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

MILIANA GOUVEIA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR MICRO DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM GOIABA (*Psidium guajava* L.)

DEVELOPMENT OF A METHOD BY MICRO DISPERSION OF THE SOLID PHASE MATRIX FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN GOIABA (Psidium guajava L.)

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

MILIANA GOUVEIA DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR MICRO DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM GOIABA (*Psidium guajava* L.)

Dissertação de mestrado apresentada 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. Luís Fabrício Santana Santos**

DEVELOPMENT OF A METHOD BY MICRO DISPERSION OF THE SOLID PHASE MATRIX FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN GOIABA (Psidium guajava L.)

Master dissertation presented to the Graduate Program in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain MSc. in Chemistry

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Silva, Miliana Gouveia da
S586d Desenvolvimento de método por micro dispersão da matriz em fase sólida para determinação de resíduos de pesticidas em goiaba (*Psidium guajava L.*) / Miliana Gouveia da Silva ; orientador Sandro Navickiene - São Cristóvão, 2024.
78 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Pesticidas. 2. Goiaba. 3. Extração (Química). Silva, Miliana Gouveia da orient. II. Título.

CDU 54

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

PPGQ

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Miliana Gouveia da Silva apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 22/07/2024.

Prof. Dr. Sandro Navickiene
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior
Departamento de Química - UFS

Drª. Debora Santos Silva Bezerra
ITPS- Laboratório de Química inorgânica/SE

"*Nenhuma decisão sensata pode ser tomada sem que se leve em conta o mundo não apenas como ele é, mas como ele virá a ser*."

(Isaac Asimov)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar perseverança durante toda a minha vida.

À minha família, pelo incentivo e apoio em todas as áreas da minha vida. Em especial, ao meu namorado, Marcus, por todo cuidado e carinho em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sandro Navickiene, por toda a dedicação, paciência e disposição em ajudar e contribuir para o meu desenvolvimento profissional. E, ao meu coorientador, Dr. Luís Fabrício, pelo apoio e desmedida transmissão de conhecimentos e habilidades ao longo destes anos.

Às pessoas com quem convivi ao longo destes anos de graduação e pós-graduação, que me incentivaram e que certamente tiveram impacto positivo na minha vida e formação acadêmica. Em particular, à Mirele Santana, Maria Danielly, Candice Nóbrega, Júlio Manoel e Tarcísio Martins.

Aos Professores do Departamento de Química pela valorosa transmissão de conhecimentos durante a minha formação acadêmica.

À Universidade Federal de Sergipe e ao Departamento de Química pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro de Laboratórios de Química Multiusuário (CLQM) pela disponibilização dos equipamentos utilizados.

À Coordenadora do Laboratório de Química Orgânica, Brenda Santos Silva, do Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe (ITPS), e à Dra. Débora Santos Silva Bezerra, pelo uso do sistema LC-MS/MS.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

RESUMO

A goiaba (Psidium guajava L.) é amplamente consumida no Brasil devido ao seu aroma agradável, sabor característico e alto valor nutricional. No entanto, sujeita a pragas e doenças diversas, a cultura da goiaba faz uso de pesticidas como a principal forma de controle. Contudo, isso pode levar à permanência de resíduos na fruta, tornando necessário investigar e monitorar a presença desses resíduos. Propomos então neste trabalho desenvolver um método para determinação de resíduos de pesticidas de diferentes classes químicas em goiaba, utilizando a técnica de dispersão da matriz em fase sólida como procedimento de extração e cromatografia líquida/espectrometria de massas como técnica instrumental de análise. Foram avaliados resíduos de acetamiprido, alacloro, aldicarbe, ametrina, atrazina, azoxistrobina, bromuconazol, carbaril, carbofurano, cipermetrina, clorpirifós, clotianidina, deltametrina, difenoconazol, dimetoato, diurom, flutriafol, imidacloprido, lufenurom, malationa, metomil, pendimetalina, piraclostrobina, pirimicarbe, simazina, teflubenzurom, tiacloprido, tiametoxam e triadimefom. As melhores condições de extração foram obtidas com 0,085 g de biocarvão de aguapé, 0,085 g de goiaba liofilizada e eluição com 5 mL de metanol. A validação analítica foi realizada a partir dos seguintes parâmetros: linearidade e sensibilidade, mostrando-se linear com coeficientes de determinação superiores a 0,99 e sensível no intervalo de 0,25-100 µg L^{-1}; seletividade (com efeito matriz entre 1,2–88%); exatidão e precisão, com valores de recuperação na faixa de 38–116% com coeficientes de variação inferiores a 16% para os níveis de concentração 0,01; 0,05; e 0,1 µg g^{-1} (n=5); limite de detecção entre 0,001-0,009 µg g^{-1} e limite de quantificação no intervalo de 0,002- 0,028 µg g^{-1}.

Palavras-chave: Pesticidas; Goiaba; µMSPD; LC-MS/MS.

ABSTRACT

Guava (Psidium guajava L.) is widely consumed in Brazil due to its pleasant aroma, characteristic flavor and high nutritional value. However, guava crops are subject to various pests and diseases and use pesticides as the main form of control. However, this can lead to residues remaining in the fruit, making it necessary to investigate and monitor the presence of these residues. In this work, we propose to develop a method for determining pesticide residues of different chemical classes in guava, using the solid-phase matrix dispersion technique as the extraction procedure and liquid chromatography/mass spectrometry as the instrumental analysis technique. The residues of acetamiprid, alachlor, aldicarb, ametryn, atrazine, azoxystrobin, bromuconazole, carbaryl, carbofuran, cypermethrin, chlorpyrifos, clothianidin, deltamethrin, difenoconazole, dimethoate, diuron, flutriafol, imidacloprid, lufenuron, malathion, methomyl, pendimethalin, pyraclostrobin, pirimicarb, simazine, teflubenzuron, thiacloprid, thiamethoxam and triadimefon were evaluated. The best extraction conditions were obtained with 0.085 g of water hyacinth biochar, 0.085 g of lyophilized guava and elution with 5 mL of methanol. Analytical validation was performed based on the following parameters: linearity and sensitivity, showing linearity with coefficients of determination higher than 0.99 and sensitive in the range of 0.25-100 µg L^{-1}; selectivity (with matrix effect between 1.2–88%); accuracy and precision, with recovery values in the range of 38–116% with coefficients of variation lower than 16% for the concentration levels 0.01; 0.05; and 0.1 µg g^{-1} (n=5); detection limit between 0.001-0.009 µg g^{-1} and quantification limit in the range of 0.002-0.028 µg g^{-1}.

Keywords: *Pesticides; Guava; µMSPD; LC-MS/MS.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1— Estruturas moleculares, nomes comerciais e científicos dos pesticidas em estudo. 23

Figura 2— Processo de homogeneização da amostra e eluição com auxílio de um sistema a vácuo do tipo manifold. 27

Figura 3— Comparação das áreas dos sinais obtidas pela análise exploratória da solução padrão dos pesticidas em metanol (1 µg mL^{-1}), utilizando formiato de amônio a 5 mmol L^{-1} ou solução 0,1% de ácido fórmico como aditivo. 42

Figura 4— Gráfico das áreas dos picos cromatográficos obtidos pela análise exploratória de soluções padrão de pesticidas em metanol (1 µg mL^{-1}) nas fontes ESI e APCI. 43

Figura 5— Cromatograma da solução padrão conjunta de pesticidas em metanol (1 µg mL^{-1}) em modo SIM da análise em 20 minutos com metanol e solução aquosa com 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio em fonte de ionização ESI obtido no sistema de cromatografia líquida Nexera UC. 45

Figura 6— Cromatograma obtido no modo de aquisição por monitoramento de reações múltiplas (MRM) de uma solução conjunta de pesticidas com concentração de 10 µg L^{-1} adquirido após a otimização do gradiente de eluição, vazão e volume de injeção no sistema Xevo TQD. 50

Figura 7— Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos 29 pesticidas, com um nível de fortificação de 0,5 µg g^{-1}, utilizando 0,5 g de goiaba *in natura*, 0,5 g de C18 e eluição com 5 mL de metanol.....52

Figura 8— Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos resíduos de pesticidas com o uso do biocarvão em comparação com o C18 como material adsorvente na µMSPD, considerando o nível de fortificação de 0,5 µg g^{-1}.....56

Figura 9— Estudo de recuperação dos pesticidas comparando a amostra de goiaba fortificada.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Principais pragas e indicações de métodos de controle na cultura da goiaba. 17

Tabela 2 — Informações gerais sobre os pesticidas em estudo. 20

Tabela 3 — Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo. 21

Tabela 4 — Gradientes de eluição utilizados durante o desenvolvimento do trabalho. 35

Tabela 5 — Condições instrumentais de análise para cromatografia líquida utilizadas durante o trabalho. 36

Tabela 6 — Resultados das análises de soluções padrão de pesticidas em metanol (1 µg mL^{-1}) realizadas em modo exploratório na fonte de ionização electrospray. 40

Tabela 7— Parâmetros ajustados para o método de aquisição por monitoramento de reações múltiplas (MRM), tempo de retenção (TR) e modo de ionização. 47

Tabela 8— Eficiência de recuperação (%) (n=3) dos pesticidas nas amostras de goiaba *in natura* e liofilizada e os seus respectivos desvios padrões relativos (DPR). 54

Tabela 9— Intervalo de concentração, equação da reta e coeficiente de determinação para curva de calibração em metanol para os pesticidas. 59

Tabela 10— Intervalos de concentração, equações da reta, coeficientes de determinação e razão dos coeficientes angulares para os pesticidas. 61

Tabela 11— Valores de Recuperação (%) médio avaliados para ensaio de exatidão e precisão realizados para validação. 64

Tabela 12— Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método; limite máximo de resíduo (LMR). 66

Tabela 13— Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de pesticidas em goiaba. 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µMSPD	– *Micro-Matrix Solid Phase Dispersion* (Micro dispersão da matriz em fase sólida)
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	– *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (Ionização a pressão atmosférica)
ESI	– *Electrospray ionization* (Ionização por eletronebulização)
DLLME	– *Dispersive liquid-liquid microextraction* (Microextração líquido-líquido dispersiva)
GC	– *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	– Ingestão Diária Aceitável
INMETRO	– Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	– *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
LC	– *Liquid Chromatography (*Cromatografia Líquida)
LC/MS	– *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida/Espectrometria de Massas)
LD	– Limite de detecção
LLE	– Liquid-liquid extraction (Extração Líquido-Líquido)
Log Kow	– Log de Coeficiente de distribuição octanol/água
LMR	– Limite Máximo de Resíduos
LQ	– Limite de quantificação
MRM	– *Multiple-Reaction Monitoring* (Monitoramento de Reações Múltiplas)
MSPD	– *Matrix Solid-Phase Dispersion* (Dispersão da Matriz em Fase Sólida)
m/z	– Razão massa-carga
pK_a	– Constante de dissociação ácida
QuEChERS	– “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe” (“Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro”)
RCA	– Razão dos coeficientes angulares
rpm	– Rotação por minuto
R^2	– Coeficiente de determinação
SDME	– *Single drop microextraction* (Microextração com gota única)
SPE	– *Solid Phase Extraction* (Extração em fase sólida)
SIM	– *Selected Ion Monitoring* (Monitoramento de Íon Selecionado)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
1.1 Goiaba 16
1.2 Pesticidas 18
1.3 Técnicas de preparo de amostras 25
1.3.1 Dispersão da matriz em fase sólida 25
1.4 Validação de Método Analítico 28
2. OBJETIVOS 30
2.1 Objetivo Geral 30
2.2 Objetivos Específicos 31
3. MATERIAIS E MÉTODOS 31
3.1 Equipamentos 31
3.2 Reagentes 32
3.3 Padrões certificados dos analitos 32
3.4 Preparo das soluções padrão dos pesticidas 33
3.5 Obtenção do biocarvão de *Eichhornia crassipes* 33
3.6 Obtenção e preparo da amostra de goiaba 34
3.7 Liofilização da Amostra 34
3.8 Condições instrumentais de análise 34
3.9 Procedimento de extração por µMSPD 37
3.10 Limpeza dos materiais 37
3.11 Descarte dos reagentes 38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 38
4.1 Desenvolvimento das condições instrumentais de análise 38
4.1.1 Ensaios realizados com a fonte Electrospray (ESI) 39
4.1.2 Ensaios para a escolha do aditivo orgânico 41
4.1.3 Ensaios para escolha da fonte de ionização 43
4.1.4 Desenvolvimento do método por LC/MS em modo SIM 44
4.2 Determinação das condições instrumentais de análise: Espectrômetro de massas Xevo TQD 46
4.2.1 Condições instrumentais de análise 49
4.3 Procedimento de extração por µMSPD 51
4.4 Avaliação do processo de liofilização para a eficiência de extração por µMPSD 52
4.4.1 Avaliação da extração na goiaba in natura e liofilizada 53
4.5 Avaliação do biocarvão de aguapé como sorvente na µMSPD 55

4.5.1 Avaliação da perda de pesticidas durante a liofilização 56
4.6 Validação de método 58
4.6.1 Linearidade e sensibilidade 58
4.6.2 Efeito Matriz 60
4.6.3 Exatidão e precisão 63
4.6.4 Limites de detecção e quantificação 65
4.7 Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de pesticidas em goiaba 67
5. CONCLUSÃO 68
6. PERSPECTIVAS DO TRABALHO 68
7. REFERÊNCIAS 69

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas, favorecido pela vasta extensão territorial, posição geográfica e condições de clima e solo favoráveis. No ano de 2022, a produção de frutas no país alcançou a marca de 58 milhões de toneladas, correspondendo a 5,4% da produção mundial. Entretanto, apesar de ser um grande produtor, as exportações brasileiras, no setor de frutas, constituem uma parcela reduzida do volume total de exportações. Essa situação é, em parte, atribuída às barreiras fitossanitárias estabelecidas por diversas nações; como normas, procedimentos e controles que visam assegurar a inocuidade e qualidade das frutas [1–3].

A goiaba é uma das frutas de destaque na produção brasileira, ocupando o 20º lugar entre as mais cultivadas no país. De acordo com os dados mais recentes do IBGE, em 2022 foram produzidas 564,8 mil toneladas de goiaba no Brasil, gerando um valor superior a 1 milhão de reais em rendimento. A produção está concentrada principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste, sendo Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo responsáveis por cerca de 80% do total nacional. Em Sergipe, a produção atingiu 2.904 toneladas no mesmo ano, com destaque para o perímetro irrigado Califórnia, localizado no Município de Poço Redondo [4–7].

Nos pomares, a natureza perene da goiabeira, a folhagem permanente, o clima, o solo, e a vegetação associada favorecem a atração de um número significativo de insetos, ácaros e doenças que prejudicam o desenvolvimento da planta e/ou a qualidade do fruto, reduzindo a produtividade. Nesse sentido, os produtores utilizam os pesticidas como uma alternativa mais rápida e eficiente para o combate e/ou prevenção desses hospedeiros naturais, além de acelerar a produção para uma maior rentabilidade. Contudo, o uso de pesticidas pode resultar na permanência de resíduos na goiaba e em seus produtos derivados que irão ficar à disposição dos consumidores, o que pode contribuir para o surgimento de problemas de saúde a curto ou a longo prazo [8,9].

A maioria dos pesticidas apresenta estabilidade química, persistência no meio ambiente e bioacumulação em potencial; além do poder de contaminação dos alimentos, causando danos à saúde dos seres humanos. Os efeitos dos pesticidas na

saúde dependem da duração e extensão da exposição, podendo provocar desde alergias leves e erupções cutâneas até mesmo a dificuldades respiratórias, doenças neurológicas, anormalidades reprodutivas e câncer. Devido a isso, diferentes órgãos regulamentadores têm implementado leis e ações de controle de pesticidas, intensificando a fiscalização destas substâncias nas matrizes alimentares, a fim de resguardar a saúde dos consumidores [10–12].

Em novembro de 2023, no Brasil, foi aprovado o Projeto de lei nº 1459, de 2022, que propõe, por meio de alterações na Lei nº 7.802, de 1989, modificar o sistema de registro, controle e comércio de pesticidas. O projeto sugere autorizar o uso de princípios ativos reconhecendo a similaridade de produtos equivalentes em termos físicos, químicos e toxicológicos a fim de acelerar o prazo para liberação de pesticidas. Com isso, mais de dois mil pesticidas foram autorizados no país entre os anos de 2019 e 2022, estes números representam um recorde para um governo desde 2003, e esse número tende a aumentar. Nessa perspectiva, se faz necessário o reforço na fiscalização dos níveis de resíduos destes compostos nos alimentos pelos órgãos de controle vigentes, bem como a necessidade do desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação dessas substâncias em alimentos [13, 14].

Atualmente a liberação de uso de pesticidas para diferentes matrizes alimentares na agricultura está condicionado a parâmetros toxicológicos adotados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo eles a Ingestão Diária Aceitável (IDA) e o Limite Máximo de Resíduos (LMR). A IDA é a quantidade de uma substância química que pode ser ingerida pelo ser humano durante toda a vida, sem que se observe risco apreciável a saúde. O LMR é a quantidade máxima de resíduos de pesticidas aceitável em um quilograma de alimento, sem que haja prejuízo a saúde dos consumidores. Sendo assim, para identificar e quantificar a presença desses pesticidas, é necessário a utilização de técnicas instrumentais de análise e métodos de preparo de amostras eficientes e sensíveis [15, 16].

Entre as técnicas convencionais utilizadas para determinação de resíduos de pesticidas em frutas estão a Cromatografia Gasosa (GC) e a Cromatografia Líquida (LC). A LC se destaca para essa finalidade, devido a técnica ser eficiente na análise de compostos com uma ampla faixa de polaridade, baixa volatilidade e/ou instabilidade térmica. Mesmo sendo eficiente na separação dos compostos, a LC

necessita de uma técnica confirmatória (confirmação da identidade química). Considerando isso, dentre as opções disponíveis, a espectrometria de massas é a técnica que melhor fornece as informações estruturais e sensibilidade adequada à quantificação dos analitos em baixos níveis de concentração [17].

Embora o uso de técnicas analíticas instrumentais seja de fundamental importância para a obtenção de resultados confiáveis, o preparo da amostra permanece como uma das etapas mais importantes de um método analítico, sobretudo para matrizes complexas como frutas. Entre as técnicas convencionais de preparo de amostras está a dispersão da matriz em fase sólida, que permite o isolamento de analitos de polaridades diferentes ou de uma classe de substâncias em amostras sólidas ou semissólidas. A técnica é adequada para a extração de contaminantes em matrizes alimentares, principalmente pela vantagem de realizar, em uma única etapa, a limpeza do extrato e extração dos analitos. Além disso, a instrumentação é simples e o extrato obtido é compatível com as técnicas analíticas de separação mais comuns como a cromatografia líquida/espectrometria de massas (LC/MS) [18, 19].

A análise de pesticidas em goiaba é um desafio devido a elevada quantidade de interferentes, e por isso requer técnicas de preparo de amostra eficientes na limpeza do extrato para determinação dos analitos. Uma revisão de literatura foi realizada com o intuito de encontrar trabalhos destinados à determinação de resíduos de pesticidas em goiaba. Contudo, os poucos estudos recentes aplicados à goiaba utilizam o método de extração QuEChERS [20, 21]. Ao focar exclusivamente nos estudos que utilizaram MSPD [22,23] como método de extração, nota-se uma escassez de trabalhos, os quais se restringem a pesticidas de grupos químicos específicos, como os organofosforados e organoclorados para essa matriz.

Diante do exposto, o presente trabalho objetiva o desenvolvimento de um método para determinação de 29 pesticidas, de diferentes classes químicas, em goiaba, utilizando a técnica de dispersão da matriz em fase sólida, e análise instrumental por cromatografia líquida/ espectrometria de massas.

1.1 Goiaba

A goiaba, conhecida como a “maçã dos trópicos”, é originária da América do Sul, mais especificamente da região entre o México e o Peru. É uma planta do gênero Psidium, da família das Mirtáceas. O gênero Psidium inclui aproximadamente 150 espécies de pequenas árvores, entre elas, cerca de 20 produzem frutas comestíveis, e as demais são frutas silvestres de qualidade inferior. A variedade mais cultivada mundialmente é a goiaba *Psidium guajava* L. [7, 24].

Conhecida por ser uma fruta sazonal a goiaba é um fruto carnoso com grande número de sementes, superfície externa irregular e aproximadamente oito centímetros de diâmetro, cuja massa oscila entre 95 e 170 gramas, dependendo da forma de cultivo. Existem duas variedades de goiaba: de polpa branca, que possui casca esverdeada e interior esbranquiçado, e a de polpa vermelha, de casca verde clara ou amarela e interior de um rosa forte, esta cor rosada é decorrente da presença do pigmento carotenoide licopeno [7, 20, 25].

O Brasil é considerado um importante produtor e consumidor de goiaba da polpa vermelha; posição justificada pela enorme aceitação no mercado interno. Além disso, é uma cultura bastante resistente à seca e a altas temperaturas, podendo resistir até 46 ºC. No entanto, apesar de ser uma planta que tolera a seca, a goiabeira, quando irrigada apresenta um aumento significativo na produção. A irrigação somada a outras técnicas de manejo, proporciona duas safras anuais, sendo possível, também, ajustar a época da colheita de acordo com os períodos de maior demanda de mercado [7,5,26].

Embora o Brasil seja um dos maiores produtores mundiais de goiaba, a sua participação no mercado internacional da fruta *in natura* é muito pequena. Vários fatores são responsáveis por esse fato, incluindo o pouco conhecimento do produto pelos consumidores nos mercados economicamente mais lucrativos, a preferência do mercado externo pela goiaba de polpa branca e o estágio de maturação altamente perecível do fruto. Este último fator exige que o produto seja bem acondicionado e enviado para o mercado internacional por via aérea, o que eleva os custos de comercialização. Em vista disso, o mercado internacional tem preferência pelo consumo da goiaba na forma de polpa ou suco concentrado [27].

A goiaba disputa a faixa mercadológica daqueles consumidores que preferem produtos naturais, visto que a goiaba é uma das frutas mais completas, em termos de balanço nutricional. Constituída principalmente por água, que representa cerca de 85% da sua composição, sendo menores os teores de fibra, lipídio e proteína. Além disso, a goiaba contém níveis de açúcar, ferro, cálcio, fósforo e vitamina C muito mais elevados do que a maioria das frutas. Um exemplo disso é que seu valor de vitamina C é de 6 a 7 vezes o de algumas frutas cítricas, como laranja e abacaxi, e é superada apenas pela acerola [25, 27, 28].

Um dos maiores desafios que a cultura da goiaba impõe ao produtor agrícola são os problemas fitossanitários decorrentes do ataque de inúmeros insetos e fungos; uma vez que estes organismos se propagam na planta e/ ou fruto, ocasionam danos que variam entre o atraso no desenvolvimento e redução da produtividade, até a morte da planta. As principais pragas e doenças associadas a goiaba são: Psilídeos (*Triozoida* sp), Tripes (*Selenothrips rubrocinctus*), gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*) e mosca-das-frutas (*Anastrepha* spp.), Bacteriose da goiabeira (*Erwinia psidii*), Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e Ferrugem (*Puccinia psidii*) [29– 31]. As pragas e doenças predominantes e seus respectivos métodos químicos de controle estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 — Principais pragas e indicações de métodos de controle na cultura da goiaba.

Pragas/doenças	Indicação de método de controle
Ferrugem (*Puccinia psidii*)	Aplicação de fungicidas cúpricos ou carbamatos como preventivo até os frutos atingirem o diâmetro de 3 cm
Psilídeo (*Triozoida* sp.)	Aplicação de inseticidas organofosforados ou carbamatos
Mosca-das- frutas (*Anastrepha* spp.)	Aplicação de inseticidas
Gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*)	Pulverizações preventivas com inseticidas organofosforados em frutos verdes
Tripes (*Selenothrips rubrocinctus*)	Realizar pulverizações com inseticidas organofosforados

Fonte: [29–31].

A grande variedade de pragas e doenças surgem em diferentes intensidades durante o desenvolvimento da cultura causando diversos danos à produção. Sendo assim, é necessário que haja o desenvolvimento de um manejo cuidadoso e controlado a fim de garantir um máximo de rendimento e rentabilidade. No entanto, por diversas vezes os produtores recorrem ao uso de elevadas dosagens de pesticidas, prejudicando o meio ambiente e levando a contaminação do alimento que possui como destino final o consumo humano [29].

1.2 Pesticidas

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária define pesticidas como substâncias ou mistura de substâncias, químicas ou biológicas, utilizadas em diversos setores agrícolas, pastagens, florestas, e em ecossistemas de ambientes urbanos, hídricos e industriais. São produtos que têm a capacidade de alterar a composição da flora ou da fauna, com o intuito de preservá-las da ação danosa de seres vivos e doenças considerados perniciosos. Também são classificados como pesticidas substâncias e produtos utilizados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento [32].

Os pesticidas são capazes de matar diretamente um organismo prejudicial ou regular o processo reprodutivo. Além disso, têm a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital para os organismos para os quais são tóxicos. A classificação dos pesticidas encontra-se em função de vários aspectos que os diferenciam em modo de ação, segundo critérios, estes são: inseticidas, matam insetos; herbicidas, matam ervas daninhas; fungicidas, inibem o crescimento de fungos; e bactericidas, combatem algumas bactérias [33].

Para a agricultura moderna os pesticidas são produtos essenciais que desempenham um papel fundamental na manutenção da produtividade agrícola em larga escala. O Brasil é um dos maiores produtores de alimentos do mundo, sendo líder mundial no uso de grandes quantidades desses defensivos agrícolas em culturas

alimentares. Consequentemente, pode acarretar em efeitos nocivos a curto ou a longo prazo no meio ambiente e para a saúde humana [34, 35].

Uma das consequências do uso recorrente de pesticidas é a permanência de resíduos em diferentes proporções nas matrizes alimentares. Nesta perspectiva, existem órgãos de controle, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), responsáveis pela avaliação toxicológica dos pesticidas, seus componentes e afins. Dentro dos estudos toxicológicos realizados pela ANVISA, há o estabelecimento de parâmetros, como os Limites Máximos de Resíduos (LMR), que é o nível máximo de resíduos de pesticidas aceitos que permanecem nos alimentos e a Ingestão Diária Aceitável (IDA), que permite estimar a carga residual que pode ser ingerida em relação ao peso corporal ao longo da vida e sem riscos para a saúde. Além disso, classifica os pesticidas quanto ao seu grau de periculosidade ambiental em classes que variam de I a IV em: extremamente, altamente, moderadamente ou pouco tóxicos [34, 36, 37].

Atualmente, existem 49 ingredientes ativos autorizados para uso agrícola em cultura de goiaba. No entanto, as goiabeiras constituem uma das espécies frutíferas que mais recebem aplicações de pesticidas, sendo que, a maior parte não são registrados para a cultura. O relatório referente ao ciclo 2017-2018 do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) mostrou que de um total de 183 amostras de goiaba analisadas, 115 apresentaram índices de contaminação por pesticidas não autorizados para a cultura [9, 38].

Diante destas informações, este trabalho propôs um estudo sobre a contaminação de goiaba por 29 pesticidas de diferentes classes químicas, incluindo: Carbamatos (aldicarbe, carbofurano, carbaril, pirimicarbe e metomil), Neonicotinóides (acetamiprido, clotianidina, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam), Piretróides (cipermetrina, deltametrina), Organofosforados (clorpirifós, dimetoato, malationa), Triazinas (ametrina, atrazina, simazina), Triazol (bromuconazol, flutriafol, triadimefom), Cloroacetamida (alacloro), Estrobilurina (azoxistrobina, piraclostrobina), Conazol (difenoconazol), Fenilureia (diurom), Dinitroanilina (Pendimetalina), Benzoilureia (Lufenurom e Teflubenzurom). Informações gerais, fórmulas estruturais e propriedades físico-químicas sobre eles são mostradas nas Tabelas 2 e 3, e Figura 1. Dentre os pesticidas selecionados para o estudo sete são liberados para a cultura da goiaba, são eles: acetamiprido, azoxistrobina, deltametrina, difenoconazol,

imidacloprido, lufenurom e teflubenzurom. Os pesticidas não liberados no Brasil e que foram encontrados em amostras de goiaba no ciclo 2017-2018 do PARA foram: acefato, carbofurano, clorpirifós, clotianidina, dimetoato, flutriafol, piraclostrobina, cipermetrina e tiametoxam [37,38].

Tabela 2 — Informações gerais sobre os pesticidas em estudo.

Princípio Ativo	Grupo Químico	Fórmula molecular	Modo de Ação	Classe Toxicológica	IDA (mg kg^{-1})
Acetamiprido	Neonicotinóide	$C_{10}H_{11}ClN_4$	Inseticida	III	0,024
Alacloro	Cloroacetamida	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	Herbicida	III	NE
Aldicarbe	Carbamato	$C_7H_{14}N_2O_2S$	Inseticida	I	0,003
Ametrina	Triazina	$C_9H_{17}N_5S$	Herbicida	III	0,5
Atrazina	Triazina	$C_8H_{14}ClN_5$	Herbicida	III	0,5
Azoxistrobina	Estrobilurina	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	Fungicida	III	NE
Bromuconazol	Triazol	$C_{13}H_{12}BrCl_2N_3O$	Fungicida	III	NE
Carbaril	Carbamato	$C_{12}H_{11}NO_2$	Inseticida	II	0,003
Carbofurano	Carbamato	$C_{12}H_{15}NO_3$	Inseticida	I	0,002
Cipermetrina	Piretróide	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	Inseticida	II	0,05
Clorpirifós	Organofosforado	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	Inseticida	I	0,01
Clotianidina	Neonicotinóide	$C_6H_8ClN_5O_2S$	Inseticida	III	0,09
Deltametrina	Piretróide	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	Inseticida	III	0,01
Difenoconazol	Conazol	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	Fungicida	I	0,6
Dimetoato	Organofosforado	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	Inseticida	II	0,002
Diurom	Fenilureia	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	Herbicida	III	NE
Flutriafol	Triazol	$C_{16}H_{13}F_2N_3O$	Fungicida	IV	0,01
Imidacloprido	Neonicotinoide	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	Inseticida	II	0,05
Lufenuron	Benzoilureia	$C_{17}H_8Cl_2F_8N_2O_3$	Inseticida	IV	0,02
Malationa	Organofosforado	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	Inseticida	III	0,3
Metomil	Carbamato	$C_5H_{10}N_2O_2S$	Inseticida	II	NE
Pendimetalina	Dinitroanilina	$C_{13}H_{19}N_3O_4$	Herbicida	III	NE
Piraclostrobina	Estrobilurina	$C_{19}H_{18}ClN_3O_4$	Fungicida	II	NE
Pirimicarbe	Carbamato	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	Inseticida	II	NE
Simazina	Triazina	$C_7H_{12}ClN_5$	Herbicida	III	NE
Teflubenzurom	Benzoilureia	$C_{14}H_6Cl_2F_4N_2O_2$	Inseticida	II	0,01
Tiacloprido	Neonicotinoide	$C_{10}H_9ClN_4S$	Inseticida	II	NE
Tiametoxam	Neonicotinoide	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	Inseticida	III	0,01
Triadimefom	Triazol	$C_{14}H_{16}ClN_3O_2$	Fungicida	III	0,02

I-Extremamente Tóxico, II-Altamente Tóxico, III-Moderadamente Tóxico, IV-Pouco Tóxico.
Fonte: IUPAC PPDB; ANVISA [39,40]

Tabela 3 — Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo.

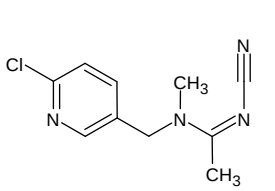
Pesticidas	MM (g mol^{-1})	Temperatura de ebulição (ºC)	Solubilidade em H_2O (mg L^{-1})	Solubilidade Solvente orgânico (mg L^{-1})	log Kow	pKa
Acetamiprido	223	352	$3,0x\ 10^3$	Acetona ($2,0x\ 10^5$)	0,8	0,7
Alacloro	270	100	$2,4x\ 10^2$	NE	NE	0,6
Aldicarbe	190	251	$4,9x\ 10^3$	Acetona ($3,8x\ 10^5$)	1,1	ND
Ametrina	227	337	$2,0x\ 10^2$	Acetona ($5,7x\ 10^4$)	2,6	10,1
Atrazina	216	200	35,0	Acetato de etila ($2,4x\ 10^4$)	2,7	1,7
Azoxistrobina	403	360	6,7	Metanol ($2,0x\ 10^4$)	2,5	1,94
Bromuconazol	377	581	48,3	Hexano ($1,8x\ 10^3$)	3,2	2,8
Carbaril	201	210	9,1	Metanol ($8,8x\ 10^4$)	2,4	10,4
Carbofurano	221	254	$3,2x\ 10^2$	Metanol ($7,2x\ 10^4$)	1,8	11,90
Cipermetrina	416	511	$9,0x\ 10^{-3}$	Metanol ($4,5x\ 10^5$)	5,6	ND
Clorpirifós	351	376	1,0	Metanol ($2,9x\ 10^5$)	5,0	ND
Clotianidina	250	435	$3,4x10^2$	Acetona ($1,5x\ 10^4$)	1,0	11,1
Deltametrina	505	300	$2,0x10^{-4}$	Metanol ($8,2x\ 10^3$)	4,6	ND
Difenoconazol	406	547	15,0	Acetona ($6,1x\ 10^5$)	4,4	1,1
Dimetoato	229	117	$2,6x10^4$	Metanol ($1,6x\ 10^6$)	0,8	ND
Diurom	233	180	35,6	Acetona ($4,7x10^4$)	2,9	13,55
Flutriafol	506	NE	95,0	Metanol ($1,2x\ 10^5$)	2,3	2,3
Imidacloprido	256	NE	$6,1x10^2$	Hexano ($1,1x\ 10^2$)	0,6	9,39
Lufenuron	511	NE	$4,6x10^{-2}$	Acetato de etila ($3,3x\ 10^5$)	5,1	10,2
Malationa	330	156	$1,5x10^2$	Metanol ($2,5x\ 10^5$)	2,8	ND
Metomil	162	65	$5,5x10^4$	Metanol ($1,0x\ 10^6$)	0,1	3,0
Pendimetalina	281	246	0,3	Acetona ($8,0x\ 10^5$)	5,4	2,8

Tabela 3 — Continuação.

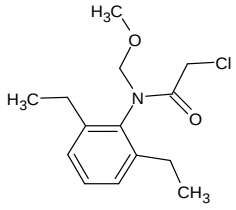
Pesticidas	MM (g mol^{-1})	Temperatura de ebulição (ºC)	Solubilidade em H_2O (mg L^{-1})	Solubilidade Solvente orgânico (mg L^{-1})	log Kow	pKa
Piraclostrobina	388	NE	1,9	Metanol (1,0x 10^5)	4,0	-0,23
Pirimicarbe	238	325	3,1x10^3	Metanol (3,5x10^5)	1,7	4,4
Simazina	208	366	5,0	Acetona (1,5x10^3)	2,3	1,6
Teflubenzurom	381	NE	1,0 x10^{-2}	Metanol (1,1x 10^3)	4,3	9,2
Tiacloprido	253	423	1,8x10^2	Acetato de etila (9,4x10^3)	1,3	1,62
Tiametoxam	292	486	4,1x10^3	Acetato de etila (7,0x10^3)	-0.1	1,70
Triadimefom	294	NE	70,0	Hexano (6,3x 10^3)	3,2	1,4

MM= Massa Molar; pKa= constante de acidez; Kow= constante de partição octanol-água; NE=não encontrado. ND= não dissocia. Fonte: IUPAC PPDB; PubChem [39,41]

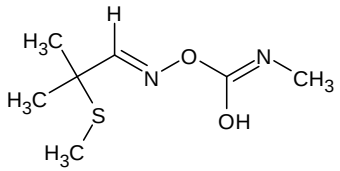
Figura 1—Estruturas moleculares, nomes comerciais e científicos dos pesticidas em estudo.



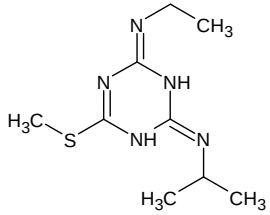
Acetamiprido: N-[(6-loropiridin-3-il)-metil]-N-ciano-N-metiletani- mida



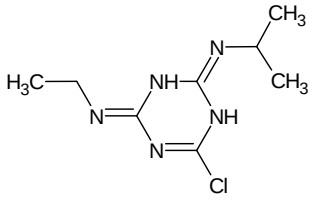
Alacloro: 2-cloro-2,6-dietil-N-(metoximetil) -acetanilida



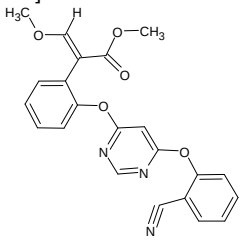
Aldicarbe: (EZ)-2-metil-2-(metiltio)propionaldeídometilcarbamoiloxima



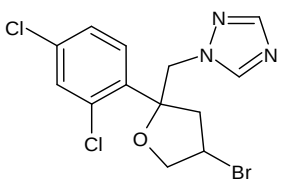
Ametrina: 4-N-etil-6-metilsulfanil-2-N-propan-2-il-1,3,5-triazina-2,4-diamina



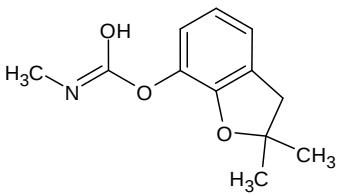
Atrazina: 2-cloro-4-etilamino-6-iso- propilamino-1,3,5-triazina



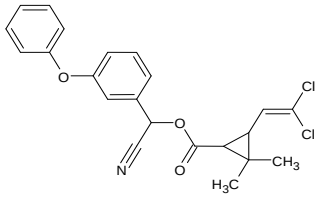
Azoxistrobina: (E)-2-[2-[6-(2-cianofenoxi)pirimidin-4-il]-oxifenil]-3-metoxiprop-2-enoatodemetil



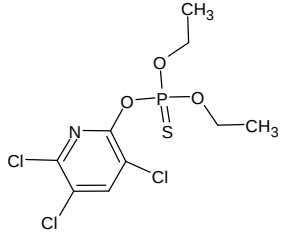
Bromuconazol: 1-[[4-bromo-2-(2,4-diclorofenil)oxolan-2-il]metil]-1,2,4-triazol



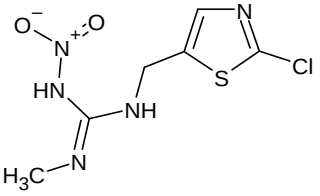
Carbofurano: (2,2-dimetil-3H-1-benzo-furan-7-il) -N-metilcarbamato



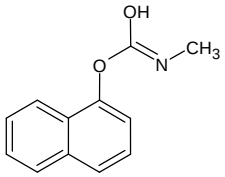
Cipermetrina: [ciano-(3-fenoxife nil)metil]-3-(2,2-dicloro etenil)-2,2-di-metilciclopropano-1-carboxilato



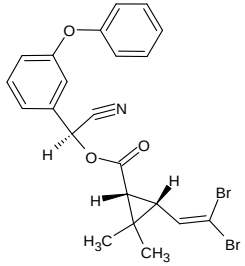
Clorpirifós: dietoxi-sulfanilideno-(3,5,6-tricloropiridin-2-il)oxi-λ5-fosfano



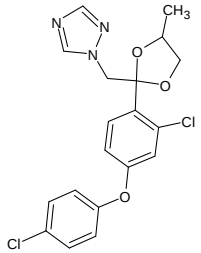
Clotianidina: 1-[(2-cloro-1,3-tiazil-5-)metil]-3-metil-2-nitroguanidina



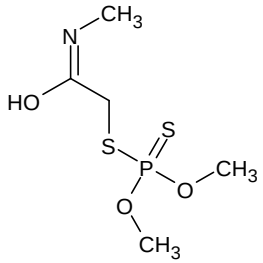
Carbaril:1-naftil-N-metilcarbamato



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

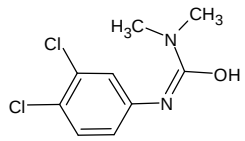


Difenoconazol: 1-[[2-[2-cloro-4-(4-clorofenoxi)fenil]-4-metil-1,3-dioxo - lan-2-il]metil]-1,2,4-triazol

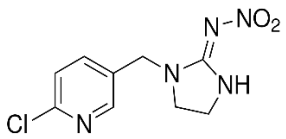


Dimetoato: 2-dimetoxifosfinotioilsulfanil-*N*–metilacetamida

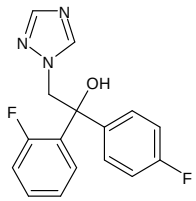
Figura 1- Continuação.



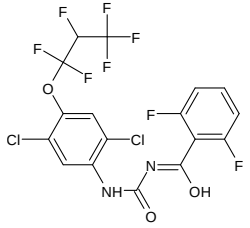
Diuron: 3-(3,4-diclorofenil) -1,1-Di-metilureia



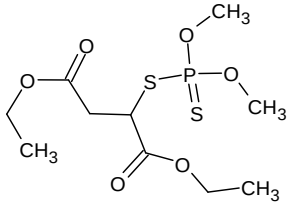
Imidaclopprido: *NE*)-*N*-[1-[(6-cloropiridin-3-il)-metil]-imidazolidin-2-ilideno] nitramida



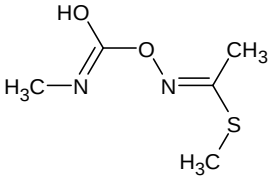
Flutriafol: 1-(2-fluorofenil) -1-(4-fluorofenil) -2-(1,2,4-triazol-1-il) etanol



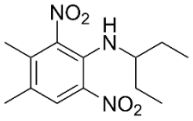
Lufenurom: *N* -[[2,5-dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil] carbamoil]2,6-difluorobenzamida



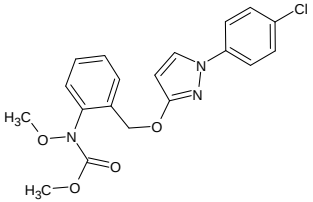
Malationa: dietil2-dimetoxifosfino-Ti-oilsulfanilbutanodioato



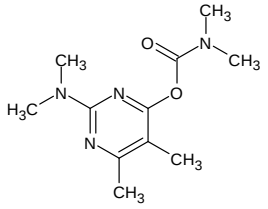
Metomil: metil(1E)-N-(metilcarbamoiloxi)etanimidotioato



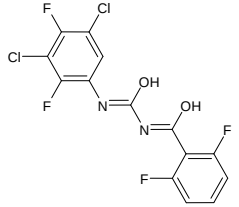
Pendimentalina: 3,4-dimetil-2,6-dinitro- *N* -pentan-3-ilanilina



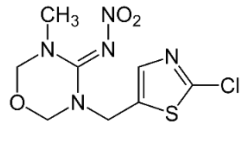
Piraclostrobina: metil-[2-[[1-(4-clorofenil)pirazol-3-il]oximetil]fenil]-*N*-metoxicar-bamato



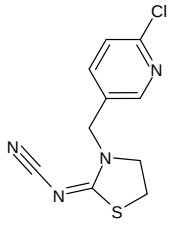
Pirimicarbe: [2-(dimetilamino)5,6-dimetilpirimidin-4-il]-N-dimetilcarbamato



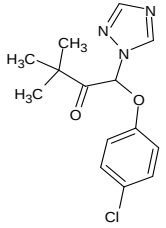
Teflubenzurom: N-[(3,5-dicloro-2,4-difluorofenil)- carbamoil]-2,6-difluoro-benzamida



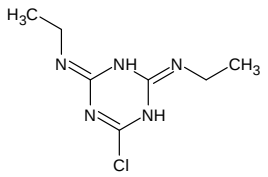
Tiametoxam: (NE)-N- [3-[(2-cloro-1,3- tiazol-5-il)metil]-5-metil -1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno]ni-tramida



Tiacloprido: [3-[(6-cloropiridin-3-il)-metil]-1,3-tiazolidin-2-ilideno]cianami- da



Triadmefom: 1-(4-clorofenoxi)-3,3-dimetil-1-(1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ona



Simazina: 6-cloro-2-N,4-N-dietil-1, 3,5-triazina-2,4-diamina

Fonte: IUPAC PPDB; ANVISA [39,40].

1.3 Técnicas de preparo de amostras

O preparo da amostra desempenha uma função essencial na determinação de resíduos de pesticidas, especialmente ao lidar com amostras complexas e concentrações baixas, conforme estabelecido pelos Limites Máximos de Resíduos (LMRs). Dentre os aspectos cruciais, destacam-se o isolamento dos analitos da matriz, a purificação para eliminar interferentes e evitar danos ao equipamento, além da pré-concentração para assegurar concentrações detectáveis durante a análise instrumental [42].

Recentemente, observa-se uma tendência de miniaturização em algumas técnicas convencionais de preparo de amostras. Essas abordagens são marcadas pela minimização da quantidade de amostra, pela redução ou eliminação do uso de solventes orgânicos tóxicos, pela incorporação de materiais alternativos, aprimoramento da seletividade e especificidade da extração, e pela automação do processo [43,52]

Neste sentido, novas técnicas foram desenvolvidas tomando como princípio à miniaturização da extração líquido-líquido (LLE- *Liquid-liquid extraction*) e a extração em fase sólida (SPE- *Solid–Liquid Extraction*), destacando-se a microextração com gota única (SDME - *Single drop microextraction*), microextração em fase sólida (SPME - s*olid-phase microextraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME- *Dispersive liquid-liquid microextraction*) por reduzirem significativamente o consumo de solventes orgânicos, além de tornar a etapa de preparo de amostras menos laboriosa [44,45,52]. Por consequência, aos poucos novos protocolos analíticos de extração miniaturizados são apresentados na literatura científica de preparo de amostras, dentre eles a micro dispersão da matriz em fase sólida (μMSPD - *Micro-matrix solid phase dispersion)* [49,50].

1.3.1 Dispersão da matriz em fase sólida

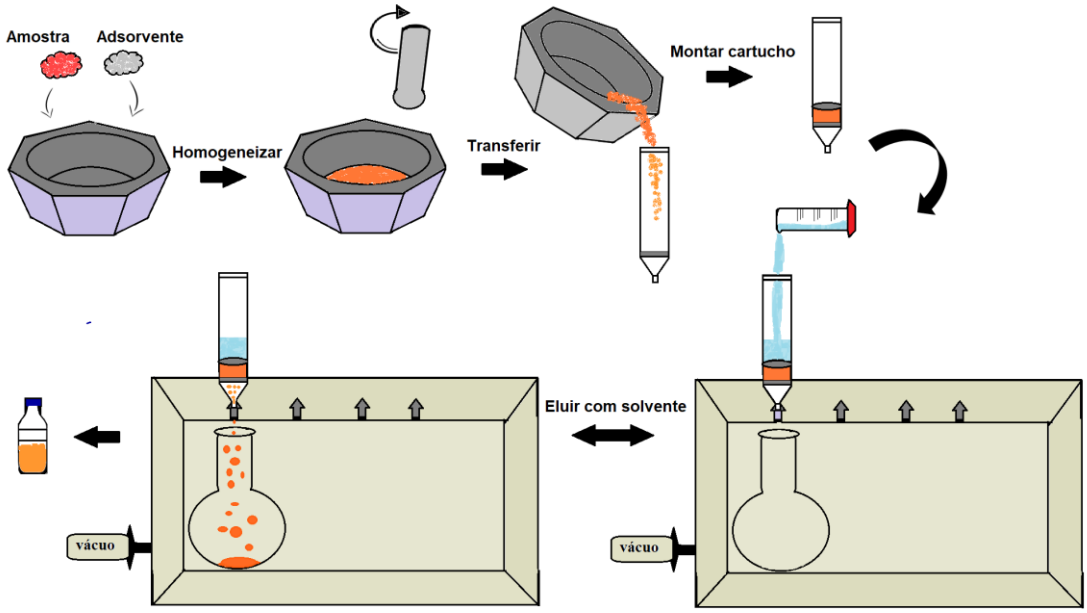
A dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*) foi uma técnica de extração e limpeza introduzida por Baker e

colaboradores em 1989, e é uma alternativa para preparar amostras sólidas, semissólidas e viscosas. Está técnica possui vantagens como rapidez, visto que o processo de extração e clean-up pode ser realizado de forma simultânea, e melhor relação custo-benefício. Além disso, possibilita a redução do uso de solventes orgânicos, fato este que diminui significativamente a geração de resíduos e atende exigências ambientais atuais [19,46, 47].

O procedimento da extração por MSPD consiste em misturar, com auxílio de almofariz e pistilo, a amostra a um suporte sólido por um tempo suficiente que permita a completa homogeneização e ruptura da amostra em pequenas partículas, fazendo com que o analito interaja com o adsorvente através do processo de sorção. Isso é feito até a obtenção de uma fase homogênea, que em seguida é transferida para um cartucho com um frit ou lã de vidro, onde é realizado o empacotamento (Figura 2). Os analitos de acordo com as suas propriedades químicas podem ser isolados pelo solvente de eluição, considerando o seu poder de eluição e a polaridade [18,47].

O suporte sólido/adsorvente tem a função de realizar a quebra da estrutura global da amostra e fazer a dispersão da matriz, fato este que permite a aumento da superfície de contato do adsorvente com o analito aprisionado na matriz, aumentando o potencial de extração da técnica. Na etapa de eluição as interações serão entre o analito e o eluente, e entre a matriz e o eluente. Sendo assim, é ideal que o solvente escolhido tenha um grau de afinidade maior com os analitos do que com os compostos interferentes da matriz [47].

Figura 2— Processo de homogeneização da amostra e eluição com auxílio de um sistema a vácuo do tipo manifold.



Fonte: Elaborada pela autora.

Durante a extração por MSPD existem alguns parâmetros que devem ser otimizados, tais como: a proporção entre a massa de suporte sólido e a massa de amostra; o tempo de homogeneização que tem o intuito de possibilitar maior interação do analito com o adsorvente; o solvente de eluição, já que o ideal é que ocorra uma eluição seletiva, de maneira a eluir os compostos de interesse e deixar os componentes da matriz retidos na coluna; o volume de eluição; adsorvente para *clean-up* (caso o método exija essa etapa) [18,47].

A miniaturização na técnica de MSPD é alcançada por meio da aplicação de abordagens que utilizam pequenas quantidades de amostra, adsorvente e solvente de extração. Além disso, o uso de adsorventes alternativos, por serem mais ambientalmente amigável e de baixo custo. Essas mudanças na metodologia asseguram resultados de extração com eficiência e sensibilidade semelhantes ao método MSPD convencional [45]. Na literatura são encontrados trabalhos utilizando a técnica miniaturizada em matrizes e analitos variados.

Llompart *et al*., 2013, foram pioneiros no uso da dispersão da matriz em fase sólida miniaturizada. Inicialmente, o método MSPD foi miniaturizado e personalizado. para evitar ou minimizar riscos de contaminação por ftalatos e reduzir resíduos e custos, para a extração de 18 plastificantes e 12 almíscares,

incluindo 10 substâncias proibidas em cosméticos. A quantidade de amostra e solvente de extração empregados foram 0,1 g e 1 mL, respectivamente [48].

Lončarić *et al*., 2020, otimizaram uma metodologia µMSPD para a extração de polifenóis da casca de doze variedades de maçã tradicionais e oito comerciais cultivadas na Croácia. O procedimento desenvolvido é caracterizado pelo uso de um adsorvente alternativo (0,8 g de areia do mar), 0,2 g de amostra, e 5 mL de uma solução de 57% de metanol em água, como solvente de eluição [85].

Carro *et al*., 2021, desenvolveram um método baseado na µMSPD combinada com cromatografia gasosa/espectrometria de massas triplo-quadrupolo em modo tandem (GC–MS/MS) para a determinação de seis diésteres de ftalato em amostras de mexilhão. O procedimento final envolveu o uso de 0,45 g de amostra, 0,5 g de adsorvente (Florisil) e 3 mL de acetato de etila. O método otimizado foi validado, proporcionando desempenho analítico satisfatório [49].

Santos *et al*., 2022, desenvolveram um protocolo µMSPD para a extração de seis alcaloides β-carbolínicos em tabaco. O procedimento µMSPD otimizado empregou 0,01 g de amostra, e eluição com 2 mL de solução aquosa de ácido fórmico a 1%, resultando em uma técnica rápida, prática, econômica e ecologicamente correta [50].

1.4 Validação de Método Analítico

A validação é uma etapa essencial para garantir a confiabilidade de um método analítico desenvolvido, antes da aplicação nas amostras de interesse, assegurando que o método seja eficiente e garanta os resultados esperados nas condições utilizadas. A validação é considerada quando se desenvolve ou se efetua adaptações em metodologias já estabelecidas, se insere novos procedimentos ou se faz uso de diferentes equipamentos. É uma ferramenta formal, sistemática e documentada que mede a capacidade de um método analítico de fornecer resultados confiáveis, precisos e reprodutíveis [51,53,54].

Existem diferentes diretrizes recomendadas para realização da validação de métodos analíticos por instituições internacionais, tais como: Agência de Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (*FDA - Food and Drug Administration*), Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*USEPA - United States Environmental Protection Agency*), e o Guia de Procedimentos de Controle de Qualidade Analítica e Validação de Métodos para Análises de Resíduos de Pesticidas em Alimentos da União Europeia (*EU-SANTE - Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed*); no Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), têm proposto diretrizes em relação à validação analítica [53-55].

Apesar de os requisitos de validação variarem, de acordo com a finalidade de aplicação, alguns parâmetros gerais podem ser adotados como guia, sendo eles: linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, efeito matriz, limite de detecção e limite de quantificação [51].

O termo linearidade se refere à capacidade do método em produzir uma relação linear entre a área do sinal de um analito e a concentração deste analito em amostras contendo componentes da matriz, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado. Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes das soluções padrão preparadas no mínimo em triplicata [18,51,55].

A sensibilidade indica a capacidade em discriminar, com uma fidelidade estabelecida, concentrações próximas de um analito. A sensibilidade pode ser determinada pela inclinação da curva de calibração obtida no ensaio de linearidade. No caso de uma reta, quanto maior o seu ângulo de inclinação, mais sensível será o método [51, 57, 58].

A exatidão mede o desvio do valor obtido em relação ao valor assumido como real. Quando aplicado a um conjunto de resultados, envolve uma combinação de erro aleatório (estimado como precisão) e um erro sistemático comum (veracidade ou viés). A estimativa de exatidão de um método pode ser feita a partir dos estudos de recuperação analítica com o intuito de quantificar perdas dos analitos durante o procedimento de preparo de amostra [51,53,55].

A precisão afere o quão bem os resultados obtidos se assemelham ao valor tido como verdadeiro. A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A partir dos valores obtidos, são calculados a média e o desvio padrão (DP) determinando-se o coeficiente de variação (CV), expresso em termos de percentagem [51,53,56].

A seletividade deve ser expressa por meio da capacidade de identificar e/ou quantificar o analito de interesse inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e constituintes da matriz. Com base nisso, um dos estudos da seletividade é o efeito matriz que avalia a influência de um ou mais compostos interferentes extraídos da amostra na medição da concentração do analito. Essa influência pode ser observada com a resposta aumentada ou diminuída em comparação com aquela produzida pelo analito no solvente [55].

Os limites de detecção e quantificação são outros dois parâmetros da validação analítica. O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente, quantificada como um valor exato. Por sua vez, o limite de quantificação (LQ) se refere a menor concentração ou massa do analito que foi validada com exatidão aceitável pela aplicação do método analítico completo e critérios de identificação [51, 55].

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

,

- Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação de resíduos de pesticidas em goiaba empregando µMSPD e LC-MS/MS.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar e selecionar os pesticidas aplicados na cultura da goiaba;
- Otimizar as condições instrumentais de análise dos pesticidas selecionados por cromatografia líquida/espectrometria de massas;
- Desenvolver protocolo analítico para extrair resíduos dos pesticidas selecionados da goiaba, utilizando a técnica de micro dispersão da matriz em fase sólida (µMSPD);
- Avaliar o uso de biocarvão de *Eichhornia crassipes* como um potencial material adsorvente no procedimento de µMSPD;
- Validar o método desenvolvido;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

- Balança analítica AL 204 (Metller Toledo, Ohio, EUA);
- Evaporador rotatório 802D (Fisatom, São Paulo, Brasil);
- Sistema para SPE vacuum manifold (Varian, Califórnia, EUA).
- Ultra-freezer (Liotop, UFR30)
- Liofilizador de bancada (Liotop, L101)
- Cromatógrafo a líquido Nexera UC (Shimadzu, Quioto, Japão) composto por: Módulo de Comunicação CBM-20A, sistema binário de bombas LC-10AD$_{XR}$, Bomba para CO_2 LC-30ADSF, Desgaseificador DGU-205R, Auto injetor SIL-30AC, Controlador de Pressão SFC-30, Forno de Colunas CTO-20AC, Detector PDA SPD-M20A, Espectrômetro de massas MS-2020, Coluna Analítica Shim-pack UC-X_RP (150 x 2,1 mm x 3,0 µm, Shimadzu, Quioto, Japão) com coluna de guarda contendo a mesma fase estacionária da coluna e software de gerenciamento Lab Solution.

- Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Acquity UPLC H-Class (Waters, Estados Unidos): Sistema binário de bombeamento, módulo de comunicação, autoinjetor, forno para coluna, detector espectrofotométrico com arranjo de diodos e espectrômetro de massas com fonte de ionização por electrospray, analisador Triplo quadrupolo, modelo Xevo TQD, com software de gerenciamento MassLynx. Coluna Analítica fenil-hexil Waters (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm).

3.2 Reagentes

- Metanol grau HPLC (SK Chemicals, Seongnam, Coreia do Sul), Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, Estado do México, México), Acetato de Etila grau HPLC (Sigma-Aldrich, pureza 95%, Saint Louis, EUA), Água ultrapura obtida em sistema de ultrapurificação Milli-Q, modelo Gradient (Milipore – Merck, Darmstadt, Alemanha), Formiato de Amônio (Neon, pureza 98%, São Paulo, Brasil), Ácido Fórmico (Sigma-Aldrich, pureza 95%, Saint Louis, EUA), Cartucho SPE SiliaSep C18 (17%) 500 mg/6 mL (Silicycle, Québec, Canadá).

3.3 Padrões certificados dos analitos

Os padrões certificados de pesticidas utilizados apresentaram pureza acima de 98%, são eles: acetamiprido (Rieldel-de Haen), alacloro (Fluka), aldicarbe (Fluka), ametrina (Rieldel-de-Haen), atrazina (Fluka), azoxistrobina (AccuStandard), bromuconazol (Fluka), carbaril (Fluka), carbofurano (Fluka), cipermetrina (Fluka), clorpirifós (AccuStandard), clotianidina (Fluka), deltametrina (Fluka), difenoconazol (Dr. Ehrenstorfer), dimetoato (AccuStandard), diuron (Fluka), flutriafol (Fluka), imidacloprido (Rieldel-de Haen), lufenurom (Chemis Service), malationa (AccuStandard), metomil (Fluka), pendimetalina (Fluka), piraclostrobina (Rieldel-de-Haen), pirimicarbe (Fluka),

simazina (Fluka), teflubenzurom (Fluka), tiametoxam (Fluka), tiacloprido (Fluka), triadimefon (Fluka).

3.4 Preparo das soluções padrão dos pesticidas

Para o preparo das soluções estoque individuais foram medidas as massas dos padrões sólidos a fim de se obter uma concentração de 1000 µg mL^{-1} em 10 mililitros de metanol grau HPLC, a partir destas soluções foram produzidas soluções intermediárias individuais de 10 µg mL^{-1} com o mesmo solvente. Soluções conjuntas e de trabalho também foram feitas em metanol. Estas soluções foram utilizadas por no máximo 30 dias. As soluções preparadas foram armazenadas em frascos de vidro com tampa rosqueável e mantidas sob refrigeração.

3.5 Obtenção do biocarvão de *Eichhornia crassipes*

O biocarvão de *Eichhornia crassipes* (aguapé) foi produzido pela mestra em química Ingred Suellen Carvalho Carregosa, e cedido pelo Grupo de Pesquisa em Petróleo e Energia da Biomassa - PEB, da Universidade Federal de Sergipe, sob Coordenação do prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior, para este estudo.

A biomassa (aguapé) foi coletada no açude Marcela (a 10° 40’ 19,83” S; 37° 25’ 14,60” W), o qual está localizado no Município de Itabaiana (Sergipe, Brasil). A biomassa foi seca a 50 °C por 48 h, e pirolisada em forno tubular a 400 °C por 2 h [82].

Parte do biocarvão foi peneirada em uma peneira granulométrica de 250 mesh. Em seguida, 10 gramas do biocarvão foram lavadas com 100 mililitros de água ultrapura em agitação no ultrassom por 15 minutos, e, posteriormente, com

100 mililitros de metanol em agitação no ultrassom por 15 minutos. Após esse processo, o material foi seco a 100 ºC em estufa por 24 horas.

3.6 Obtenção e preparo da amostra de goiaba

Amostras de goiabas maduras foram obtidas na Central Estadual de Abastecimento de Sergipe, na cidade de Aracaju. No Laboratório de Análise Compostos Orgânicos Poluentes (LCP), localizado no Departamento de Química, com o auxílio de um processador de alimento portátil, foi homogeneizada e posteriormente armazenada, sob atmosfera de nitrogênio, em um frasco de vidro de tampa rosqueável previamente limpo e etiquetado, em freezer.

3.7 Liofilização da Amostra

A goiaba homogeneizada foi disposta em bandejas inox e congeladas em ultra freezer com temperatura de -80°C por 4 horas. Em seguida, as bandejas contendo a amostra congelada foram rapidamente transferidas para um liofilizador de bancada com temperatura controlada entre 50 e 55 °C negativos e pressão inferior a 4,7 mm de mercúrio, o qual ficou em funcionamento por 24 horas para sublimação da água presente na amostra.

3.8 Condições instrumentais de análise

A Tabela 4 apresenta os gradientes de eluição utilizados durante o trabalho. Em todos os testes a fase móvel foi composta por metanol/água, e 5 mmol de formiato de amônio como modificador orgânico. As condições instrumentais de análise para os equipamentos e configurações dos

espectrômetros de massas (MS 2020 e Xevo TQD) utilizadas estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 4— Gradientes de eluição utilizados durante o desenvolvimento do trabalho.

Cromatógrafo Nexera UC LC-MS		**Cromatógrafo Acquity UPLC LC-MS/MS**	
Tempo (min)	Metanol (%)	Tempo (min)	Metanol (%)
0,01	30	0,01	5
10	100	10	100
15	100	11	100
18	30	12	5
20	30	13,5	5

Tabela 5—Condições instrumentais de análise para cromatografia líquida utilizadas durante o trabalho.

	Cromatógrafo Nexera UC LC-MS	**Cromatógrafo Acquity UPLC LC-MS/MS**
Fase estacionária (coluna analítica)	Shim-pack UC-X_RP 3,0 µm (150 mm x 2,1 mm)	Fenil-hexil Waters 1,7 µm (50 mm x 2,1 mm)
Vazão da fase móvel	0,5 mL min^{-1}	0,15 mL min^{-1}
Composição da fase móvel	A: água (5 mmol NH_4HCO_2) B: metanol (5 mmol NH_4HCO_2)	A: água (5 mmol NH_4HCO_2) B: metanol (5 mmol NH_4HCO_2)
Temperatura do forno da coluna	40 ºC	40 ºC
Volume de injeção	5 µL	5 µL
	MS- 2020	**Xevo TQD Waters**
Fonte de Ionização	Electrospray	Electrospray
Modo de Aquisição	SIM (Positivo e negativo)	MRM
Temperatura da fonte de ionização	350 ºC	150 ºC
Voltagem da fonte de ionização	3,5 kV	3,0 kV
Vazão de gás de dessolvatação (N_2)	1,5 L min^{-1}	900 L Hr^{-1}
Vazão do gás do cone (N_2)	10 L min^{-1}	50 L Hr^{-1}

3.9 Procedimento de extração por µMSPD

O procedimento de extração por µMSPD consistiu em medir a massa em vidro de relógio da goiaba liofilizada (0,085 g). Em seguida, a polpa da goiaba foi homogeneizada com o adsorvente (0,085 g) por 3 minutos com auxílio de um almofariz e pistilo. O homogeneizado foi empacotado em um cartucho de SPE (capacidade de 3,5 mL) com o auxílio de lã de vidro. No sistema de vácuo do tipo manifold foi eluído com 5 mL de metanol, ajustando o fluxo para 1 mL min^{-1}, recolhendo o eluato em um balão de vidro de fundo redondo. Após a passagem do volume de amostra, foram aguardados 2 minutos para secagem do cartucho. O eluato foi concentrado em um evaporador rotatório (60 ºC e 120 rpm) até aproximadamente 1 mL. O volume do eluato foi ajustado em um balão volumétrico de 1 mL e filtrado com uma membrana de 0,22 µm para análise em LC-MS/MS.

3.10 Limpeza dos materiais

A limpeza da vidraria para o sistema LC/MS-MS segue um procedimento padrão utilizado do Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP), como segue:

- Enxague com água corrente;
- Enxague com água destilada;
- Enxague com água ultrapura;
- Acetona
- Secagem em estufa a 100 °C (exceto as vidrarias volumétricas);

3.11 Descarte dos reagentes

Os resíduos gerados durante o desenvolvimento do trabalho foram descartados de acordo com as suas características: Resíduos líquidos resultantes de solventes orgânicos foram descartados em bombonas de plástico adequadamente especificado e distintas entre solventes clorados e não clorados. Os resíduos sólidos advindos do procedimento de extração foram armazenados em frasco de vidro também identificados para posterior coleta realizada por empresa responsável.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento das condições instrumentais de análise

A maneira mais eficaz de explorar o comportamento de uma solução de pesticidas diante da técnica de cromatografia líquida, a fim de determinar o tipo de eluição (isocrática ou em gradiente) e o modificador orgânico da fase móvel, é conduzir uma análise cromatográfica com um gradiente abrangente. Sendo assim, soluções individuais dos 29 pesticidas (acetamiprido, alacloro, aldicarbe, ametrina, atrazina, azoxistrobina, bromuconazol, carbaril, carbofurano, cipermetrina, clorpirifós, clotianidina, deltametrina, difenoconazol, dimetoato, diurom, flutriafol, imidacloprido, lufenurom, malationa, metomil, pendimetalina, piraclostrobina, pirimicarbe, simazina, teflubenzurom, tiacloprido, tiametoxam e triadimefom) foram preparadas em concentração de 1 µg mL^{-1} e analisadas no LC-MS (Nexera UC) em modo exploratório de eluição.

Para a análise exploratória foi utilizado um gradiente com variação linear do percentual de solvente orgânico entre 10 e 100%, com a fase móvel constituída por metanol:água e, em análises posteriores, acetonitrila:água. A escolha dessas composições de fases móveis foi devido ao fato de serem rotineiramente utilizadas na cromatografia líquida de fase reversa, caracterizada pelo uso de uma fase estacionária apolar enquanto a fase móvel é de caráter polar. Para

esse estudo foi utilizada uma coluna analítica Shim-pack UC-X-RP (150 x 2,1 mm x 3,0 µm), a qual é caracterizada pela presença de grupos orgânicos apolares (C18) na composição da fase estacionária.

Nesta etapa foram avaliados também dois tipos de fonte de ionização, Electrospray (ESI) e Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI). Tais testes justificam-se devido a diversidade das moléculas dos pesticidas e dificuldade em prever a efetividade do processo de ionização que ocorrerá sob elas em cada interface. Foram testados também dois tipos de modificadores orgânicos nas fases móveis, com o intuito de verificar qual deles melhor contribuiria para a ionização dos compostos:formiato de amônio (5 mmol L^{-1} de NH_4HCO_2) e ácido fórmico (0,1% de CH_2O_2).

Os ensaios para escolha da fase móvel, modificador orgânico e fonte de ionização foram realizados em modo varredura de íons (SCAN) com um intervalo de *m/z* entre 100 e 1000 Da em um tempo de corrida de 30 minutos. Este intervalo de *m/z* foi definido, pois os pesticidas escolhidos para esse estudo possuem massas molares entre 162 e 527 g mol^{-1}. Também foi avaliado o modo de ionização dos pesticidas com o intuito de verificar se ionizavam em modo positivo ou negativo.

4.1.1 Ensaios realizados com a fonte Electrospray (ESI)

Durante as análises foram identificados e definidos os íons (*m/z*) que seriam monitorados para cada pesticida, tendo em vista que em alguns compostos podem formar adutos. Modificadores que contêm amônia, como o formiato de amônio, podem resultar na formação de adutos de amônio $[M+NH_4]^+$, em vez da molécula protonada $[M+H]^+$. É observado também a formação de adutos de sódio $[M+Na]^+$, mesmo que o sódio não esteja presente na fase móvel propositalmente, ele pode advir de impurezas derivadas de frascos, tubulação ou solventes [60]. Por isso, em modo positivo foram verificados os íons referentes a formação de íons com protón $[M+H]^+$, amônio $[M+NH_4]^+$ e sódio $[M+Na]^+$. E, em modo negativo, a desprotonação $[M-H]^-$, bem como a possível formação de adutos de formiato $[M+HCOO]^-$.

Os resultados obtidos a partir das análises exploratórias das soluções padrão dos 29 pesticidas em metanol (1 µg mL^{-1}), utilizando a fonte de ionização

ESI e os solventes orgânicos acetonitrila e metanol, em diferentes modificadores, estão descritos na Tabela 6. Os resultados expressam os íons selecionados, o modo de ionização, e os tempos de retenção em cada composição de fase móvel. É possível perceber que a protonação $[M+H]^+$ e a desprotonação $[M-H]^-$ foram os processos majoritários na ionização dos pesticidas.

Tabela 6— Resultados das análises de soluções padrão de pesticidas em metanol (1 µg mL^{-1}) realizadas em modo exploratório na fonte de ionização electrospray.

ELECTROSPRAY			**Modificador na fase móvel**		
			MeOH:H_2O		**ACN:H_2O**
Pesticidas	**Ionização**	***m/z***	**Tempo de retenção (T_R, min)**		
			5 mmol L^{-1} NH_4HCO_2	**0,1%CH_2O_2**	**0,1%CH_2O_2**
Acetamiprido	$[M+H]^+$	223,0	13,1	13,5	9,6
Alacloro	$[M+H]^+$	270,09	19,0	17,12	17,13
Aldicarbe	$[M+NH_4]^+$	208,11	14,4	15,4	N. D
Ametrina	$[M+H]^+$	228,1	18,1	18,0	N. D
Atrazina	$[M+H]^+$	216,0	17,1	15,6	14,4
Azoxistrobina	$[M+H]^+$	404,1	17,9	16,7	15,8
Bromuconazol	$[M+H]^+$	378,0	22,3	21,11	22,1
Carbaril	$[M+H]^+$	202,1	20,1	19,7	19,5
Carbofurano	$[M+H]^+$	222,1	15,8	15,1	12,8
Cipermetrina	$[M+NH_4]^+$	433,0	21,2	20,3	20,6
Clorpirifós	$[M+H]^+$	350,0	8,4	7,5	8,2
Clotianidina	$[M+H]^+$	249,9	12,3	13,4	8,7
Deltametrina	$[M+NH_4]^+$	527,0	22,4	21,8	22,1
Difenoconazol	$[M+H]^+$	406,0	23,3	18,8	23,8
Dimetoato	$[M+H]^+$	230,0	17,8	17,0	17,3
Diurom	$[M+H]^+$	233,0	17,3	15,6	14,7
Flutriafol	$[M+H]^+$	302,1	16,9	15,2	14,4
Imidacloprido	$[M+H]^+$	256,1	9,3	10,2	8,7
Lufenuron	$[M-H]^-$	508,9	12,2	13,2	19,4
Malationa	$[M+H]^+$	331,0	20,5	20,9	N. D
Metomil	$[M+H]^+$	163,0	16,7	15,1	14,9
Pendimetalina	$[M+H]^+$	282,1	20,9	19,9	19,8
Piraclostrobina	$[M+H]^+$	388,1	19,7	18,4	18,1
Pirimicarbe	$[M+H]^+$	239,0	17,4	16,9	17,0
Simazina	$[M-H]^-$	201,7	15,8	12,8	14,6
Teflubenzurom	$[M-H]^-$	378,9	20,6	19,3	N. D
Tiacloprido	$[M+H]^+$	253,0	13,9	14,0	10,7
Tiametoxam	$[M+H]^+$	292,0	10,9	12,6	7,2
Triadmefom	$[M+H]^+$	293,8	18,6	17,0	16,8

N.D= não detectado

Analisando os resultados expostos na Tabela 6, foi possível perceber que os tempos de retenção dos analitos que foram obtidos com acetonitrila na fase móvel foram inferiores àqueles apresentados quando a fase foi composta por metanol. Isso ocorre devido a força de eluição e a polaridade da acetonitrila que é maior que a do metanol, o que faz com que na cromatografia em fase reversa os compostos mais polares sejam eluidos mais rapidamente [61].

A partir dos resultados expostos na Tabela 6 foi observado que metanol: água com 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio e metanol: água com 0,1% de ácido fórmico, permitiu a eluição e a ionização dos 29 pesticidas propostos neste trabalho. Contudo, o uso de fase móvel com acetonitrila:água com 0,1% de ácido fórmico permitiu apenas que 25 pesticidas respondessem satisfatoriamente. Isso pode ter ocorrido por características de polaridade dos solventes orgânicos que têm impacto direto na ionização dos compostos na ESI [62].

O metanol melhora a eficiência de ionização na fonte de ionização por electrospray (ESI), proporcionando sinais mais fortes para muitos analitos. Ele também gera menos ruído na linha de base em comparação com a acetonitrila, o que pode aumentar a sensibilidade da análise. Além disso, sua menor volatilidade em relação à acetonitrila pode reduzir a formação de gotas maiores e evitar problemas de ionização na fonte ESI [61].

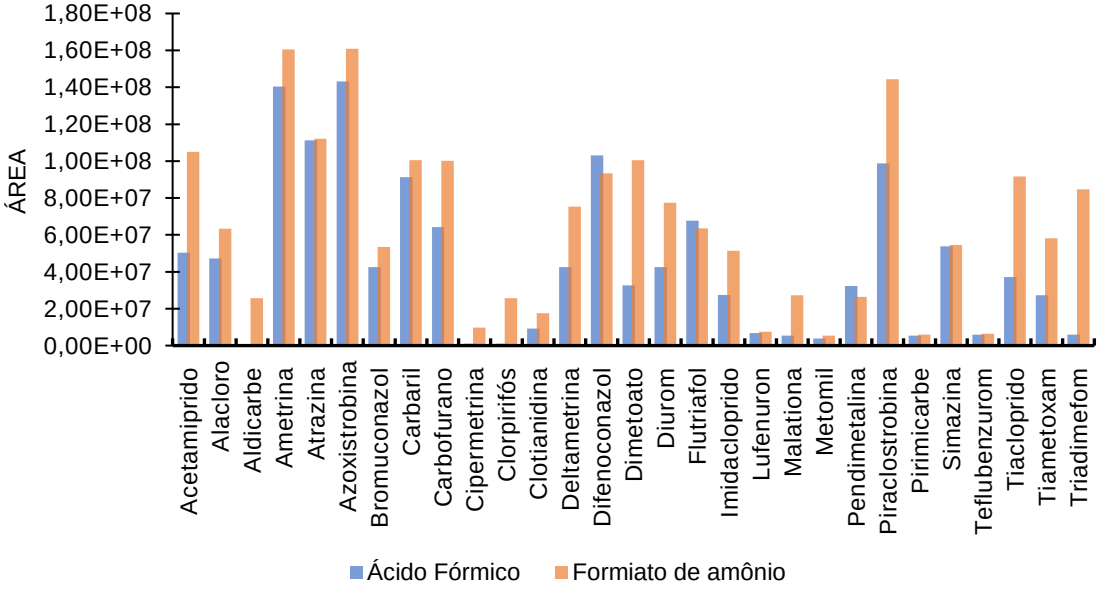
4.1.2 Ensaios para a escolha do aditivo orgânico

Na cromatografia de fase reversa, aditivos orgânicos como ácido fórmico e formiato de amônio são comumente utilizados para preparar fase móvel, estes aditivos auxiliam na manutenção do pH da fase móvel para assegurar que os analitos ionizáveis permaneçam em um único estado de ionização, melhorando a resposta na fonte de ionização durante a análise [63].

Como foi possível perceber na Tabela 6, os 29 pesticidas foram identificados nas análises exploratórias com metanol: água, utilizando tanto formiato de amônio a 5 mmol L^{-1} como 0,1% de ácido fórmico como aditivo. Desta forma, foi necessário fazer uma comparação da maior intensidade de respostas dos analitos em ambos os aditivos, a fim de escolher o mais adequado para continuar

o desenvolvimento do método. Na Figura 3 estão expostos os resultados obtidos para essa análise comparativa.

Figura 3- Comparação das áreas dos sinais obtidas pela análise exploratória da solução padrão dos pesticidas em metanol (1 µg mL^{-1}), utilizando formiato de amônio a 5 mmol L^{-1} ou solução 0,1% de ácido fórmico como aditivo.



Os processos de formação de íons na ESI são complexos. Muitos parâmetros e processos de equilíbrio da solução afetam o sinal do íon. Por exemplo, aditivos com presença de amônia podem promover reações de protonação em fase gasosa aumentando significativamente a intensidade do íon $[M+H]^+$ para compostos com um $pK_a < 3$, mas não para compostos com um $pK_a > 4$. Porém, há relatos de alguns compostos que não seguem esse padrão, tendo sua área aumentada mesmo com pK_a superior a 4, fato esse que pode estar ligado a propriedades intrínsecas dos analitos [64,65].

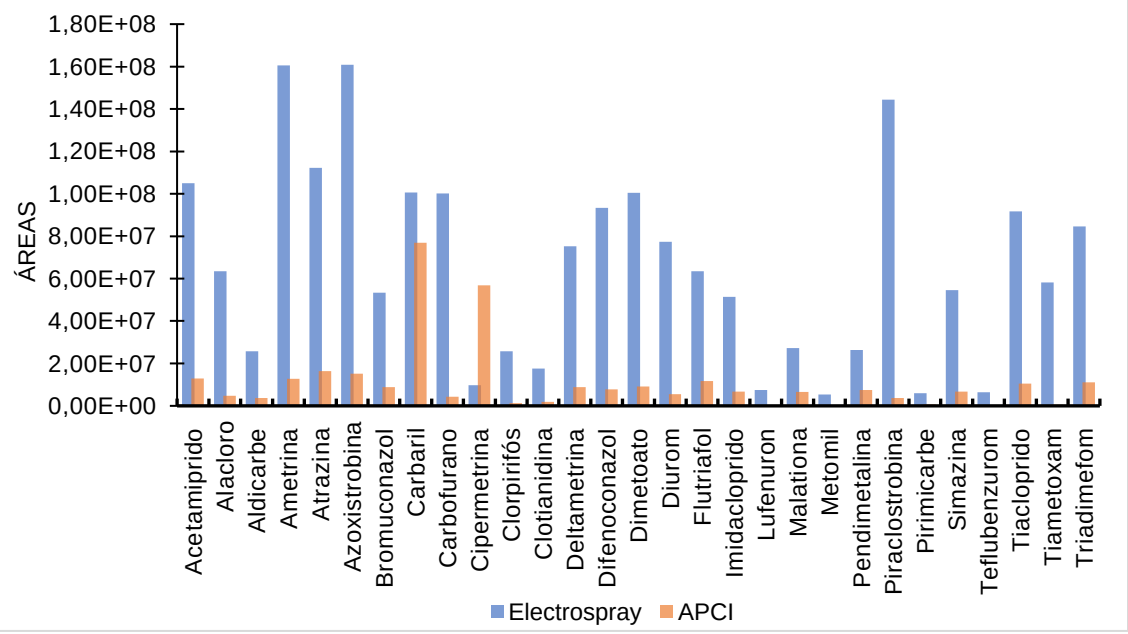
Na análise exploratória com o formiato de amônio foram observadas maiores intensidades de área para os compostos. Em vista disso, o formiato de amônio foi escolhido como aditivo mais adequado para as análises, considerando que a maior área do sinal está relacionada a facilidade do analito em se ionizar nesse aditivo [62].

4.1.3 Ensaios para escolha da fonte de ionização

As fontes ESI e APCI são muito utilizadas para desenvolver métodos de determinação de resíduos de pesticidas em matrizes alimentares. Existem diversos parâmetros que podem influenciar a eficiência de ionização com essas interfaces. Por exemplo, a ESI é afetada pela presença de gotas grandes de solvente com tensão superficial elevada e condutividade, já que estes fatores dificultam a formação de gotas menores e os íons na fase gasosa. A fonte APCI é um processo alternativo de ionização para a analisar compostos de baixa a média polaridade e que apresentem alguma volatilidade [61,67].

Desta forma, para verificar a melhor interface para a ionização dos compostos, foi feita uma análise exploratória da solução padrão dos pesticidas (1 µg mL^{-1}) utilizando a fase móvel metanol: água (5 mmol L^{-1} de formiato de amônio) e APCI como fonte de ionização. Os resultados expressos em valores numéricos das áreas dos picos dos analitos foram comparados com a análise exploratória realizada com a fonte ESI e estão apresentados na Figura 4.

Figura 4– Gráfico das áreas dos picos cromatográficos obtidos pela análise exploratória de soluções padrão de pesticidas em metanol (1 µg mL^{-1}) nas fontes ESI e APCI.



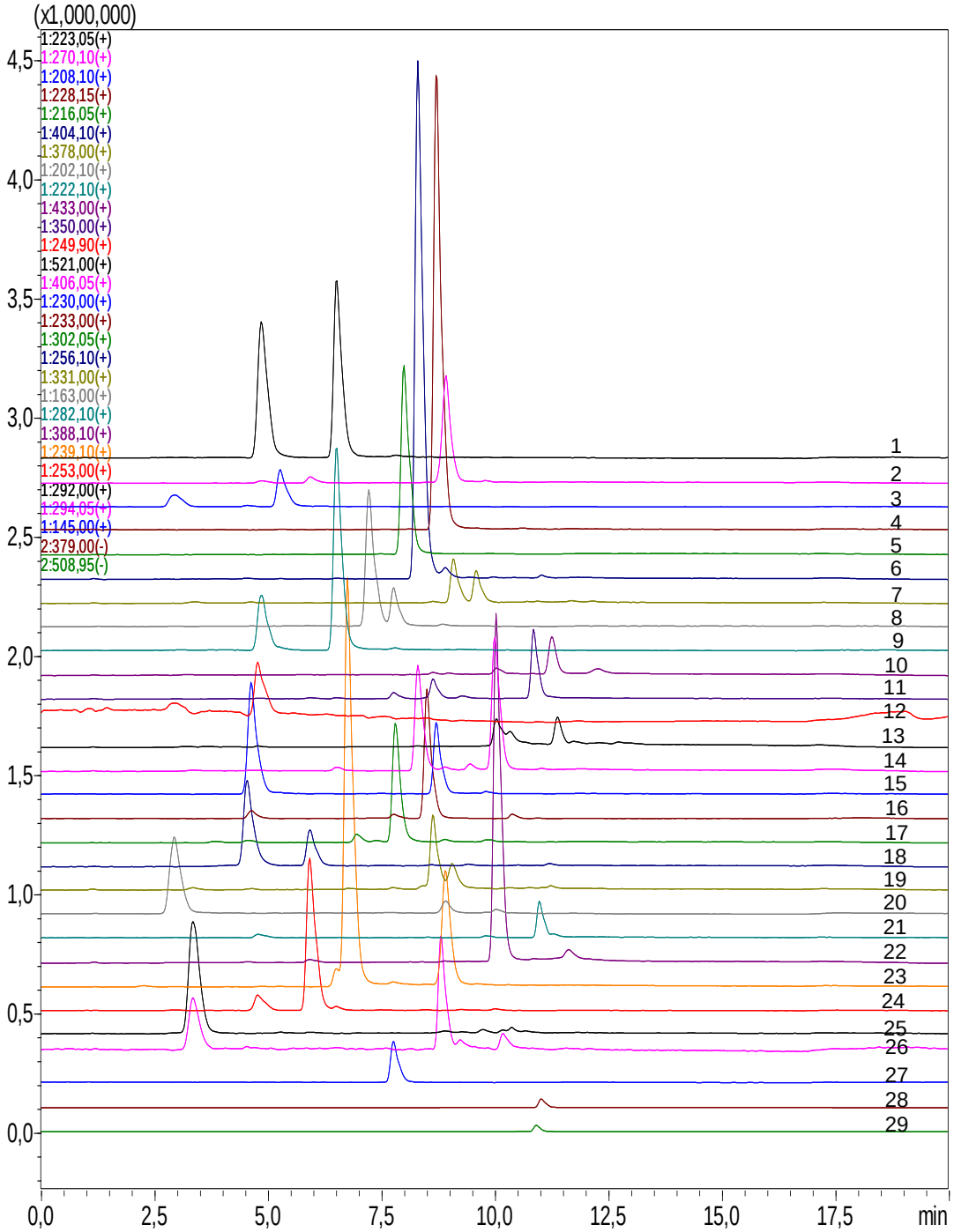
Com base nos dados fornecidos na Figura 4, foi possível verificar que a fonte Electrospray proporcionou maiores intensidades de sinal para os pesticidas em estudo do que a Ionização Química a Pressão Atmosférica. Isso está atrelado ao fato de a ESI ser uma fonte de ionização mais branda, enquanto a APCI é considerada mais agressiva e que pode causar a degradação dos analitos, ocasionando uma diminuição da intensidade do sinal [68]. Dessa maneira, optou-se em seguir o desenvolvimento do trabalho com a fase móvel metanol: água (5 mmol L^{-1} de formiato de amônio) e a fonte ESI.

4.1.4 Desenvolvimento do método por LC/MS em modo SIM

Tendo sido definidas a composição da fase móvel e a fonte de ionização, a partir dos perfis de ionização dos pesticidas observados, a atenção foi dirigida para o desenvolvimento de um método em modo de monitoramento dos íons selecionados (SIM), com o intuito de aumentar a sensibilidade de detecção instrumental. O modo de aquisição SIM difere do SCAN, pois permite que o equipamento focalize íons específicos de cada analito, sem a necessidade de processar todos os íons que estão contidos em um determinado intervalo de *m/z*, o que promove um aumento da sensibilidade da análise dos compostos [62].

Foram monitorados os íons *m/z* que apresentaram melhores resultados em termos de modo de ionização (positivo ou negativo, protonado ou aduto) na análise exploratória com metanol e formiato de amônio 5 mmol L^{-1} em modo SIM. Após ajuste da proporção inicial de solvente orgânico e adição de uma faixa de tempo da análise de modo isocrático, o cromatograma do gradiente adotado no presente estudo está representado na Figura 5.

Figura 5— Cromatograma da solução padrão conjunta de pesticidas em metanol (1 µg mL^{-1}) em modo SIM da análise em 20 minutos com metanol e solução aquosa com 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio em fonte de ionização ESI obtido no sistema de cromatografia líquida Nexera UC.



Identificação dos picos no cromatograma: 1- Acetamiprido; 2- Alacloro; 3- Aldicarbe; 4- Ametrina; 5- Atrazina; 6- Azoxistrobina; 7- Bromuconazol; 8- Simazina; 9- Carbofurano; 10- Cipermetrina; 11- Clorpirifós; 12- Clotianidina; 13- Deltametina; 14- Difenoconazol; 15- Dimetoato; 16- Diurom; 17- Flutriafol; 18- Imidacloprido; 19- Malationa; 20- Metomil; 21- Pendimetalina; 22- Piraclostrobina; 23- Pirimicarbe; 24- Tiacloprido; 25- Tiametoxam; 26- Triadimefom; 27- Carbaril; 28-Teflubenzurom; 29- Lufenurom.

O cromatograma observado na Figura 5 foi adquirido a partir da análise de uma solução padrão dos pesticidas em concentração de 1 µg mL^{-1}. Após a

elaboração de um gradiente de eluição com uma concentração inicial de metanol de 30% na fase móvel, a qual variou até 100% em 10 minutos, permanecendo por 5 min para assegurar a eluição de todos os compostos, retornando à condição inicial em 3 minutos e na qual permaneceu por dois minutos para permitir a estabilização do sistema cromatográfico antes de uma nova análise.

4.2 Determinação das condições instrumentais de análise: Espectrômetro de massas Xevo TQD

As condições instrumentais de análise foram definidas no cromatógrafo a líquido Nexera UC (LC-MS), porém devido a problemas técnicos no equipamento, as análises precisaram ser transferidas para outro sistema. Nesse caso, foram transferidas para um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência com espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (LC-MS/MS), modelo Xevo TQD.

Para a otimização das condições instrumentais no espectrômetro de massas, foram realizadas infusões de soluções individuais dos pesticidas em uma solução de metanol: água (50:50, v/v) acidificada com ácido fórmico a uma concentração de 1 µg mL^{-1}. A ferramenta *Intellistart*™ do software do equipamento auxiliou na avaliação dos parâmetros para cada analito: modo de ionização (positivo e negativo), voltagem do capilar, voltagem do cone e energias de colisão. A intensidade do sinal foi utilizada como critério de escolha dos íons de quantificação e de confirmação.

Os parâmetros de temperatura da fonte e de fluxo do gás de dessolvatação foram ajustados de acordo com as recomendações do fabricante, baseadas no fluxo da fase móvel do método de eluição. Em seguida, foram definidos os melhores valores de voltagem do cone do íon molecular para cada analito e as energias de colisão dos dois fragmentos mais intensos, que foram escolhidos como íon de quantificação e íon de confirmação, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7— Parâmetros ajustados para o método de aquisição por monitoramento de reações múltiplas (MRM), tempo de retenção (TR) e modo de ionização.

Analito	Tr (min)	Aduto	Voltagem do cone (V)	Ion precursor (*m/z*)	Íons produtos (*m/z*) (energia de colisão - eV)	
					Quantificação	Confirmação
Acetamiprido	5,8	$[M+H]^+$	34	223,04	125,97 (20)	55,98 (14)
Alacloro	8,7	$[M+H]^+$	12	270,09	238,11(10)	162,15 (22)
Aldicarbe	5,9	$[M+NH_4]^+$	12	208,11	115,96 (8)	89,00 (14)
Ametrina	7,9	$[M+H]^+$	42	228,15	96,01 (24)	67,10 (36)
Atrazina	7,3	$[M+H]^+$	38	216,06	96,01 (24)	103,95 (26)
Azoxistrobina	8,5	$[M+H]^+$	28	404,09	372,04 (14)	344,06 (24)
Bromuconazol	9,1	$[M+H]^+$	38	375,92	158,96 (26)	69,97 (18)
Carbaril	7,0	$[M+H]^+$	22	202,11	145,05 (12)	127,02 (26)
Carbofurano	6,7	$[M+H]^+$	25	222,10	122,90 (20)	165,00 (10)
Cipermetrina	10,6	$[M+NH_4]^+$	25	433,00	190,80 (11)	126,90 (29)
Clorpirifós	10,0	$[M+H]^+$	27	350,00	96,70 (33)	197,90 (15)
Clotianidina	5,1	$[M+H]^+$	23	249,90	131,80 (13)	169,00 (13)
Deltametrina	10,7	$[M+NH_4]^+$	26	521,00	278,89 (16)	171,84 (30)
Difenoconazol	9,6	$[M+H]^+$	44	406,03	250,99 (22)	110,98 (58)
Dimetoato	5,4	$[M+H]^+$	20	229,99	124,92 (20)	198,92 (8)
Diurom	7,7	$[M+H]^+$	34	232,99	71,99 (16)	159,95 (26)
Flutriafol	7,6	$[M+H]^+$	32	302,07	69,97 (18)	122,96 (30)
Imidacloprido	5,4	$[M+H]^+$	25	256,10	174,90 (15)	208,90 (15)
Lufenuron	10,1	$[M-H]^-$	30	508,95	325,92 (20)	338,93 (12)
Malationa	8,5	$[M+H]^+$	24	331,00	127,00 (12)	98,94 (20)

Tabela 7— Continuação.

Analito	Tr (min)	Aduto	Voltagem do cone (V)	Ion precursor *(m/z)*	Íons produtos (*m/z)* (energia de colisão - eV)	
					Quantificação	**Confirmação**
Metomil	3,9	$[M+H]^+$	14	163,01	88,01 (10)	105,98 (12)
Pendimetalina	10,2	$[M+H]^+$	20	282,11	212,07 (10)	194,10 (18)
Piraclostrobina	9,4	$[M+H]^+$	24	388,12	194,03 (12)	163,11 (24)
Pirimicarbe	7,3	$[M+H]^+$	30	239,11	72,00 (20)	182,09 (14)
Simazina	6,6	$[M+H]^+$	42	202,11	124,06 (16)	131,96 (18)
Teflubenzurom	10,0	$[M-H]^-$	26	378,87	338,86 (10)	195,87 (22)
Tiacloprido	6,4	$[M+H]^+$	36	253,00	125,99 (20)	90,03 (38)
Tiametoxam	4,6	$[M+H]^+$	26	292,00	210,96 (12)	180,96 (22)
Triadmefom	8,4	$[M+H]^+$	34	294,06	69,00 (20)	197,03 (14)

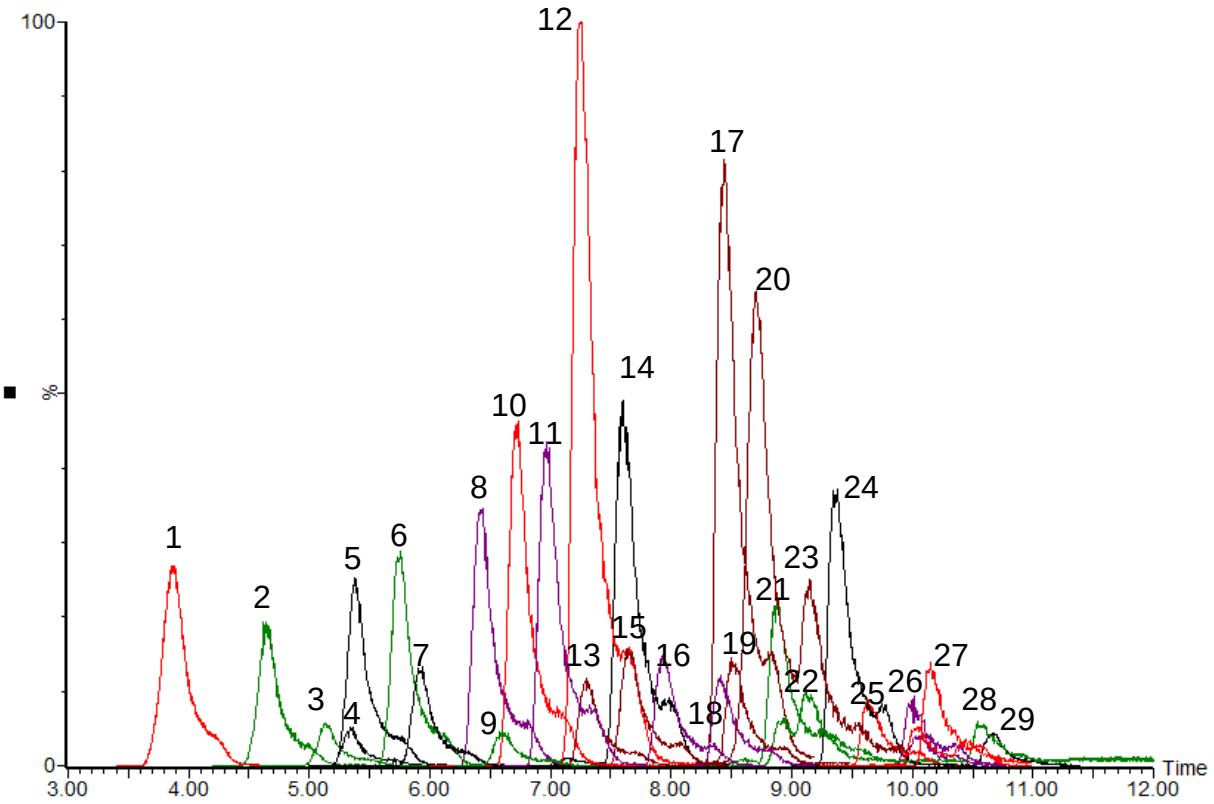
Como apresentado na Tabela 7, foram determinados os íons precursores, os íons de quantificação e os íons de confirmação para análise por ESI^+/ESI^-, bem como os valores de energia de colisão e de voltagem do cone para cada pesticida. Em seguida, com esses parâmetros estabelecidos, foi criado um método de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) para a quantificação dos compostos alvo. Este método é importante em estudos de monitoramento de moléculas alvos por espectrometria de massas, pois possibilita uma maior sensibilidade na quantificação.

4.2.1 Condições instrumentais de análise

Uma vez que a condição cromatográfica (escolha do solvente de eluição) havia sido definida após a otimização com o cromatógrafo a líquido Nexera UC como melhor arranjo de solvente/aditivo para o grupo de analitos, esse parâmetro foi então mantido, sendo realizados novos estudos de separação cromatográfica devido a mudança de equipamento e de fase estacionária (coluna), e com isso, foi construído um novo gradiente de eluição.

Após os testes para otimização das condições cromatográficas, ficaram definidas como condições: coluna analítica ACQUITY CSH Fenil-hexil (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm), fase móvel composta por metanol e água, ambas com formiato de amônio 5 mmol L^{-1}, temperatura do forno da coluna, 40 °C, vazão da fase móvel 0,15 mL min^{-1}, volume de injeção 5 µL. O cromatograma da solução conjunta de pesticidas com os parâmetros otimizados pode ser observado na Figura 6.

Figura 6— Cromatograma obtido no modo de aquisição por monitoramento de reações múltiplas (MRM) de uma solução conjunta de pesticidas com concentração de 10 µg L^{-1} adquirido após a otimização do gradiente de eluição, vazão e volume de injeção no sistema Xevo TQD.



Identificação dos picos no cromatograma: 1- metomil, 2- tiametoxam, 3-clotianidina, 4-dimetoato, 5- imidacloprido, 6- acetamiprido, 7- aldicarbe, 8- tiacloprido, 9- simazina, 10- carbofurano, 11- carbaril, 12- atrazina, 13- pirimicarbe, 14- flutriafol, 15-diurom, 16- ametrina, 17- triadimefom, 18- malationa, 19- alacloro, 20-azoxistrobina, 21- piraclostrobina, 22-bromuconazol, 23- difenoconazol, 24- clorpirifós, 25- teflubenzurom, 26- lufenurom, 27- pendimentalina, 28- cipermetrina, 29-deltametrina.

Para os dois sistemas distintos de equipamentos (Cromatógrafo Nexera UC e Espectrômetro de massas MS-2020; Acquity UPLC com Espectrômetro de massas Xevo TQD), a composição da fase móvel contendo metanol (5 mmol L^{-1} de formiato de amônio) e uma solução aquosa (5 mmol L^{-1} de formiato de amônio), assim como a fonte de ionização ESI, demonstraram ser adequadas para a análise do grupo de pesticidas investigado.

4.3 Procedimento de extração por µMSPD

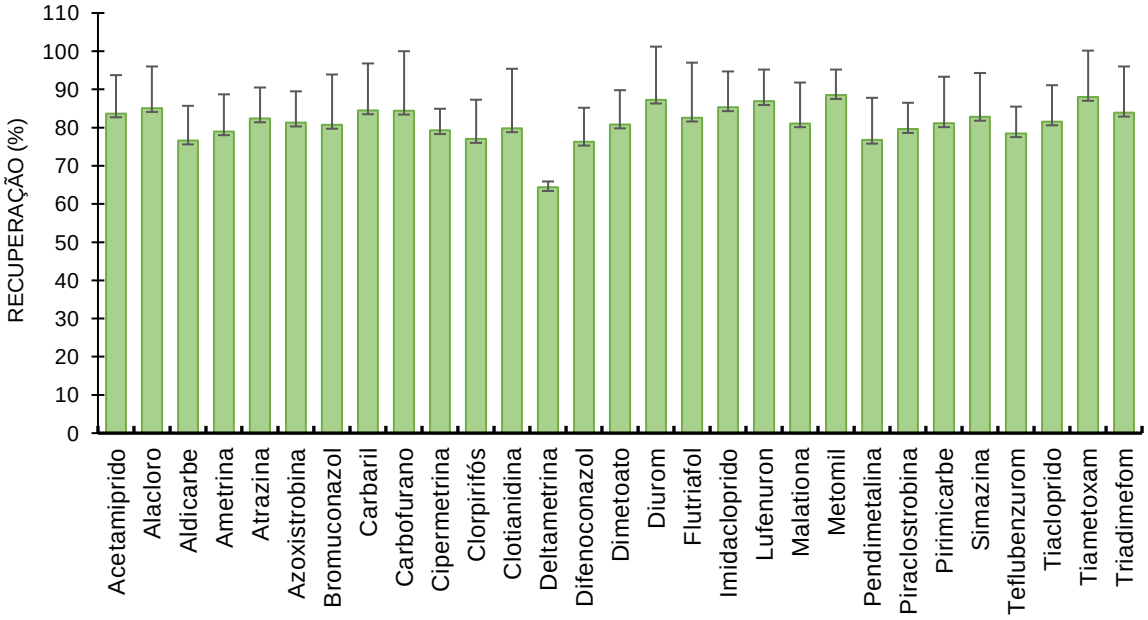
A MSPD foi escolhida por ser uma técnica eficiente, de baixo custo, tempo reduzido de preparo da amostra e simplicidade, o que permite que seja adotada facilmente em qualquer laboratório. Estas características são devido a combinação da ruptura da amostra, extração dos analitos e limpeza do extrato sem a necessidade de equipamentos sofisticados para a sua execução. A eficiência do processo pode ser otimizada com algumas variáveis, incluindo a seleção do tipo apropriado de adsorvente, a proporção entre a massa do adsorvente e a massa da amostra, o tempo de homogeneização, a composição e o volume do solvente extrator [69].

Os ensaios de recuperação foram realizados fortificando-se a matriz com uma alíquota de concentração conhecida da solução padrão dos pesticidas. Foram realizadas as extrações necessárias para obter valores de recuperação percentual entre 70 e 120% e de coeficientes de variação inferior a 20% para os pesticidas estudados [51].

Diante disso, o C18 (octadecilsilano) foi escolhido como adsorvente para os testes iniciais com a MSPD, a fim de extrair seletivamente os 29 pesticidas na matriz goiaba *in natura*. Esse adsorvente possui ampla aplicação em amostras diversas, sobretudo na extração de pesticidas multiclasse em frutas devido as suas propriedades apolares e mecanismo de retenção por partição. As principais forças químicas e físicas que atuam entre as moléculas do analito e este sorvente são as interações de Van der Waals, por meio das ligações carbono-hidrogênio do analito com o grupo funcional da superfície da sílica [70].

Neste teste inicial foi utilizada a proporção matriz/adsorvente (1:1 m/m), 0,5 g da goiaba *in natura*; 0,5 g de C18; 0,5 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), para remoção da água da amostra; e 5 mL de metanol como solvente de eluição. O homogeneizado e o sulfato de sódio anidro foram empacotados em um cartucho vazio de SPE com capacidade de 6 mL. A eficiência do processo de extração por meio de valores de recuperação podem ser vistos na Figura 7.

Figura 7— Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos 29 pesticidas, com um nível de fortificação de 0,5 µg g^{-1}, utilizando 0,5 g de goiaba *in natura*, 0,5 g de C18 e eluição com 5 mL de metanol.



De modo geral, a extração se mostrou eficiente para todos os pesticidas, apresentando valores de recuperação na faixa de 64,4 – 88,5% com valores de desvio padrão entre 1,5 e 15,6%. Como a extração apresentou valores de desvio padrão com alta dispersão, optou-se por realizar um teste de liofilização na amostra, visto que os desvios podem ter sido causados pela grande presença de água na amostra, o que que diminui a interação do adsorvente com os analitos mais adsorvidos dentro da estrutura da matriz, tornando-os menos disponível para a extração [83,84]. Além de isentar a amostra de água, a liofilização representa a isenção de reagentes hidrófilos como o sulfato de sódio anidro do procedimento.

4.4 Avaliação do processo de liofilização para a eficiência de extração por µMPSD

A liofilização é uma técnica utilizada para reduzir a umidade a partir do congelamento e subsequente sublimação da água, utilizando baixas temperaturas de secagem e pressões reduzidas. Além disso, a liofilização é adequada para conservar alimentos perecíveis como a goiaba, o que garante a preservação as propriedades

químicas e sensoriais da amostra. Visto que, mudanças na bioquímica dessa, podem prejudicar a análise laboratorial [71].

Para avaliar a influencia da liofilização no desenvolvimento do método deste trabalho foram realizados dois testes comparativos. O primeiro teste consistiu em observar a perda mássica de água na amostra de goiaba após liofilização, que poderia sugerir a massa de trabalho a ser utilizada. O segundo teste foi realizado para verificar a possibilidade de perda de analitos pela durante o processo de liofilização.

De acordo com os resultados do procedimento descrito no subitem 3.6, foi observado no processo de liofilização que a composição da massa residual medida em triplicata foi a mesma para todas, o que correspondeu a uma perda de massa de cerca de 83,0 ± 0,22%, que corresponde a umidade da amostra. Portanto, aproximadamente 17,0% da goiaba foi recuperada das análises em triplicata da massa de 10 gramas da amostra. Sendo assim, foi realizado um cálculo (Equação 1) para determinar a massa de goiaba liofilizada correspondende a 0,5 grama da goiaba *in natura*, e assim foi obtido o valor de 0,085 grama da amostra liofilizada para os ensaios seguintes.

$$(\text{Massa da amostra liofilizada}) = \frac{0{,}5 * 17}{100} = 0{,}085\ \text{g} \quad \text{(Equação 1)}$$

Diante do exposto, a liofilização foi uma ação estabelecida para conservar as propriedades químicas da goiaba, minimizar a geração de resíduos, visto que elimina o uso do Na_2SO_4, reduz a massa de amostra necessária no procedimento e, por consequência do adsorvente, haja visto que a amostra desidratada requer menos adsorvente para se obter um pó seco e homogêneo após a maceração.

4.4.1 Avaliação da extração na goiaba in natura e liofilizada

De início, um estudo de interação dos analitos com a matriz foi feito para avaliar a possibilidade de perda dos analitos com a liofilização. Os testes de recuperação (n=3) seguiram a sequência: (1) medir a massa em vidro de relógio (2) fortificar uma alíquota

da amostra no nível de 0,5 µg g^{-1} (3) avaliar a recuperação dos pesticidas, considerando: A) amostra de goiaba *in natura* [(0,5 g) + 0,5 g de C18] e (B) amostra de goiaba liofilizada [(0,085 g) + 0,085 g de C18], utilizando 5 mL de metanol em ambas as extrações. As médias das recuperações e desvios padrões estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8— Eficiência de recuperação (%) (n=3) dos pesticidas nas amostras de goiaba *in natura* e liofilizada e os seus respectivos desvios padrões relativos (DPR).

Analito	Extração			
	A) Amostra *in natura* (0,5 g)		B) Amostra liofilizada (0,085 g)	
	Recuperação (%)	DPR (%)	Recuperação (%)	DPR (%)
Acetamiprido	83,7	10,04	99,0	3,0
Alacloro	85,1	10,9	99,1	1,4
Aldicarbe	76,6	9,1	87,9	2,6
Ametrina	79,0	9,7	94,2	1,5
Atrazina	82,4	8,1	98,0	3,0
Azoxistrobina	81,3	8,2	98,7	0,5
Bromuconazol	80,7	13,2	100,6	1,2
Carbaril	84,5	12,3	97,7	2,0
Carbofurano	84,4	15,6	99,7	1,3
Cipermetrina	79,3	5,63	95,7	3,9
Clorpirifós	77,0	10,3	95,9	2,7
Clotianidina	79,8	15,6	100,7	2,9
Deltametrina	64,4	1,5	91,9	7,9
Difenoconazol	76,3	8,9	99,0	0,8
Dimetoato	80,8	9,0	96,4	0,5
Diurom	87,3	13,9	95,1	2,7
Flutriafol	82,6	14,4	98,7	0,6
Imidacloprido	85,3	9,4	98,3	1,9
Lufenuron	86,9	8,3	98,8	0,4
Malationa	81,1	10,7	98,9	0,7
Metomil	88,5	6,7	94,5	1,0
Pendimetalina	76,8	11,0	90,2	2,4
Piraclostrobina	79,6	6,9	96,0	0,7
Pirimicarbe	81,1	12,2	96,3	2,0
Simazina	82,8	11,5	97,9	2,0
Teflubenzurom	78,5	7,0	94,1	3,7
Tiacloprido	81,6	9,5	95,7	2,2
Tiametoxam	88,0	12,0	98,1	1,8
Triadimefom	83,9	12,1	99,2	0,3

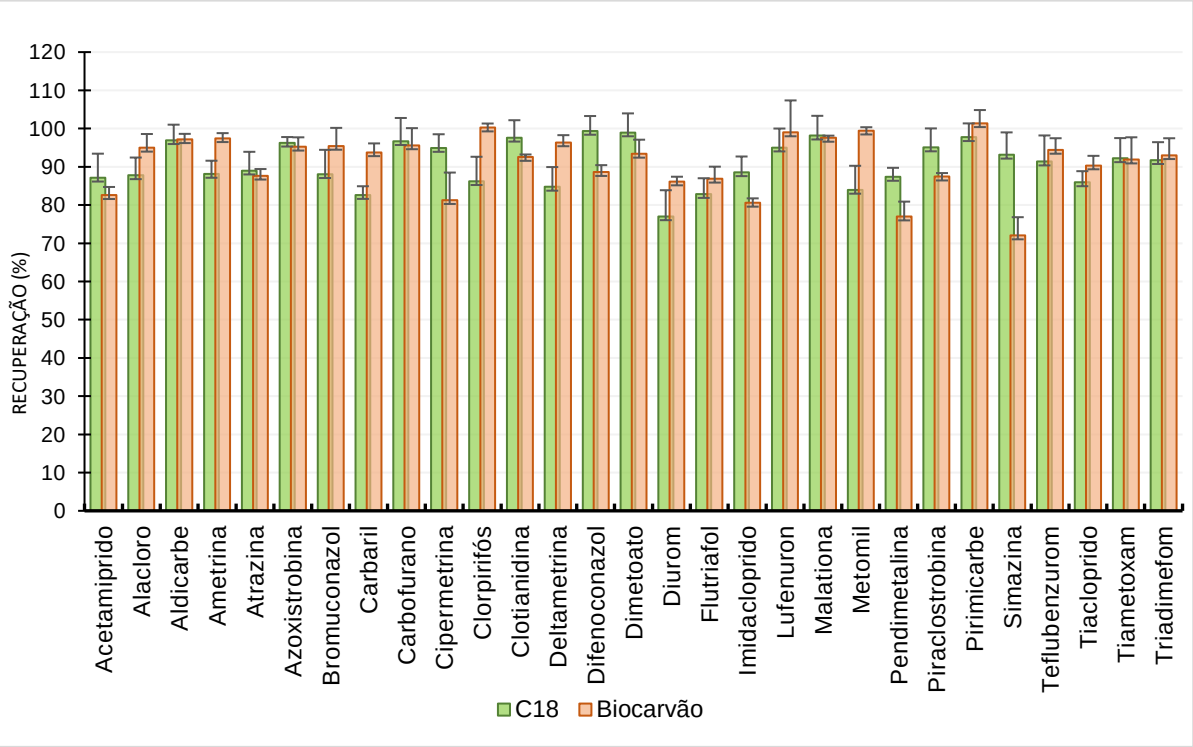
Ao observar os resultados apresentados na Tabela 8, foi possível perceber que para a goiaba liofilizada foram obtidos maiores valores de recuperação (de 87,9 –

100,7 %) com valores de desvio padrão inferiores a 8% para todos os pesticidas. Sugere-se que como os analitos e provavelmente muitos compostos coextraídos sejam polares nesta matriz com alto contéudo de água, o uso do C18 acaba não obtendo a mesma eficiência que na amostra de goiaba desidratada, já que esse adsorvente é hidrófóbico [72]. Sendo assim, o procedimento de extração utilizando a goiaba liofilizada é consideravelmente mais adequado pois fornece resultados com melhor repetitividade e reprodutibilidade, e por isso foi incorporado ao método como uma etapa de pré-tratamento da amostra.

4.5 Avaliação do biocarvão de aguapé como sorvente na µMSPD

O biocarvão de aguapé, *Eichhornia crassipes*, foi avaliado como adsorvente alternativo para a extração de 29 pesticidas em goiaba. O teste foi realizado mantendo-se a proporção matriz/adsorvente (1:1 m/m), 0,085 g da amostra liofilizada, 0,085 g do biocarvão e fortificação da amostra de 0,5 µg g^{-1}. O tempo de maceração foi de 3 minutos, e 5 mL de metanol como solvente de eluição. Os valores de recuperação em comparação aos resultados obtidos com C18 sob as mesmas condições experimentais estão apresentados na Figura 8.

Figura 8— Eficiência na recuperação (%) (n=3) dos resíduos de pesticidas com o uso do biocarvão em comparação com o C18 como material adsorvente na μMSPD, considerando o nível de fortificação de 0,5 μg g^{-1}.



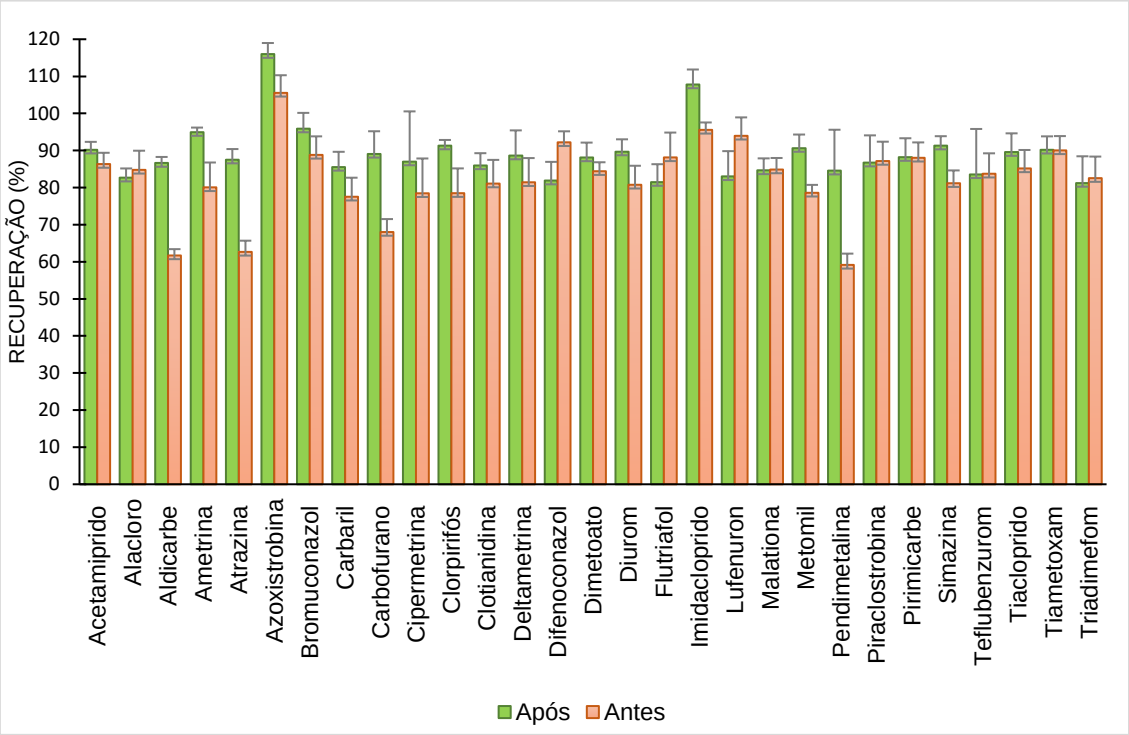
Observando o gráfico da Figura 8, verifica-se que as recuperações variaram entre 72 e 101% com desvios padrões de 1,2 a 9,5%. Sendo assim, o biocarvão mostrou-se eficiente para ser utilizado como adsorvente para a finalidade do trabalho, uma vez que possibilitou recuperações superiores a 70% e baixos valores de dispersão. Além disso, o biocarvão de aguapé é uma froma de tornar o procedimento mais ambientalmente amigável e sustentável, visto que é produzido a partir de uma biomassa alternativa [73–75].

4.5.1 Avaliação da perda de pesticidas durante a liofilização

Em teoria, a desidratação da amostra por liofilização não ocasiona uma redução significativa dos resíduos de pesticidas nas amostras, tendo em vista que as condições de baixa temperatura e baixo volume de oxigênio contribuem para minimizar a degradação dos pesticidas [79]. No entanto, com o intuito de simular a extração dos pesticidas de uma amostra comercial de goiaba, foi realizada a fortificação da amostra antes do procedimento de liofilização.

Na Figura 9 está apresentado um gráfico comparativo dos resultados obtidos, entre fortificar a amostra antes de realizar o procedimento de liofilização e fortificando a amostra após ser liofilizada. Com isso, foi possível notar que fortificando a amostra antes de ser realizado o procedimento de liofilização, as recuperações ficaram na faixa de 59—106% e desvios padrões relativos inferiores a 9%, sendo que 25 dos pesticidas apresentaram recuperações acima de 70%.

Figura 9— Estudo de recuperação dos pesticidas comparando a amostra de goiaba fortificada antes e após o processo de liofilização, utilizando biocarvão como adsorvente de extração.



A fortificação da amostra, antes de realizar a liofilização, foi incorporada ao procedimento. Considerando que, para quatro pesticidas houve uma redução significativa nos valores de recuperação, quando comparada com a fortificação após a liofilização, sendo eles: aldicarbe (62 ± 2%), atrazina (63 ± 3%), carbofurano (68 ± 6%) e pendimentalina (59 ± 3%). A redução na recuperação dos pesticidas, após passar pelo processo de liofilização, pode estar relacionado com a volatilidade dos pesticidas na amostra seca [79,80,86].

Por fim, as melhores condições para a extração dos 29 pesticidas em goiaba foram: 0,085 g de goiaba liofilizada, 0,085 g de biocarvão de aguapé como agente dispersante, maceração continua por 3 minutos, tranferência completa da amostra

homogeneizada para cartucho SPE (modelo de 4 mL), eluição com 5 mL de metanol em sistema de vácuo, retirada de alíquota para análise por cromatografia líquida e espectrometria de massas.

4.6 Validação de método

Os parâmetros adotados para o ensaio de validação do método analítico para os 29 pesticidas em goiaba foram: linearidade, sensibilidade, efeito matriz, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação, de acordo com os protocolos estabelecidos pela SANTE [55] e ANVISA [56].

4.6.1 Linearidade e sensibilidade

Por se tratar de um método quantitativo é preciso que se conheça a dependência entre a resposta medida no equipamento e a concentração conhecida dos analitos. A linearidade é obtida por meio de uma equação da reta geralmente “y = ax + b” e pela avaliação do seu coeficiente de determinação (r^2) ou correlação (r) [56].

Para obtenção das curvas analíticas foi preparada uma solução padrão conjunta dos pesticidas em metanol, a uma concentração de 1000 µg L^{-1}, a partir dela foram preparadas soluções trabalho para compor a curva, nas concentrações: 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; µg L^{-1}. As análises foram feitas em triplicata (n=3), após a aquisição dos dados as curvas foram construídas a partir da relação entre concentração e área do íon de quantificação de cada pesticida. A Tabela 9 demonstra as equações da reta e os coeficientes de determinação (r^2) obtidos a partir das curvas analíticas de cada pesticida estudado por LC-MS/MS.

Tabela 9— Intervalo de concentração, equação da reta e coeficiente de determinação para curva de calibração em metanol para os pesticidas.

Pesticidas	Intervalo de Concentração	Solvente		Pesticidas	Intervalo de Concentração	Solvente	
	(µg L^{-1})	Equação da reta	r^2		(µg L^{-1})	Equação da reta	r^2
Acetamiprido	0,25-100	y= 14423012x + 6233143	0,9998	Diurom	0,25-100	y= 8666304x + 3848838	0,9998
Alacloro	0,25-100	y= 28802269x + 3338147	0,9999	Flutriafol	0,5- 100	y= 24146897x + 23087852	0,9988
Aldicarbe	0,25-100	y= 6712077x + 5753617	0,9983	Imidacloprido	0,25-100	y= 2264836x + 1816616	0,9992
Ametrina	0,25-100	y= 8445738x + 1129498	0,9999	Lufenuron	0,5- 100	y= 823409x + 753891	0,9995
Atrazina	0,25-100	y= 6317726x + 2763005	0,9998	Malationa	0,25-100	y= 7799051x + 1799951	0,9999
Azoxistrobina	0,25-100	y= 40072399x + 40072399	0,9994	Metomil	0,25-100	y= 7799051x + 6938009	0,9998
Bromuconazol	0,25-100	y= 6934575x+ 9636629	0,9996	Pendimetalina	0,25-100	y= 6701322x -785582	0,9995
Carbaril	0,25-100	y= 22657180x + 10540533	0,9996	Piraclostrobina	0,25-100	y= 15870104x + 2724946	0,9995
Carbofurano	0,25-100	y= 23486969x + 10428641	0,9997	Pirimicarbe	0,25-100	y= 54358545x + 18083967	0,9998
Cipermetrina	0,25-100	y= 2141560x + 14186153	0,9975	Simazina	0,5- 100	y= 2505106x + 500582	0,9999
Clorpirifós	0,5- 100	y= 1899247x + 3433	0,9998	Teflubenzurom	0,25-100	y= 4331557x + 6866709	0,9996
Clotianidina	0,25-100	y= 2735286x + 1675015	0,9995	Tiacloprido	0,25-100	y= 17596970x + 11318885	0,9996
Deltametrina	0,25-100	y= 184199x + 1383259	0,9999	Tiametoxam	0,25-100	y= 9494466x + 6198641	0,9991
Difenoconazol	0,25-100	y= 4907365x + 3747203	0,9994	Triadimefom	0,25-100	y= 5957556x - 414435	0,9997
Dimetoato	0,25-100	y= 12693598x + 3425626	0,9999				

Como é notado, elevados valores de coeficiente de determinação (>0,99) indicam uma alta correlação linear entre a concentração dos alcaloides e as respostas cromatográficas para o intervalo em que foi proposto para o método; estando de acordo com a recomendação dada por órgãos de regulamentação de métodos analíticos tais como ANVISA e INMETRO. A partir das equações das retas foi possível inferir também a respeito da sensibilidade analítica do método de análise tomando como parâmetro os coeficientes angulares, que indica o quão sensível o método é capaz de distinguir com fidelidade concentrações muito próximas, onde quanto maior a inclinação da reta maior a sensibilidade. Desta maneira, nota-se que o pesticida que apresenta uma maior sensibilidade de resposta com a variação de concentração foi a azoxistrobina, enquanto a deltametrina apresentou-se como o composto com menor sensibilidade [56, 76].

4.6.2 Efeito Matriz

O efeito matriz é o efeito dos componentes da matriz na resposta analítica. Este parâmetro está diretamente relacionado com a seletividade do método analítico, demonstrada por meio da capacidade do método de identificar ou quantificar o analito, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes no extrato da amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz [56].

O efeito matriz pode ser avaliado por meio da razão entre os coeficientes angulares (RCA) das equações das retas obtidas a partir das curvas de calibração para os analitos preparados no extrato da matriz e em solvente puro. Portanto, foram construídas curvas analíticas: uma a partir da diluição da solução padrão em metanol e outra pela diluição em extrato da amostra após o processo de extração por µMSPD. Todos os pontos na curva do extrato da matriz foram realizados a partir da diluição de 50 µL de solução padrão em 950 µL do extrato. O estudo foi feito desta forma a fim de evitar a diluição excessiva do extrato da matriz. A Tabela 10 apresenta as equações das retas dos pesticidas preparadas na concentração de 0,25 a 100 µg L^{-1}.

Tabela 10— Intervalos de concentração, equações da reta, coeficientes de determinação e razão dos coeficientes angulares para os pesticidas.

Pesticidas	Intervalo de Concentração (µg L^{-1})	Solvente		Extrato		
		Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2	RCA
Acetamiprido	0,25-100	y = 14423012x + 6233143	0,9998	y = 5959314x + 8437743	0,9994	0,4132
Alacloro	0,25-100	y = 28802269x + 3338147	0,9999	y = 18389615x + 5616111	0,9993	0,6382
Aldicarbe	0,25-100	y = 6712077x + 5753617	0,9983	y = 766942x + 512136	0,9992	0,1147
Ametrina	0,25-100	y = 8445738 x + 1129498	0,9999	y = 6755377x + 7781635	0,9989	0,7997
Atrazina	0,25-100	y = 6317726x + 2763005	0,9998	y = 3302683x + 54622112	0,9984	0,5228
Azoxistrobina	0,25-100	y = 40072399 x + 40072399	0,9994	y = 15920606x + 55101531	0,9937	0,3973
Bromuconazol	0,25-100	y = 6934575x+ 9636629	0,9996	y = 6891422x + 9636629	0,9998	0,3973
Carbaril	0,25-100	y = 22657180x + 10540533	0,9996	y = 11703713x + 20380270	0,9966	0,5161
Carbofurano	0,25-100	y = 23486969x + 10428641	0,9997	y = 7770263x + 154704796	0,9956	0,3308
Cipermetrina	0,25-100	y = 2141560 x + 14186153	0,9975	y = 930655x + 8199613	0,9926	0,4345
Clorpirifós	0,5-100	y = 1899247x + 3433	0,9998	y = 1602648x + 6519739	0,9993	0,8456
Clotianidina	0,25-100	y = 2735286x + 1675015	0,9995	y = 1014279x + 959175	0,9982	0,3708
Deltametrina	0,25-100	y = 184199x + 1383259	0,9999	y = 868405x + 3154272	0,9997	0,4002
Difenoconazol	0,25-100	y = 4907365x + 3747203	0,9994	y = 2151702x + 3055689	0,9997	0,4398
Dimetoato	0,25-100	y = 12693598x + 3425626	0,9999	y = 7282822x + 723370	0,9981	0,5733
Diurom	0,25-100	y = 8666304x + 3848838	0,9998	y = 5247216x + 8841154	0,9979	0,6050
Flutriafol	0,5-100	y = 24146897x + 23087852	0,9988	y = 8733803x + 15544201	0,9992	0,3611
Imidacloprido	0,25-100	y = 2264836 x + 1816616	0,9992	y = 1384073x + 16462108,31	0,9975	0,6101
Lufenuron	0,5-100	y = 823409x + 753891	0,9995	y = 813836x + 1717511	0,9973	0,9883

Tabela 10— Continuação.

Pesticidas	Intervalo de Concentração (µg L^{-1})	Solvente		Extrato		
		Equação da reta	r^2	Equação da reta	r^2	RCA
Malationa	0,25-100	y = 7799051x + 1799951	0,9999	y = 6755377x + 7781635,138	0,9989	0,8662
Metomil	0,25-100	y = 7799051x + 6938009	0,9998	y = 6985473x + 17882914	0,9979	0,4329
Pendimetalina	0,25-100	y = 6701322x -785582	0,9995	y = 3575072x + 94395655	0,9907	0,5330
Piraclostrobina	0,25-100	y = 15870104x + 2724946	0,9995	y = 16185121x + 22558913	0,9981	0,7652
Pirimicarbe	0,25-100	y = 54358545x + 18083967	0,9998	y = 33902326x + 42138778	0,9912	0,6233
Simazina	0,5-100	Y = 2505106x + 500582	0,9999	y = 1126427x + 1168419	0,9977	0,4496
Teflubenzurom	0,25-100	y = 4331557x + 6866709	0,9996	y = 3351842x + 8000796	0,9971	0,7738
Tiacloprido	0,25-100	Y = 17596970x + 11318885	0,9996	y = 9312293x + 10122392	0,9991	0,5286
Tiametoxam	0,25-100	y = 9494466x + 6198641	0,9991	y = 5137642x + 6949269	0,9973	0,5403
Triadimefom	0,5-100	y = 5957556x - 414435	0,9997	y = 2261715x + 2284834	0,9991	0,3796

O efeito de matriz nulo ocorre quando os gráficos de calibração construídos em solvente e em matriz possuem a mesma inclinação. A supressão do sinal entre a faixa de 0-20% (RCA 1 ± 0,20) é considerada efeito matriz irrelevante, entre 20 e 50% (RCA 1 ± 0,20-0,50) de baixa supressão de sinal e acima de 50% (RCA 1 ± 0,50) uma supressão significativa do sinal [77,78]. Baseado nisso, as curvas analíticas, apresentadas na Tabela 10, mostraram que o efeito matriz foi significativo para 13 pesticidas analisados. Enquanto que para 16 analitos o efeito matriz foi inferior a 50% representando uma baixa influencia na supressão de sinal. Sendo assim, com a finalidade de minimizar o efeito matriz, os ensaios de quantificação foram realizados a partir de soluções dos pesticidas preparadas com o extrato da matriz [77].

4.6.3 Exatidão e precisão

Com o intuito de assegurar a eficiência do método de extração em diferentes níveis de concentração analítica, foram avaliados os parâmetros de exatidão e precisão. A exatidão do método foi avaliada a partir de ensaios de recuperação da amostra de goiaba em três níveis de concentração (0,01, 0,05 e 0,1 μg g^{-1}) para cada pesticida e em quintuplicata para cada nível. A precisão foi avaliada a partir de ensaios de repetibilidade, em que foi utilizado o mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, usando o mesmo equipamento com análises realizadas no mesmo dia (intradia) e em três dias diferentes (interdia), partindo do critério de aceitabilidade de que o valor do desvio padrão relativo seja inferior a 20% [55,56].

As concentrações de 0,01; 0,05 e 0,1 μg g^{-1} foram adotadas para o procedimento de validação do método, com o intuito de assegurar a exatidão e precisão com valores aceitos (70-120%; RSD < 20% respectivamente) pelas diretrizes utilizadas como referência, além disso são concentrações que se encontram dentro da faixa utilizada para a construção da curva de calibração como sugerido pela Anvisa [56]. A Tabela 11 apresenta os valores de exatidão e de precisão encontrados para amostra de goiaba.

Tabela 11— Valores de Recuperação (%) médio avaliados para ensaio de exatidão e precisão realizados para validação.

Pesticida	Recuperação média (DPR) (%)					
	Fortificação nos níveis em (μg g^{-1})					
	Intradia (n=5)			Interdia (n=15)		
	0,01	0,05	0,1	0,01	0,05	0,1
Acetamiprido	89 (3)	91 (3)	86 (3)	92 (5)	89 (2)	93 (4)
Alacloro	96 (5)	87 (5)	85 (5)	90 (6)	85 (5)	83 (5)
Aldicarbe	50 (4)	54 (12)	62 (2)	62 (7)	59 (4)	63 (5)
Ametrina	76 (7)	95 (1)	80 (7)	93 (11)	85 (8)	88 (7)
Atrazina	48 (6)	67 (2)	63 (3)	52 (11)	65 (2)	64 (10)
Azoxistrobina	93 (5)	98 (2)	105 (5)	97 (5)	97 (3)	98 (6)
Bromuconazol	102 (7)	86 (5)	89 (5)	90 (11)	93 (5)	89 (11)
Carbaril	79 (3)	88 (2)	78 (5)	82 (6)	87 (3)	85 (7)
Carbofurano	71 (3)	70 (2)	71 (4)	72 (10)	70 (3)	76 (9)
Cipermetrina	96 (4)	106 (7)	78 (9)	96 (6)	99 (11)	96 (15)
Clorpirifós	97 (9)	82 (3)	78 (7)	89 (7)	80 (7)	79 (10)
Clotianidina	85 (5)	88 (5)	81 (6)	85 (6)	90 (4)	90 (6)
Deltametrina	108 (8)	109 (5)	81 (6)	88 (14)	95 (9)	98 (13)
Difenoconazol	97 (7)	97 (2)	92 (3)	99 (7)	97 (6)	92 (5)
Dimetoato	86 (1)	89 (1)	84 (2)	89 (3)	89 (2)	92 (7)
Diurom	91 (3)	92 (2)	81 (5)	87 (5)	88 (5)	84 (4)
Flutriafol	81 (2)	91 (5)	88 (7)	83 (5)	92 (3)	88 (7)
Imidacloprido	95 (7)	116 (3)	96 (2)	111 (13)	114 (9)	94 (9)
Lufenuron	94 (3)	93 (8)	94 (5)	93 (6)	89 (5)	93 (8)
Malationa	97 (4)	85 (3)	85 (3)	94 (4)	85 (3)	84 (8)
Metomil	70 (5)	77 (3)	79 (2)	70 (4)	78 (2)	81 (6)
Pendimetalina	38 (5)	56 (4)	59 (3)	45 (8)	53 (3)	61 (11)
Piraclostrobina	93 (4)	96 (2)	87 (5)	95 (12)	95 (3)	91 (7)
Pirimicarbe	93 (5)	100 (3)	88 (4)	89 (5)	97 (4)	95 (5)
Simazina	92 (3)	86 (4)	81 (3)	88 (3)	89 (3)	88 (5)
Teflubenzurom	91 (3)	88 (7)	84 (6)	90 (16)	92 (5)	90 (7)
Tiacloprido	87 (3)	89 (2)	85 (5)	88 (5)	89 (5)	89 (5)
Tiametoxam	89 (4)	91 (3)	90 (4)	92 (4)	92 (3)	92 (3)
Triadimefom	96 (4)	87 (4)	83 (6)	94 (8)	91 (5)	91 (5)

A Tabela 11 exibe os valores encontrados para os testes de exatidão e precisão intermediária em amostras de goiaba. Os valores de recuperação e coeficientes de variação indicam que o método proposto apresenta ótima exatidão e precisão intermediária para os níveis de concentração avaliados, tendo em vista que os resultados se encontram dentro do faixa de 70-120% e

inferiores a 20% respectivamente, para 25 pesticidas, conforme proposto pela SANTE [55].

4.6.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram definidos a partir dos resultados obtidos pelos ensaios de linearidade e efeito matriz. Considerando o efeito provocado pela matriz no processo de ionização dos analitos, tomou-se como parâmetro a faixa linear de trabalho proveniente das curvas analíticas construídas pelos extratos de goiaba fortificados. Também, considerando a natureza sólida da amostra, os resultados são apresentados (Tabela 12) a partir da relação massa/massa (analito/amostra), ou seja, µg g^{-1}.

Neste trabalho os valores de LD e LQ foram calculados com base nas Equações 2 e 3, a qual pode utilizar os parâmetros da curva analítica e/ou ensaio de recuperação

$$\text{LD} = 3{,}3 * \frac{s}{S} \quad \text{(Equação 2)} \qquad\qquad LQ = 10 * \frac{s}{S} \quad \text{(Equação 3)}$$

Em que s representa a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e o S representa o coeficiente angular da curva analítica [53, 55].

Tabela 12— Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método; limite máximo de resíduo (LMR).

Pesticida	Limite de Detecção ($\mu g\ g^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu g\ g^{-1}$)	LMR ($\mu g\ g^{-1}$)
Acetamiprido	0,001	0,004	0,010 ;1,00*
Alacloro	0,001	0,004	0,010
Aldicarbe	0,001	0,004	0,020
Ametrina	0,002	0,005	-
Atrazina	0,003	0,009	0,050
Azoxistrobina	0,002	0,007	0,200 ; 0,200*
Bromuconazol	0,001	0,010	0,010 ; 0,050*
Carbaril	0,003	0,009	0,010
Carbofurano	0,001	0,003	0,010
Cipermetrina	0,002	0,005	0,050
Clorpirifós	0,003	0,010	0,010
Clotianidina	0,002	0,006	0,010
Deltametrina	0,001	0,003	0,010 ; 0,080*
Difenoconazol	0,001	0,003	0,100
Dimetoato	0,002	0,007	0,010 ; 0,600*
Diurom	0,002	0,007	0,010
Flutriafol	0,001	0,005	0,010
Imidacloprido	0,003	0,008	0,010 ; 0,100*
Lufenuron	0,003	0,009	0,010 ; 0,700*
Malationa	0,002	0,005	0,020
Metomil	0,001	0,002	0,010
Pendimetalina	0,009	0,028	0,050
Piraclostrobina	0,002	0,007	0,020
Pirimicarbe	0,005	0,010	0,010
Simazina	0,003	0,008	0,010
Teflubenzurom	0,004	0,012	0,010
Tiacloprido	0,002	0,005	0,010
Tiametoxam	0,003	0,008	0,010
Triadimefom	0,002	0,006	0,010

Fonte: [40*,81].

Os valores de limites atribuídos ao método (LD e LQ) são satisfatórios, uma vez que o instrumento apresenta a capacidade de detectar (0,001 – 0,009 $\mu g\ g^{-1}$) e quantificar (0,002– 0,028 $\mu g\ g^{-1}$) em baixas concentrações para todos os analitos. Além disso, em consulta aos materiais legais sobre resíduos de pesticidas em goiaba foram encontrados limites máximos de resíduos (LMR's) para quase todos os pesticidas em estudo [40,81]. Com isso, ao comparar os valores de LD e LQ obtidos no método com os LMR's existentes, estes resultados são considerados adequados, visto que se encontram igual ou abaixo do que é previsto pelos protocolos dos órgãos oficiais.

4.7 Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de pesticidas em goiaba

Para destacar a qualidade do método proposto, alguns parâmetros analíticos foram comparados a outros métodos publicados para determinação de pesticidas em goiaba. A Tabela 13 descreve os parâmetros comparados entre os métodos.

Tabela 13— Comparação do método proposto com outros métodos analíticos para determinação de pesticidas em goiaba.

Ref.	Amostra	Método Analítico	Solvente	LD ($\mu g\ g^{-1}$)	LQ ($\mu g\ g^{-1}$)	Recuperação (%)
Este trabalho	Goiaba (0,085 g)	µMSPD/ LC-MS/MS	Metanol (5 mL)	0.001-0.009	0.002-0.028	48 – 116
[22]	Goiaba (0,5 g)	MSPD/ GC-NPD	10 mL acetato de etila/acetona (80:20 v/v)	0.197 0.172	n.a	97 93
[23]	Goiaba (0,5 g)	MSPD/ LC-UV	10 mL de diclorometano	0.100	0.334	90
[26]	Goiaba (10 g)	QuEChERS/ GC-MS	10 mL de acetonitrila	0.002-0.010	0.005-0.030	75 – 110
[20]	Goiaba (15 g)	QuEChERS/ GC–MS/MS	15 mL de acetonitrila	n.a	n.a	86 – 99

n.a= não avaliado.

5. CONCLUSÃO

O método de preparo de amostras associado com a técnica de cromatografia líquida/espectrometria de massas apresentou resultados excelentes para a determinação de pesticidas (acetamiprido, alacloro, aldicarbe, ametrina, atrazina, azoxistrobina, bromuconazol, carbaril, carbofurano, cipermetrina, clorpirifós, clotianidina, deltametrina, difenoconazol, dimetoato, diurom, flutriafol, imidacloprido, lufenurom, malationa, metomil, pendimetalina, piraclostrobina, pirimicarbe, simazina, teflubenzurom, tiacloprido, tiametoxam e triadmefom) em goiaba.

A aplicação do biocarvão de Aguapé para a técnica MSPD apresentou ótimo desempenho comprovando a sua potencialidade para ser utilizado como material adsorvente para a determinação dos pesticidas estudados, uma vez que apresentou valores de recuperação entre 59 e 106%, e RSD ≤ 9%. Desse modo, o método que utilizou apenas 0,085 g de biocarvão, 0,085 g de goiaba liofilizada, 5 mL de metanol como solvente de eluição e tempo de maceração de 3 minutos mostrou-se eficiente para a determinação de 29 pesticidas de diferentes classes químicas em goiaba.

O método de extração desenvolvido foi submetido ao processo de validação, no qual foram obtidos valores bastante adequados para os parâmetros estudados, quais sejam: linearidade (r^2 >0,99), seletividade (efeito matriz variando de 1,2 – 88%), exatidão (entre 48 – 116 %, RSD ≤ 16%), precisão (repetibilidade RSD ≤ 12% e precisão intermediária RSD ≤ 16%), limite de detecção (LD entre 0,001 – 0,009 μg g^{-1}) e limite de quantificação (LQ entre 0,002– 0,028 μg g^{-1}), atestando a confiabilidade nos resultados obtidos com a aplicação do método desenvolvido.

6. PERSPECTIVAS DO TRABALHO

- Aplicar o método desenvolvido em amostras comercias de goiaba do estado de Sergipe, uma vez que não foi possível realizar devido a problemas técnicos.

7. REFERÊNCIAS

[1] Quais são as frutas mais produzidas no Brasil? **ABRAFRUTAS** (2023). Disponível em: <https://abrafrutas.org/2023/04/quais-sao-as-frutas-mais-produzidas-no-brasil/>. Acesso em: 15 dez. 2023.

[2] Tamanho do mercado de frutas e vegetais do Brasil e análise de participação – Tendências e previsões de crescimento (2023 – 2028). **MORDORINTELLIGENCE**, ano 2023. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/fruits-and-vegetables-industry-in-brazil-industry>. Acesso em: 15 dez. 2023.

[3] FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. **Fruticultura fundamentos e práticas. Pelotas**: UFPEL, 2008. 123p

[4] VITTI, K. A.; LIMA, L. M.; MARTINES FILHO, J. G. Agricultural and economic characterization of guava production in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 42, n. 1, 2020.

[5] OLIVEIRA DA SILVA, F. et al. **A biodiversidade que gera frutos no semiárido: o caso da goiabeira**. 2019. Editora UFS: Universidade Federal de Sergipe.

[6] IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Pesquisa da Pecuária Municipal** (2019). Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e ermanentes.html?=&t=sobre>. Acesso em: 15 dez. 2023.

[7] MOREIRA, F. R. B.; LIMA, M. F. (Ed.). **A cultura da goiaba**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. 180 p. (Coleção plantar, 66). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/128279/1/PLANTAR-Goiaba-ed02-2010.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2021.

[8] MANDAL, S. et al. Validation of a modified QuEChERS method to determine multiclass multipesticide residues in apple, banana and guava using GC–MS and LC–MS/MS and its application in real sample analysis. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 1-14, 2020.

[9] GALLI, J. A.; TIVELLI, S. N**. Como produzir goiaba orgânica?** Rio de Janeiro. Sociedade Nacional de Agricultura, 2017. Série capacitação técnica. Disponível em: <https://ciorganicos.com.br/wp-content/uploads/2017/10/Como-Produzir-Goiaba-Org%C3%A2nica.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2023.

[10] SHARMA, N.; SINGHVI, R. Effects of chemical fertilizers and pesticides on human health and environment: a review**. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 675-679, 2017.

[11] BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 4-5, p. 182-187, 2000.

[12] FROTA, E. B.; VASCONCELOS, N. M. S. **Química Ambiental**. 2ª edição. Fortaleza. Editora da Universidade Federal do Ceará (EduECE), 2019.

[13] PAJOLLA, Murilo. Senado aprova PL do Veneno com apenas um voto contrário. **Brasil de Fato**, 28 nov. 2023. Disponível em: <https://www.brasildefato.com.br/2023/11/28/pl-do-veneno-e-aprovado-no-plenario-do-senado-com-apenas-um-voto-contrario >. Acesso em: 22 de dez. 2023.

[14] Número de agrotóxicos registrados em 2020 é o mais alto da série histórica; maioria é genérico, diz governo. **Portal G1 de notícias**, **2021**. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2021/01/14/numero-de-agrotoxicos-registrados-em-2020-e-o-mais-alto-da-serie-historica-maioria-e-produto-generico.ghtml>**.** Acesso em: 03 de jul. 202.

[15] MILANI, M.; DE OLIVEIRA, D. S.; MORALES, E. M. Resíduos de agrotóxicos em alimentos no brasil. **Interciência & Sociedade**, v. 5, n. 1, 2020.

[16] ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. **Agrotóxicos em alimentos**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agroto- xicos/agrotoxicos-em-alimentos>. Acesso em: 02 jul. 2023.

[17] KRUVE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015.

[18] CALDAS, S. S. et al. Avanços recentes da MSPD para extração de resíduos de agrotóxicos, PPCPs, compostos inorgânicos e organometálicos. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 3, p. 190-213, 2013.

[19] TU, X.; CHEN, W. Uma revisão sobre o progresso recente na dispersão da fase sólida da matriz. **Molecules**, v. 23, n. 11, pág. 2767, 2018.

[20] WANWIMOLRUK, C.; PHOPIN, K.; WANWIMOLRUK, S. Food safety in Thailand 6: How to eat guava fruits safely? Effects of washing and peeling on removing pesticide residues in guava fruits. **Journal of Food Safety**, v. 39, n. 4, p. e12654, 2019.

[21]-ZHAO, J. et al. Evaluation of the matrix effect of pH value and sugar content on the analysis of pesticides in tropical fruits by UPLC-MS/MS. **Microchemical Journal**, p. 106375, 2021.

[22] ETTIENE, G. et al. Validación de un método para la determinación de imidacloprid en frutos de guayabo (Psidium guajava L.) empleando dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía líquida de alta resolución. **Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ),** v. 30, p. 193-216, 2013.

[23] RAGA-CARRENO, J. et al. Validation of an analytical method to determine organophosphorus pesticides in guava (Psidium guajava L.) fruits by using matrix solid phase dispersion and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **Revista de la Facultad de Agronomia de la Universidad del Zulia**, v. 29, n. 4, p. 525-541, 2012.

[24] KUNDU, P.; MALLICK, U. K. Modeling the impact of natural pesticides on optimize guava nutrients in an integrated cultivation. **Modeling Earth Systems and Environment**, p. 1-20, 2023.

[25] PASUPULETI, Vijayanand; KULKARNI, Shyamrao Gururao. Lycopene fortification on the quality characteristics of beverage formulations developed from pink flesh guava (Psidium guajava L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 4126-4131, 2014.

[26] GUEDES, J. A. C. et al. Matrix effect in guava multiresidue analysis by QuEChERS method and gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 199, p. 380-386, 2016.

[27] Gonzaga Neto, Luiz. **Produção de goiaba**. Fortaleza: Instituto Frutal, 2007.

[28] ALIMENTAÇÃO, N. N. (2011). **Tabela brasileira de composição de alimentos- TACO**. Campinas: NEPA - UNICAMP.

[29] IDE, C. D.; MARTELLETO, L.A.P. **Goiaba**: controle de pragas e doenças. Niterói: PESAGRO-RIO, 2008. 16 p.

[30] Junqueira, N. T.; de Andrade, L. R.; Pereira, M.; Lima, M. M.; Chaves, R. d. **Doenças da goiabeira no cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001.

[31] Sobrinho, R. B.; Cardoso, J. E.; Freire, F. d. **Pragas de fruteiras tropicais de importância agroindustrial**. Fortaleza: CNPAT/EMBRAPA, 1998.

[32] SILVÉRIO, F. O.; et al. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência, **Química Nova**, Vol. 35, N. 10, 2012. p. 2052-2056.

[33] NASCIMENTO, L.; MELNYK, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Revista Mangaio Acadêmico**, v. 1, n. 1, p. 54-61, 2016.

[34] GERAGE, J. M.; MEIRA, A. P. G.; DA SILVA, M. V. Food and nutrition security: pesticide residues in food. **Nutrire**, v. 42, n. 1, p. 3, 2017.

[35] BONNER, Matthew R. ALAVANJA, Michael CR. Pesticidas, saúde humana e segurança alimentar. **Segurança Alimentar e Energética** , v. 6, n. 3, p. 89-93, 2017.

[36] ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agrotóxicos em alimentos**. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/duvidas-sobre-agrotoxicos-em-alimentos>. Acesso em: 18 de agosto de 2023.

[37] ANVISA. **Registro de agrotóxicos**. Disponível em: < https://www.gov.br/anvisa/ptbr/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/registro-deagrotoxicos>. Acesso em: 18 de agosto de 2023.

[38] 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:< https://www.gov.br/anvisa/ptbr/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analisederesiduos-em-alimentos >. Acesso em: 15 de agosto de 2023.

[39] IUPAC PPDB – International Union of Pure and Applied Chemistry. **Pesticides Properties Data Base**. Disponível em: Acesso em: 30 de agosto de 2023.

[40] ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Sistema de Informações Sobre Agrotóxicos**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 30 de agosto de 2023.

[41] Pubchem. **Pubchem Data Base**. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ > Acesso em: 30 de agosto de 2023.

[42] CARASEK, Eduardo; MERIB, Josias. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: a review. **Analytica chimica acta**, v. 880, p. 8-25, 2015.

[43] JALILIA, V.; BARKHORDARIB, A. e GHIASVANDC, A. Liquid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. **Reviews in Analytical Chemistry**, v.39, p. 1-19, 2020

[44] OLIVEIRA, A. R. M. de et al. Liquid-phase microextraction (LPME): fundamentals and applications to the analysis of drugs in biological samples. **Química Nova**, v. 31, p. 637-644, 2008.

[45] CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; CASS, Q. B. New trends in sample preparation in Brazil: an overview of bioanalytical applications by liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 9-19, 2014.

[46] BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, n. 2, p. 353-361, 1989.

[47] FIGUEIREDO, E. C.; BORGES, K. B.; QUEIROZ, M. E. C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. **Editora Gen LTC, Rio de Janeiro**, 2015.

[48] LLOMPART, Maria et al. Analysis of plasticizers and synthetic musks in cosmetic and personal care products by matrix solid-phase dispersion gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1293, p. 10-19, 2013.

[49] CARRO, Nieves et al. Fast determination of phthalates in mussel samples by micro-matrix solid-phase dispersion (micro-MSPD) coupled with GC–MS/MS. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 12, p. 1-11, 2021.

[50] SANTOS, L. F. S. et al. A miniaturized matrix solid-phase dispersion methodology (μMSPD) for determination of β-carboline alkaloids in tobacco samples by UPLC-ESI-Q-TOF/MSE. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 218, p. 114871, 2022.

[51] Lanças, F. M.; Cromatografia Líquida Moderna. Editora **Átomo**: Campinas, 2009.

[52] CHEN, Yanlong et al. Advanced materials for sample preparation in recent decade. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 120, p. 115652, 2019.

[53] ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada** - RDC nº 166 de 24 de julho de 2017; Brasília, 2021.

[54] MARSON, Breno M. et al. Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: An overview focused on HPLC methods. Química Nova, v. 43, p. 1190-1203, 2020.

[55] SANTE (2019) Analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document SANTE/12682/2019.

[56] ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 166. 2017.

[57] TANDON, Shishir; PAL, Suman Lata. The RP-HPLC method development and validation for simultaneous determination of oryzalin and ethofumesate pesticides in soil and water. **Acta Chromatographica**, v. 34, n. 4, p. 469-474, 2022.

[58] TRIPATHY, Vandana et al. Development and validation of tandem mass spectrometry-based method for the analysis of more than 400 pesticides in honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 128, p. 106013, 2024.

[59] SANTINI, Saul et al. Multi-residue method validation of a LC-MS/MS method for quantitative determination of 349 pesticides in tomato and their health risk assessment through monitoring studies. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 106049, 2024.

[60] SILVA, R. De O. et al. 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, 2019.

[61] STEEN, R. J. et al. Ultra-trace-level determination of polar pesticides and their transformation products in surface and estuarine water samples using column liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 857, n. 1-2, p. 157-166, 1999.

[62] KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** v. 1216, n. 4, p. 685-699, 2009.

[63] LUPO, Sharon; K., T. New advice on an old topic: Buffers in reversed-phase HPLC. **LCGC Europe**, v. 30, n. 7, p. 362–371-362–371, 2017.

[64] TRÖTZMÜLLER, Martin et al. Characteristics and origins of common chemical noise ions in negative ESI LC–MS. **Journal of mass spectrometry**, v. 46, n. 6, p. 553-560, 2011.

[65] YANG, X. J. et al. Effect of ammonium on liquid-and gas-phase protonation and deprotonation in electrospray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 138, n. 2, p. 659- 665, 2013.

[67] DALMIA, A. et al. A LC-MS/MS method with electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization source for analysis of pesticides in hemp. **Journal of Cannabis Research**, v. 3, p. 1-13, 2021.

[68] LANÇAS, F. M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

[69] WIANOWSKA, D.; GIL, M. New insights into the application of MSPD in various fields of analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 112, p. 29- 51, 2019

[70] AUGUSTO, F.; HANTAO, L. W.; MAGOLLÓN, N. G. S.; BRAGA, A. C. G. N. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, n., p. 14-23, 2013.

[71] OYINLOYE, Timilehin Martins; YOON, Won Byong. Effect of freeze-drying on quality and grinding process of food produce: A review. **Processes**, v. 8, n. 3, p. 354, 2020.

[72] DOREA, Haroldo Silveira; LANCAS, Fernando Mauro. Matrix solid-phase dispersion extraction of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in cashew nut and passion fruit. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, n. 5, p. 367-375, 1999.

[73] LEHMANN, Johannes; JOSEPH, Stephen (Ed.). **Biochar for environmental management: science, technology and implementation**. Routledge, 2015.

[74] SANT’ANNA, Mércia VS et al. Electrochemical sensor based on biochar and reduced graphene oxide nanocomposite for carbendazim determination. **Talanta**, v. 220, p. 121334, 2020.

[75] PENG, Li-Qing et al. Carbonized biosorbent assisted matrix solid-phase dispersion microextraction for active compounds from functional food. **Food Chemistry**, v. 365, p. 130545, 2021.

[76] INMETRO–INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQCGCRE-008. 2020.

[77] CUTILLAS, V., GALERA, M. M., RAJSKI, Ł., 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, pg. 67-74, 2018.

[78] KING, Richard et al. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, n. 11, p. 942-950, 2000.

[79] WANG, Lang et al. Transfer Behaviors of 30 Pesticide Residues during the Common Processing of Ginseng. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 815-824, 2022.

[80] CHUANG, Jane C. et al. Evaluation of analytical methods for determining pesticides in baby food. **Analytica chimica acta**, v. 399, n. 1-2, p. 135-142, 1999.

[81] European Comission. EU Pesticides Database. Disponível em: <https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en>. Acesso em: 25 de junho de 2024.

[82] SANTOS, Luana O. et al. Potential bio-oil production from invasive aquatic plants by microscale pyrolysis studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 151-158, 2018.

[83] PROVINI, A.; GALASSI, S. Polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in bird eggs from Calabria (Southern Italy). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, n. 1, p. 91-97, 1999.

[84] DOS REIS SOUZA, Michel Rubens et al. Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs

of the chicken Gallus gallus domesticus. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 395-401, 2013.

[85] LONČARIĆ, Ante et al. Peel of traditional apple varieties as a great source of bioactive compounds: Extraction by micro-matrix solid-phase dispersion. **Foods**, v. 9, n. 1, p. 80, 2020.

[86] HRYNKO, Izabela et al. The effect of food thermal processes on the residue concentration of systemic and non-systemic pesticides in apples. **Food Control**, v. 143, p. 109267, 2023.