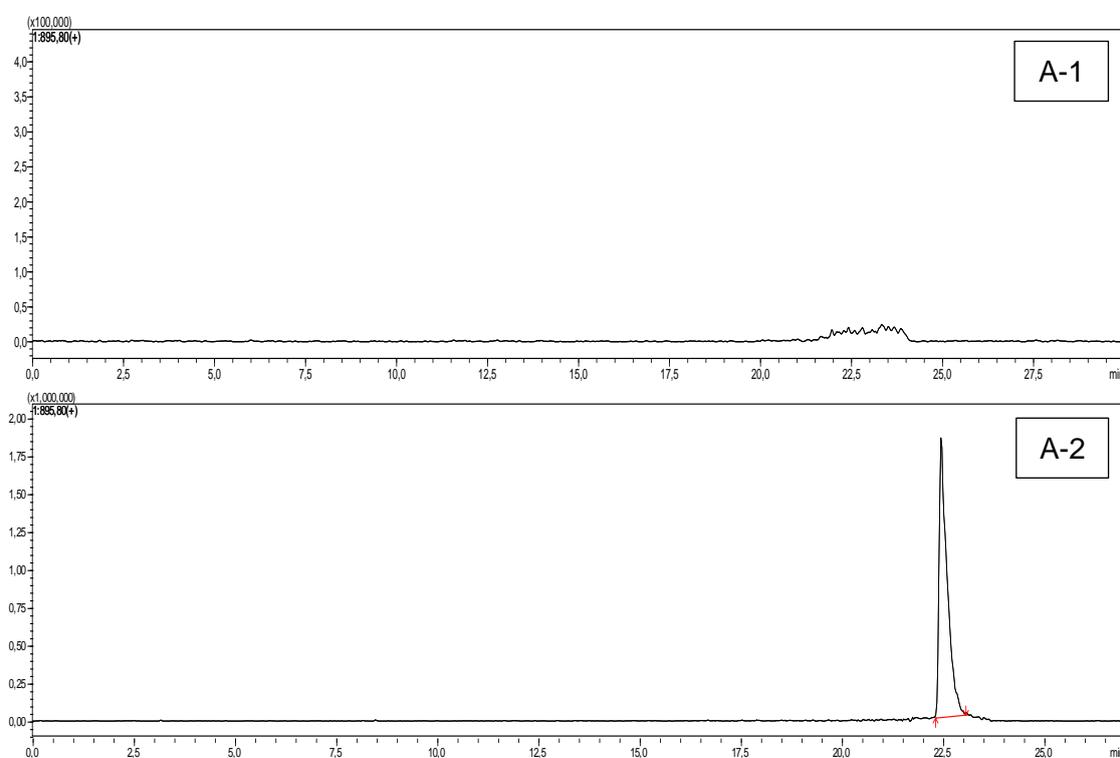
Como é possível ver no cromatograma da Figura 5, alguns analitos forneceram respostas satisfatórias para o método proposto, contudo, analitos como a abamectina e lufenuron, Figura 6, não foram compatíveis com a técnica. Isso pode ter acontecido por alguns motivos:

a) Os analitos não foram ionizados devido a polaridade dos compostos e/ou alta massa molar, uma vez que o princípio da fonte APCI é voltado para moléculas com baixa massa molar e baixa polaridade. Estudos prévios mostraram a maior sensibilidade da fonte de ionização por *electrospray* frente a fonte APCI. Como o estudo feito por Grimalt e colaboradores, que avaliaram a resposta da abamectina com a fonte ESI, APCI e Ion Sabre APCI da Waters. [58,94].

b) A voltagem utilizada na fonte APCI degradou as moléculas sem ionizá-las adequadamente. Na fonte ESI, a tensão elétrica presente no capilar para a

ionização das moléculas está na faixa entre 3 e 5 kV. Na APCI a ionização conta com uma descarga elétrica constante para a ionização dos analitos. Essa descarga elétrica pode ser suficiente para degradar algumas moléculas, como a abamectina. Como mostrado no estudo da Valenzuela e colaboradores [95], a voltagem pode influenciar na ionização dos analitos. Desta forma, utilizando uma fonte ESI, avaliou a possível influência da tensão na ionização da abamectina e verificaram que voltagens mais altas ocasionavam um aumento na fragmentação que não eram reprodutíveis, diminuindo a abundância dos íons moleculares.

Figura 6. Cromatograma da Abamectina na fonte APCI (A1) e na fonte ESI (A2). Solução feita em metanol, concentração dos analitos em $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Desta forma, com o intuito de manter sempre a melhor resposta em termos de sinal e de área para os analitos em geral, foi mantida a fonte de ionização por *Electrospray* para a ionização dos compostos no presente estudo.

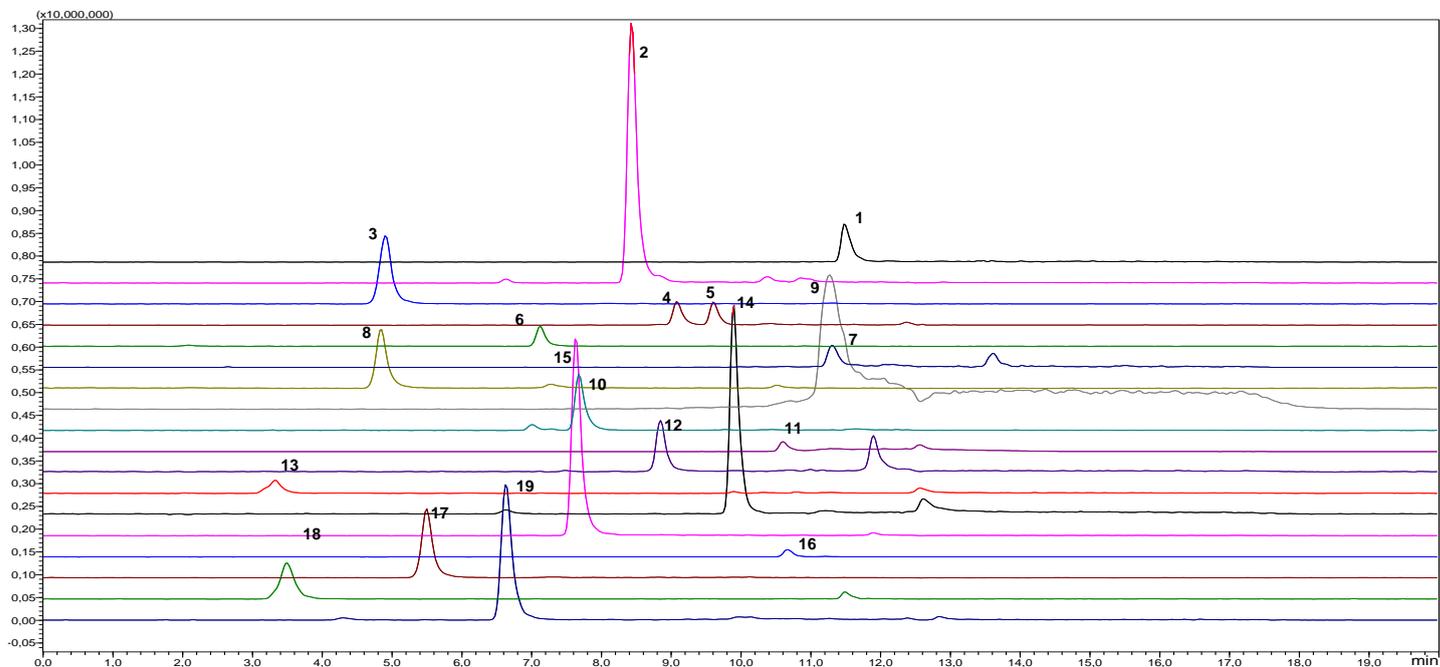
5.1.5 Desenvolvimento do método LC/MS no modo de monitoramento de íons selecionado (SIM) e otimização do gradiente.

No espectrômetro de massas foi possível selecionar o modo de aquisição de dados, uma vez que no analisador de massas há a possibilidade de filtrar os íons. Esse modo de aquisição é chamado de monitoramento de íon selecionado (SIM – *Selected ion monitoring*) [94].

Ao finalizar a determinação da composição da fase móvel, sendo escolhidos metanol/água, ambos com 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio, os analitos foram avaliados em diferentes gradientes com o intuito de ter a melhor condição de separação dos analitos. O gradiente de eluição, o qual varia a proporção dos componentes da fase móvel durante a corrida cromatográfica, visa prover a melhor separação dos analitos e uma análise mais rápida.

Desta forma, após avaliar um gradiente inicial com o tempo total de 30 min, foi alcançada uma separação satisfatória ao utilizar o seguinte gradiente: 0-0,01 min, 30%B, 0,01-10 min, 100%B, 10-15 min, 100%B, 15-18 min, 30%B, 18-20 min, 30%B, representado no cromatograma da Figura 7.

Figura 7. Cromatograma obtido com o gradiente otimizado da solução conjunta dos analitos utilizando MeOH:H₂O com 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio no modo SIM. Solução conjunta na concentração de 1 µg mL⁻¹. Considerar as condições de análise descritas na Tabela 5.



1 Abamectina; 2 Azoxistrobina; 3 Acetamiprido; 4 Bromuconazol-1; 5 Bromuconazol-2; 6 Carbaril; 7 Deltametrina; 8 Dimetoato; 9 Esfenvalerato; 10 Flutriafol; 11 Lufenuron; 12 Malationa; 13 Metomil; 14 Piraclostrobrina; 15 Pirimicarbe; 16 Teflubenzurom; 17 Tiacloprido; 18 Tiametoxam; 19 Tiofanato-metílico.

5.1.6 Avaliação da Vazão da Fase Móvel

Por fim, foi avaliada a vazão da fase móvel. Até então, os testes foram feitos com uma vazão de 0,5 mL min⁻¹. Desta forma, foram testadas as vazões de 0,4, 0,3 e 0,2 mL min⁻¹.

A priori, os melhores valores foram referentes aos valores de 0,5, 0,4 e 0,3 mL min⁻¹, os quais preservaram a boa separação dos analitos dentro do gradiente, já que o efeito contrário foi observado nas vazões mais baixas que 0,3 mL min⁻¹. Sendo assim, os dois valores, de 0,5 e 0,4 mL min⁻¹, foram avaliados no modo SIM e observando os valores de área, os quais constam na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação das áreas obtidas na avaliação da vazão da fase móvel com 0,5 e 0,4 mL min⁻¹.

Analito	Vazão	
	0,5 mL min ⁻¹	0,4 mL min ⁻¹
Abamectina	2,49E+07	7,22E+06
Azoxistrobina	6,59E+07	6,18E+07
Acetamiprido	2,17E+07	2,32E+07
Bromuconazol-1	4,99E+06	6,02E+06
Bromuconazol-2	5,86E+06	4,79E+06
Carbaril	4,19E+06	1,16E+07
Deltametrina	9,74E+06	1,80E+07
Dimetoato	1,73E+07	2,23E+07
Esfenvalerate	1,81E+06	8,50E+06
Flutriafol	1,47E+07	1,14E+06
Lufenuron	1,21E+06	1,87E+06
Malationa	1,42E+07	1,68E+07
Metomil	5,14E+06	8,22E+06
Piraclostrobina	4,56E+07	5,40E+07
Pirimicarbe	5,13E+07	5,65E+07
Teflubenzurom	3,06E+06	1,74E+06
Tiacloprido	2,04E+07	2,17E+07
Tiametoxam	1,19E+07	1,51E+07
Tiofanato-Metílico	3,94E+07	3,81E+07

Foi notado uma diferença de área entre as duas vazões. Essa variação de área é explicada ao compreender o tipo de resposta que a técnica empregada para a detecção é sensível. Há dois tipos de resposta, as técnicas sensíveis ao fluxo de massa e as que são sensível a concentração do analito. Aqueles baseados na resposta na concentração independe da vazão da fase móvel, mantendo o perfil em diferentes vazões. Aqueles que apresentam respostas em função ao fluxo de massa variam a área do sinal com base na alteração da vazão [58,90]. Desta forma, diminuindo a vazão, além de aumentar o tempo de retenção dos analitos há um decréscimo da altura dos sinais, ocasionou na perda na intensidade do sinal sob a vazão de 0,4 mL min⁻¹. Desta maneira optou-se na permanência da vazão de 0,5 mL min⁻¹.

Assim, após os testes de otimização, foi utilizado Metanol/Água para compor a fase móvel com 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio sob uma vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Para a ionização dos analitos foi utilizada a fonte de ionização por electrospray.

5.2 Otimização do processo de extração QuEChERS

5.2.1 Avaliação da quantidade de sais da etapa de extração

O método de extração QuEChERS é dividido em duas etapas, a primeira etapa responsável pela extração utilizando um solvente extrator e sais para a partição entre a fase orgânica e a fase aquosa e uma segunda etapa responsável pela limpeza em fase sólida dispersiva. Primeiramente foram avaliados a variação na quantidade de sal na etapa da extração dos pesticidas.

Para os ensaios foram utilizados o kit comercial de extração roQ QuEChERS da Phenomenex ® contendo a mistura de sais estabelecida pelo Comitê Europeu de Padronização (CEN). O kit contém um total de 6,5 g dos sais, sendo 4,0 g de sulfato de magnésio, 1,0 g de cloreto de sódio, 1,0 g de citrato tribásico de sódio dihidratado e 0,5 g de citrato dibásico de sódio sesquihidratado. Como solvente extrator foram utilizados 5 mL de acetonitrila para 5 g de amostra.

A acetonitrila é o solvente extrator que se mostrou mais seletivo e efetivo para a extração por QuEChERS, como afirmado relatado por Anastassiades e Lehotay [36]. A acetonitrila promove uma extração monofásica, a qual será separada da fase aquosa após a adição dos sais. Além disso, a acetonitrila não extraiu tantos compostos lipofílicos quando comparado a outros solventes como acetato de etila e acetona, além de ser um solvente comumente usado na cromatografia líquida. Desta forma, optou-se por manter a acetonitrila como solvente extrator

Os sais adotados para a aplicação no presente trabalho foram determinados pelo Comitê Europeu de Padronização, validando o método BS EN 15662:2008 2008, o qual apresenta um sistema de sais de citrato, os quais conferem um ajuste de pH (sistema tamponado). Desta forma, o primeiro parâmetro a ser avaliado foi referente a quantidade de sal no processo de

extração dos analitos, uma vez que a diferença na quantidade de sais no sistema pode influenciar diretamente na recuperação, causando extração de interferentes ou não sendo suficiente para o efeito *salting-out*. Para isso, foram testados em 3 quantidades: 0,812 g, 1,62 g e 3,25 g (Tabela 9) com o intuito de avaliar a eficiência da extração dos analitos por meio dos valores percentuais de recuperação.

Tabela 9. Quantidade individuais de sais utilizados em cada teste utilizando o método CEN.

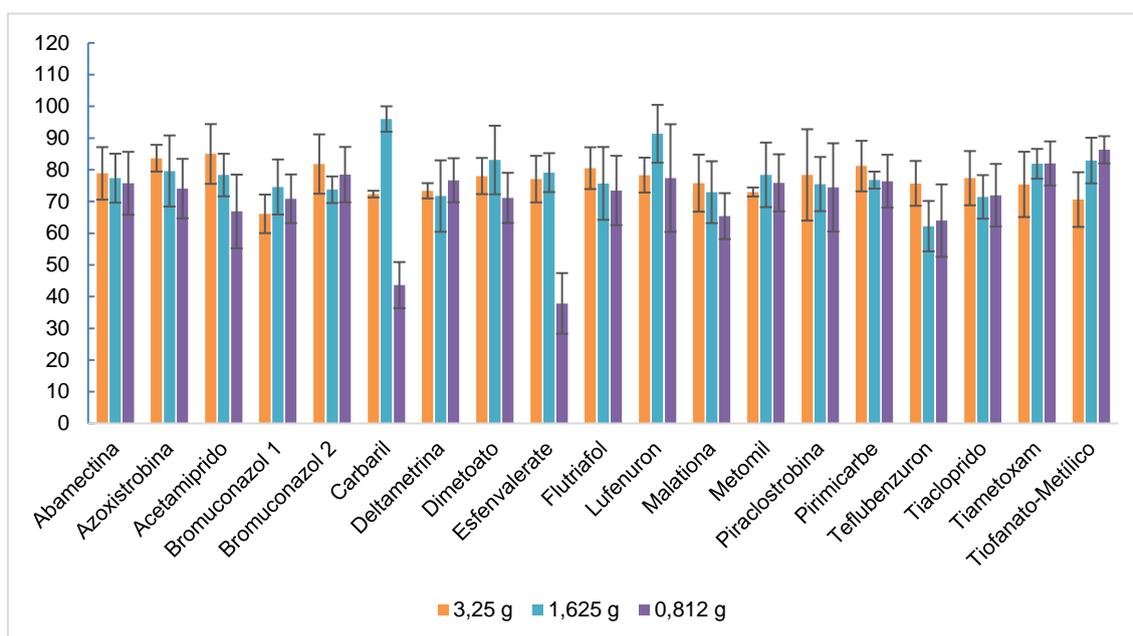
Sais	Quantidade Total (g)		
	2	1	0,5
MgSO₄	2	1	0,5
NaCl	0,5	0,25	0,125
C₆H₅Na₃O₇.2H₂O^a	0,5	0,25	0,125
C₆H₆Na₂O₇.1,5H₂O^b	0,25	0,125	0,062
Total	3,25 g	1,62 g	0,812 g

^a – Citrato tribásico de sódio dihidratado

^b – Citrato dibásico de sódio sesqui-hidratado

Em seguida foram realizados ensaios para avaliar a recuperação dos analitos em estudo no nível de fortificação de 0,3 µg mL⁻¹. A figura 8 mostra os valores de recuperação percentuais obtidos a partir dos testes variando a quantidade de sais na etapa extratora.

Figura 8. Valores percentuais de recuperação (n=3) dos pesticidas na concentração de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ em tomate utilizando o procedimento BS EN 15662:2008 variando a quantidade de sais.



Com base na figura 8, é possível notar que foram obtidos valores de recuperação dentro da faixa de 70%-120% para a grande maioria dos compostos, exceto para carbaril e esfenvalerato que apresentaram valores de recuperação de 44% e 38%, respectivamente, utilizando 0,812 g dos sais. É importante que haja um controle da quantidade de sal na etapa da extração. Isso porque os sais são responsáveis para promover o efeito *salting-out*, sendo o cloreto de sódio designado para o controle da polaridade do meio. Desta forma, conforme houve uma diminuição da quantidade do cloreto de sódio e do sulfato de magnésio, mais compostos oriundos da matriz foram extraídos. Assim, esses compostos se tornam potenciais competidores no momento da ionização, levando a menores recuperações dos analitos em questão [96, 97, 98].

Resultados semelhantes são encontrados na literatura, como mostrado por Anastassiades e colaboradores que avaliaram a quantidade de cloreto de sódio no processo de extração. Foi avaliado o método sem cloreto de sódio, com 0,5, 1 e 2 g do sal. Nas menores quantidade foi verificado que compostos mais polares originários da matriz são extraídos [39]. Também é relatado por Musarurwa e colaboradores, 2021, que avaliaram a influência da quantidade de sulfato de magnésio para a extração de malationa em laranja, maçã e pêra. Foi

relatado que menores quantidade de sulfato de magnésio promovia menores recuperações do malationa. Assim, como explicado por Musarurwa e colaboradores, a adição da quantidade certa de sulfato de magnésio aumenta a temperatura do sistema extrator, levando ao aumento da interação do solvente orgânico com a matriz, uma vez que diminui a viscosidade do solvente orgânico [96].

Mesmo com o método que empregava a menor quantidade sendo promissor, foi observado que no ensaio utilizando 0,812 g da mistura dos sais havia valores de %RSD acima do estabelecido para sete analitos estudados: deltametrina, dimetoato, esfenvalerato, metomil, pirimicarbe, tiacloprido e tiofanato-metílico, como é possível ver na Tabela 10, a qual contém os valores de desvio padrão relativo para o método utilizando 0,812 g e 1,62 g de sais.

Tabela 10. Valores de Recuperações e Desvio Padrão Relativo (n=3) obtidos nos ensaios de recuperação com o nível de fortificação em $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando duas quantidades de sais.

Analitos	0,812 g		1,62 g	
	%REC	%RSD	%REC	%RSD
Abamectina	76	9,1	77	12,0
Azoxistrobina	74	13,0	80	9,7
Acetamiprido	67	17,8	78	11,3
Bromuconazol 1	71	19,0	75	11,3
Bromuconazol 2	78	18,2	74	8,3
Carbaril	44	18,5	96	17,8
Deltametrina	77	25,0	72	14,9
Dimetoato	71	22,9	83	11,8
Esfenvalerate	38	30,4	79	12,3
Flutriafol	73	13,4	76	13,5
Lufenuron	77	16,3	91	5,3
Malationa	65	17,1	73	15,3
Metomil	76	23,4	78	14,6
Piraclostrobina	74	15,3	75	9,5
Pirimicarbe	76	24,9	77	5,5
Teflubenzurom	64	18,4	62	14,2
Tiacloprido	72	27,1	71	12,6
Tiametoxam	82	13,5	82	12,6
Tiofanato-Metílico	86	28,4	83	10,4

Como é possível ver na Tabela 10, um número maior de analitos no ensaio utilizando 0,812 g dos sais apresentaram uma dispersão entre os resultados mais expressivos, destacando o esfenvalerato (30%), tiofanato-metílico (28%) e tiacloprido (27%). Esses valores ultrapassaram o limite estabelecido pelo

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) [97] como critério de aceitabilidade de %RSD>20% [74]. Desta forma, uma vez que os métodos utilizando 3,25 g e 1,62 g apresentaram desempenho semelhante com bons valores de recuperação, optou-se em adotar a quantidade de 1,62 g por: a) manter uma ótima eficiência na extração dos analitos, b) manter uma variação menor entre os resultados obtidos nos ensaios e c) ser visado um método em que tenha bom desempenho usando a menor quantidade de reagente possível.

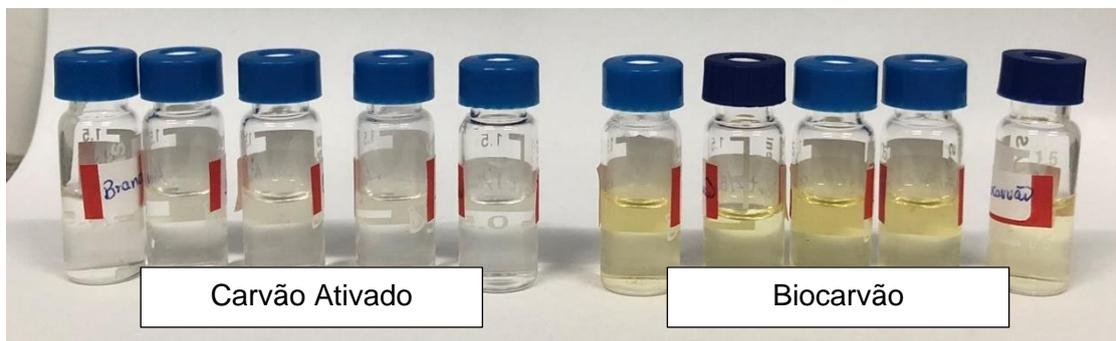
5.3 Avaliação do Procedimento de Clean-up (d-SPE)

5.3.1 Tipo de adsorvente para o clean-up do extrato

Na extração por QuEChERS é aplicado uma etapa voltada para a limpeza do extrato obtido a partir da etapa anterior. Para isso é utilizado a técnica d-SPE com o intuito de retirar todos os possíveis co-extratos presentes na fase orgânica. Logo, é adicionado no extrato uma mistura de adsorvente e sulfato de magnésio. O sulfato de magnésio é utilizado para a secagem de possíveis resíduos de água ainda presentes na fase extratora. Sendo assim, optou-se por manter o uso do sulfato de magnésio para a remoção da água.

Foram avaliados, a priori, os adsorventes Florisil, C18, Alumina Neutra, Sílica, Carvão Ativado, Biocarvão e sem etapa de d-SPE. A eficiência da limpeza foi avaliada pelo perfil cromatográfico e aspecto visual do extrato. Para isso utilizou-se 6 mg do adsorvente e 37,5 mg do sulfato de magnésio. Não foi constatada variação da coloração do extrato entre os ensaios avaliados, com exceção do extrato obtido utilizando o carvão ativado o qual foi o único que se mostrou transparente frente ao pálido amarelo obtido com os outros adsorventes, como visto na figura 9, a qual apresenta a coloração do biocarvão e do carvão ativado.

Figura 9. Aspecto visual dos extratos obtidos utilizando 37,6 mg de sulfato de magnésio e 6,2 mg de carvão ativado e 6,2 mg de Biocarvão.



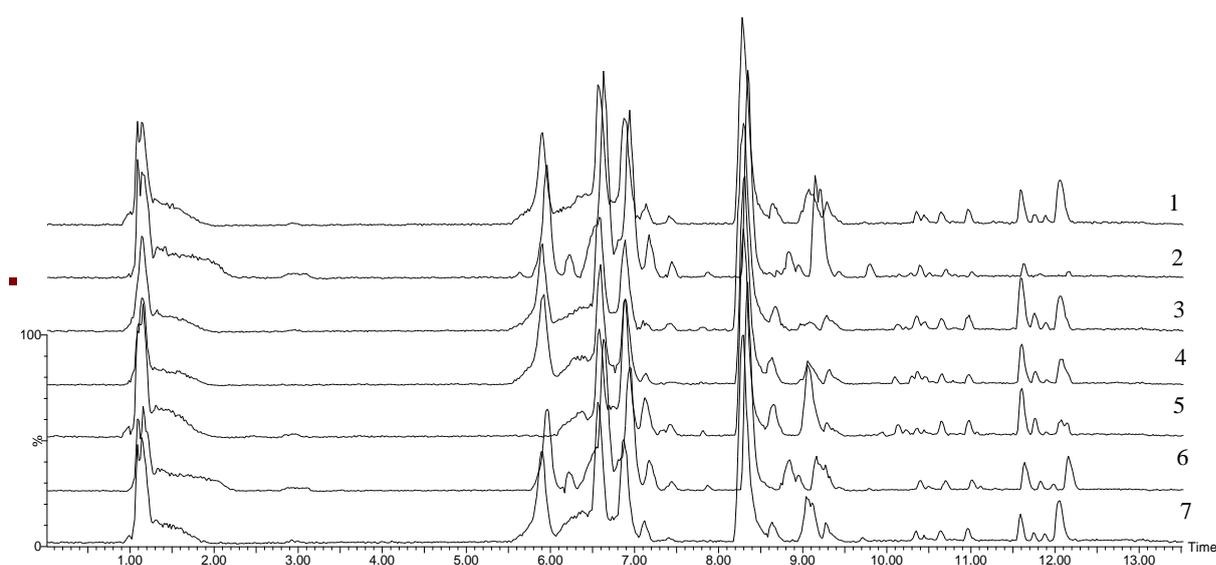
O carvão ativado é um adsorvente aplicado em procedimentos visando a remoção de compostos não polares como pigmentos, carotenoides, esteroides entre outros. Entretanto, as recuperações obtidas são baixas, chegando a 20%, Tabela 11. Essa baixa recuperação é ocasionada pela alta taxa de adsorção dos compostos na superfície do carvão ativado, a qual caracteriza-se pela interação intermolecular entre o analito-adsorvente é maior que a interação analito-solvente. A exemplo, Suo e colaboradores [100] relataram adsorção dos pesticidas por meio dos grupos funcionais contendo átomos de oxigênio, nitrogênio e a rede de elétrons π das duplas ligações dos anéis aromáticos. Outro ponto notável do uso do carvão ativado foi o único que apresentou algumas diferenças no cromatograma (Figura 10), diminuindo a intensidade dos sinais entre 10 e 11 min e a grande diminuição dos sinais presentes entre 11,5 min e 12,3 min, aproximadamente. Uma vez que a modalidade da cromatografia usada é em fase reversa, sugere-se então que tais compostos nesse tempo de retenção sejam compostos com baixa polaridade. Sendo assim o carvão ativado consegue reter com mais intensidade [100,101,102]. Mediante os resultados dos ensaios com o carvão ativado, este adsorvente não foi utilizado posteriormente.

Tabela 11. Avaliação da eficiência dos adsorventes comparando as recuperações (%) e desvio padrão relativo (n=3) utilizando 6,2 mg dos adsorventes na etapa do clean-up

	Alumina		C18		Sílica		Florisil		Biocarvão		Carvão Ativado	
	%REC	%RSD	%REC	%RSD	%REC	%RSD	%REC	%RSD	%REC	%RSD	%REC	%RSD
Abamectina	92	5,6	77	7,7	87	8,0	92	11,9	79	2,0	38	13
Azoxistrobina	98	6,1	80	11,2	89	6,0	97	10,7	93	9,0	44	13
Bromuconazol 2	94	7,4	74	4,2	83	7,1	89	8,6	80	5,5	45	21
Carbaril	101	5,3	96	4,0	94	4,7	91	8,7	86	8,9	379	14
Deltametrina	92	3,5	72	10,8	92	7,1	92	9,0	86	4,6	41	18
Dimetoato	86	8,1	83	6,1	82	7,1	94	8,9	98	6,9	46	15
Esfenvalerate	98	3,0	79	11,5	91	6,7	89	7,9	91	1,8	41	16
Flutriafol	96	8,0	76	9,1	86	5,8	85	6,0	90	1,8	43	14
Malationa	116	3,0	91	10,2	104	5,2	91	11,2	141	6,8	108	20
Metomil	107	12,6	73	8,5	85	8,6	90	10,8	100	7,9	51	15
Piraclostrobina	96	4,4	78	2,7	90	7,2	91	11,4	87	4,6	31	19
Pirimicarbe	94	5,8	75	7,9	88	3,9	93	11,2	92	2,5	45	14
Tiacloprido	100	5,5	77	6,9	85	5,6	97	10,7	92	2,0	56	14
Tiametoxam	78	8,6	62	4,7	120	10,6	97	12,9	59	2,5	46	12
Tiofanato-Metilico	95	4,1	71	7,2	90	8,5	90	9,7	93	4,1	42	14
Lufenuron	95	2,8	82	4,9	93	5,9	101	11,3	87	3,2	44	14
Teflubenzuron	94	3,9	83	5,3	89	7,0	98	11,3	85	2,1	20	7

A figura 10 apresenta os cromatogramas referentes as análises das amostras em branco usando o método sem a etapa d-SPE, C18, Sílica, Florisil e Alumina, Biocarvão e Carvão ativado.

Figura 10. Cromatogramas referentes as análises das amostras sem fortificação utilizando 1,625 g dos sais CEN e com modificações no clean-up, sendo 1) sem dSPE, 2) Carvão Ativado, 3) Sílica, 4) Alumina Neutra, 5) C18, 6) Biocarvão e 7) Florisil.



Com base nesse teste preliminar foi possível perceber que o perfil se manteve inalterado utilizando um adsorvente para clean-up ou não, o que chamou atenção uma vez que os adsorventes utilizados possuem propriedades distintas quando comparados entre si. Mesmo nos estudos de recuperação, o desempenho dos materiais utilizados se mostrou promissor, com exceção do carvão ativado. Surgiram então duas hipóteses: a) os adsorventes usados não estão sendo efetivos na etapa da limpeza e b) a quantidade dos adsorventes não está sendo suficiente para apresentar diferença significativa.

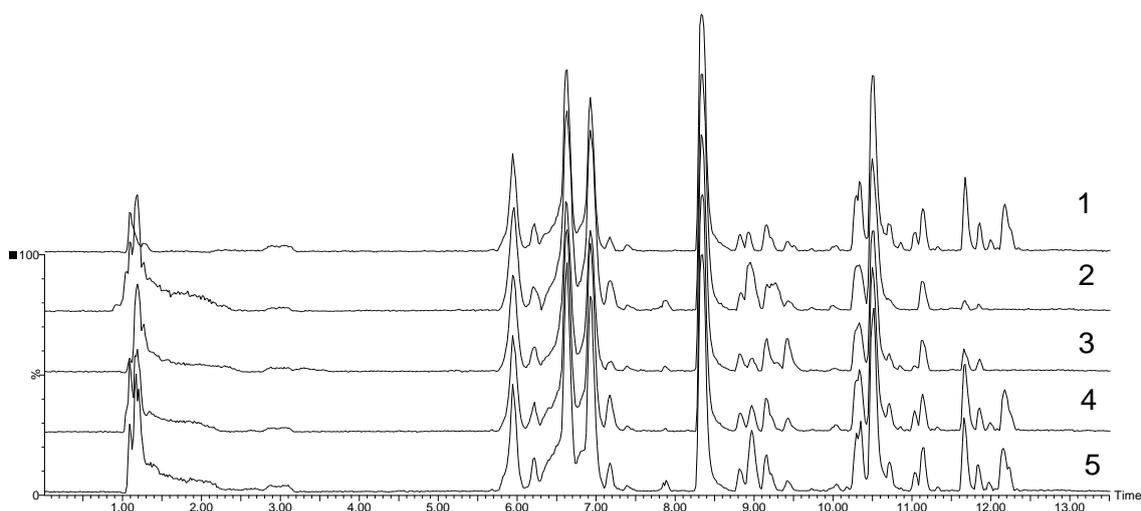
5.3.2 Avaliação da quantidade de adsorventes

Assim, a fim de investigar a primeira hipótese, foi proposto, então, uma extrapolação da quantidade utilizada de adsorventes para a limpeza. Logo, foram utilizado 450 mg de adsorventes, sendo eles C18, Florisil, Sílica, Alumina neutra

e uma mistura de 225 mg de C18 com 225 mg de Biocarvão, e 150 mg de sulfato de magnésio. Para a avaliação desses testes foram estabelecidos como critério a eficiência da limpeza por meio dos cromatogramas, além dos resultados por meio das recuperações [75].

Após os ensaios, os cromatogramas ainda mostram uma certa uniformidade no perfil entre os adsorventes utilizados, como é visto na figura 11.

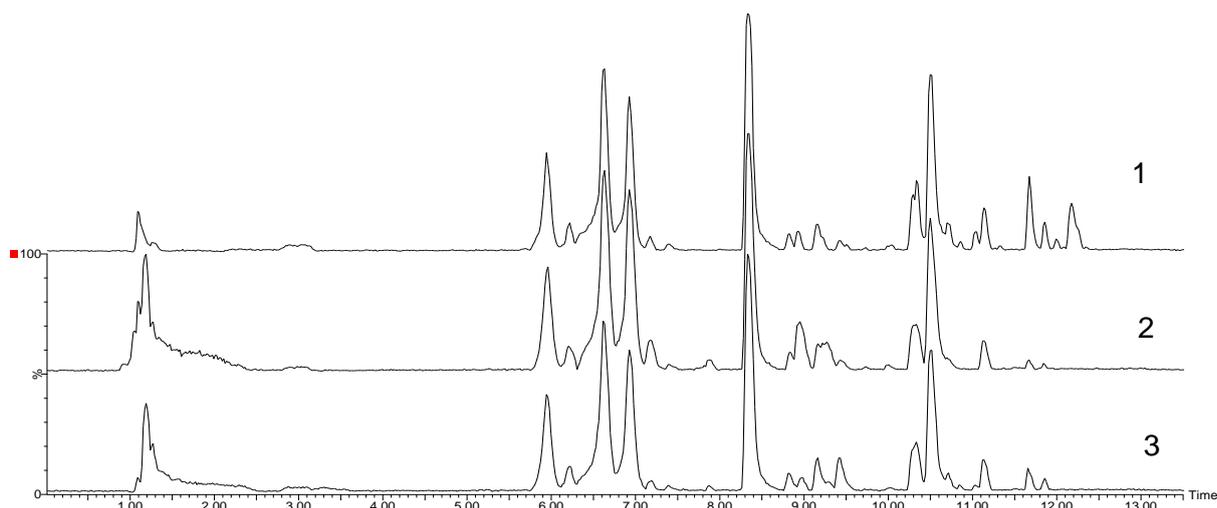
Figura 11. Avaliação da eficiência de limpeza utilizando 450 mg dos adsorventes, sendo 1) Florisil, 2) C18, 3) C18 + Biocarvão, 4) Sílica e 5) Alumina neutra + 150 mg de sulfato de magnésio.



Algumas diferenças foram notadas quando foram utilizados o Florisil, C18 e C18/Biocarvão. De forma geral, o ensaio com o Florisil mostrou uma diminuição no sinal próximo a 1 min e uma diminuição nos sinais entre 6,5 min e 7 min, como é mostrado nos cromatogramas da Figura 12. Isso se dá pela característica do material adsorvente, uma vez que o silicato de magnésio $[Mg.Al(SiO_4)_n]$ é um adsorvente polar que possui facilidade em reter ácidos orgânicos, pigmentos, açúcares e outras moléculas polares [103, 104]. Na literatura há relatos sobre a aplicação de Florisil como um eficiente adsorvente na etapa de limpeza em QuEChERS, como Lozowicka e colaboradores [103] que estudaram o espirotetramato e seus metabólitos em salsa e rabanete obtiveram uma limpeza mais eficaz com este adsorvente, removendo interferentes e obtendo recuperações acima de 70%.

O uso de C18 ocasionou uma redução nos sinais mais ao fim dos cromatogramas e este efeito foi verificado do também no cromatograma aplicando C18 com biocarvão indicando que a remoção desses compostos é devido ao C18. Esse adsorvente contém propriedades apolares. O mecanismo de interação com os analitos baseia-se nas interações hidrofóbicas entre a cadeia C18 e os analitos, sendo assim, interagem mais fortemente com analitos de médio/não polares [105]. Desta forma, tais compostos no final dos cromatogramas podem tender a menor polaridade, interagindo mais efetivamente com esse material, como de fato aconteceu nos ensaios.

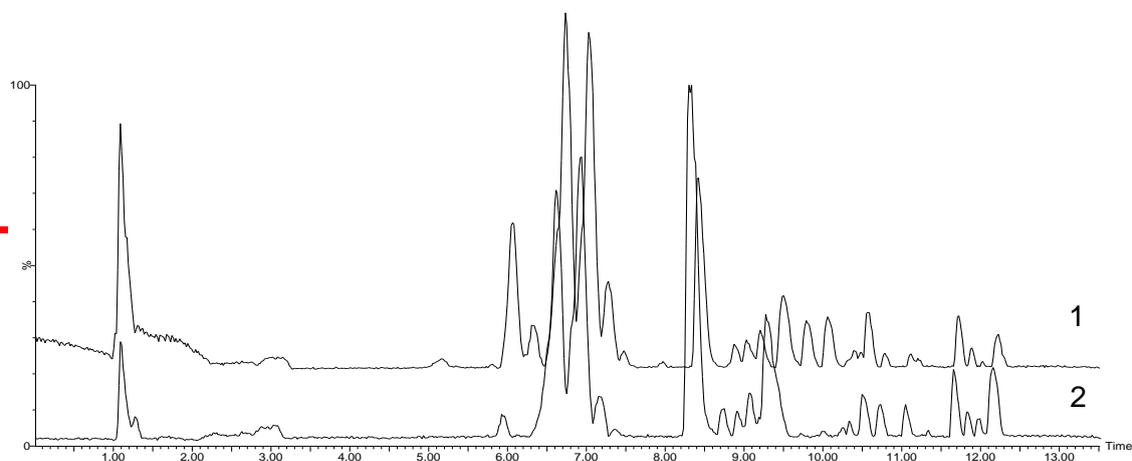
Figura 12. Cromatogramas obtidos das amostras de tomate sem fortificação utilizando 450 mg de 1) Florisil, 2) C18 e 3) C18 + Biocarvão.



Sendo assim, com base nos resultados prévios, foi efetuado um estudo de efeito matriz com C18 e Florisil. O método com Florisil proporcionou resultados com valores dentro da faixa aceitável, sendo 15 analitos dentro da faixa de -19% a 2%, 2 analitos entre -21% e -25%. Entretanto, o esfenvalerato foi o único que apresentou -51% de efeito matriz, mostrando forte supressão do sinal. Contudo, o método com C18 resultou em valores ainda mais afetado frente aos resultados obtidos com o uso do Florisil. Para o C18, apenas metomil apresentou um efeito matriz baixo com o valor de 5%. Os demais analitos apresentaram valores entre -39% a -81. Desta forma, optou-se por utilizar o Florisil como adsorvente para a etapa de clean-up do método.

Após a escolha do tipo de material adsorvente a ser utilizado na etapa do *d*-SPE, foi verificada a possibilidade de redução da quantidade de adsorvente. Assim, efetuou-se um estudo utilizando 450 mg e 150 mg para avaliar a eficiência do método com quantidades menores de adsorvente. A princípio, analisando os cromatogramas das amostras em branco, foi possível perceber algumas diferenças entre os cromatogramas. O procedimento com 450 mg de adsorvente se mostrou levemente mais eficiente na redução dos sinais de alguns compostos, sendo mais visível a diferença nos sinais entre 1 min e 1,5 min, no sinal em 6 min, aproximadamente, e nos sinais entre 9 a 10 min, figura 13. Esse primeiro resultado sugere que, de fato, a quantidade de adsorvente é importante para este método, uma vez que a quantidade de co-extrativos é significativa, caso não haja uma etapa de limpeza eficiente.

Figura 13. Comparação dos cromatogramas das amostras de tomate em branco no estudo da eficiência do processo de clean-up utilizando 1) 150 mg de Florisil + 150 mg de sulfato de magnésio e 2) 450 mg de Florisil + 150 mg de sulfato de magnésio.



Com o uso de 150 mg foram obtidos resultados entre 26% a -24% de efeito matriz e recuperações de 76% a 126% e %RSD de <21%. Em contrapartida, o método com 450 mg proporcionou valores de efeito matriz entre -53% e 24%, com recuperações na faixa de 47% a 124% e %RSD que variaram entre 0,2% a 26%. Foi notado que os compostos mais polares demonstraram uma influência da supressão de sinal mais expressiva que os compostos menos polares, o que pode ser relacionado ao fato que o Florisil é um adsorvente com

características polares, como dito anteriormente. Sendo assim, é possível que essas moléculas mais polares tenderam a ter uma maior interação com o adsorvente que o solvente orgânico utilizado para a extração por conta da superfície hidrofílica do material [103, 104]. Logo, optou-se, então, utilizar 150 mg de Florisil e 150 mg de sulfato de magnésio para compor a etapa de *d*-SPE do método.

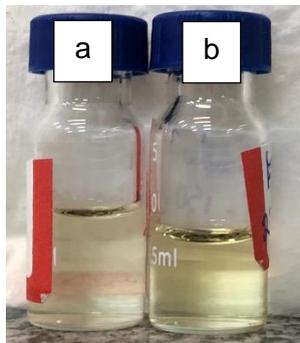
5.3.3 Avaliação da diluição do extrato

Após o estudo sobre o tipo e quantidade de adsorvente para compor a etapa de *d*-SPE, foi investigado a possibilidade de um método sem a etapa de *clean-up*, utilizando apenas a diluição do extrato. Essa alternativa se fez necessária uma vez que não houve mudança expressiva entre o uso de diferentes adsorventes e quantidades.

Na literatura é verificado a aplicação de uma etapa de *clean-up* para o método QuEChERS com a técnica *d*-SPE. Entretanto, recentemente Stringhini e colaboradores [106] realizaram um estudo na otimização do procedimento QuEChERS em amostras de tomate e relataram ensaios variando os adsorventes presentes na etapa de limpeza com quitosana, Strata-X, PSA, PSA + C18, PSA + Florisil desativado, PSA + Florisil ativado, PSA + GCB e a necessidade real de uma etapa de limpeza, empregando uma diluição no extrato após a etapa de extração e perceberam que a diluição foi tão efetiva quanto o método aplicando a etapa de limpeza.

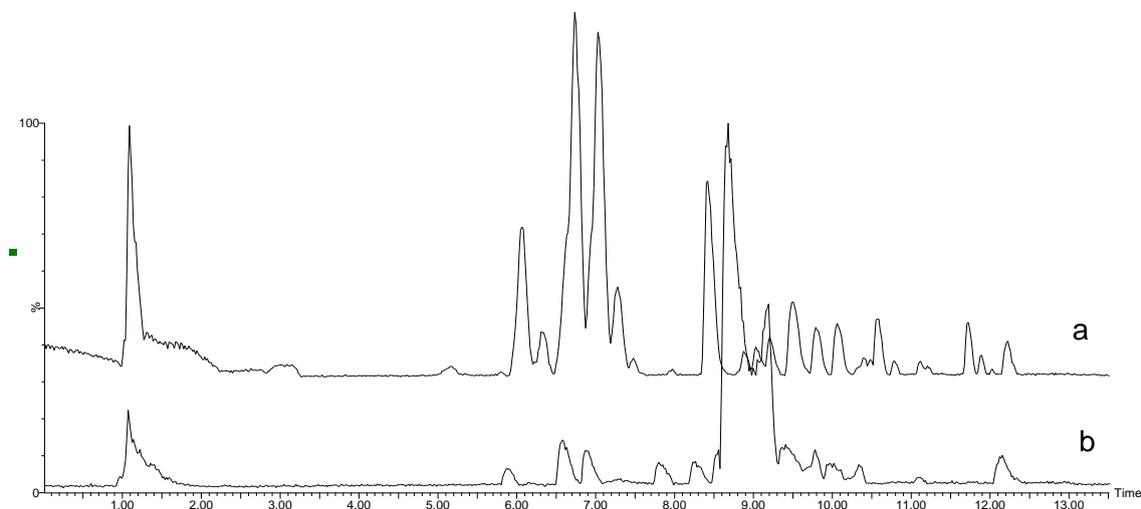
Logo, foi realizado a avaliação do uso da diluição do extrato. Após o processo de extração, foi realizada uma diluição de 10x no extrato, retirando uma alíquota de 100 μL e solubilizando em 900 μL de metanol, a fim de se obter uma concentração final de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, Figura 14.

Figura 14. Extrato de tomates obtido utilizando a diluição de 10x (a) e extrato obtido utilizando 150 mg de Florisil (b).



Analisando o cromatograma referente ao estudo da diluição é possível perceber que, de fato, há uma redução de compostos da matriz, Figura 15.

Figura 15. Cromatogramas de amostra em branco adquirido no método a) utilizando 150 mg de Florisil e b) utilizando a diluição com fator de 10x;



Porém, o procedimento de diluição não se mostrou adequado avaliando os valores de recuperação. A Tabela 12 mostra os valores de recuperação e o efeito matriz para o método. Apenas um analito foi menos afetado pelo efeito matriz, o esfenvalerato. Os demais compostos sofreram uma forte supressão de sinal da maioria dos analitos estudados. A supressão do sinal ocorre quando há competição entre os compostos originários da matriz e os analitos no momento da ionização. Há relatos na literatura que mostram que mesmo com uma diluição, a influência da supressão de sinal oriunda da competição dos compostos da matriz ainda é significativa, como mostrado por Jiao e colaboradores, em que estudaram vários fatores de diluição para seis tipos de chás. Utilizando uma

diluição de 20x, Jiao e colaboradores, 2016, obtiveram uma supressão de sinal para um dos analitos de -65%, assemelhando-se aos resultados encontrados no presente trabalho [107].

Tabela 12. Valores de recuperação, desvio padrão e efeito matriz referentes ao método utilizando a diluição após a etapa da extração em amostra de tomate fortificados na concentração de 100 µg L⁻¹ do método.

ANALITOS	REC%	%RSD	EM
METOMIL	78%	17%	-22
TIAMETOXAM	71%	7%	-29
DIMETOATO	71%	1%	-29
ACETAMIPRIDO	61%	8%	-39
TIACLOPRIDO	74%	4%	-26
CARBARIL	77%	8%	-23
PIRIMICARBE	77%	11%	-23
TIOFANATO-METÍLICO	63%	15%	-37
FLUTRIAFOL	70%	16%	-30
AZOXISTROBINA	81%	16%	-19
MALATIONA	56%	7%	-44
BROMUCONAZOL 1	68%	24%	-32
BROMUCONAZOL 2	42%	19%	-58
PIRACLOSTROBINA	62%	4%	-38
TEFLUBENZUROM	46%	11%	-54
LUFENURON	66%	15%	-34
ABAMECTINA	45%	11%	-55
DELTAMETRINA	66%	9%	-34
ESFENVALERATE	89%	19%	-11

Desta forma, a aplicação do procedimento de diluição foi descartada, visto que tal proposta não se provou eficiente quando avaliada sob o ponto de vista do estudo de recuperação, com valores de recuperação abaixo de 70% e com forte influência da matriz.

5.4 Validação do Método Analítico

Após otimizar tanto as condições instrumentais de análise e o método de extração, foi realizada a validação do método. Para tanto, os parâmetros selecionados para a determinação de abamectina, azoxistrobina, acetamiprido, bromuconazol, carbaril, deltametrina, dimetoato, esfenvalerato, flutriafol,

lufenuron, malationa, metomil, piraclostrobina, pirimicarbe, teflubenzuron, tiacloprido, tiametoxam e tiofanato-metílico em tomate foram: linearidade, sensibilidade, seletividade, exatidão, precisão e limite de quantificação (LOQ). Esses parâmetros foram determinados baseados nas indicações das diretrizes de validação da SANCO bem como também as diretrizes estabelecidas pela ANVISA [68, 69].

5.4.1 Linearidade e Sensibilidade

O primeiro parâmetro avaliado foi a linearidade do método analítico por meio da faixa linear, o qual visa definir o intervalo de concentração em que há a possibilidade de quantificar os analitos de forma confiável. Nos procedimentos com base no LC/MS é comum estabelecer duas linearidades que são intimamente ligadas: a) correlação linear entre sinal do analito e a concentração do mesmo em soluções constituídas com solvente e b) a correlação linear do sinal do analito e a concentração do mesmo quando solubilizado em soluções as quais contém a complexidade dos componentes da matriz (extrato) [68, 69, 108].

Desta forma, para compor a curva de calibração foram utilizados os níveis seguintes de concentrações: 1; 2; 5; 7,5; 10; 20; 30; 50; 75; 100 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, como é possível ver na Tabela 13.

Tabela 13. Curvas analíticas para os pesticidas em metanol (n=3) com intervalo de concentração, coeficiente de determinação e equação da reta.

Analito	Faixa de Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coeficiente de determinação (r^2)	Equação da reta
Abamectina	10 – 300	0,996	$y = 2270,6x + 33282$
Azoxistrobina	1 – 300	0,998	$y = 31282x - 611,7$
Acetamiprido	5 - 300	0,993	$y = 14063x - 443,91$
Bromuconazol-1	7,5 - 300	0,993	$y = 3562,9x + 4195,2$
Bromuconazol-2	2 - 300	0,995	$y = 2617,1x + 7853,5$
Carbaril	10 - 300	0,991	$y = 8129x + 57740$
Deltametrina	1 - 300	0,994	$y = 5954,4x + 13942$
Dimetoato	1 - 300	0,991	$y = 12228x + 16053$
Esfenvalerato	1 - 300	0,995	$y = 3717,2x + 26815$
Flutriafol	2 - 300	0,993	$y = 8500,7x - 3355,9$
Lufenuron	1 - 300	0,996	$y = 3195x + 21836$
Malationa	20 - 300	0,998	$y = 5579,6x - 86452$
Metomil	20 - 300	0,993	$y = 5040,8x - 999,08$
Piraclostrobina	1 - 300	0,991	$y = 27692x + 110041$
Pirimicarbe	2 - 300	0,992	$y = 30039x + 65051$
Teflubenzurom	1 - 300	0,994	$y = 2933,7x + 25211$
Tiacloprido	5 - 300	0,992	$y = 14143x + 9156,9$
Tiametoxam	10 - 300	0,993	$y = 8572,1x + 3984,4$
Tiofanato-Metílico	1 - 300	0,9996	$y = 23477x - 10577$

É possível afirmar com base nos dados apresentados na Tabela 13 que os valores obtidos dos coeficientes de determinação para cada analitos estudado foram satisfatórios, com valores acima de 0,99, o que aponta uma boa linearidade dos sinais dos analitos e a concentração deles conforme ocorre a alteração das concentrações, conforme estabelecido pelo SANCO e ANVISA [68, 69]. Além disso, é possível avaliar a sensibilidade a partir da equação da reta, a qual indicará que há maior sensibilidade conforme o aumento da inclinação da reta. Desta forma, percebe-se que os pesticidas que apresentaram uma maior sensibilidade de resposta conforme há uma variação a concentração foi a malationa [75].

5.4.2 Seletividade (Efeito Matriz)

É comum que nos métodos empregando vários analitos com classes distintas nem sempre resultem em valores tão satisfatórios, apresentando valores de recuperações acima ou abaixo de 100%, sendo categorizado como

valores que sofreram influência dos compostos da matriz: ou seja, efeito matriz [109].

O Efeito matriz é um parâmetro de extrema relevância na validação do método analítico. No presente estudo, o efeito matriz foi avaliado a partir da determinação da razão dos coeficientes angulares, RCA. Para tanto, duas curvas analíticas foram elaboradas. Todos os pontos de ambas as curvas foram executados utilizando 50 µL da solução padrão dos pesticidas em 450 µL. A Tabela 14 contém os intervalos de concentração, equações da reta (do solvente e do extrato), o coeficiente de determinação e o RCA. Foi utilizado o mesmo intervalo de concentração para cada analito estudado [109,110].

Tabela 14. Intervalos de concentração, equações da reta, coeficientes de determinação e razão dos coeficientes angulares para os pesticidas estudados.

Analito	Intervalo µg L ⁻¹	Amostra			Solvente		RCA
		R ²	Equação da Reta	R ²	Equação da Reta		
Abamectina	10 – 300	0,990	y = 1898x - 28833	0,996	y = 2270,6x + 33282	0,84	
Azoxistrobina	1 – 300	0,998	y = 33823x - 6500,2	0,998	y = 31282x - 611,7	1,08	
Acetamiprido	5 - 300	0,996	y = 14501x + 196076	0,993	y = 14063x - 443,91	1,03	
Bromuconazol 1	7,5 - 300	0,996	y = 3199,6x - 22510	0,993	y = 3562,9x + 4195,2	0,90	
Bromuconazol 2	2 - 300	0,998	y = 2081,2x + 7098,9	0,995	y = 2617,1x + 7853,5	0,80	
Carbaril	10 - 300	0,997	y = 8985,4x + 375791	0,991	y = 8129x + 57740	1,11	
Deltametrina	1 - 300	0,997	y = 6365,2x + 65064	0,994	y = 5954,4x + 13942	1,07	
Dimetoato	1 - 300	0,998	y = 12277x - 52032	0,991	y = 12228x + 16053	1,00	
Esfenvalerato	1 - 300	0,998	y = 2910,1x + 48052	0,995	y = 3717,2x + 26815	0,78	
Flutriafol	2 - 300	0,998	y = 8416,9x + 6287,4	0,993	y = 8500,7x - 3355,9	0,99	
Lufenuron	1 - 300	0,995	y = 3514,4x + 27701	0,996	y = 3195x + 21836	1,10	
Malationa	20 - 300	0,951	y = 5473,4x + 3E+06	0,998	y = 5579,6x - 86452	0,98	
Metomil	20 - 300	0,983	y = 5538,3x - 5025,5	0,993	y = 5040,8x - 999,08	1,10	
Piraclostrobina	1 - 300	0,999	y = 31429x + 100433	0,991	y = 27692x + 110041	1,13	
Pirimicarbe	2 - 300	0,990	y = 33449x - 193709	0,992	y = 30039x + 65051	1,11	
Teflubenzuron	1 - 300	0,998	y = 3131x + 15139	0,994	y = 2933,7x + 25211	1,07	
Tiacloprido	5 - 300	0,999	y = 14847x - 51579	0,992	y = 14143x + 9156,9	1,05	
Tiametoxam	10 - 300	0,996	y = 8500,6x + 64623	0,993	y = 8572,1x + 3984,4	0,99	
Tiofanato-Metílico	1 - 300	0,999	y = 19981x - 11634	0,999	y = 23477x - 10577	0,85	

Mediante aos resultados obtidos para o RCA foi possível notar que o esfenvalerato foi o analito com que mais sofreu uma supressão de sinal (efeito matriz negativo), com um valor de 22%. Além disso, há compostos que houve um enriquecimento do sinal na matriz frente ao sinal obtido no solvente, superando assim valores acima de 1,00. Dentre esses, destaca-se o de maior

valor, o piraclostrobina, com o valor de 1,13 de RCA, um enriquecimento de sinal em 13%. Cutillas e colaboradores, 2018, afirma que um efeito matriz com valores entre -20% e 20% são considerados como efeito matriz irrelevante, tornando-se apenas com baixa supressão ou enriquecimento valores que ultrapassam a faixa e chegam a -50% ou 50% e supressão/enriquecimento significativo ultrapassando os -50% ou 50%. Logo é possível afirmar que, de fato, tais resultados são aceitáveis e adequados para dar prosseguimento ao processo de validação [107,111].

5.4.3 Precisão e Exatidão

Para assegurar a eficiência do método otimizado em diferentes níveis de concentração dos analitos, foi avaliado a exatidão e precisão. A Exatidão do método foi avaliada por meio dos valores de recuperação obtidos a partir das extrações por QuEChERS em 3 níveis de concentrações e em triplicata para cada respectivo nível de concentração, sendo apresentado na tabela 15 os valores de recuperação para cada nível avaliado. Para o todos os pesticidas o método foi avaliado nas concentrações de 20, 30 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 15. Resultados de recuperação média (%) e desvios padrão relativos para os três níveis de concentração testados (n=3);

ANALITO	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação Média (%)	RSD (%)
Abamectina	20	80	18
	30	92	1
	50	87	7
Azoxistrobina	20	78	7
	30	92	3
	50	93	4
Acetamiprido	20	79	8
	30	114	10
	50	104	10
Bromuconazol 1	20	101	13
	30	92	13
	50	70	7
Bromuconazol 2	20	1	11
	30	85	5
	50	80	8

Tabela 15. Continuação

Carbaril	20	100	5
	30	85	6
	50	112	10
Deltametrina	20	102	5
	30	114	8
	50	102	9
Dimetoato	20	101	8
	30	99	15
	50	100	5
Esfenvalerate	20	102	9
	30	75	10
	50	95	7
Flutriafol	20	100	9
	30	113	10
	50	93	9
Lufenuron	20	80	18
	30	83	5
	50	80	5
Malationa	20	85	18
	30	98	3
	50	94	9
Metomil	20	121	18
	30	97	9
	50	81	13
Piraclostrobina	20	93	9
	30	80	5
	50	88	5
Pirimicarbe	20	79	15
	30	95	15
	50	85	10
Teflubenzuron	20	80	17
	30	87	5
	50	75	6
Tiacloprido	20	108	10
	30	108	1
	50	116	9
Tiametoxam	20	83	14
	30	108	7
	50	86	9
Tiofanato-Metilico	20	83	9
	30	93	3
	50	96	5

A precisão foi determinada por meio dos ensaios de repetibilidade utilizando o mesmo método otimizado, o qual afirma que a repetibilidade expressa a fidelidade obtida nas mesmas condições operações, como mesmo analista, equipamentos, condições experimentais etc., aplicadas em um curto

intervalo de tempo. Logo, a precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade a partir da determinação do desvio padrão relativo (RSD) das análises por dias diferentes (Interdia) e no mesmo dia (intradia). Os ensaios para a avaliação da precisão foram realizados utilizando o nível de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ por 3 dias consecutivos. A Tabela 16 apresenta as recuperações dos analitos, bem como os valores de RSD em porcentagem. Para avaliar o quão eficiente o método proposto é, os valores foram comparados as faixas descritas na literatura e adotadas anteriormente: valores de recuperação entre 70%-120% e com $\%RSD = < 20\%$ [68, 69, 93].

Tabela 16. Valores percentuais de recuperação e desvio padrão relativo (n=5) do método otimizado para os ensaios do interdia e intradia com o nível de fortificação em $30 \mu\text{g L}^{-1}$.

Analito	Interdia		Intradia	
	%REC	%RSD	%REC	%RSD
Abamectina	93	15	94	18
Azoxistrobina	94	18	107	7
Acetamiprido	111	19	93	4
Bromuconazol 1	94	18	78	8
Bromuconazol 2	106	13	116	10
Carbaril	84	7	103	14
Deltametrina	95	8	96	4
Dimetoato	101	20	112	14
Esfenvalerate	80	18	108	7
Flutriafol	112	20	104	10
Lufenuron	82	14	90	10
Malationa	99	9	104	7
Metomil	93	19	107	5
Piraclostrobina	81	9	99	3
Pirimicarbe	94	20	88	17
Teflubenzuron	87	20	112	14
Tiacloprido	108	19	96	5
Tiametoxam	107	19	88	11
Tiofanato-Metílico	94	11	99	5

Assim, com base nos resultados obtidos nos ensaios de precisão, os valores dos desvios padrão relativos para a precisão interdia e intradia foram \leq

20%, como é definido e defendido pela literatura. Logo, pode-se afirmar que o método desenvolvido foi preciso e exato.

5.4.4 Limite de Quantificação (LOQ)

Os quantificação (LOQ) é um parâmetro que expressa matematicamente o ponto de que todas as técnicas contêm um limite estabelecido o qual, abaixo dele, não é mais possível ter total confiança na quantificação do composto estudado. O limite de quantificação foi definido a partir dos resultados obtidos pelo ensaio de linearidade. Logo, tomou-se como parâmetro a faixa linear de trabalho proveniente das curvas analíticas construídas pelo extrato de tomate fortificado. Assim, o LOQ adotado é referente ao primeiro ponto da curva de calibração utilizada nos ensaios de linearidade [111], expressados na Tabela 17.

Tabela 17. Valores do limite de quantificação (LOQ) para o método otimizado em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Analitos	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Abamectina	0,01
Azoxistrobina	0,001
Acetamiprido	0,005
Bromuconazol 1	0,075
Bromuconazol 2	0,002
Carbaril	0,01
Deltametrina	0,001
Dimetoato	0,001
Esfenvalerate	0,001
Flutriafol	0,002
Lufenuron	0,001
Malationa	0,02
Metomil	0,02
Piraclostrobina	0,001
Pirimicarbe	0,002
Teflubenzuron	0,001
Tiacloprido	0,005
Tiametoxam	0,01
Tiofanato-Metilico	0,001

5.5 Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de pesticida em tomates

Para destacar a qualidade do método proposto, alguns parâmetros analíticos foram comparados a outros métodos publicados para determinação de pesticidas em matrizes alimentares. A Tabela 18 descreve os parâmetros comparados entre os métodos.

A comparação apresentada na Tabela 18 mostrou que o método otimizado neste estudo dispõe de boas recuperações e bons valores de desvio padrão relativo, se comparando aos métodos encontrados na literatura. Além disso, destaca-se a diferença quando comparados aos outros como, por exemplo, a menor quantidade de amostra necessária, menor quantidade de sais e solvente, menor quantidade de adsorvente e sal para o *clean-up*.

Tabela 18. Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de pesticidas em matrizes de tomate

Método analítico	Matriz	Extração		dSPE		%REC	%RSD	REF
		Solvente	Sais	Sal	Adsorvente			
QuEChERS/LC-MS	Tomate (5g)	ACN (5 mL)	1 g MgSO ₄ , 0,25 g NaCl, 0,25 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O ^a e 0,125 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O ^b	150 mg MgSO ₄	150 mg Florisil	78 - 116	<20	*
QuEChERS/GC-MS e LC-MS	Uva, Limão, cebola e tomate (10 g)	ACN (10 mL)	4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl, 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O ^a e 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O ^b	950 mg MgSO ₄	150 mg PSA	72-120	<6	[112]
QuEChERS/LC-MS/MS	Alface, maçã, uva e Tomate (5 g)	ACN (5 mL)	2 g MgSO ₄ , 0,5 g NaCl, 0,5 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O ^a e 0,25 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O ^b	600 mg MgSO ₄	200 mg PSA	83-115	<18	[81]
QuEChERS/UPLC-MS/MS	Tomate (10g)	ACN (10 mL)	4 g MgSO ₄ , 1,7 g CH ₃ COONa	150 mg MgSO ₄	75 mg adsorvente Fluorado	70-106	<19	[85]

*Método do presente estudo;

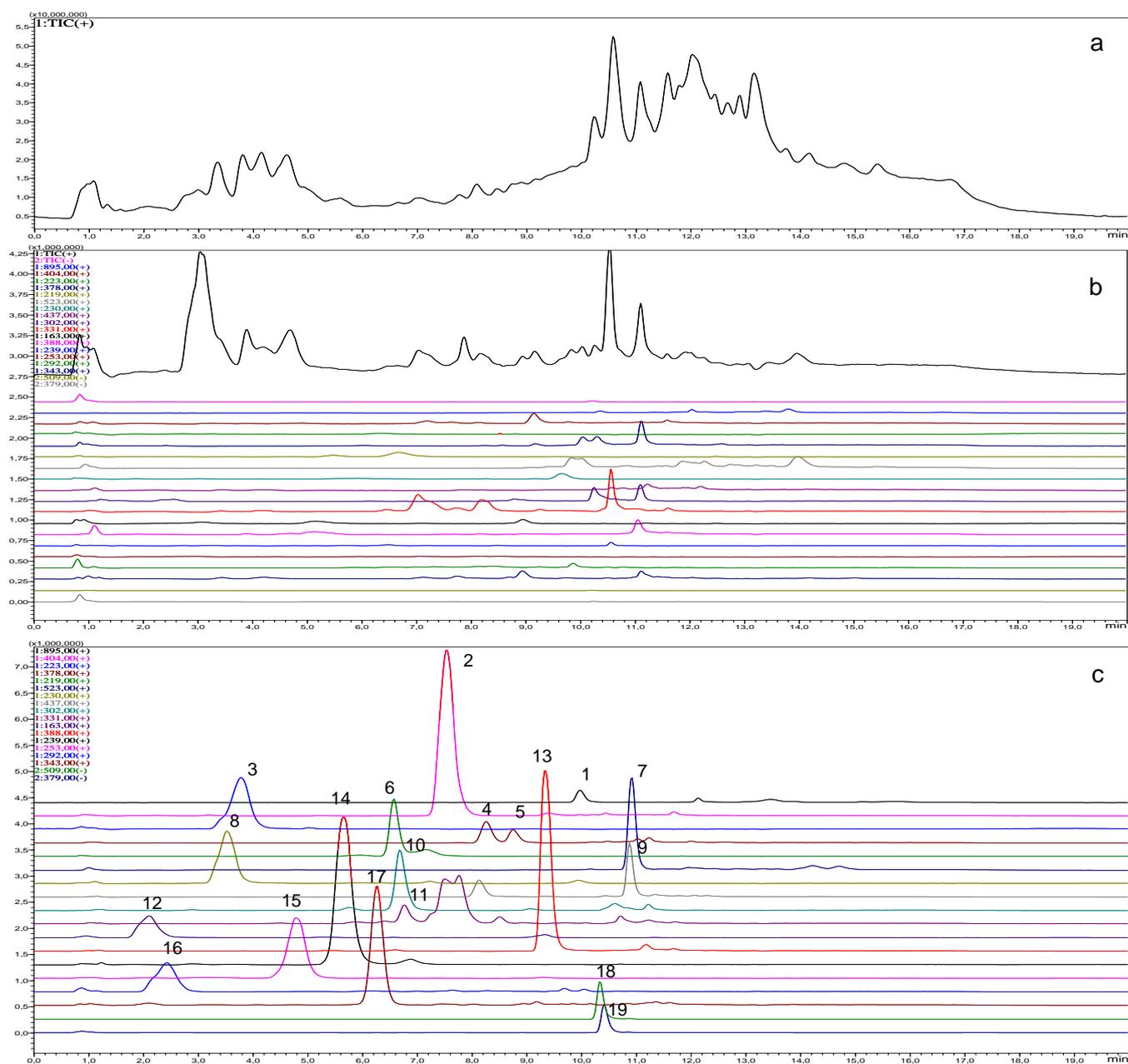
^aCitrato de sódio tribásico dihidratado; ^bCitrato de sódio dibásico sesqui-hidratado;

5.6 Aplicação em amostras de tomates comercial

Após o processo de validação, o método para a determinação de 18 pesticidas, sendo eles: abamectina, azoxistrobina, acetamiprido, bromuconazol, carbaril, deltametrina, dimetoato, esfenvalerato, flutriafol, lufenuron, malationa, metomil, piraclostrobina, pirimicarbe, teflubenzurom, tiacloprido, tiametoxam e tiofanato-metílico foi aplicado em amostra comercializadas no bairro Rosa Elze, situado no município de São Cristóvão/SE.

A amostra foi submetida ao processo de extração descrito no Tópico 4.7 e submetida a análise por LC/MS, como descrito no Tópico 4.6, utilizando tanto o modo de aquisição dados em varredura de íons (SCAN), bem como no monitoramento do íon selecionado (SIM). A Figura 16 apresenta os cromatogramas da análise da amostra comercial de tomate.

Figura 16. Cromatogramas da análise em (a) modo SCAN e (b) modo SIM das amostras de tomates e c) Solução conjunta dos padrões estudados em metanol. Considerar as condições cromatográficas da Tabela 5.



1 Abamectina; 2 Azoxistrobina; 3 Acetamiprido; 4 Bromuconazol-1; 5 Bromuconazol-2; 6 Carbaril;
7 Deltametrina; 8 Dimetoato; 9 Esfenvalerato; 10 Flutriafol; 11 Malationa; 12 Metomil; 13
Piraclostrobina; 14 Pirimicarbe; 15 Tiacloprido; 16 Tiametoxam; 17 Tiofanato-metilico; 18
Lufenuron; 19 Teflubenzuron;

Alguns sinais relativamente intensos podem ser observados no cromatograma utilizando o monitoramento de íons selecionado (SIM), com pode ser observado na figura 16. Logo, visando comprovar a possível presença dos analitos na amostra, foi feito um estudo com os tempos de retenção dos picos presentes na amostra com os tempos de retenção dos analitos em solvente.

Entretanto, com base nos tempos de retenção obtidos nessa solução dos analitos em solvente foi constatado que não há, de fato, a presença dos analitos na amostra, uma vez que os tempos não coincidem. Desta forma, é sugerido que a amostra de tomate analisada não apresenta resíduos de nenhum dos pesticidas estudados, levando o intervalo de concentração estipulado para o método aplicado.

6 CONCLUSÕES

As condições instrumentais de análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foram obtidas e mostraram adequadas para a separação, qualificação e quantificação dos pesticidas esfenvalerato, abamectina, lufenurom, metomil, piraclostrobina, teflubenzurom, tiacloprido, tiofanato-metílico, carbaril, dimetoato, pirimicarbe, malationa, flutriafol, bromuconazol, deltametrina, azoxistrobina e tiametoxam, possibilitando uma análise efetiva e uma ótima resposta linear com valores próximos a $R^2 = 0,99$ para a faixa de concentração de $0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A primeira etapa da extração do procedimento QuEChERS se mostrou eficiente para os demais analitos em tomate, resultando em ótimos valores de recuperação para a concentração de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. O método aplicado foi baseado na proposta adotada pela comissão europeia, utilizando sais de citrato na extração. Logo, foi avaliado a efetividade aplicando diferentes quantidades dos sais no processo de extração. A quantidade de sais que promoveu melhores valores de recuperação foi obtida com 1,62 g da mistura, com valores na faixa de 66-96% e %RSD médio de $\pm 11\%$.

O procedimento de limpeza aplicando d-SPE também se mostrou efetivo, tanto para reter compostos coextrativos da matriz utilizando Florisil juntamente com o sulfato de magnésio. Foram obtidos valores de recuperação e desvio padrão relativo médios de $91,7\% \pm 9,7\%$ respectivamente, os quais são aceitáveis dentro das diretrizes regulamentadoras.

A diminuição da quantidade de adsorvente no d-SPE apresentou bons valores de recuperação para todos os pesticidas estudados, possibilitando uma redução de 450 mg do Florisil + 150 mg do sulfato de magnésio para 150 mg de Florisil + 150 mg de sulfato de magnésio, com recuperações entre 76% a 126% e efeito matriz que variou entre 26% e -24%, ficando dentro da faixa de baixo efeito matriz, apresentando boa eficiência com uma menor quantidade de reagente.

Também foi avaliado a possibilidade da eliminação da etapa de clean-up

empregando uma diluição do extrato, entretanto tal método não se mostrou efetivo, uma vez que foram obtidos altos valores de efeito matriz em até -58%, sendo visível a forte supressão de sinal dos analitos, mantendo-se a utilização da técnica dSPE.

Assim, o método otimizado utilizou para a etapa de extração 1,62g da mistura de sais composta por sulfato de magnésio, cloreto de sódio e os sais de citrato. Para a etapa de limpeza foram utilizados 150 mg de Florisil e 150 mg de sulfato de magnésio.

Os parâmetros de validação estudados apresentaram bons resultados, permitindo boa linearidade, sensibilidade e eficiência do método desenvolvido com a técnica de extração por QuEChERS e análise por LC/MS. O método proposto foi aplicado na análise de amostras de tomates comercializados em São Cristóvão, Sergipe. Contudo não foi verificado resíduos de pesticidas nestas amostras.

7 PESPECTIVAS DO TRABALHO

- Estender a aplicação do método em tomates produzidos e comercializados em Itabaiana/SE

8 REFERÊNCIAS

- [1] CALBO, Adonai Gimenez. **Armazenamento de hortaliças**. EMBRAPA, Brasília:DF 2001.
- [2] EMBRAPA – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. **Rastreabilidade e Certificação do Sistema de Produção do Tomatec**. Disponível em : <https://www.embrapa.br/busca-de-projetos/-/projeto/203060/rastreabilidade-e-certificacao-do-sistema-de-producao-do-tomatec>. Consultado em 10/07/2020.
- [3] EMBRAPA – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. **Soluções tecnológicas**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/1245/tomate-em-cultivo-sustentavel---tomatec>. Consultado em 10/07/2020.
- [4] TALAMINI, V.; NUNES, M. U. C. Estratégias de controle das principais doenças do tomateiro orgânico na região central de Sergipe. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2018.
- [5] ALSAMIR, M., MAHMOOD, T., TRETOWAN, R., AHMAD, N. An overview of heat stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 1654, 2021
- [6] KHAPTE, P. S., KUMAR, P., BURMAN, U., KUMAR, P. Deficit irrigation in tomato: Agronomical and physio-biochemical implications. **Scientia horticulturae**, v. 248, p. 256-264, 2019
- [7] ANVISA; Programa de Análise de resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Relatório das amostras analisadas no período de 2017 – 2018. Brasília: s.n., 2019. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acessado em 17/06/2020.
- [8] KIM, L.; LEE, D; CHO, H-K; CHOI, S-D; Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 22, p. e00063, 2019.
- [9] DA CRUZ, P M F; BRAGA, G C; DE GRANDI, A M. Composição química, cor e qualidade sensorial do tomate seco a diferentes temperaturas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 1475-1486, 2012.
- [10] MOURA-ANDRADE, Graziela Cristina Rossi; OETTERER, Marília; TORNISIELO, Valdemar Luiz. O tomate como alimento-cadeia produtiva e resíduos de agrotóxicos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 2010.
- [11] . VITALE, A A; BERNATENE, E A; POMILIO, A.B.. Carotenoides en quimioprevención: Licopeno. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 44,

p. 195-238, 2010.

[12] NARENDERAN, S. T.; MEYYANATHAN, S. N.; BABU, B. Review of pesticides residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques. **Food Research International**, v. 133, p. 109141, 2020.

[13] Companhia Nacional de Abastecimento. Compêndio de Estudos Conab / Companhia Nacional de Abastecimento. – v.1 (2016-). - Brasília: Conab, 2016-

[14] IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Consultado em 09/07/2020

[15] LOPES, C.A.; DE ÁVILA, A. C. Doenças do tomateiro. **Embrapa Hortaliças-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2005.

[16] LOPES, C. A.; REIS, A. Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2011.

[17] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Pesticidas**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Consultado em 15/06/2020

[18] PORCIUNCULA, L. M.; TEXEIRA, A. R.; SANTOS, Maria F.C.; D'OCA, Marcelo, G.M.; SANTOS, Leonardo S.; NACHTIGALL, Fabiane M.; ORTH, Elisa S.; D'OCA, Caroline R.M.. Novel lipophilic analogues from 2, 4-D and Propanil herbicides: Biological activity and kinetic studies. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 231, p. 104947, 2020.

[19] WANG, Z.; CANG, T.; WU, S.; WANG, X.; ZHAO, X.; Screening for suitable chemical acaricides against two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae*, on greenhouse strawberries in China. **Ecotoxicology And Environmental Safety**. v. 163, p. 63-68, 2018.

[20] DA CRUZ APOLINÁRIO, R. V.; FEDER, M. D.; GOMES, Suzete Araújo Oliveira. **Conscientização sobre o Uso de Inseticidas**. Editora Appris, 2020.

[21] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agrotóxicos em Alimentos**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/en_US/duvidas-sobre-agrotoxicos-em-alimentos. Consultado em 10/07/2020.

[22] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Entenda o monitoramento de agrotóxicos em alimentos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Consultado em 15/06/2020.

[23] FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>. Consultado em 22/06/2020.

[24] DG-SANCO, EUROPEAN COMMISSION, Method Validation and Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. **Document N° SANCO/12495/2011**, Brussels, 01 Jan 2012

[25] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monitoramento de agrotóxicos é divulgado**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>.

Consultado em 15/06/2020.

[26] OLIVEIRA, T. C.; LANÇAS, F. M.; Extração de pesticidas em amostras de alimentos através de sorção em ponteiros descartáveis. **Scientia Chromatographica**. v. 10, p. 243-255, 2018.

[27] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias Autorizadas**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>. Consultado em 10/07/2020.

[28] GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; RODRÍGUEZ, B. S.; HERRERA-HERRERA, A.V.; GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; BORGES, J. Hernández.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.Á.; Evolution and applications of the QuEChERS method. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169-185, 2015.

[29] IUPAC PPDB – International Union Of Pure and Applied Chemistry. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/atoz.htm#P>; acessado em 10/07/2020.

[30] ANASTASSIADES, M., SCHERBAUM, E., TASDELEN, B., & STAJNBAHER, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. **Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**. Weinheim: Wiley-VCH, v. 46, p. 439-458, 2007.

[31] MUSARURWA, H.; CHIMUKA, L.; PAKADE, V. E.; TAVENGWA, N. T.; Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 84, p. 103314, 2019.

[32] MALVAR, J. L.; SANTOS, J. L.; MARTÍN, J.; APARICIO, I.; ALONSO, Esteban; Comparison of ultrasound-assisted extraction, QuEChERS and selective pressurized liquid extraction for the determination of metabolites of parabens and pharmaceuticals in sludge. **Microchemical Journal**, v.157, p.104987, 2020.

[33] CASTRO, Ó.; POCURULL, E.; BORRULL, F. Determination of organophosphate ester flame retardants and plasticisers in fish samples by QuEChERS followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Exposure and risk assessment through fish consumption. **Journal of Chromatography A**, v.1626, p. 461356, 2020.

[34] HERRERA-HERRERA, A. V.; MOHAMED-RODRÍGUEZ, N.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; MALLOL, C.; Development of a QuEChERS-based method combined with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of alkanes in sediments. **Microchemical Journal**, v. 155, p. 104774, 2020.

[35] KIM, L., L., D., Cho, H. K., Choi, S. D. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 22, p. e00063, 2019.

[36] ANASTASSIADES, M., LEHOTAI, S. J., STAJNBAHER, D., SCHENCK,

F.; Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, p. 412-431, 2003.

[37] SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; GONZÁLE-SÁLAMO, J.; HERRERA-HERRERA, A.V., HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á.; Recent advances and developments in the QuEChERS method. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 76, p. 319-374, 2017.

[38] . PERESTRELO, R.; SILVA, P., PORTO-FIGUEIRA, P.; PEREIRA, J.A. M.; SILVA, C. MEDINA, S.; CÂMARA, J. S.; QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 1070, p. 1-28, 2019.

[39] CHOOCHUAY, S.; PHAKAM, J.; JALA, P.; MANEEBOON, T.; TANSAKUL, N.; Determination of Aflatoxin B1 in Feedstuffs without Clean-Up Step by High-Performance Liquid Chromatography. **International Journal of Analytical Chemistry**. v.2018, p. 4650764, 2018.

[40] VALVERDE, S.; IBÁÑEZ, M.; BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J.; HERNÁNDEZ, F., BERNAL, J.; Development and validation of ultra high performance-liquid chromatography–tandem mass spectrometry based methods for the determination of neonicotinoid insecticides in honey. **Food Chemistry**, v. 266, p. 215-222, 2018

[41] SURMA, M.; SADOWSKA-ROCIK, A.; CIEŚLIK, E.; SZNAJDER-KATARZYŃSKA, K. Optimization of QuEChERS sample preparation method for acrylamide level determination in coffee and coffee substitutes. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 98-102, mar. 2017.

[42] LEE, J.; SHIN, Y.; LEE, J.; LEE, J.; KIM, B. J.; KIM, J.-H. Simultaneous analysis of 310 pesticide multiresidues using UHPLC-MS/MS in brown rice, orange, and spinach. **Chemosphere**, v. 207, p. 519-526, set. 2018. Elsevier BV.

[43] MORENO-GONZÁLEZ, D.; ALCÁNTARA-DURÁN, J.; ADDONA, S. M.; BENEITO-CAMBRA, M. Multi-residue pesticide analysis in virgin olive oil by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1562, p. 27-35, ago. 2018

[44] BÜYÜKTIRYAKI, S.; KEÇILI, R.; HUSSAIN, C. M. Functionalized Nanomaterials in Dispersive Solid Phase Extraction: Advances & Prospects. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 127, p. 115893, 2020.

[45] SHABEER, T. A., GIRAME, R., UTTURE, S., OULKAR, D., BANERJEE, K., AJAY, D., ARIMBOOR, R. MENON, K.R.K. Optimization of multi-residue method for targeted screening and quantitation of 243 pesticide residues in cardamom (*Elettaria cardamomum*) by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) analysis. **Chemosphere**, v. 193, p. 447-453 2018

[46] DA COSTA MORAIS, E. H.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C. S. F. Pesticide determination in sweet peppers using QuEChERS and LC–MS/MS. **Food**

Chemistry, v. 249, p. 77-83, 2018.

[47] GRECCO, C. F. MIRANDA, L.F.C; CRUZ, J.C; QUEIROZ, M.E.C. Extração líquido-líquido assistida pelo efeito salting out para análise de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 10, p. 99-110.

[48] KOLE, P. L., VENKATESH, G., KOTECHA, J., SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v. 25, p. 199-217, 2011.

[49] LEHOTAY, S. J., SON, K. A., KWON, H., KOESUKWIWAT, U., FU, W., MASTOVSKA, K., HOH, E., LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2548-2560, 2010.

[50] ANDRADE-EIROA, A., C., M., LEROY-CANCELLIERI, V., C., V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641-654, 2016.

[51] LEE, Y., RAHMAN, MD.M., EL-ATY, A. M. A., CHOI, JH., CHUNG, H. S., KIM, SW., ABDEL-ATY, A.M., SHIN, HC., SHIM, JH. Detection of three herbicide, and one metabolite, residues in brown rice and rice straw using various versions of the QuEChERS method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 210, p. 442-450, 2016.

[52] WALORCZYK, S.; DROŹDŹYŃSKI, D.; KIERZEK, R. Determination of pesticide residues in samples of green minor crops by gas chromatography and ultra performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 132, p. 197-204, 2015.

[53] MALHAT, F., BOULANGÉ, J., ABDELRAHEEM, E., ABD ALLAH, O., ABD EL-HAMID, R., ABD EL-SALAM, S. Validation of QuEChERS based method for determination of fenitrothion residues in tomatoes by gas chromatography-flame photometric detector: Decline pattern and risk assessment. **Food Chemistry**, v. 229, p. 814-819, 2017.

[54] TETTE, P. A. S., DA SILVA OLIVEIRA, F. A., PEREIRA, E. N. C., SILVA, G., DE ABREU GLÓRIA, M. B., FERNANDES, C. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 211, p. 130-139, 2016.

[55] ALCÂNTARA, D.B, FERNANDES, T.S.M. NASCIMENTO, H.O. LOPES, A.M. MENEZES, M.G.G. CARVALHO, T.V. GRINBERG. P. MILHOME, M. A. L. OLIVEIRA, A.H.B. BECKER, H. ZOCOLO, G.J. NASCIMENTO, R.F. Diagnostic detection systems and QuEChERS methods for multiclass pesticide analyses in different types of fruits: An overview from the last decade. **Food Chemistry**, v.298, p. 124958, 2019.

[56] BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, EC de; QUEIROZ, M. E. C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. **GEN, editor. Rio de Janeiro: Editora LTC**, 2015.

- [57] VÁZQUEZ, P. P., HAKME, E., UCLÉS, S., CUTILLAS, V., GALERA, M. M., MUGHARI, A. R., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Large multiresidue analysis of pesticides in edible vegetable oils by using efficient solid-phase extraction sorbents based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe methodology followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1463, p. 20-31, 2016.
- [58] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: UNICAMP. 2006.
- [59] BAKIRCI, G. T.; ACAY, D. B. Y.; BAKIRCI, F.; ÖTLES, S. Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey. **Food Chemistry**, v. 160, p. 379-392, out. 2014.
- [60] NARENDERAN, S.T.; MEYYANATHAN, S.N.; KARRI, Veera Venkata S. R.; BABU, B.; CHINTAMANENI, Pavankumar. Multivariate response surface methodology assisted modified QuEChERS extraction method for the evaluation of organophosphate pesticides in fruits and vegetables cultivated in Nilgiris, South India. **Food Chemistry**, v. 300, p. 125188, dez. 2019.
- [61] XIU-PING, Z.; LIN, M.; LAN-QI, H.; JIAN-BO, C.; LI, Z. The optimization and establishment of QuEChERS-UPLC–MS/MS method for simultaneously detecting various kinds of pesticides residues in fruits and vegetables. **Journal Of Chromatography B**, v. 1060, p. 281-290, ago. 2017.
- [62] HUANG, Y.; SHI, T.; LUO, X.; XIONG, H.; MIN, F.; CHEN, Yi; NIE, S.; XIE, M. Determination of multi-pesticide residues in green tea with a modified QuEChERS protocol coupled to HPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 275, p. 255-264, mar. 2019.
- [63] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction To Modern Liquid Chromatography**. John Wiley & Sons, 2011.
- [64] TIAN, F.; QIAO, C.; LUO, J.; GUO, L.; PANG, T.; PANG, R.; LI, J.; WANG, C.; WANG, R.; XIE, H. Development of a fast multi-residue method for the determination of succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in cereals, vegetables and fruits by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. **Journal Of Chromatography B**, v. 1152, p. 122261, set. 2020.
- [65] COSTA, E. C. Ma.; KUROKAWA, S.; PISSOLATO, J. Corona Discharge Model for Transmission Lines by Lumped Elements. **IEEE Latin America Transactions**, v.9, p. 804-809, 2011.
- [66] MASÍÁ, A., SUAREZ-VARELA, M. M., LLOPIS-GONZALEZ, A., PICÓ, Y. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 936 p. 40-61, 2016.
- [67] SILVA, R. O.; MENEZES, M. G.G.; CASTRO, r. C.; NOBRE, C. A.; MILHOME, M. A.L.; NASCIMENTO, R. F.. Efficiency of ESI and APCI ionization sources in LC-MS/MS systems for analysis of 22 pesticide residues in food matrix. **Food Chemistry**, v. 297, p. 124934, nov. 2019

- [68] ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **RE Nº 899**, de 29 de maio de 2003.
- [69] EUROPEAN UNION. SANTE/11813/2020, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2019.
- [70] International Conference on Harmonisation. ICH Q14: Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation. 2018.
- [71] IUPAC. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of method of analyses .IUPAC technical report. Pure and Applied Chemistry. V. 74, pg. 835–855, 2002.
- [72] World Health Organization. QAS/16.666 - GUIDELINES ON VALIDATION. 2016.
- [73] LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Editora RiMa. São Carlos. 2004
- [74] KRUIVE, A. REBANE, R. KIPPER, K. OLDEKOP, M-L. EVARD, H. HERODES, K. RAVIO, P. LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. **Analytica chimica Acta**, v 870, p. 8-28, 2015.
- [75] LEITE, F. **Validação em análise química**. Editora Átomo, 4ª Edição. Campinas, SP. 2002.
- [76] INMETRO. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev. 7, 2018.
- [77] ANASTASSIADES, M; LEHOTAY, S J.; STAJNBAHER, D; SCHENCK, F J.; Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003
- [78] VARGAS-PÉREZ, M; MARÍN-SÁEZ, J; GONZÁLEZ, F J E; FRENICH, A G; Optimization and establishment of QuEChERS based method for determination of propoxycarbazono and its metabolite in food commodities by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 274, p. 429-433, 2019.
- [79] HAN, Y; ZOU, N; SONG, L; LI, Y; QIN, Y; LIU, S; LI, X; PAN, C; Simultaneous determination of 70 pesticide residues in leek, leaf lettuce and garland chrysanthemum using modified QuEChERS method with multi-walled carbon nanotubes as reversed-dispersive solid-phase extraction materials. **Journal of Chromatography B**, v. 1005, p. 56-64, 2015.
- [80] MONTIEL-LEÓN, J. M; DUY, S V; MUNOZ, G; VERNER, M-A; HENDAWI, M Y.; MOYA, H; AMYOT, M; SAUVÉ, S. Occurrence of pesticides in fruits and vegetables from organic and conventional agriculture by QuEChERS extraction

liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Control**, v. 104, p. 74-82, out. 2019

[81] RIBEIRO BEGNINI KONATU, F.; SALES FONTES JARDIM, I. C. Development and validation of an analytical method for multiresidue determination of pesticides in lettuce using QuEChERS–UHPLC–MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 41, p. 1726-1733, 2018.

[82] MARTÍNEZ-PIERNAS, A.B.; POLO-LÓPEZ, M.I.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P.; AGÜERA, A. Validation and application of a multiresidue method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for evaluating the plant uptake of 74 microcontaminants in crops irrigated with treated municipal wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 1534, p. 10-21, jan. 2018

[83] ANDRADE, G. C. R. M., MONTEIRO, S. H., FRANCISCO, J. G., FIGUEIREDO, L. A., BOTELHO, R. G., TORNISIELO, V. L. Liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry and dynamic multiple reaction monitoring method for determining multiple pesticide residues in tomato. **Food Chemistry**, v. 175, p. 57-65, 2015.

[84] MARTINS, M. L.; KEMMERICH, M.; PRESTES, O. D.; MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F.; ZANELLA, R. Evaluation of an alternative fluorinated sorbent for dispersive solid-phase extraction clean-up of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for pesticide residues analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1514, p. 36-43, set. 2017.

[85] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias Autorizadas**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>. Consultado em 10/07/2020.

[86] HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2008.

[87] KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 685-699, 2009.

[88] CONSTANTOPOULOS, T. L.; JACKSON, G. S.; ENKE, C. G. Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 10, p. 625-634, 1999.

[89] YANG, X. J., QU, Y., YUAN, Q., WAN, P., DU, Z., CHEN, D., WONG, C. Effect of ammonium on liquid- and gas-phase protonation and deprotonation in electrospray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 138, p. 659-665, 2013.

[90] LANÇAS, F. M. **Espectrometria de massas: fundamentos, instrumentação e aplicações**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2019.

[91] COLE, R. B.; HARRATA, A. K. Solvent effect on analyte charge state, signal intensity, and stability in negative ion electrospray mass spectrometry;

implications for the mechanism of negative ion formation. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 4, p. 546-556, 1993.

[92] LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2016.

[93] GRIMALT, S., POZO, Ó. J., MARÍN, J. M., SANCHO, J. V., HERNÁNDEZ, F. Evaluation of different quantitative approaches for the determination of noneasily ionizable molecules by different atmospheric pressure interfaces used in liquid chromatography tandem mass spectrometry: abamectin as case of study. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, p. 1619-1630, 2005.

[94] VALENZUELA, A. I., REDONDO, M. J., PICO, Y., FONT, G. Determination of abamectin in citrus fruits by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v 871, p. 57-65, 2000.

[95] MUSARURWA, Herbert; CHIMUKA, Luke; TAVENGWA, Nikita T. Z-sep+ based QuEChERS technique for the pre-concentration of malathion pesticide in fruits followed by analysis using UV-Vis spectroscopy. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, n. 12, p. 2093-2108, 2020.

[96] BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA. **Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos**. 2015

[97] QUEIROZ, S. CN; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 35, p. 185-192, 2012.

[98] RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; FURLONG, E. B.; PRIMEL, E. G. Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. **Química Nova**, v. 34, 780-786, 2011.

[99] SUO, F; LIU, X; LI, C; YUAN, M; ZHANG, B; WANG, J; MA, Y; LAI, Z; JI, M. Mesoporous activated carbon from starch for superior rapid pesticides removal. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 806-813, 2019.

[100] HENNION, M. C. Graphitized carbons for solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, V. 885, pg. 73–95, 2000.

[101] XIAN, Y., GUO, X., HOU, X., WANG, L., WU, Y. CHEN, L., DONG, H. WANG, B. A modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe cleanup method followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the rapid analysis of perchlorate, bromate and hypophosphite in flour. **Journal of Chromatography A**, v. 1526, pg. 31 – 38. 2017.

[102] ŁOZOWICKA, B; MOJSAK, P; KACZYŃSKI, P; KONECKI, R; BORUSIEWICZ, A; The fate of spirotetramat and dissipation metabolites in Apiaceae and Brassicaceae leaf-root and soil system under greenhouse

conditions estimated by modified QuEChERS/LC–MS/MS. **Science of The Total Environment**, v. 603, p. 178-184, 2017.

[103] CAPRIOTTI, A, L; CAVALIERE, C; GIANSANT, P; GUBBIOTTI, R; SAMPERI, R; LAGANÀ, A; Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2521-2532, 2010.

[104] TREVISAN, M,T,S; OWEN, R, W; CALATAYUD-VERNICH, P; BREUER, A; PICÓ, Y; Pesticide analysis in coffee leaves using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and liquid chromatography tandem mass spectrometry: Optimization of the clean-up step. **Journal of Chromatography A**, v. 1512, p. 98-106, 2017

[105] STRINGHINI, F; RIBEIRO, L,C; ROCHA, G, I; KUNTZ, J, D, B; ZANELLA, R; PRESTES, O, D; ADAIME, M, B; Dilution of QuEChERS Extracts Without Cleanup Improves Results in the UHPLC-MS/MS Multiresidue Analysis of Pesticides in Tomato. **Food Analytical Methods**, p. 1-13, 2021.

[106] JIAO, W; XIAO, Y; QIAN, X; TONG, M; HU,Y; HOU, R; HUA, R;. Optimized combination of dilution and refined QuEChERS to overcome matrix effects of six types of tea for determination eight neonicotinoid insecticides by ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 210, p. 26-34, 2016.

[107] KRUBE, A; KUNNAPAS, A; HERODES, K; LEITO, I; Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, n. 1-2, p. 58-66, 2008.

[108] TAYLOR, Paul J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 328-334, 2005.

[109] PINHO, G,P; NEVES, A, A; QUEIROZ, M, E, L; SILVÉRIO, F, O; Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, p. 987-995, 2009.

[110] CUTILLAS, V, GALERA, M, M; RAJSKI, L; FERNÁNDEZ-ALBA, A, R; Evaluation of supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for pesticide residues in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1545, p. 67-74, 2018.

[111] Thier, H. P.; Zeumer, H. *Manual of Pesticide Residue Analysis*, **VHC, Weinheim**, 1a. ed, 1987, volume 1, pp 37-44.

[112] LESUEUR, C; KNITTL, P; GARTNER, M; MENTLER, A; FUERHACKER, M. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. **Food Control**, v. 19, n. 9, p. 906-914, 2008