

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

GRAZIELA CRISTINA ROSSI DE MOURA ANDRADE

**Análise multirresíduos de pesticidas em tomate utilizando LC-MS/MS e
avaliação dos efeitos de lavagem na descontaminação**

Piracicaba

2013

GRAZIELA CRISTINA ROSSI DE MOURA ANDRADE

**Análise multirresíduos de pesticidas em tomate utilizando LC-MS/MS e
avaliação dos efeitos de lavagem na descontaminação**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia
Nuclear da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Química na Agricultura
e no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo

Piracicaba

2013

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Moura Andrade, Graziela Cristina Rossi de

Análise multirresíduos de pesticidas em tomate utilizando LC-MS/MS e avaliação dos efeitos de lavagem na descontaminação / Graziela Cristina Rossi de Moura Andrade; orientador Valdemar Luiz Tornisielo. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

133 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise de alimentos 2. Contaminação de alimentos 3. Cromatografia líquida de alta eficiência 4. Espectrometria de massas 5. Hortaliças 6. Resíduos de pesticidas em plantas I. Título

CDU 632.95.028 : (543.544.5.068.7 + 543.51)

Dedico

Ao meu marido Daniel, pelas palavras de incentivo e confiança... por todos os momentos de convivência, cumplicidade e felicidade...

A toda minha família, em especial para minha querida mãe Rosa, meu papai José Carlos (*in memoriam*) e irmãs Giowanna e Anileda. Que a paz e a harmonia continuem reinando na nossa família.... pois essa é a nossa verdadeira riqueza...

"Peçam, e será dado; busquem, e encontrarão; batam, e a porta será aberta.

Pois todo o que pede recebe; o que busca encontra; e àquele que bate, a porta será aberta."

Mateus 7:7-8

AGRADECIMENTOS

A Deus que conduz minha vida com infinita bondade e amor; por encher minha existência de bons amigos e ótimos exemplos.

Ao Dr. Valdemar Luiz Tornisielo, pela humildade e sabedoria com que me conduziu durante a realização deste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto obtido através de bolsa individual e de auxílio à pesquisa.

Ao assessor da FAPESP, pela contribuição com olhar crítico sobre os relatórios.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo pela oportunidade e estrutura disponível para que este trabalho fosse realizado e a todos os seus funcionários.

Aos técnicos do Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP, Carlos Dorelli e Rodrigo Pimpinato, pela amizade e auxílio na fase experimental.

Aos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia: Marcela, Nádia, Neide, Rafael Grossi, Rafael Leal, Bruno, Paulo e Mayra, Thais, Rosana, Franz, Alyne, Felipe, Carol Poppi, Ademar e Luana pela amizade e colaboração.

Ao Dr. Denis Silva da Casa da Agricultura de Piracicaba pelo auxílio prestado.

Ao Dr Aderbal Almeida Rocha por toda ajuda prestada, amizade e cordialidade.

À Dra. Ana Carolina Ribeiro Dias por toda à atenção e ajuda prestada.

À nossa querida secretária Renata Pousa Maziero por toda sua eficiência, simpatia e prestatividade.

Ao amigo e pesquisador do Instituto Biológico, Sérgio Henrique Monteiro pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, às gargalhadas e amizade fraternal adquirida nesse curto convívio.

Às amigas "elevadoras de ânimo" Leila Figueiredo e Jeane Francisco (sem os nomes do meio) pela pronta ajuda em questões cromatográficas ou pessoais e por encher minha vida acadêmica de alegria.

A Bibliotecária Chefe do CENA/USP, Marília Ribeiro Garcia Henyei pela sua simpatia e pronto atendimento na revisão final deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse possível, meu MUITO OBRIGADA!!

RESUMO

MOURA ANDRADE, G. C. R. **Análise multirresíduos de pesticidas em tomate utilizando LC-MS/MS e avaliação dos efeitos de lavagem na descontaminação.** 2013. 133 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Os pesticidas têm sido largamente empregados na agricultura para controle de pragas, doenças e ervas daninhas. O uso intensivo de pesticidas nas culturas de tomates, desrespeitando as boas práticas agrícolas, tem causado preocupações quanto à provável contaminação do produto final e muitos métodos multirresíduos têm sido empregados para avaliar e determinar os níveis de resíduos em amostras de alimentos. Para tanto, o objetivo deste estudo foi a validação do método usando QuEChERS no preparo de amostra e LC-MS/MS para a quantificação de resíduos de 61 pesticidas de diferentes classes químicas em tomate. A detecção foi realizada utilizando espectrômetro de massas no modo MRM dinâmico, o tempo de análise foi de 13 min com coluna analítica recheada com partículas de 1,8 μm de partícula. Dos 61 pesticidas estudados, 46 estão de acordo com os parâmetros de validação da Comissão Européia e Anvisa, 15% dos pesticidas validados apresentaram efeito matriz médio e as recuperações ficaram entre 87 e 116% e coeficiente de variação de 5 a 17%. Mais de 85% dos compostos investigados apresentaram limites de detecção igual ou menor que 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de quantificação igual ou menor que 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foram analisadas 58 amostras de tomate coletadas em supermercados da cidade de Piracicaba, SP, Brasil. Doze compostos foram detectados em trinta e cinco amostras (60% do total analisado), todos abaixo do limite máximo de resíduos permitido no Brasil para acefato, acetamiprido, azoxistrobina, benalaxil, bromuconazol, diflubenzurom, imidacloprido, iprodiona, procloraz e tiametoxam, e 15 amostras positivas para metamidofós e 1 para oxamil, que não possuem uso autorizado para a cultura de tomate. Foi realizado um estudo de lavagem de tomates contaminados com produtos formulados (8 pesticidas) com água, solução com 10% de vinagre e

com 10% de bicarbonato de sódio e analisada a casca e polpa, para avaliar a capacidade de remoção de cada procedimento. Todos os tratamentos de lavagens (n=3) diferiram estatisticamente para todos os pesticidas avaliados (n=8), com exceção do fipronil, para o qual as lavagens com solução de 10% de bicarbonato de sódio e água não apresentaram diferença no nível de significância de 5%. A lavagem com água ou outras soluções antes do consumo é indicada para a redução de resíduos de pesticidas em tomate e a retirada da casca também contribui para essa redução.

Palavras-chave: LC-ESI-MS/MS. Resíduos. Pesticidas. QuEChERS. Tomate.

ABSTRACT

MOURA ANDRADE, G. C. R. **Multiresidue analysis of pesticides in tomatoes using LC-MS/MS and evaluation of the effects of washing in decontaminating.** 2013. 133 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Pesticides have been widely used in agriculture to control pests, diseases and weeds. The intensive use of pesticides in tomato crops disrespecting good agricultural practices have been causing concerns about the possible contamination of the final product and many multiresidue methods have been used in order to evaluate and determine the levels of residues in food samples. Therefore, the aim of this study was validate the method using QuEChERS sample preparation and LC-MS/MS for quantification of 61 pesticides residues from different chemical classes in tomato. Detection was performed using mass spectrometry in dynamic MRM mode, run time had 13 min and analytical column packed with 1,8 μm particles. Of the 61 pesticides studied, 46 are in accordance with the validation parameters of the European Commission and ANVISA, 15% of the validated pesticides presented matrix effect, recoveries were between 87 and 116% and coefficient of variation 5 to 17%. More than 85% of the compounds investigated showed limits of detection less or equal than 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and the limits of quantification less or equal than 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. 58 real samples of tomato were analyzed and collected in supermarkets in Piracicaba, SP, Brazil. Twelve compounds were detected in thirty-five samples (60% of the total analyzed), all below the maximum residue limit allowed in Brazil for acephate, acetamiprid, azoxystrobin, benalaxyl, bromuconazole, diflubenzuron, imidacloprid, iprodione, prochloraz and thiamethoxam, and 15 positive samples of methamidophos and 1 for oxamyl, which are not authorized to use at the culture of tomatoes. A wash study was conducted with spiked tomatoes using formulated products (8 pesticides) with water, 10% acetic acid, 10% sodium bicarbonate solution and analyzed concentration in the peel and pulp, in order to evaluate the capacity to remove

pesticides in each procedure. All wash treatments (n= 3) differed significantly for all pesticides evaluated (n= 8), with the exception of fipronil, which the washing with 10% of sodium bicarbonate solution and water no showed difference in the level of significance 5%. The washing with water or other solutions before consumption is indicated for the reduction of pesticide residues in tomatoes and the peeling also contributes to this reduction.

Keywords: LC-ESI-MS/MS. Residues. Pesticides. QuEChERS. Tomato.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Tomate.....	19
2.2 O uso de pesticidas no Brasil e no mundo	20
2.3 Métodos de análise de resíduos de pesticidas em alimentos.....	22
2.3.1 Técnicas de preparo de amostras	23
2.3.1.1 QuEChERS	24
2.4 Uso de métodos cromatográficos para análise de resíduos de pesticidas em alimentos	26
2.4.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS)	27
2.4.2 Aplicação da técnica LC-MS/MS na determinação de resíduos de pesticidas em alimentos	33
2.5 Validação de métodos analíticos	35
2.5.1 Parâmetros de Validação	35
2.5.1.1 Seletividade	36
2.5.1.2 Linearidade	37

2.5.1.3 Precisão	39
2.5.1.3.1 Repetitividade	39
2.5.1.3.2 Precisão intermediária	40
2.5.1.4 Exatidão.....	40
2.5.1.5 Limite de detecção	42
2.5.1.5 Limite de quantificação	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Pesticidas Seleccionados.....	44
3.2 Equipamentos e Instrumentação	59
3.3 Materiais e reagentes.....	60
3.4 Preparo de soluções padrões	60
3.5 Seleção dos íons: precursor e produto.....	61
3.6 Análises LC.....	61
3.7 Condições MS/MS	62
3.8 Método de preparação de amostras QuEChERS	62
3.9 Validação do método analítico	63
3.9.1 Seletividade	63
3.9.2 Linearidade.....	64

3.9.3 Sensibilidade.....	64
3.9.4 Efeito Matriz	65
3.9.5 Limite de detecção e quantificação	65
3.9.9 Precisão	66
3.9.10 Estabilidade dos extratos.....	66
3.10 Análise de amostras.....	67
3.11 Testes de lavagem	68
3.11.1 Tomate inteiro sem lavagem	69
3.11.2 Tomate inteiro com lavagem em água	70
3.11.3 Tomate inteiro com lavagem em solução 10% vinagre	70
3.11.4 Tomate inteiro com lavagem em solução 10% bicarbonato de sódio	71
3.12 Casca e polpa	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1 Otimização dos parâmetros do MS/MS.....	72
4.2 Análises LC-MS/MS	75
4.3 Condições Cromatográficas	77
4.4 Método de preparação de amostras QuEChERS.....	78
4.5 Validação do método analítico	78

4.5.1 Seletividade	78
4.5.2 Linearidade, sensibilidade e efeito matriz.....	80
4.5.3 Limite de detecção e quantificação	85
4.5.4 Exatidão e precisão	89
4.5.5 Estabilidade dos extratos	96
4.6 Análise de amostras	97
4.7 Testes de Lavagem	103
4.8 Casca e polpa.....	116
5 CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS	123

1 INTRODUÇÃO

O crescimento contínuo da população mundial e, conseqüentemente, o aumento da demanda por alimentos tem impulsionado o desenvolvimento de sistemas agrícolas de produção cada vez mais eficientes. Neste sentido, o uso de pesticidas para o controle de pragas durante o cultivo e após a colheita tornou-se uma ferramenta essencial para garantir o crescimento e a qualidade na produção de alimentos.

Atualmente existem mais de 143 compostos (BRASIL, 2003), pertencentes à classes químicas diferentes, registrados como ingredientes ativos no cultivo do tomate no Brasil. Mas, o uso incorreto destes compostos pode contaminar o meio ambiente, ocasionando efeitos adversos à saúde dos seres vivos e problemas associados com a presença de resíduos de pesticidas em alimentos.

Para avaliar a exposição humana aos resíduos de pesticidas presentes nos alimentos e assegurar a saúde pública, agências reguladoras de vários países têm criado programas de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos. No Brasil, onde existe um grande potencial agrícola e um dos maiores mercados consumidores de pesticidas do mundo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011a) criou, em 2001, o Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA).

O tomate figura entre os principais produtos da horticultura presentes na mesa do consumidor brasileiro. Em 2011, a produção nacional foi maior que 4 milhões de toneladas permanecendo na 8ª posição, sendo a China o maior produtor mundial com mais de 48 milhões (FAO, 2013). Por este motivo, torna-se indispensável realizar um controle rigoroso para avaliação da possível contaminação por resíduos de pesticidas no cultivo de tomate do país.

Na determinação de resíduos de pesticidas em alimentos, geralmente são empregados métodos cromatográficos para a análise, como a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC). Também têm sido desenvolvidas técnicas de análise de pesticidas em alimentos cada vez mais rápidas, seletivas e sensíveis devido à necessidade de se detectar simultaneamente um grande número de compostos em baixos níveis de concentração. Dentre elas, pode-se destacar a cromatografia líquida de ultra eficiência (*ultra-high pressure liquid chromatography* - UHPLC) e os métodos cromatográficos com detecção por espectrometria de massas em série (MS/MS).

Este estudo teve como objetivo a validação do método multirresíduo de preparação de amostras QuEChERS para tomate e análise por cromatografia líquida LC-MS/MS de 61 pesticidas de diferentes grupos químicos, a quantificação de amostras coletadas em supermercados da cidade de Piracicaba-SP, bem como a avaliação do perfil de distribuição dos resíduos de 8 pesticida na casca e na polpa do fruto de tomate, e em amostras inteiras, após 3 procedimentos de lavagem (água, solução com 10% bicarbonato e solução com 10% de vinagre).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tomate

O tomate é considerado um alimento funcional, pois contém moléculas antioxidantes, como ácido ascórbico, vitamina E, carotenóides, flavonóides, licopeno e ácidos fenólicos, que trazem efeitos benéficos à saúde. O licopeno constitui o carotenoide predominante em tomates vermelhos, mas β -caroteno, α -caroteno e luteína representam cerca de 20% dos carotenoides totais em tecido de tomate fresco (DAVIS; FISH; PERKINS-VEAZIE, 2003).

O tomate de mesa ou para consumo in natura é produzido em praticamente todas as regiões geográficas do Brasil e em épocas distintas, sob diferentes sistemas de cultivo e diferentes níveis de manejo cultural, destacando-se como a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, sendo superada apenas pela batata (MATOS; SHIRAHIGE; DE MELO, 2012; FAO, 2013).

Em 2011, a safra mundial de tomate de mesa e indústria totalizou 159,02 milhões de t em área cultivada de 4,73 milhões de ha e produtividade média de 33,5 t ha⁻¹. O maior produtor mundial foi a China, com 48,5 milhões de t em 0,98 milhões de ha e produtividade de 47,8 t ha⁻¹. O Brasil produziu 4,41 milhões de t, em 71,4 mil ha, colocando-se em 8º e 13º lugares, respectivamente, na escala mundial, com produtividade média de 61,79 t ha⁻¹ (35ª posição).

A cadeia produtiva brasileira do tomate vem experimentando importantes transformações desde o final da década passada, orientadas para a sua modernização e aumento da produtividade. A produtividade média brasileira de tomate, nos segmentos de mesa e indústria, vem aumentando de forma significativa e consistente desde o início da década de 1980. Nas décadas de 1980, 1990 e 2000, os rendimentos

médios foram de 30,64 t ha⁻¹, 37,14 t ha⁻¹ e 53,26 t ha⁻¹, respectivamente. A produtividade média em 2010 foi de 60,49 t ha⁻¹, enquanto que em 1980, foi de apenas 30,64 t ha⁻¹. Sendo assim, em três décadas, a produtividade da tomaticultura brasileira incrementou 97,5% (MATOS; SHIRAHIGE; DE MELO, 2012; FAO, 2013).

O manejo cultural do tomate, principalmente em épocas de chuva, exige cuidados especiais, como aplicações de pesticidas a cada três dias, ocasionando alto investimento para os produtores. Este fato, além de promover um maior custo na produção, pode acarretar em ressurgência de pragas, aparecimento de novas pragas, ou, ainda, resistência de algumas pragas aos produtos utilizados (REIS FILHO; MARIN; FERNANDES, 2009).

O controle de pragas, através do uso intensivo e indiscriminado de pesticidas e grandes períodos de carência, representa riscos de contaminação aos trabalhadores, consumidores e meio ambiente. Os inseticidas recomendados para o controle das pragas do tomateiro chegam a ter período de carência de 14 a 30 dias (BRASIL, 2013). Em função do uso intensivo na cultura do tomate, inclusive na colheita, é praticamente inevitável a presença de resíduos nos alimentos (REIS FILHO; MARIN; FERNANDES, 2009).

2.2 O uso de pesticidas no Brasil e no mundo

O termo agrotóxico ou pesticida abrange uma vasta gama de compostos, incluindo inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, moluscicidas, nematocidas, reguladores de crescimento de plantas e outros. As práticas agrícolas modernas dependem, amplamente, da aplicação de pesticidas durante o cultivo e após a colheita, e no período de estocagem dos produtos agrícolas. O uso de pesticidas é essencial para prevenir ou reduzir perdas na agricultura, melhorando, assim, a

produtividade, e também para que sejam obtidos produtos com qualidade, que satisfaçam os consumidores e garantam sua comercialização (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009).

A venda global de pesticidas permaneceu relativamente constante até o final dos anos 1990, entre 270 e 300 bilhões de dólares, dos quais 47% eram herbicidas, 28% eram de inseticidas, 20% eram fungicidas/bactericidas, e 5% outros. De 2007 a 2008, os herbicidas permaneceram em 1º lugar, seguido pelo rápido aumento dos fungicidas/bactericidas. O continente europeu é o maior consumidor de pesticidas do mundo, seguida pela Ásia. A China, os Estados Unidos, Alemanha, França, Japão e Brasil são os maiores países produtores e consumidores de pesticidas do mundo (ZHANG; JIANG; OU, 2011). Porém seu uso incorreto pode ser altamente tóxicos para os seres humanos e para o ambiente, causando efeitos adversos na atmosfera, solos e rios, resultando na acumulação de substâncias tóxicas e ameaçando a saúde humana e o meio ambiente (SWARUP; PATRA, 2005; RICE; ARTHUR; BAREFOOT, 2007; WASI; TABREZ; AHMAD, 2013).

Os alimentos são considerados a principal fonte de exposição dos seres humanos aos pesticidas (BOOBIS et al., 2008; JARDIM; ANDRADE; DE QUEIROZ, 2009). Muitos países desenvolvidos realizam regularmente estudos de dieta total, como um método de avaliação da exposição da população a vários contaminantes nos alimentos, incluindo pesticidas. Esses estudos são considerados importantes para acompanhamento das exposições alimentares a produtos químicos, e o risco associado à saúde pública é caracterizado pela comparação da estimativa de valores internacionais de orientação de saúde, como a ingestão diária aceitável e ingestão semanal tolerável provisória (VANNOORT; THOMSON, 2009; BETSY; RAO; POLASA, 2012).

Para controlar a exposição humana aos resíduos de pesticidas presentes nos alimentos e assegurar a saúde pública, agências reguladoras de vários países têm

estabelecido limites máximos de resíduos (LMR) cada vez menores e possuem programas de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos (US FDA, 2013; ANVISA, 2011a; EFSA, 2010).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2001, o Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), e de acordo com os dados divulgados em 2010, além do uso de pesticidas acima do LMR permitido (2,1%), o Brasil ainda enfrenta problemas com a utilização de pesticidas não autorizados aplicados na cultura do tomate (14,2%) (ANVISA, 2011a).

Na Europa a European Food Safety Authority (EFSA, 2010) é responsável pela avaliação de risco dos pesticidas e pelo Annual Report on Pesticides Residues onde compila e analisa as informações de monitorização gerados pelos estados membros. No último relatório (2008) 21% das amostras de tomate analisadas apresentaram resíduos de múltiplos pesticidas e das amostras importadas provenientes de Marrocos, 34 excederam o LMR.

Nos Estados Unidos o FDA, através do relatório anual, resume os resultados dos programas de monitoramento de resíduos de pesticidas no país (US FDA, 2013). Em 2008 25,5% das amostras de tomate apresentaram contaminação, e 0,9% excederam o LMR, das amostras importadas, 31,7% estavam contaminadas, com 2,4% acima do LMR.

2.3 Métodos de análise de resíduos de pesticidas em alimentos

Os métodos de análise de resíduos de pesticidas em alimentos compreendem, basicamente, quatro etapas: a primeira etapa consiste na amostragem, que deve ser representativa de um todo, a segunda é o preparo da amostra, isto é, a extração do

analito da matriz, remoção de interferentes (*clean-up*) e concentração; a terceira etapa trata-se da separação e detecção dos analitos (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011), e por último, o processamento dos dados.

2.3.1 Técnicas de preparo de amostras

Uma das técnicas de preparo de amostras mais utilizada é a extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* - LLE) (BOTITSI; ECONORNOU; TSIPI, 2007; LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007; LIU et al., 2011). A LLE é uma técnica de extração baseada na transferência dos analitos presentes em uma matriz líquida para outra fase líquida imiscível (solvente orgânico menos polar ou apolar), de acordo com as diferenças de solubilidade dos analitos nestas duas fases (CHEN et al., 2008). A LLE clássica apresenta alguns problemas como a possibilidade de formação de emulsões, o consumo de grandes quantidades de amostra e solventes, muitas vezes não é capaz de eliminar os interferentes presentes em matrizes complexas, como alimentos, além de ser relativamente lenta e gerar um grande volume de descarte (BEYER; BIZIUK, 2008; CHEN et al., 2008). Por isso, existe uma busca pelo desenvolvimento de métodos de preparo de amostra mais rápidos, que consumam menores quantidades de solventes tóxicos e que permitam o seu acoplamento “on-line” aos sistemas de análise.

Dentre as técnicas de extração desenvolvidas como alternativa à LLE destaca-se a extração em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE) (KANG et al., 2011; YANG et al., 2011) que é uma técnica bastante empregada, muitas vezes em conjunto com a ELL, como etapa de *clean-up* (GONZALAZ-RODRIGUEZ et al., 2008; BEYER; BIZIUK, 2010). Durante a SPE, os analitos inicialmente presentes em uma matriz líquida são passados através de cartucho e adsorvido em um sorvente sólido (sendo o mais

popular o grupo octadecil ligado à sílica - C18), sendo este previamente condicionado e ativado com água e/ou solvente orgânico. Em seguida, os interferentes são removidos por lavagem com solventes orgânicos, enquanto os analitos são ainda retidos no sorvente. Após este passo de limpeza, os analitos são subsequentemente eluídos com outros solventes orgânicos, obtendo extratos mais limpos (ZHANG et al., 2012).

Além da SPE, pode-se destacar como avanços em técnicas de preparo de amostras a extração por fluido supercrítico (*supercritical fluid extraction* - SFE), extração por líquido pressurizado (*pressurized-liquid extraction* - PLE), extração assistida por micro-ondas (*microwave-assisted extraction* - MAE), extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (*liquid liquid extraction with the low temperature partition technique* - LLE-LTP), extração por dispersão da matriz em fase sólida (*matrix solid phase dispersion* - MSPD), microextração em fase sólida (*solid phase micro-extraction* - SPME), microextração em fase líquida (*liquid phase micro-extraction* - LPME), polímeros molecularmente impressos (*molecularly imprinted polymers* - MIPs), extração por sorção em barra de agitação (*stir bar sorptive extraction* - SBSE), extração em ponto de nuvem (*cloud point extraction* - CPE) e QuEChERS (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) (ZHANG et al., 2012).

O método de preparação de amostra ideal para análise de pesticidas em alimentos deve ter um compromisso entre custo, precisão, seletividade e detectabilidade, e devido à sua importância no cenário da segurança alimentar, novos métodos devem continuar a serem desenvolvidos e melhorados.

2.3.1.1 QuEChERS

QuEChERS é um método de preparação de amostra voltado para análise multirresíduos de pesticidas, que foi desenvolvido entre 2000 e 2002, sendo publicado pela primeira vez em 2003 por Anastassiades et al. Apesar de ser um método relativamente novo, QuEChERS tem sido amplamente aceito pela comunidade internacional de analistas de resíduos de pesticidas, uma vez que muitos trabalhos têm sido publicados empregando sua forma original ou com variações (LEHOTAY et al., 2005; PAYA et al., 2007; WIILKOWSKA; BIZIUK, 2011; ARIENZO; CATALDO; FERRARA, 2013; RAHMAN et al., 2013; ZHANG; WU; LU, 2013).

O método QuEChERS original envolve uma extração inicial de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila, seguida por partição líquido-líquido formada pela adição de 4 g $MgSO_4$ anidro, que tem a função de remover o excesso de água da amostra; e mais 1 g de NaCl, para o ajuste da força iônica. A remoção da água residual e *clean-up* são realizadas simultaneamente, usando um procedimento rápido chamado extração em fase sólida dispersivo (dispersive solid-phase extraction - dSPE), em que 150 mg $MgSO_4$ anidro e 25 mg de sorvente amina primária secundária (PSA - composto por grupos etilenodiamina-N-propil ligados à sílica) são simplesmente misturadas com 1 mL extrato de acetonitrila. O PSA tem a função de remover açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos (ANASTASSIADES et al., 2003).

O método original foi modificado para ampliar o alcance tanto de pesticidas como de matrizes. De grande importância, foi a introdução de tamponamento com a adição de sais para melhorar a recuperação de analitos dependentes de pH. (LEHOTAY; MASTOVSKA; LIGHTFIELD, 2005) introduziram o tampão acetato para atingir um valor de pH de 6 para todas as amostras e esta abordagem resultou no método oficial da Association of Official Analytical Chemists -AOAC 2007.01 (AOAC, 2007). A modificação com tampão citrato foi nomeada pelo Comitê Europeu de Normalização como método oficial EN 15662:2008 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2008).

O método QuEChERS foi desenvolvido para análise de resíduos de pesticidas em matrizes com baixo teor de gordura. Porém, quando realizadas algumas modificações, pode ser empregado na análise de matrizes com elevado teor de gorduras, grandes quantidades de pigmentos, carotenóides ou clorofila (LEHOTAY; MASTOVSKA; YUN, 2005; LI et al., 2009; SOBHANZADEH et al., 2012). O método também vem sendo adaptado e utilizado para outros analitos como antibióticos, fármacos, acrilamidas e micotoxinas em diferentes matrizes como sangue, rim, fígado (MASTOVSKA; LEHOTAY, 2006; KINSELLA et al., 2009; USUI et al., 2012; LLORENT-MARTINEZ et al., 2013).

2.4 Uso de métodos cromatográficos para análise de resíduos de pesticidas em alimentos

Na etapa de separação, identificação e quantificação dos resíduos de pesticidas em alimentos, geralmente são empregados métodos cromatográficos de análise. A cromatografia gasosa (GC) foi uma das primeiras técnicas a serem empregadas na determinação de resíduos de pesticidas em alimentos, devido ao elevado grau de desenvolvimento e especificidade de seus detectores, como o detector por captura de elétrons (*electron capture detector* - ECD), de nitrogênio e fósforo (*nitrogen-phosphorus detector* - NPD) e o fotométrico de chama (*flame-photometric detector* - FPD). Porém, nos últimos anos tem aumentado significativamente o número de pesticidas de maior polaridade, os quais apresentam menor persistência e toxicidade que os apolares, o que inviabiliza o emprego direto da GC ou limita a sua aplicação ao uso de técnicas de derivatização do analito (JARDIM; ANDRADE; DE QUEIROZ, 2009; VIDAL et al., 2009).

Na busca por métodos de análise de pesticidas em matrizes complexas, cada vez mais rápidos, seletivos e sensíveis, vários avanços têm sido obtidos no

desenvolvimento das técnicas analíticas de separação e detecção. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) tornou-se uma ferramenta analítica amplamente utilizada para a análise de pesticidas. Durante o últimos anos, muitos trabalhos têm sido publicados sobre a análise de pesticidas e seus produtos de degradação por um único quadrupolo LC-MS (SOLER; MANES; PICO, 2005; SAGRATINI et al., 2007).

Apesar do enorme potencial de LC-MS um certo número de desvantagens e limitações foram também evidenciadas afetando a determinação qualitativa e quantitativa. Uma dessas desvantagens é que o espectro de massas obtido mostra os íons de interesse, mas não na mesma proporção que no padrão, tornando-o difícil estabelecer se são *background* ou interferências. A abundância relativa de íons utilizada para confirmação tem que combinar com os de um padrão e ser superior a 2%. Como regra geral, quanto maior é a fragmentação obtida, menor será a sensibilidade (PICO et al., 2006).

Para contornar esta dificuldade foi criada a técnica MS/MS, com detectores acoplados. A principal vantagem é apresentar maior detectabilidade e seletividade do que o quadrupolo único, pois garante que o íon precursor selecionado fragmente nos íons produtos. Isto permite a análise de um grande número de pesticidas simultaneamente e a detecção e confirmação desses compostos em concentrações muito pequenas.

2.4.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS)

O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas possibilita combinar as vantagens da técnica cromatográfica (alta seletividade e

eficiência de separação) com as vantagens da MS (obtenção de informação estrutural, da massa molar e aumento adicional da seletividade e detectabilidade). Mas, para que o acoplamento seja possível, idealmente é necessário que as características de cada instrumento não sejam afetadas pela sua conexão, assim como não devem ocorrer modificações químicas não controladas do analito e perdas de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Porém, quando a LC-MS começou a ser utilizada foram encontradas incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente do sistema cromatográfico com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas (VÉKEY, 2001). As vazões utilizadas na LC são relativamente grandes (da ordem de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$), não sendo possível bombear o eluente de um cromatógrafo líquido diretamente para o interior da fonte do espectrômetro, que opera a pressões de cerca de $1,3 \times 10^{-4} \text{ Pa}^2$. Assim, uma das mais importantes funções de uma interface empregada em LC-MS é remover toda ou, pelo menos, uma parte significativa da fase móvel (FM) (DONATO et al., 2012).

Além do problema existente com relação à vazão, os compostos que são separados por LC são relativamente pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura, de maneira que não é possível sua ionização utilizando as técnicas de ionização mais comumente aplicadas na MS. Desta forma, para o acoplamento da LC à MS foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização alternativas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Desde a década de 1970, várias interfaces de LC-MS foram desenvolvidos, mas foi somente após o lançamento de ionizações à pressão atmosférica como, por exemplo, a ionização por eletronebulização (*electrospray ionization* - ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* - APCI), que a LC-MS tornou-se uma alternativa robusta. A ESI é a mais universal dessas

interfaces, pois a relação entre o intervalo de massa molecular e as polaridades dos analitos que podem ser analisados é maior (HERNANDEZ; SANCHO; POZO, 2005). Além disso, neste trabalho, será dada maior ênfase à ESI, que foi a fonte de ionização utilizada no método proposto para a determinação de resíduos de pesticidas em tomate.

Na ESI, o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido passa através de um capilar, a pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*spray*) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica com maior ou menor potencial (dependendo do modo de ionização: positivo ou negativo). A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂) na região do *spray*. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento, ocorre a chamada "explosão coulômbica" que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos os íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CROTTI et al., 2006; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Devido ao modo de obtenção dos íons por esta fonte de ionização, a sua aplicação a compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares que podem ser facilmente ionizados é favorecida. Em ESI, compostos sensíveis à temperatura podem ser ionizados sem sofrer degradação, já que a ionização ocorre diretamente na solução. Já os compostos com massas molares relativamente grandes podem ser analisados utilizando-se ESI, porque esta fonte de ionização é capaz de gerar íons com múltiplas cargas. Assim, como o espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) dos íons, o intervalo de "massa" de aplicabilidade do

instrumento pode ser expandido por um fator equivalente ao número de cargas do íon, isto é, um íon com m/z 1000 e com 20 cargas representa um composto com uma massa molar de 20 000 Da (VÉKEY, 2001).

A ESI é uma técnica de ionização "suave". Isto significa que quantidades relativamente pequenas de energia são transmitidas às moléculas que são ionizadas e detectadas. A eficiência de formação de íons por ESI, em parte, depende da capacidade de uma molécula para associar e levar uma carga. Desta maneira, são formados íons pseudo-moleculares intactos, do tipo $[M+H]^+$ no modo positivo ou $[M-H]^-$ no modo negativo. Estas espécies são complexos não covalentes formadas entre um analito de interesse e quaisquer outros componentes (tais como fase móvel, aditivos e impurezas) presentes na amostra (DANIEL et al., 2002). O modo de operação positivo ou negativo é estabelecido pelos modificadores adicionados à FM. No modo de ionização positivo é adicionado à FM um ácido orgânico, geralmente ácido fórmico. Já no modo negativo, adiciona-se à FM uma base orgânica, geralmente trietilamina (WANG; CHEUNG; GRANT, 2005).

A formação de adutos de sódio, que são pobremente fragmentados e não muito recomendável para métodos MS/MS pode ser minimizada pela adição de modificadores à FM, bem como para adutos de K^+ , NH_4^+ , $HCOO^-$ e CH_3COO^- (BOTERO-COY et al., 2012).

O uso de MS/MS fornece um nível adicional de informação estrutural. O primeiro analisador é usado para isolar o íon precursor ($[M + H]^+$ ou $[M - H]^-$), que em seguida é submetido a fragmentação (que pode ser conseguida espontaneamente ou por meio de alguma técnica de ativação) para produzir íons produto e fragmentos neutros, que são então analisadas por um segundo analisador de massas (MADEIRA; FLORÊNCIO, 2012). Esta técnica tem sido amplamente utilizada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, acoplada à

cromatografia, uma vez que possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência de compostos presentes na matriz.

Os analisadores de massas mais comumente empregados no MS/MS são o triplo quadrupolo QqQ, quadrupolo-analisador de tempo de voo (*Quadrupole time-of-flight* -Q-TOF), *Ion-Trap* e quadrupolo-*Ion-Trap* (Qtrap). Para a realização deste trabalho foi utilizado um triplo quadrupolo QqQ, constituído por três quadrupolos em série, sendo que o Q1 seleciona o íon precursor, o q2 atua como célula de colisão (octopolo), e Q3 é utilizado para analisar os íons fragmentados que saem do q2. Normalmente, os íons de massa selecionados que emergem de Q1 são acelerados por um deslocamento de cerca de 10 eV para o q2, onde o gás de colisão (N₂) é fornecido a uma pressão de 0,1 - 0,3 Pa (SPARKMAN, 2005).

Na cela de colisão ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (*collision induced dissociation* – CID). As colisões entre o íon precursor e o gás de colisão (He, N₂, Ar) são acompanhadas por um aumento da energia interna. Este aumento da energia interna induz a fragmentação. A colisão inelástica de um íon (com elevada energia cinética) com um neutro resulta na conversão de uma parte da energia cinética em energia interna que conduz à decomposição do íon (SPARKMAN, 2005; MADEIRA; FLORÊNCIO, 2012).

Quando a CID é realizada com baixa energia, a fragmentação é minimizada e a informação obtida corresponde normalmente à íons não fragmentados, relacionados com a molécula original (H₂O, MeOH, CO, CO₂, etc.). No entanto, quando alta energia é empregada a fragmentação é promovida, resultando em fragmentos abundantes, que fornecem informações estruturais mais significativas, uma vez que pode levar à quebra das moléculas em posições características. Porém, quando a energia é muito elevada pode ocorrer uma fragmentação descontrolada (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; BOTERO-COY et al., 2012).

O acoplamento MS/MS permite a utilização de várias estratégias para a seleção dos íons de interesse, tais como a varredura dos íons produto (*product ion scan*), *full scan*, varredura dos íons precursores (*precursor ion scan*), varredura da constante perda de íons neutros (*constant neutral loss scan*), monitoramento seletivo de reação (*selected reaction monitoring* - SRM) ou múltiplas (*multiple reaction monitoring* - MRM) (SPARKMAN, 2005). Neste trabalho, utilizou-se o modo MRM dinâmico (*Dynamic Multiple Reaction Monitoring* - DMRM).

Ao usar a função DMRM, não há necessidade de definir segmentos de janela de tempo para o grupo selecionado de transições levando em conta os tempos de retenção, considerando também o número total de espécies alvo e o *dwell time*. Na verdade, segmentos de tempo "virtuais" são automaticamente construídos pelo software durante a análise (como uma janela de tempo em movimento contínuo ao longo do curso da execução). Deste modo, todas as transições de íons tem o mesmo *dwell time* (que não é definido pelo usuário), ou seja, o *dwell time* irá variar a todo instante para assegurar que todo analito tenha um número suficiente de dados em todos os picos detectados, garantindo assim uma integração mais adequada dos picos (BUNTING; WANG; FLANAGAN, 2009).

Desta forma, ocorre a configuração automática de sobreposição de segmentos de tempo, sem intervenção do usuário. O benefício do DMRM é permitir *dwell time* maiores realizando transições MRM em torno do tempo de eluição do composto e não continuamente ao longo do cromatograma.

A ferramenta do software MassHunter, "Dynamic MRM (DMRM)", utilizada neste estudo, constrói automaticamente tabelas de tempo DMRM com base no tempo de retenção do analito, com uma janela de detecção (Delta RT), para evitar perdas de analito devido ao deslocamento do pico, e um tempo de ciclo constante de digitalização (para fornecer número suficiente de pontos de dados em todos os picos detectados). Neste trabalho, o valor Delta RT foi fixado em 1,0 min

(ZWEIGENBAUM *et al.*, 2009; STONE *et al.*, 2009; GILBERT-LOPEZ *et al.*, 2010). Porém essa técnica não está disponível em todos os equipamentos de MS/MS comercializados por diferentes fabricantes.

2.4.2 Aplicação da técnica LC-MS/MS na determinação de resíduos de pesticidas em alimentos

Devido à necessidade de monitorizar um grande número de pesticidas e como a maioria dos pesticidas comercializados atualmente é mais fácil e eficientemente determinada pela LC-MS/MS utilizando o espectrômetro triplo quadrupolo, operado no modo MRM, ela tem sido a técnica mais utilizada em laboratórios oficiais e de rotina para análise de pesticidas em alimentos (CAMINO-SANCHEZ *et al.*, 2010; KANRAR; MANDAL; BHATTACHARYYA, 2010; KMELLAR *et al.*, 2010; DONG *et al.*, 2012).

Camino-Sanchez *et al.* (2010) utilizaram a LC-MS/MS para a determinação de resíduos de 69 pesticidas, em nove matrizes representativas (abobrinha, melão, pepino, melancia, tomate, alho, berinjela, alface e pimenta) selecionadas para investigar o efeito de diferentes matrizes na recuperação e precisão do método. Para isto, os autores empregaram o método de preparação de amostras QuEChERS e para a detecção um triplo quadrupolo (QqQ), em modo ESI e varredura MRM. O método proposto foi aplicado para a análise de 2203 amostras de vegetais a partir do cultivo em estufas, na província de Almería, na Espanha, durante um ano, sendo que 15% das amostras apresentaram resultados positivos para pelo menos um dos pesticidas analisados. O método foi validado e acreditado de acordo com o padrão internacional UNE-EN-ISO/IEC 17025:2005 (acreditação número 278/LE1027).

Kanrar, Mandal e Bhattacharyya (2010) validaram método para determinação de 42 pesticidas em chá, infusão de chá e em folhas para análise de rotina por cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS) utilizando MRM com 2 transições. O processo de extração utilizou mistura de acetato de etila + hexano (9:1, v/v), o *clean-up* foi realizado utilizando d-SPE com PSA + GCB + Florisil que proporcionou alta eficiência de limpeza e baixo efeito matriz, com recuperação satisfatória de 66 a 105%. A incerteza global foi determinada para todos os pesticidas no nível de 50 ng g⁻¹ de acordo com o procedimento estatístico do EURACHEM/CITAC Guia CG4 calculada em $\leq 20\%$, indicando adequação às exigências das normas internacionais.

Kmellar et al. (2010) realizaram um método *screening* para 300 pesticidas em amostras de 12 matrizes representativas de frutas e vegetais (tomate, maçã, alface, pepino, cenoura, cogumelo, uva; limão, pimenta, pera, batata e repolho) e a determinação e quantificação de 55 pesticidas em corrida posterior. Para a preparação da amostra foi utilizado QuEChERS com tampão acetato (AOAC Official Method 2.007,01) e para a detecção triplo quadrupolo (QqQ) em modo ESI e varredura MRM para os 55 pesticidas. Foram analisadas 200 amostras de frutas e legumes de mercados húngaros, e não foram encontrados resíduos de pesticidas em metade das amostras, mas 12 violações acima dos limites máximos de resíduos europeus foram detectadas.

Dong et al. (2012) desenvolveram método para determinação de cinco fungicidas pirazólicos em cereais (arroz e trigo), vegetais (pepino, tomate, alface), e frutas (maçã e uva). Foi utilizado o método de preparação de amostras QuEChERS e para *clean-up* das amostras de maçã, tomate e cereais utilizou-se C18 (50 mg), e GCB (25 mg) foi utilizado para limpeza das amostras de uva, pepino e alface. Para a quantificação e detecção empregou-se UHPLC, com triplo quadrupolo, em modo ESI positivo e negativo e varredura MRM.

2.5 Validação de métodos analíticos

A necessidade de comprovar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004). As agências reguladoras do Brasil e de outros países têm estabelecido guias de orientações oficiais que contêm as diretrizes a serem adotadas no processo de validação (CODEX ALIMENTARIUS, 2007; INMETRO, 2010; EUROPEAN COMMISSION, 2011) possibilitando a obtenção, de forma clara e objetiva, de evidências de que um método analítico é adequado para o uso desejado.

Para a confirmação que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar: métodos não normalizados; métodos criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório; métodos normalizados, usados fora dos escopos para os quais foram concebidos e ampliações e modificações de métodos normalizados (INMETRO, 2010).

2.5.1 Parâmetros de Validação

É necessário que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de multirresíduos. Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método. Por exemplo, se um método será usado para análise qualitativa em nível de resíduos, não há necessidade de testar e validar a linearidade do método sobre toda

a faixa linear dinâmica do equipamento. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros analíticos de validação (ou figuras de mérito) mais usados para avaliar métodos de separação são: seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez. (RIBANI et al., 2004; PASCHOAL et al., 2008; ANVISA, 2012).

2.5.1.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes existentes na amostra. Esses interferentes podem ser substâncias quimicamente relacionadas com o analito, entre elas isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, produtos de degradação, impurezas e outros (PASCHOAL et al., 2008).

Segundo o documento nº SANCO/12495/2011 da União Européia, a seletividade é a capacidade da extração, do *clean-up*, da derivatização, do sistema de separação e (especialmente) do detector de discriminar entre o analito e outros compostos (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

A seletividade precisa estar assegurada para que a linearidade, a exatidão e a precisão não sejam comprometidas. A seletividade de um método analítico pode ser avaliada de duas formas: primeiramente comparando-se a matriz isenta dos pesticidas com a matriz adicionada com os padrões dos pesticidas para verificar a existência de coeluição destes compostos junto a interferentes da matriz; e utilizando-se detectores modernos (arranjo de diodos e espectrômetros de massas) que permitem comparar o espectro do pico obtido na amostra com o espectro do padrão puro e, no caso da espectrometria de massas em série, é possível selecionar

as transições MRM entre os íons dos analitos e seus íons fragmentados específicos (RIBANI et al., 2004).

2.5.1.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de concentração (RIBANI et al., 2004).

A quantificação requer o conhecimento da dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = a + bx \quad (1)$$

sendo:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y, quando x = 0;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade (INMETRO, 2010).

O método é considerado mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (b) (INMETRO, 2010).

A partir da regressão linear, além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular o coeficiente de correlação linear (r). Este parâmetro permite avaliar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados, ou seja, indica o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático para o estudo de caso (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010)

A quantificação do composto de interesse na validação pode ser obtida através dos seguintes métodos: (a) padronização externa: compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão; (b) padronização interna: consiste na preparação de soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto chamado de padrão interno; (c) adição padrão: é realizada adicionando-se quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada às quantidades conhecidas da amostra, antes de seu preparo; (d) superposição da matriz (*matrix matched*), é a adição do padrão da substância de interesse, em diversas concentrações, em uma matriz similar à amostra e isenta dessa substância, denominada amostra "branco", relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões para a construção da curva (RIBANI et al., 2004).

O método de superposição de matriz pode ser utilizado para calibração, tanto com a padronização interna como com a padronização externa. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de extrema importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

2.5.1.3 Precisão

A precisão corresponde ao grau de concordância entre os resultados analíticos independentes obtidos através da aplicação do procedimento experimental sob condições previamente definidas e é expressa pelo coeficiente de variação (CV%) também conhecido como desvio padrão relativo (*relative standard deviation* - RSD). Para a validação de métodos em um único laboratório (*single-laboratory validation*), que é o enfoque deste trabalho, duas etapas são relevantes para esse parâmetro: precisão intra-ensaio: sob condições de repetitividade e, precisão inter-ensaios: descreve o grau de variações observadas em diferentes corridas analíticas (INMETRO, 2010; EUROPEAN COMMISSION, 2011).

O coeficiente de variação é calculado da seguinte forma:

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

DP = desvio-padrão;

CMD = concentração média determinada (INMETRO, 2010)

2.5.1.3.1 Repetitividade

As condições de repetitividade podem ser caracterizadas utilizando: mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob

mesmas condições; mesmo local, e repetições no menor espaço de tempo possível (INMETRO, 2010).

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito a branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho. O número de replicatas para cada nível de concentração deve expressar a rotina do laboratório (INMETRO, 2010).

2.5.1.3.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório (INMETRO, 2010).

É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004).

2.5.1.4 Exatidão

É o grau de concordância entre o resultado do teste e do verdadeiro, ou o aceito como valor de referência (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão (ou tendência) de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2010).

A limitação dos ensaios de recuperação é que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra. Isso pode implicar, por exemplo, na presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione melhor detecção, ocasionando avaliações excessivamente otimistas da recuperação. Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, o efeito matriz (EM) deve ser investigado. A recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse (RIBANI et al., 2004).

A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. Pode ser expressa como recuperação analítica, definida como (INMETRO, 2010):

$$\textit{Exatidão} = \textit{recuperação} = \frac{\textit{valor observado}}{\textit{valor esperado}} \times 100\% \quad (3)$$

O intervalo aceitável de recuperação para a análise de resíduos geralmente é de 70 a 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (EUROPEAN COMMISSION, 2011; ANVISA, 2012).

2.5.1.5 Limite de detecção

O limite de detecção (*limit of detection* - LD) é a menor concentração de um analito em uma matriz, onde uma identificação positiva e não quantitativa pode ser alcançada utilizando um método analítico validado (ANVISA, 2012).

O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

Pelo método baseado em parâmetros da curva analítica o limite de detecção pode ser expresso como:

$$LOD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (4)$$

onde:

s= é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica;

S= inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

2.5.1.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação (*limit of quantitation* - LQ) é a menor concentração de um analito em uma matriz, que pode ser quantificada e alcançada utilizando um método analítico validado (ANVISA, 2012).

Os mesmos critérios usados para a determinação do LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

Pelo método baseado em parâmetros da curva analítica o limite de quantificação pode ser expresso como:

$$LOQ = 10 \frac{s}{S} \quad (5)$$

onde:

s = é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica;

S = inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

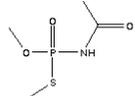
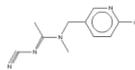
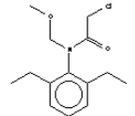
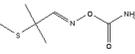
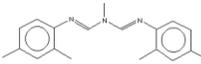
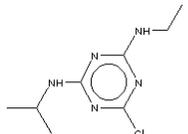
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pesticidas Seleccionados

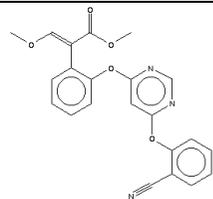
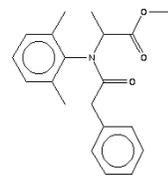
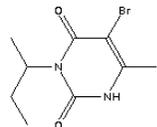
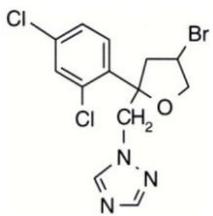
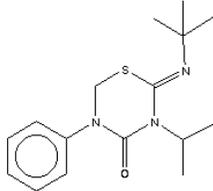
Neste estudo foram seleccionados 61 pesticidas de diferentes classes químicas que são frequentemente investigados em programas de monitorização de resíduos de pesticidas.

A Tabela 1 apresenta a classe, o grupo químico, massa molecular, pka, fórmula molecular e estrutural dos pesticidas em estudo.

Tabela 1 - Pesticidas estudados com classe e grupo químico, massa molecular, pka, fórmula molecular e estrutural

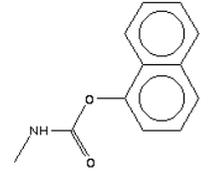
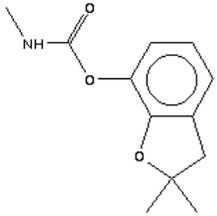
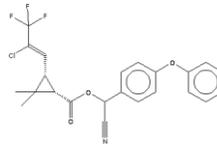
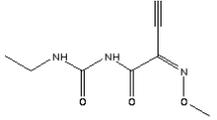
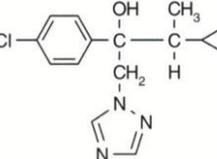
Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural
1 acefato	A, I	organofosforado	183,17	8,35	$C_4H_{10}NO_3PS$ [M+H] ⁺	
2 acetamiprido	I	neonicotinóide	222,67	0,7	$C_{10}H_{11}ClN_4$ [M+H] ⁺	
3 alacloro	H	cloroacetanilida	269,77	0,62	$C_{14}H_{20}ClNO_2$ [M+H] ⁺	
4 aldicarbe	A, I, N	metilcarbamato de oxima	190,26	N.D.	$C_7H_{14}N_2O_2S$ [M+Na] ⁺	
5 amitraz	A, I	amidina	293,41	9,8	$C_{19}H_{23}N_3$ [M+H] ⁺	
6 atrazina	H	triazina	215,68	1,7	$C_8H_{14}ClN_5$ [M+H] ⁺	

continua

							continuação
Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural	
7 azoxistrobina	Fu	estrobilurina	403,4	N.D.	$C_{22}H_{17}N_3O_5$ [M+H] ⁺		
8 benalaxil	Fu	acilalaninato	325,40	N.D.	$C_{20}H_{23}NO_3$ [M+H] ⁺		
9 bromacila	H	uracila	261,12	9,27	$C_9H_{13}BrN_2O_2$ [M+H] ⁺		
10 bromuconazol	Fu	triazol	377,06	2,75	$C_{13}H_{12}BrCl_2N_3O$ [M+H] ⁺		
11 buprofezina	A, I	tiadiazinona	305,44	N.D.	$C_{16}H_{23}N_3OS$ [M+H] ⁺		

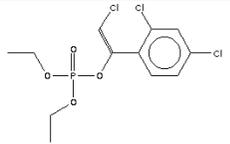
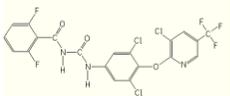
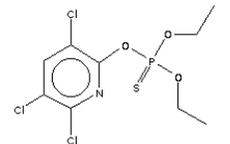
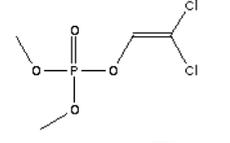
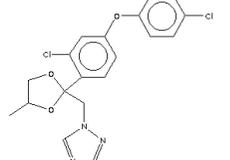
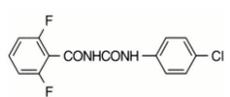
continua

continuação

Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural
12 carbaril	I	metilcarbamato de naftila	201,22	10,4	$C_{12}H_{11}NO_2$ [M+H] ⁺	
13 carbofurano	A, C, N, I	metilcarbamato de benzofuranila	221,26	N.D.	$C_{12}H_{15}NO_3$ [M+H] ⁺	
14 λ-cialotrina	I	piretróide	449,85	9	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$ [M+NH ₄] ⁺	
15 cimoxanil	Fu	acetamida	198,18	9,3	$C_7H_{10}N_4O_3$ [M+H] ⁺	
16 ciproconazol	Fu	triazol	291,78	N.D.	$C_{15}H_{18}ClN_3O$ [M+H] ⁺	

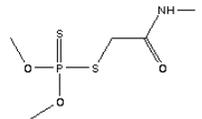
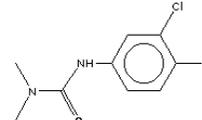
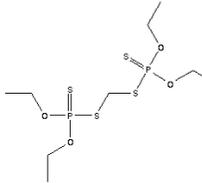
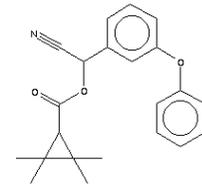
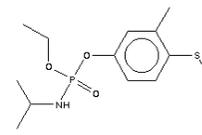
continua

continuação

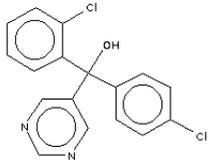
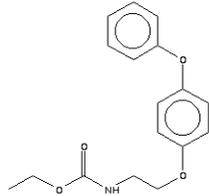
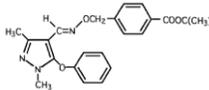
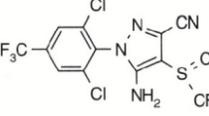
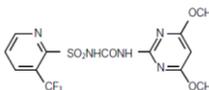
Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural
17 clorfenvinfós	A, I	organofosforado	359,6	*	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$ [M+H] ⁺	
18 clorfluazuron	I	benzoilurea	540,65	8,1	$C_{20}H_9Cl_3F_5N_3O_3$ [M+H] ⁺	
19 clorpirifos	A, Fo, I	organofosforado	350,89	N.D.	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ [M+H] ⁺	
20 diclorvós	I	organofosforado	220,98	N.D.	$C_4H_7Cl_2O_4P$ [M+H] ⁺	
21 difenoconazole	Fu	triazol	406,26	1,07	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$ [M+H] ⁺	
22 diflubenzurom	A, I	benzoiluréia	310,68	*	$C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$ [M+H] ⁺	

continua

continuação

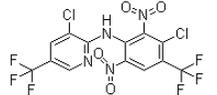
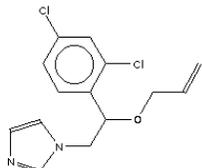
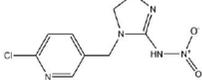
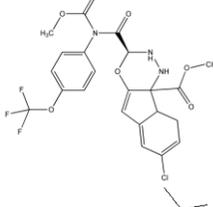
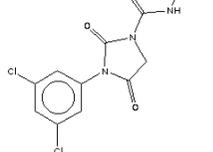
Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural
23 dimetoato	A, I	organofosforado	229,26	N.D.	$C_5H_{12}NO_3PS_2$ [M+H] ⁺	
24 diurom	H	uréia	233,09	N.D.	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$ [M+H] ⁺	
25 etiona	A, I	organofosforado	384,48	*	$C_9H_{22}O_4P_2S_4$ [M+H] ⁺	
26 fempropatrina	A, I	piretróide	349,42	*	$C_{22}H_{23}NO_3$ [M+H] ⁺	
27 fenamifós	N	organofosforado	303,36	N.D.	$C_{13}H_{22}NO_3PS$ [M+H] ⁺	

continua

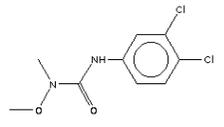
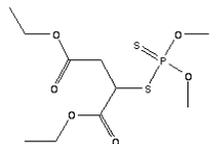
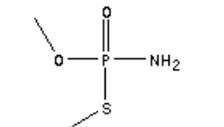
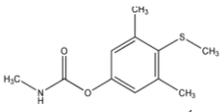
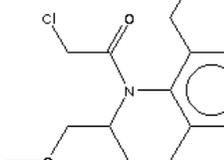
							continuação
Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural	
28 fenarimol	Fu	pirimidinil carbinol	331,20	*	$C_{17}H_{12}Cl_2N_2O$ [M+H] ⁺		
29 fenoxicarb	I	carbamato	301,34	N.D.	$C_{17}H_{19}NO_4$ [M+H] ⁺		
30 fempiroximato	A	pirazol	421,49	N.D.	$C_{24}H_{27}N_3O_4$ [M+H] ⁺		
31 fipronil	C, Fo, I	pirazol	437,15	N.D.	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ [M+H] ⁺		
32 flazassulfurom	H	sulfoniluréia	407,37	4,37	$C_{13}H_{12}F_3N_5O_5S$ [M+H] ⁺		

continua

continuação

Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural
33 fluazinan	Fu	fenilpiridinilamina	465,14	7,34	$C_{13}H_4Cl_2F_6N_4O_4$ [M-H] ⁻	
34 imazalil	Fu	imidazol	297,18	6,49	$C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$ [M+H] ⁺	
35 imidacloprido	I	neonicotinóide	255,66	N.D.	$C_9H_{10}ClN_5O_2$ [M+H] ⁺	
36 indoxacarbe	C, Fo, I	oxadiazina	527,83	N.D.	$C_{22}H_{17}ClF_3N_3O_7$ [M+H] ⁺	
37 iprodiona	Fu	dicarboximida	330,17	N.D.	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$ [M+H] ⁺	

continua

							continuação
Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural	
38 linuron	H	uréia	249,09	N.D.	$C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$ [M+H] ⁺		
39 malationa	A, I	organofosforado	330,36	N.D.	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$ [M+H] ⁺		
40 metamidofós	A, I	organofosforado	141,13	*	$C_2H_8NO_2PS$ [M+H] ⁺		
41 metiocarbe	I	metilcarbamato de fenila	225,31	N.D.	$C_{11}H_{15}NO_2S$ [M+H] ⁺		
42 metolacloro	H	cloroacetanilida	283,8	N.D.	$C_{15}H_{22}ClNO_2$ [M+H] ⁺		

continua

continuação

Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural
43 metribuzim	H	triazinona	214,29	0,99	$C_8H_{14}N_4OS$ [M+H] ⁺	
44 monocrotofós	A, I	organofosforado	223,16	*	$C_7H_{14}NO_5P$ [M+H] ⁺	
45 monurom	H	feniluréia	198,65	*	$C_9H_{11}ClN_2O$ [M+H] ⁺	
46 oxamil	A, N, I	carbamato	219,26	-2,11	$C_7H_{13}N_3O_3S$ [M+NH ₄] ⁺	
47 pirimetanil	Fu	anilinopirimidina	199,11	3,52	$C_{12}H_{13}N_3$ [M+H] ⁺	
48 pirimicarbe	I	dimetilcarbamato	238,39	4,4	$C_{11}H_{18}N_4O_2$ [M+H] ⁺	

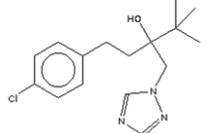
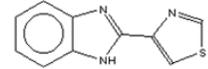
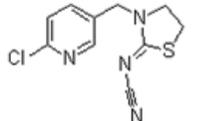
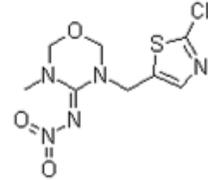
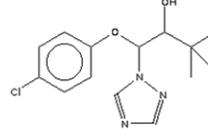
continua

continuação

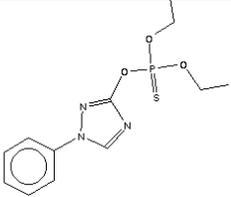
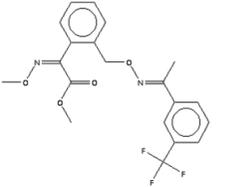
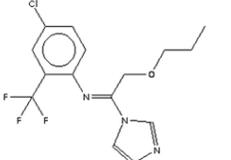
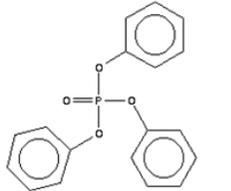
Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural	
49	pirimifós-metil	A, I	organofosforado	305,33	4,3	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$ [M+H] ⁺	
50	procimidona	Fu	dicarboximida	284,14	N.D.	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$ [M+H] ⁺	
51	procloraz	Fu	imidazolilcarboxamida	376,7	3,8	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$ [M+H] ⁺	
52	prometrina	H	triazina	241,36	4,1	$C_{10}H_{19}N_5S$ [M+H] ⁺	
53	propargito	A	sulfito de alquila	350,47	N.D.	$C_{19}H_{26}O_4S$ [M+NH ₄] ⁺	

continua

continuação

Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural
54 tebuconazol	Fu	triazol	307,82	*	$C_{16}H_{22}ClN_3O$ [M+H] ⁺	
55 tiabendazol	Fu	benzimidazol	201,25	4,73	$C_{10}H_7N_3S$ [M+H] ⁺	
56 tiacloprido	I	neonicotinóide	252,72	N.D.	$C_{10}H_9ClN_4S$ [M+H] ⁺	
57 tiametoxam	I	neonicotinóide	291,71	N.D.	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$ [M+H] ⁺	
58 triadimenol	Fu	triazol	295,76	N.D.	$C_{14}H_{18}ClN_3O_2$ [M+H] ⁺	

continua

							conclusão
Pesticida	Classe	Grupo químico	Massa Molecular	pka	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural	
59 triazofós	A, I, N	organofosforado	313,3	*	$C_{12}H_{16}N_3O_3PS$ [M+H] ⁺		
60 trifloxistrobina	Fu	estrobilurina	408,37	N.D.	$C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$ [M+H] ⁺		
61 triflumizol	Fu	imidazol	345,75	3,7	$C_{15}H_{15}ClF_3N_3O$ [M+H] ⁺		
SU trifenilfosfato		surrogate	326,29	*	$C_{18}H_{15}O_4P$ [M+H] ⁺		

N.D.: não ocorre dissociação SU: *surrogate* *: dados não disponíveis

A: Acaricida; C: Cupinicida; Fo: Formicida; Fu: Fungicida; H: Herbicida; I: Inseticida; N: Nematicida

Fonte: NIST, 2005; IUPAC, 2013; ANVISA, 2013

Na Tabela 2 são apresentados os LMR estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA), CODEX Alimentarius e pela União Européia para os pesticidas na cultura do tomate.

Tabela 2 - Limites máximos de resíduos para os pesticidas estudados segundo a ANVISA, CODEX e União Européia (mg kg⁻¹)

	Pesticida	LMR	LMR	LMR	LMR
		ANVISA	CODEX	U.E. 2008/9/10/11	U.E. atual
1	acefato	0,5	1	0,02	0,01
2	acetamiprido	0,5	n.a.	0,1	0,2
3	alacloro	n.a.	n.c.	0,1	0,01
4	aldicarbe	n.a.	n.a.	0,02	0,02
5	amitraz	n.a.	0,5	0,05	0,05
6	atrazina	n.a.	n.c.	0,05	0,05
7	azoxistrobina	0,5	n.a.	3,0	3,0
8	benalaxil	0,1	0,2	0,5	0,5
9	bromacila	n.a.	n.c.	n.c.	n.c.
10	bromuconazol	0,1	n.c.	0,05	0,05
11	buprofezina	0,5	1,0	1,0	1,0
12	carbaril	0,1	5,0	0,5	0,01
13	carbofurano	0,1	n.a.	0,02	0,01
14	λ-cialotrina	n.c.	n.a.	0,1	0,1
15	cimoxanil	0,1	n.c.	0,2	0,2
16	ciproconazol	n.a.	n.a.	0,05	0,05
17	clorfenvinfós	n.c.	n.c.	0,02	0,02
18	clorfluazuron	0,5	n.c.	n.c.	n.c.
19	clorpirifos	0,5*	n.a.	0,5	0,5
20	diclorvós	n.a.	n.a.	0,01	0,01
21	difenoconazole	0,1	0,5	2	2
22	diflubenzurom	0,5	n.a.	0,05	0,05
23	dimetoato	1,0	n.a.	0,02	0,02
24	diurom	n.a.	n.c.	0,1	0,01
25	etiona	2,0	n.a.	0,01	0,01

continua

					conclusão
26	fempropatrina	0,2	1,0	0,01	0,01
27	fenamifós	0,1	n.a.	0,05	0,04
28	fenarimol	n.a.	n.a.	0,5	0,02
29	fenoxicarb	n.c.	n.c.	0,05	0,05
30	femproximato	0,1	n.a.	0,2	0,2
31	fipronil	n.a.	n.a.	0,005	0,005
32	flazassulfurom	0,1	n.c.	0,01	0,01
33	fluazinan	1,0	n.c.	0,05	0,05
34	imazalil	n.a.	n.a.	0,5	0,5
35	imidacloprido	0,5	0,5	3	0,5
36	indoxacarbe	0,1	0,5	0,5	0,5
37	iprodiona	4,0	5,0	5	5
38	linuron	n.a.	n.c.	0,05	0,05
39	malationa	3,0	0,5	0,5	0,02
40	metamidofós	exc.	n.a.	0,01	0,01
41	metiocarbe	1,0	n.a.	0,2	0,2
42	metolacloro	n.a.	n.c.	0,05	0,05
43	metribuzim	0,1	n.c.	0,1	0,1
44	monocrotofós	exc.	n.c.		0,01
45	monurom	n.c.	n.c.	0,2	0,01
46	oxamil	exc.	2,0	0,02	0,02
47	pirimetanil	1,0	0,7	1,0	1,0
48	pirimicarbe	1,0	n.a.	1,0	1,0
49	pirimifos-metil	n.a.	n.a.	1,0	1,0
50	procimidona	2,0	n.c.	0,02	0,01
51	procloraz	0,5	n.a.	0,05	0,05
52	prometrina	n.a.	n.c.	n.c.	n.c.
53	propargito	2,0	2,0	2	2
54	tebuconazol	0,3	0,7	1,0	1,0
55	tiabendazol	n.a.	n.a.	0,05	0,05
56	tiacloprido	0,1	0,5	0,5	0,5
57	tiametoxam	1,0	n.a.	0,2	0,2
58	triadimenol	n.a.	n.a.	0,3	1,0
59	triazofós	0,5	n.a.	0,01	0,01
60	trifloxistrobina	0,5	0,7	0,5	0,5
61	triflumizol	n.a.	n.c.	1,0	1,0
SU	trifenilfosfato	-	-		

n.a.: não autorizado na cultura de tomate. n.c.: não consta

Fonte: (CODEX ALIMENTARIUS, 2013; EU Pesticides Database, 2013; ANVISA, 2013)

3.2 Equipamentos e Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho estão disponíveis no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo e foram os seguintes: balança semi-analítica (Gehaka BG4400); balança analítica de precisão (Shimadzu AX200); banho de ultrassom (Bandelin Sonorex RK510S); centrífuga (Hitachi CF16RXII); liquidificador com copo de vidro (Oster 600 W); sistema de purificação de água (Milli-Q®); pHmetro (MPA 270P Ação Científica); micropipeta de 10 – 100 µL (Eppendorf Research); micropipeta de 20 – 200 µL (Eppendorf Research) e micropipeta de 100 – 1000 µL (Eppendorf Research). Um sistema de filtração à vácuo de vidro (Millipore) e uma bomba de vácuo, modelo MZ 2C NT (Vacuubrand) foram utilizados para filtrar as fases móveis, empregando-se uma membrana de polietileno com 0,45 µm de porosidade (Millipore).

Nas análises foram utilizados os seguintes sistemas cromatográficos:

- 1) Sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo Líquido Agilent 1200 composto por: amostrador automático, bomba binária, forno para coluna e sistema de degaseificação;
- 2) Detector MS Triplo Quadrupolo 6430 LC/MS;
- 3) Sistema de aquisição de dados: software Agilent Massa Hunter.

Foi utilizada coluna Zorbax C18 50 mm × 2,1 mm e 1,8 µm de tamanho de partícula e filtro in-line RRLC 2 mm 0,2 µm do mesmo fabricante (Agilent).

3.3 Materiais e reagentes

Foram utilizados padrões analíticos dos pesticidas da ChemService, com 98,5 a 99,5% de pureza; acetonitrila (MeCN) HPLC/Spectro 99,9% (Tedia Company, INC); ácido acético 99,7% (Sinth); ácido fórmico 88% (90,1%) (J. T. Baker); kit QuEChERS: Tubo 1 de 50 mL com 6 g de sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) e 1,5 g de acetato de sódio anidro e Tubo 2 de 2 mL com 150 mg de $MgSO_4$ e 50 mg de PSA (N-Propiletilenodiaminossilano) (Thermo).

Para os testes de lavagem foram utilizados vinagre Acidez 4,0% (Castelo) e bicarbonato de sódio (Kitano Yoki Alimentos S.A.) para simular a higienização doméstica.

3.4 Preparo de soluções padrões

Primeiramente foram pesados 10 mg de cada padrão analítico e diluído em 10 mL de acetonitrila para preparação da solução estoque individual 1mg mL^{-1} . Estas soluções foram estocadas em freezer a $-18\text{ }^\circ\text{C}$.

A partir das soluções estoque foram feitas diluições em concentrações adequadas para preparar as soluções de trabalho empregadas na construção das curvas analíticas e na fortificação das amostras testemunhas. Estas soluções, principalmente as mais diluídas, permaneceram estáveis por um período de sete dias, se armazenadas adequadamente e refrigeradas a $-18\text{ }^\circ\text{C}$.

3.5 Seleção dos íons: precursor e produto

Para a seleção do íon precursor e dos íons produto foi realizada uma injeção de solução padrão de pesticida ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila) diretamente no espectrômetro de massas. Diferentes potenciais de fragmentação (de 50 a 200 V) e diferentes potenciais de colisão (de 0 a 120 V) foram testadas. Foi utilizado o software Mass Hunter Optimizer para a realização destes testes. A partir do íon precursor, duas diferentes transições de maior abundância foram selecionadas para quantificar e confirmar a resposta analítica, respectivamente.

Para esses testes as injeções foram feitas sem coluna para observar somente a ionização das transições selecionadas. As fases móveis foram água Milli-Q® com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila. A vazão foi de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ durante todo o processo e $10 \mu\text{L}$ de padrão foi injetado.

Para o processo de validação utilizou-se coluna Zorbax C18 $50 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$ e $1,8 \mu\text{m}$ de tamanho de partícula e as fases móveis empregadas foram água Milli-Q® com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B). A vazão foi de $0,35 \text{ mL min}^{-1}$, a temperatura da coluna 30°C e $2 \mu\text{L}$ de volume de injeção. O programa de gradiente iniciou com 20% de B, com gradiente linear até 90% de B em 10 min e então constante por 3 min. Após a corrida de 13 minutos o tempo de reequilíbrio (*post time*) foi de 7 min.

3.6 Análises LC

Primeiramente foi utilizada para as análises uma coluna C18 fase reversa de $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ e $5 \mu\text{m}$ de tamanho de partícula, mas se optou pela utilização de

uma coluna de tamanho de partícula menor. O emprego de partículas pequenas nas separações cromatográficas resulta em maior eficiência e possibilita a redução dos tempos de análise e menor consumo de solvente.

Para a transferência de um método com coluna convencional para coluna com partículas de diâmetro sub-2 μm a vazão, o perfil do gradiente e o volume de amostra injetado devem ser ajustados adequadamente (PEREIRA, 2008).

3.7 Condições MS/MS

Para a análise por espectrometria de massas foi utilizado um Espectrômetro Triplo Quadrupolo 6430 LC/MS. A fonte de ESI (electrospray ionization) foi operada no modo positivo de ionização e seus parâmetros foram: temperatura do gás a 350° C; vazão de gás de 11 L min^{-1} ; gás nebulizador a 43 psi e tensão capilar de 3500 V. O nitrogênio foi utilizado como nebulizador (grau técnico) e gás de colisão (6.0) e para a aquisição de dados foi utilizado o software Agilent Massa Hunter.

Para a detecção no MS/MS foi utilizado o modo DMRM, sendo necessário incluir no software os íons precursor e produto, energia de colisão e fragmentação, tempo de retenção dos analitos e delta RT (1,0 min) de cada analito.

3.8 Método de preparação de amostras QuEChERS

O método de preparação da amostra QuEChERS (LEHOTAY; MASTOVSKA; LIGHTFIELD, 2005) foi aplicado nas amostras de tomate orgânico (isento de

pesticidas) certificadas pelo Instituto Biodinâmico (IBD, 2013), utilizadas na validação do método e posteriormente nas amostras.

Após homogeneização completa da amostra (1 kg) em liquidificador, uma porção de 15 g de amostra foi pesada em béquer de 50 mL e adicionado em tubo de centrífuga de 50 mL (kit QuEChERS tubo 1) contendo 6 g de $MgSO_4$ e 1,5 g de acetato de sódio anidro. Em seguida, 15 mL de acetonitrila com 1% ácido acético foram adicionados e as amostras agitadas manualmente e vigorosamente por 5 min. O extrato foi então centrifugado (5000 rpm) por 5 min. Foi removido 1 mL do sobrenadante e adicionado em tubo de centrífuga de teflon de 2 mL, contendo 150 mg de $MgSO_4$ e 50 mg de PSA (kit QuEChERS tubo 2). O extrato foi agitado manualmente durante 1 minuto e centrifugado novamente por 5 min a 5000 rpm. A seguir, o sobrenadante foi transferido para vial de 2 mL e evaporado sob fluxo de nitrogênio e reconstituído em FM (acetonitrila/água (20/80 v/v) com 0,1% de ácido fórmico) para posterior análise. Antes da injeção no sistema LC-MS/MS, as amostras foram filtradas em filtros de teflon de 0,22 μm . Com este procedimento, 1 mL do extrato de amostra corresponde a 1 g de amostra.

3.9 Validação do método analítico

O método foi validado seguindo as diretrizes da ANVISA (2012) e da União Européia (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

3.9.1 Seletividade

Com a MS/MS é possível obter informação estrutural do analito, o que assegura sua identificação com maior exatidão do que quando ela é feita apenas com base nas características de retenção dos compostos analisados, como ocorre nas outras técnicas de detecção cromatográficas. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica empregada, é possível detectá-los individualmente se possuírem diferentes massas molares ou gerarem diferentes espectros de massas (VÉKEY, 2001)

No caso dos pesticidas estudados neste trabalho, todos apresentaram íons precursores, assim como íons produtos distintos uns dos outros, o que assegurou a seletividade do método.

3.9.2 Linearidade

Foi avaliada a linearidade das curvas analíticas a partir das soluções padrões preparadas em solvente e nos extratos da matriz tomate, nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura de pesticidas. A sequência analítica foi injetada 5 vezes. Para os cálculos da curva de linearidade, foi utilizado o procedimento chamado de Teste de Huber ($k=2$), onde há a rejeição dos dados anômalos permitindo uma equação que representa os dados experimentais com confiabilidade (VALENTE; AUGUSTO; RIEDO, 2003).

3.9.3 Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da reta de

regressão de calibração, conforme a equação 1 e é determinada simultaneamente com os testes de linearidade.

3.9.4 Efeito Matriz

Os estudos de linearidade também proporcionaram informações sobre o efeito matriz - EM (diminuição ou aumento do sinal cromatográfico), que foi obtido por meio de uma comparação entre as razões do *slope* dos padrões em solvente e em matriz, calculada conforme equação:

$$EM(\%) = 1 - \frac{(\text{slope curva matriz})}{(\text{slope curva solvente})} \times 100 \quad (6)$$

Segundo este cálculo, foi considerado diminuição/aumento de sinal leve os valores encontrados entre -20% e 20%, efeito médio quando atingiu valores entre -50% e -20% ou 20% e 50% e um forte sinal de supressão valores abaixo de -50% ou acima de 50% (KMELLAR et al., 2008).

3.9.5 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram avaliados pela curva analítica em matriz nas concentrações 0,0005; 0,001; 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. E foram calculados conforme equações 4 e 5.

3.9.6 Exatidão

Foram realizados estudos de recuperação para a determinação da exatidão em 3 níveis com 5 réplicas (EUROPEAN COMMISSION, 2011). Os valores das médias das recuperações devem estar na faixa de 70 - 120%.

O teste foi realizado com tomate orgânico e o procedimento de extração foi realizado conforme item 3.8. As amostras foram fortificadas com 30 μL e 300 μL da solução de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, correspondendo aos níveis 0,01 e 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e 150 μL da solução de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ correspondendo ao nível 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para uma maior interação entre os compostos e a matriz, o extrato fortificado foi deixado em banho de ultrassom por 15 minutos antes do processo de preparação da amostra.

3.9.9 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade dos resultados e precisão intermediária. Foi medida através do coeficiente de variação (CV%) entre as medições, conforme equação 2.

3.9.10 Estabilidade dos extratos

A estabilidade dos analitos no extrato foram investigados nas concentrações 0,1 e 0,5 mg kg^{-1} durante a validação do método (EUROPEAN COMMISSION, 2011). Após a injeção em LC-MS/MS foi determinado a recuperação e coeficiente de variação. Posteriormente, as soluções foram armazenadas em freezer à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e após

7 dias foram injetadas novamente em LC/MS-MS e determinados os mesmos parâmetros descritos acima. A estabilidade dos pesticidas foi determinada comparando-se as médias de recuperação de cada nível de fortificação através do teste t de Student a 99% ($t=3,36$).

3.10 Análise de amostras

Foram coletadas 58 amostras de supermercados e de um distribuidor do Ceasa e varejões da cidade de Piracicaba, SP, no período de fevereiro a maio de 2012, observando cuidadosamente a origem das amostras para evitar análise da mesma amostra comercializada em lugares diferentes. Segundo dados históricos (INMET, 2012) os meses de coleta coincidem com períodos de alta temperatura e de chuva intensa levando a uma maior incidência de pragas e doenças no tomate e maior uso de pesticidas na lavoura, além dos meses de fevereiro e março pertencerem à safra de verão e abril e maio à safra de inverno.

A fim de assegurar a confiabilidade dos resultados, um controle de qualidade foi usado quando o método proposto foi aplicado. Este controle de qualidade consistiu na calibração realizada na curva da matriz; injeção de um branco de matriz, a fim de eliminar falsos positivos por contaminação no processo de extração; e uma amostra fortificada na concentração de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, a fim de avaliar a recuperação do método proposto durante todo o processo de quantificação das amostras.

3.11 Testes de lavagem

Devido à incompatibilidade química entre alguns pesticidas estudados e sendo a mistura uma prática pouco adotada no campo, optou-se por fazer uma mistura de 8 pesticidas que foram encontrados abaixo do LMR nas amostras analisadas e alguns comumente utilizados na cultura do tomate.

Foi preparada uma solução padrão individual dos padrões: acetamiprido, azoxistrobina, diflubenzuron, dimetoato, fipronil, imidacloprido, procimidona e tiametoxam na concentração de 1000 mg mL^{-1} em acetonitrila. Uma solução intermediária da mistura dos padrões individuais foi preparada adicionando $500 \mu\text{L}$ de cada solução estoque avolumadas com 10 mL de acetonitrila, resultando em solução de concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e mantida em freezer a -18°C antes do uso. A partir desta solução foi construída a curva analítica nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os testes de lavagem foram baseados nos estudos de Abou-Arab (1999) e Zhang, Liu e Hong (2007). Os produtos formulados na concentração de 50 mg kg^{-1} foram diluídos em 2 litros de água de torneira e 1 kg de tomate orgânico permaneceu na solução por 20 minutos para a contaminação das amostras.

Os seguintes produtos comerciais foram usados: Convence (contendo 200 g/L de acetamiprido), Amistar WG (contendo 500 g/kg de azoxistrobina), Dimax 480 SC (contendo 480 g/L de diflubenzuron), Perfekthion 400 (contendo 400 g/L de dimetoato), Regent 800 WG (contendo 800 g/kg de fipronil), Confidor 700 WG (contendo 700 g/kg de imidacloprido), Sumilex 500 WP (contendo 700 g/kg de procimidona) e Actara 750 (contendo 750 g/kg de tiametoxam).

Com base nos objetivos e no delineamento experimental definido nas fases que antecederam a implantação do experimento, foi adotada a técnica de análise de

variância (McCULLAGH; NELDER, 1989; LITTELL et al., 2006), com modelo apropriado para experimentos com um fator (One-way ANOVA) e para a execução das comparações múltiplas de média, foi selecionado “a priori” o teste de Tukey-Kramer (HSU, 1996).

A análise de variância permitiu testar a existência de efeito do único fator em estudo (método de Lavagem) na quantidade de resíduo de 8 pesticidas, após o processo de lavagem. Uma vez detectado efeito significativo, o teste de Tukey-Kramer permitiu a comparação das médias da quantidade de resíduos entre os métodos de lavagem, dois a dois, permitindo uma maior especificação das diferenças encontradas.

A validação do modelo de análise de variância foi feita por meio da avaliação da normalidade residual, a qual foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk e pelos coeficientes de assimetria e curtose (SHAPIRO; WILK, 1965).

Em todos os testes estatísticos foi adotado o nível de significância de 5% e os cálculos foram efetuados com uso do sistema SAS (SAS, 2009).

O uso dos modelos lineares generalizados admite uma série de características no modelo que vão além da questão antes avaliada, a de que o modelo era aplicável em função do delineamento experimental, sendo assim além do modelo ser apropriado para experimentos com um fator (One-Way ANOVA), na técnica atual pode-se introduzir modificações com objetivo de fazer com que o modelo mais se adapte aos dados e, com vistas a se garantir um modelo ótimo, avalia-se o requisito de que em um modelo ótimo, os erros devam ser aderentes à distribuição Gaussiana.

3.11.1 Tomate inteiro sem lavagem

Os tomates contaminados com a solução de produtos formulados (1 kg) foram secos em temperatura ambiente por 25 minutos, cortados e triturados em liquidificador. Em seguida, foi transferido aproximadamente 200 g para recipiente de vidro (em duplicata), sendo uma fração analisada imediatamente e a duplicata armazenada em freezer à temperatura de -18°C para posterior reanálise, se necessário.

3.11.2 Tomate inteiro com lavagem em água

Após a primeira secagem (25 minutos), os tomates contaminados foram deixados de molho em água da torneira por 20 minutos, após foram secos em temperatura ambiente por mais 25 minutos, cortados e triturados em liquidificador. Em seguida, foi transferido aproximadamente 200 g para recipiente de vidro (em duplicata), sendo uma fração analisada imediatamente e a duplicata armazenada em freezer à temperatura de -18°C para posterior reanálise.

3.11.3 Tomate inteiro com lavagem em solução 10% vinagre

Foi preparada uma solução contendo 200 mL de vinagre de vinho tinto em 2 L de água da torneira e após a primeira secagem, os tomates contaminados foram deixados de molho em solução de vinagre ($\text{pH} = 3,64$) por 20 minutos, após foram secos em temperatura ambiente por mais 25 minutos, cortados e triturados em liquidificador. Em seguida, foi transferido aproximadamente 200 g para recipiente de vidro (em duplicata), sendo uma fração analisada imediatamente e a duplicata armazenada em freezer à temperatura de -18°C para posterior reanálise.

3.11.4 Tomate inteiro com lavagem em solução 10% bicarbonato de sódio

Foi preparada uma solução contendo 200 g de bicarbonato de sódio em 2 L de água da torneira e após a primeira secagem, os tomates fortificados foram deixados de molho em solução de bicarbonato (pH= 8,28) por 20 minutos, após foram secos em temperatura ambiente por mais 25 minutos, cortados e triturados em liquidificador. Em seguida, foi transferido aproximadamente 200 g para recipiente de vidro (em duplicata), sendo uma fração analisada imediatamente e a duplicata armazenada em freezer à temperatura de -18°C para posterior reanálise.

3.12 Casca e polpa

Os tomates fortificados com a solução de produtos formulados (1 kg) foram secos em temperatura ambiente por 25 minutos, após a casca foi retirada em pequenos pedaços com faca e triturada em *ultraturrax*. Em seguida, foi transferido aproximadamente 200 g para recipiente de vidro (em duplicata), sendo uma fração analisada imediatamente e a duplicata armazenada em freezer à temperatura de -18°C para posterior reanálise.

Para a avaliação da polpa foi utilizado o mesmo procedimento e a polpa foi cortada, tomando cuidado para não contaminar a polpa com a casca, e triturada em liquidificador. Em seguida, foi transferido aproximadamente 200 g para recipiente de vidro (em duplicata), sendo uma fração analisada imediatamente e a duplicata armazenada em freezer à temperatura de -18°C para posterior reanálise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização dos parâmetros do MS/MS

Na LC-MS/MS, graças à seletividade do sistema de detecção, é possível identificar os pesticidas sem que estes estejam necessariamente separados, isto é, possuam tempos de retenção distintos. Desta maneira, como o modo de varredura utilizado foi o DMRM, inicialmente foram otimizados os parâmetros do espectrômetro de massas para obtenção do íon precursor e do íon produto mais abundante de cada pesticida conforme descrito no item 3.5. As energias de fragmentação e colisão e os íons monitorados para cada composto estão listados na Tabela 3.

É importante que todos os parâmetros sejam otimizados para que os compostos possam ser analisados em uma única análise proporcionando economia de custos e tempo. As transições e energias de alguns produtos foram otimizadas manualmente, uma vez que o software Mass Hunter Optimizer não apresentou fragmentação com abundância suficiente para a sua identificação e quantificação.

A adição de ácido fórmico na FM, fez com que a ionização dos pesticidas ocorresse no modo positivo, isto é, foram formados íons $[M + H]^+$, exceto para o aldicarbe ($[M+Na]^+$), λ -cialotrina ($[M+NH_4]^+$), oxamil ($[M+NH_4]^+$) e propargito $[M+NH_4]^+$, conforme mostrado na Tabela 1. Testes realizados com adição de formiato de amônio não melhoraram significativamente a ionização destes compostos, por isso se optou por usar como único aditivo o ácido fórmico.

Tabela 3 - Tempo de retenção dos compostos (t_R), íon precursor (ip) e íon de quantificação (iq), íon precursor e íon qualificador (igual), potencial de fragmentação, e potencial de colisão da transição 1 e 2

Pesticida	t_R (min)	Quantificação ip/ iq (1)	Confirmação ip/ igual (2)	Potencial frag (V)	Potencial Colisão 1 (V)	Potencial Colisão 2 (V)
acefato	0,54	184/142,9	184/125	55	0	20
acetamiprido	2,42	223,1/126	223,1/99	90	20	39
alacloro	8,4	270,1/238,1	270,1/162,1	80	4	19
aldicarbe	3,77	213/89,1	213/116	110	10	5
amitraz	*	294,2/163,1	294,2/122,1	*	*	*
atrazina	5,6	216,1/174	216,1/104	120	16	32
azoxistrobina	7,8	404,1/372	404,1/344,1	100	8	24
benalaxil	9,0	326,2/148,1	326,2/294,1	100	16	4
bromacila	4,2	261/204,9	261/188	70	9	26
bromuconazol	7,66	376/158,9	376/89	130	24	104
buprofezina	8,0	306,2/116	306,2/201	90	12	8
carbaril	5,8	202,1/145	202,1/127	55	0	28
carbofurano	5,4	222,1/165	222,1/123	70	8	20
λ -cialotrina	*	467,1/225,0	467,1/141,2	*	*	*
cimoxanil	2,8	199,1/128	199,1/83	50	0	12
ciproconazole	7,3	292,1/70,1	292,1/125	110	16	32
clorfenvinfos	8,8	359/155	359/169,9	85	4	52
clorfluazuron	11,6	540/382,9	540/158	125	20	16
clorpirifos	11,2	349,9/96,9	349,9/197,9	90	24	16
diclorvos	4,8	221/109	221/95	95	12	32
difenoconazole	9,2	406,1/250,9	406,1/188	120	24	52
diflubenzurom	8,2	311/158	311/141	120	10	35
dimetoato	2,06	230/198,9	230/124,9	60	4	20

continua

						continuação
diurom	6,1	233/72	233/159,9	100	20	24
etiona	11,3	385/199	385/142,9	85	0	20
fempropatrina	11,1	350,2/97	350,2/125,1	75	34	8
fenamifos	7,6	304,1/216,9	304,1/201,9	110	20	36
fenarimol	7,8	331/189	331/111	140	52	64
fenoxicarb	8,5	302,1/116	302,1/256,1	90	4	8
fenpiroximato	11,5	422,2/366,1	422,2/138	110	8	32
fipronil	9,0	437/368,2	437/314,9	130	13	25
flazassulfurom	6,9	408,1/182	408,1/139	110	12	40
fluazinan	*	462,9/415,8	462,9/397,9	*	*	*
imazalil	*	297,0/158,9	297,0/200,9	*	*	*
imidacloprido	1,8	256,1/209	256,1/175,1	90	12	16
indoxacarbe	10,1	528,1/202,9	528,1/149,9	110	40	20
iprodivona	8,3	330/245	n.a	90	10	n.a
linurom	7,3	249/159,9	249/132,9	100	12	36
malationa	8,4	331,1/127	331,1/284,9	70	8	0
metamidofós	0,5	142/94	142/125	70	10	8
metiocarbe	7,2	226,1/169	226,1/121	60	4	16
metolacoloro	8,3	284,1/252,1	284,1/176,1	80	12	24
metribuzim	4,6	215,1/187,2	215,1/74	85	13	36
monocrotofos	0,7	224,1/193	224,1/127	60	0	12
monurom	4,5	199,1/126	199,1/99	85	24	40
oxamil	0,7	237/72,1	237/90,1	60	15	0
pirimetanil	4,2	200,1/107	200,1/181,1	150	21	47
pirimicarbe	1,1	239,1/182,1	239,1/72	90	12	20
pirimifos-metil	8,0	306,1/201,1	306,1/106	90	8	24
procimidona	8,3	284/133	284/145	95	51	45

continua

						conclusão
procloraz	7,5	376/307,9	376/70	85	4	24
prometrina	5,4	242,1/158	242,1/200	120	20	16
propargito	*	368,1/175,1		*	*	*
tebuconazol	8,0	308,2/70	308,2/125	120	16	40
tiabendazol	0,7	202/175	202/131	140	24	36
tiacloprido	4,0	253/126	253/90	95	16	28
tiametoxam	1,1	292/211	292/181	70	4	20
triadimenol	7,0	296,1/70,1	296,1/227	60	5	1
triazofos	8,5	314,1/162	314,1/119	100	16	36
trifenilfosfato	9,3	327,1/77	327,1/152	165	48	40
trifloxistrobina	10,2	409,1/186	409,1/145	85	12	52
triflumizol	8,3	346,1/277,9	346,1/73	70	3	8

*não ocorreu fragmentação adequada.

Dos 61 pesticidas analisados, 57 apresentaram parâmetros de fragmentação adequados para identificação, e 46 foram qualificados para as análises de acordo com os parâmetros de validação. No caso da iprodiona houve apenas uma transição, sob as condições estudadas, tornando difícil sua identificação.

4.2 Análises LC-MS/MS

Após a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas, foi realizado o acoplamento ao sistema cromatográfico para a otimização da separação cromatográfica. Devido à seletividade do detector, foi necessário apenas otimizar um gradiente que garantisse uma maior detectabilidade dos pesticidas analisados e

possibilitasse que o equilíbrio da coluna fosse restabelecido entre injeções consecutivas, para que os tempos de retenção fossem reproduzíveis. Os tempos de retenção estão apresentados na Tabela 3 e o cromatograma obtido, utilizando-se as condições analíticas conforme item 3.6, encontra-se na Figura 1.

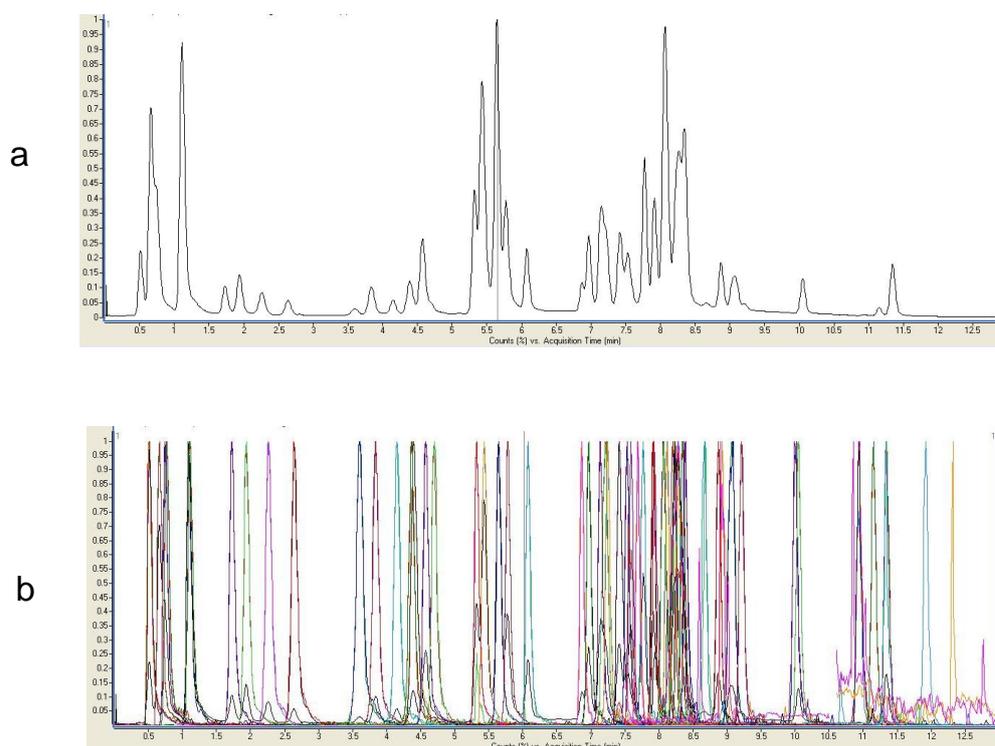


Figura 1 - a) Cromatograma de íon total, b) Transições dos 46 compostos analisados no modo MRM dinâmico

Em métodos multirresíduo algumas dificuldades relacionadas à identificação podem ocorrer devido à presença de isômeros, íons precursores idênticos, ou transições comuns. Neste estudo, o bromuconazole apresentou pico duplo por ser uma mistura de dois isômeros e sua quantificação foi feita para a mistura e não para cada um separadamente.

Os produtos cimoxanil e monurom apresentaram o mesmo íon precursor (199,1 m/z), porém diferentes tempos de retenção (2,8 e 4,5 min) não interferindo em sua identificação. Já no caso de procimidona e metolaclor (284 m/z) e pirimifós-metil e buprofezina (306 m/z), embora o tempo de retenção seja o mesmo, os íons quantificadores e qualificadores são diferentes proporcionando uma correta identificação.

4.3 Condições Cromatográficas

Como mencionado no item 3.6, o uso de colunas recheadas com partículas de tamanho inferior a 2 μm , tem se tornado uma tendência mundial, devido ao aumento expressivo na eficiência de separação dos analitos. Como benefícios, não há somente o aumento da eficiência, mas também o tempo total de análise é reduzido, e se obtém melhor detectabilidade (PLUMB et al., 2004), além de economia de solvente.

Foram calculados os novos parâmetros para transferência de coluna C18 de 150 mm \times 4,6 mm e 5 μm de tamanho de partícula para coluna de 50 mm \times 2,1 mm e 1,8 μm de tamanho, de acordo com Pereira (2008) e a vazão foi otimizada para 0,35 mL min^{-1} e volume de injeção de 2 μL .

A utilização de colunas de UHPLC forneceu vantagens significativas com relação à seletividade, detectabilidade e tempo das análises, e seu uso apresentou uma ótima performance mesmo sendo utilizada em um equipamento usual (Agilent 1200 LC System) onde a pressão máxima de trabalho é de 400 bar. Testes realizados com coluna de 150 mm \times 4,6 mm e 5 μm resultaram em corrida de 35 min, *post time* de 12 min e vazão de 0,6 mL min^{-1} .

4.4 Método de preparação de amostras QuEChERS

Os cromatogramas mostram que, mesmo na presença da matriz, foi possível detectar os pesticidas pelas transições selecionadas no modo DMRM, empregando as condições otimizadas descritas no item 3.7 e o método de preparação da amostra descrita no item 3.8.

Frenich et al. (2008) propuseram a eliminação da etapa de *clean-up* do método QuEChERS, com consequente redução do tempo de preparo da amostra, usando UHPLC-MS/MS com uma interface electrospray (ESI) para a determinação de 53 pesticidas multiclases em matrizes representativas de frutas e hortaliças. Neste trabalho, foi testada a extração com eliminação do *clean-up* e embora essa extração tenha apresentado resultados satisfatórios de recuperação optou-se pela realização do procedimento com *clean-up*, pois o sistema apresentou elevação rápida de pressão após poucas injeções, sugerindo que os interferentes presentes no extrato possam causar entupimento e perda da eficiência cromatográfica da coluna.

4.5 Validação do método analítico

4.5.1 Seletividade

Conforme mostrado no item 4.1, foram selecionadas as transições entre o íon precursor e o respectivo íon produto de maior intensidade dos pesticidas estudados, para que pudesse ser realizada a identificação e a quantificação destes pesticidas baseadas nestas transições. No caso dos pesticidas estudados neste trabalho, todos

apresentaram íons precursores, assim como íons produtos distintos uns dos outros, o que assegura a seletividade do método.

Foram analisados extratos “branco” da matriz (sem adição de pesticidas) e extratos fortificados com os 46 pesticidas. A amostra de tomate, apesar de possuir uma composição complexa, não apresentou interferentes nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados o que torna a metodologia seletiva. Na Figura 2 são apresentados os cromatogramas obtidos por LC-MS/MS do extrato da matriz “branco” reagente (onde foi realizado todo o processo de preparação de amostra mas sem adição da matriz) e “branco” matriz e a Figura 3 os cromatogramas de soluções analíticas preparadas em FM e no extrato “branco” fortificado da matriz na concentração de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

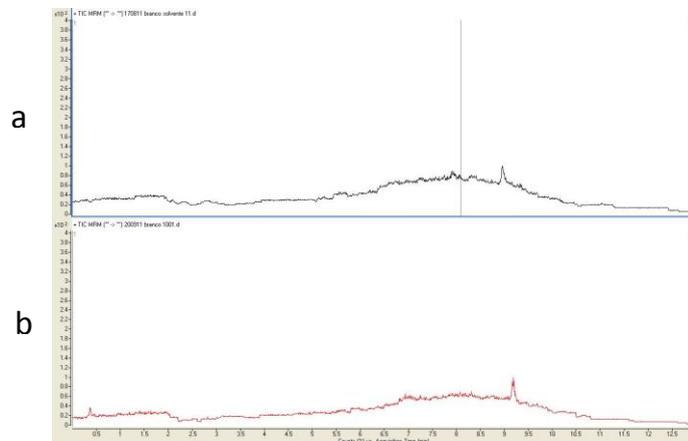


Figura 2 - a) Cromatogramas do “branco” reagente e b) “Branco” matriz

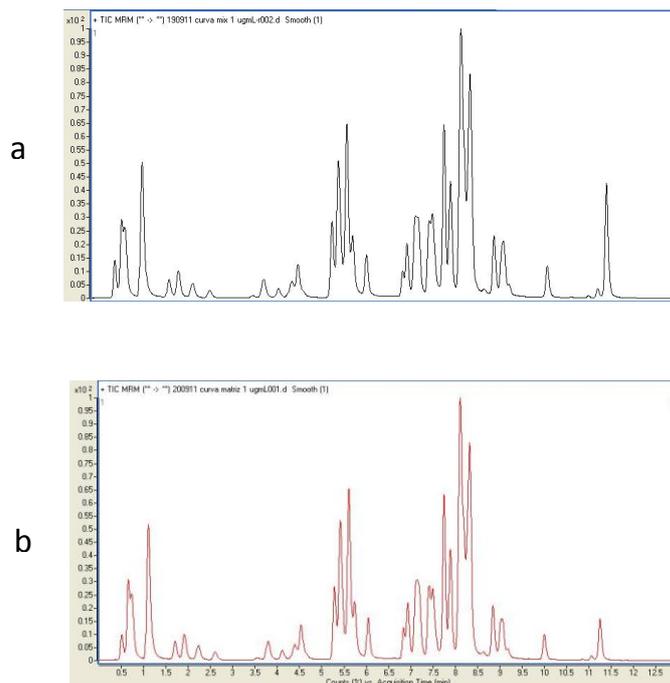


Figura 3 - a) Cromatogramas dos pesticidas em solvente (fase móvel) e b) em “branco” da matriz, ambos na concentração de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$

4.5.2 Linearidade, sensibilidade e efeito matriz

Foram construídas as curvas analíticas a partir de padrões puros dos pesticidas diluídos em fase móvel, ou seja, por padronização externa sem superposição de matriz e a partir da adição dos padrões no extrato da matriz, ou seja, padronização externa com superposição de matriz, nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos 46 pesticidas em cinco replicatas. A Figura 4 apresenta as curvas obtidas para os pesticidas oxamil, pirimifós-metil, diflubenzurom e fenoxicarb.

Foram calculados os coeficientes angular e linear e coeficiente de correlação linear (r) aplicando-se o teste de Huber ($k=2$) utilizando o programa Excel. Pode ser

observado que o intervalo de trabalho escolhido apresentou excelente relação linear com o sinal analítico, indicado pelos valores de coeficiente de correlação linear maiores que 0,99, de maneira que o método pode ser considerado linear de acordo com as normas da ANVISA (2012). Do mesmo modo, apresentou boa sensibilidade, pois os coeficientes angulares das retas apresentaram valores elevados (Tabela 4).

Com base nas curvas analíticas da Figura 4 pode-se observar que a reta obtida pelo método de padronização externa com superposição de matriz não é paralela à reta obtida quando se utilizou padronização externa sem superposição de matriz para alguns dos pesticidas estudados. Estes desvios observados nas retas obtidas podem ser atribuídos ao efeito causado pela presença da matriz na fonte de ionização, o que afeta a obtenção dos íons dos pesticidas. O EM foi calculado para os 57 pesticidas com fragmentação adequada, conforme descrito no item 3.9.4 e está apresentado na Tabela 4. Deste modo, para a correção dos efeitos da matriz sobre os sinais dos analitos, foi utilizado o método de padronização com superposição da matriz para a quantificação dos pesticidas. Dos 46 pesticidas que obtiveram recuperação e coeficiente de variação dentro da faixa aceitável, 85% apresentaram efeito matriz leve e 15% efeito médio.

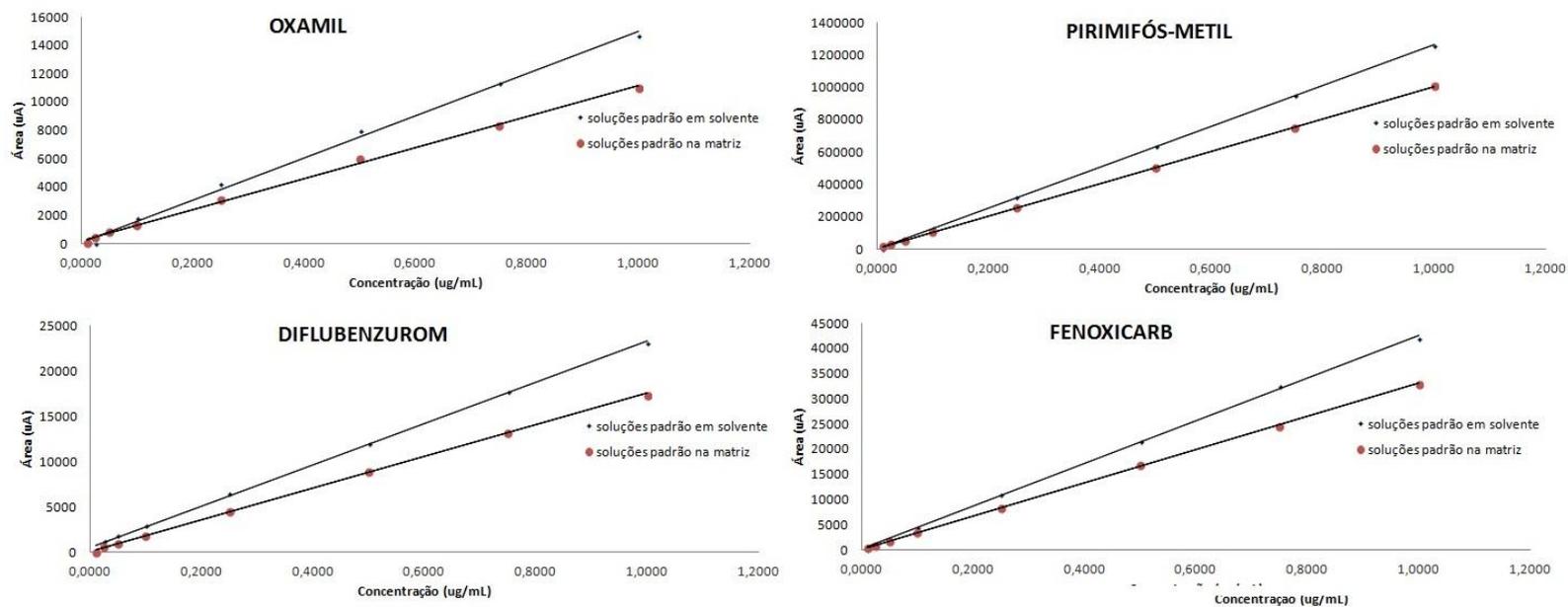


Figura 4 - Curvas analíticas obtidas para alguns dos pesticidas estudados (oxamil, pirimifós-metil, diflubenzurom e fenoxicarb) por padronização externa sem e com superposição de matriz (solvente e na matriz) utilizando LC-MS/MS

Tabela 4 - Valores do coeficiente angular, linear e de correlação linear (r) dos pesticidas em solvente (fase móvel) e na matriz (tomate), e efeito matriz

Produto	solvente			matriz			EM
	Coef angular	Coef linear	r	Coef angular	Coef linear	r	
acefato	117619,2	3581,00	0,99941	99169,71	1702,70	0,99977	-15,69
acetamiprido	80426,5	-779,91	0,99990	69567,08	130,03	0,99985	-13,50
alaclopro	26925,2	225,01	0,99965	23770,59	241,73	0,99945	-11,72
aldicarbe	19928,0	200,49	0,99977	18746,45	378,62	0,99987	-5,93
atrazina	1080818,9	-59,52	0,99999	913840,96	2536,92	0,99994	-15,45
azoxistrobina	652207,5	7115,69	0,99976	535047,77	5086,54	0,99992	-17,96
benalaxil	229391,3	411,41	0,99995	194990,96	434,03	0,99997	-15,00
bromacila	49639,2	-135,83	0,99999	40175,53	105,34	0,99999	-19,06
bromuconazol	84159,4	50,47	0,99997	70690,72	6,86	0,99988	-16,00
buprofezina	254374,2	53,98	0,99999	202606,91	574,91	0,99978	-20,35
carbaril	146678,0	765,83	0,99996	129582,76	869,43	0,99977	-11,65
carbofurano	251809,6	862,34	0,99998	203016,48	1371,15	0,99992	-19,38
cimoxanil	52152,7	-462,89	0,99990	46871,83	77,79	0,99959	-10,13
ciproconazole	384436,8	-289,88	0,99999	313861,47	574,77	0,99997	-18,36
clorfenvifós	9551,6	40,74	0,99974	8102,05	15,59	0,99983	-15,18
clorfluazurom	4766,1	-49,28	0,99913	872,04	60,66	0,91942	-81,70
clorpirifós	7917,8	34,79	0,99998	4128,25	239,51	0,99458	-47,86
diclorvós	22859,8	-38,96	0,99997	19944,17	109,28	0,99992	-12,75
difenoconazole	620153,0	-1275,49	0,99998	450430,34	-3438,73	0,99992	-27,37
diflubenzurom	22431,9	701,49	0,99995	17307,65	165,85	0,99996	-22,84
dimetoato	98334,6	-64,57	0,99997	79281,82	299,58	0,99999	-19,38
diuron	185607,5	1854,04	0,99987	153347,52	1314,39	0,99990	-17,38

continua

continuação

etiona	32077,9	25,88	0,99989	17782,12	-328,30	0,99707	-44,57
fempiroximato	834088,4	354,71	0,99993	279098,41	-4567,89	0,99694	-66,54
fempropatrina	3552,4	32,39	0,99998	2127,29	265,60	0,99105	-40,12
fenamifós	159619,3	-28,08	0,99997	129687,74	401,28	0,99993	-18,75
fenarimol	33747,1	-53,39	0,99999	28530,66	19,78	0,99996	-15,46
fenoxicarb	42146,9	325,90	0,99978	32849,82	177,89	0,99990	-22,06
fipronil	6312,6	-4,05	0,99989	5359,23	28,17	0,99886	-15,10
flazassulfurom	79930,8	638,00	0,99993	69576,51	268,96	0,99983	-12,95
imidacloprido	43410,9	-67,05	0,99995	37833,25	183,02	0,99999	-12,85
indoxacarbe	10780,3	0,80	0,99996	7892,76	-47,77	0,99942	-26,79
iprodiona	15069,1	21,71	0,99999	11926,96	158,55	0,99987	-20,85
linuron	29035,4	62,14	0,99999	24371,49	194,85	0,99981	-16,06
malationa	57726,6	511,58	0,99968	48871,19	458,29	0,99957	-15,34
metalocloro	295343,1	1261,55	0,99999	245539,59	1291,49	0,99990	-16,86
metamidofós	36844,9	64,69	0,99976	31701,99	232,25	0,99971	-13,96
metiocarbe	188261,9	1176,38	0,99991	157755,10	1319,53	0,99990	-16,20
metribuzim	203041,9	63,39	0,99999	175693,06	291,64	0,99998	-13,47
monocrotofós	129239,5	-434,94	0,99999	109041,60	680,03	0,99966	-15,63
monurom	11933,9	72,27	0,99991	10802,74	97,05	0,99987	-9,48
oxamil	14444,0	424,70	0,99923	10806,67	277,53	0,99944	-25,18
pirimetanil	112636,2	-202,25	0,99998	100404,17	199,95	0,99997	-10,86
pirimicarbe	430775,3	-757,62	0,99999	366432,44	249,03	0,99988	-14,94
pirimifós-metil	1258260,2	2162,86	0,99997	1001768,89	3414,65	0,99997	-20,38
procimidona	6992,9	113,83	0,99925	5266,21	105,97	0,99991	-24,69
procloraz	351024,7	146,09	0,99997	283186,58	1371,34	0,99997	-19,33
prometrina	658935,0	-2844,21	0,99996	553328,50	-297,26	0,99988	-16,03
tebuconazol	419399,3	-829,31	0,99997	346904,02	-19,07	0,99988	-17,29

continua

							conclusão
tiabendazol	401913,2	-694,34	0,99998	388470,07	933,40	0,99997	-3,34
tiacloprido	86627,4	-586,97	0,99998	73933,94	317,83	0,99997	-14,65
tiametoxam	23544,2	-198,82	0,99995	19941,46	207,01	0,99979	-15,30
triadimenol	257801,4	-602,92	0,99998	213194,71	232,09	0,99994	-17,30
triazofós	655971,9	6149,38	0,99987	533293,65	5215,22	0,99991	-18,70
trifenilfosfato	42837,3	1595,55	0,99997	34627,77	647,22	0,99983	-19,16
trifloxistrobina	170549,4	1389,46	0,99986	129591,20	20,99	0,99997	-24,02
triflumizol	403033,5	3056,46	0,99988	301848,40	1178,00	0,99985	-25,11

4.5.3 Limite de detecção e quantificação

Foram calculados o LD e o LQ para os pesticidas estudados conforme item 3.9.5. Os coeficientes linear e angular das curvas analíticas, confeccionadas para realização dos cálculos de LD e LQ, bem como os valores obtidos, estão apresentados na Tabela 5.

Os valores de LD e LQ mostram que os pesticidas estudados tiveram boa detectabilidade no sistema LC-MS-MS utilizando o método QuEChERS.

Tabela 5 - Valores do coeficiente angular, linear e de correlação linear (r) dos pesticidas na matriz (tomate), Limite de detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ)

Produto	matriz			LD	LQ
	Coef angular	Coef linear	r	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹
acefato	99169,71	1702,70	0,99977	0,002	0,01
acetamiprido	69567,08	130,03	0,99985	0,001	0,004
alacloro	23770,59	241,73	0,99945	0,02	0,05
aldicarbe	18746,45	378,62	0,99987	0,003	0,01
atrazina	913840,96	2536,92	0,99994	0,0005	0,002
azoxistrobina	535047,77	5086,54	0,99992	0,001	0,004
benalaxil	194990,96	434,03	0,99997	0,001	0,004
bromacila	40175,53	105,34	0,99999	0,003	0,01
bromuconazol	70690,72	6,86	0,99988	0,004	0,01
buprofezina	202606,91	574,91	0,99978	0,003	0,009
carbaril	129582,76	869,43	0,99977	0,001	0,004
carbofurano	203016,48	1371,15	0,99992	0,001	0,003
cimoxanil	46871,83	77,79	0,99959	0,002	0,01
ciproconazole	313861,47	574,77	0,99997	0,002	0,01
clorfenvifós	8102,05	15,59	0,99983	0,007	0,02
clorfluazurom	872,04	60,66	0,91942	0,02	0,06
clorpirifós	4128,25	239,51	0,99458	0,007	0,02
diclorvós	19944,17	109,28	0,99992	0,002	0,01
difenoconazole	450430,34	-3438,73	0,99992	0,002	0,01
diflubenzurom	17307,65	165,85	0,99996	0,003	0,01
dimetoato	79281,82	299,58	0,99999	0,003	0,01
diuron	153347,52	1314,39	0,99990	0,002	0,01
etiona	17782,12	-328,30	0,99707	0,002	0,01

continua

continuação

femproximato	279098,41	-4567,89	0,99694	0,001	0,002
fempropatrina	2127,29	265,60	0,99105	0,002	0,01
fenamifós	129687,74	401,28	0,99993	0,002	0,01
fenarimol	28530,66	19,78	0,99996	0,02	0,06
fenoxicarb	32849,82	177,89	0,99990	0,002	0,01
fipronil	5359,23	28,17	0,99886	0,02	0,07
flazassulfurom	69576,51	268,96	0,99983	0,001	0,004
imidacloprido	37833,25	183,02	0,99999	0,002	0,01
indoxacarbe	7892,76	-47,77	0,99942	0,003	0,01
iproclona	11926,96	158,55	0,99987	0,006	0,02
linuron	24371,49	194,85	0,99981	0,003	0,01
malationa	48871,19	458,29	0,99957	0,003	0,01
metamidofós	31701,99	232,25	0,99971	0,002	0,01
metiocarbe	157755,10	1319,53	0,99990	0,001	0,005
metolochloro	245539,59	1291,49	0,99990	0,002	0,01
metribuzim	175693,06	291,64	0,99998	0,002	0,01
monocrotofós	109041,60	680,03	0,99966	0,001	0,004
monurom	10802,74	97,05	0,99987	0,002	0,01
oxamil	10806,67	277,53	0,99944	0,001	0,004
pirimetanil	100404,17	199,95	0,99997	0,002	0,01
pirimicarbe	366432,44	249,03	0,99988	0,002	0,01
pirimifós-metil	1001768,89	3414,65	0,99997	0,001	0,003
procimidona	5266,21	105,97	0,99991	0,01	0,05
procloraz	283186,58	1371,34	0,99997	0,001	0,004
prometrina	553328,50	-297,26	0,99988	0,001	0,004
tebuconazol	346904,02	-19,07	0,99988	0,001	0,003
tiabendazol	388470,07	933,40	0,99997	0,001	0,004

continua

					conclusão
tiacloprido	73933,94	317,83	0,99997	0,001	0,003
tiametoxam	19941,46	207,01	0,99979	0,002	0,01
triadimenol	213194,71	232,09	0,99994	0,002	0,01
triazofós	533293,65	5215,22	0,99991	0,001	0,003
trifenilfosfato	34627,77	647,22	0,99983	0,001	0,004
trifloxistrobina	129591,20	20,99	0,99997	0,002	0,01
triflumizol	301848,40	1178,00	0,99985	0,001	0,005

Mais de 85% dos compostos investigados apresentaram limites de detecção igual ou menor que $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ e de quantificação igual ou menor que $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Dos pesticidas estudados o fipronil e a procimidona apresentaram LQ superior ao LMR permitido segundo a União Européia, porém estão dentro dos limites estipulados no Brasil e pelo Codex. O fenarimol teve seu limite diminuído segundo a UE n° 899/2012 de 0,5 para 0,02 e o alacloro de 0,1 para 0,01 resultando também em LQ maiores que o LMR segundo a União Européia.

Os limites encontrados estão em conformidade com os da literatura para quantificação de multirresíduos em tomate utilizando método QuEChERS (KMELLAR et al., 2008; LESUEUR et al., 2008) e em sua maioria são iguais ou menores aos LMR estabelecidos pela União Européia, Codex Alimentarius e ANVISA (EU PESTICIDES DATABASE, 2013; CODEX ALIMENTARIUS, 2013; BRASIL, 2013), demonstrando que o método de extração e detecção é adequado para as análises.

4.5.4 Exatidão e precisão

A exatidão do método desenvolvido foi determinada por meio de ensaios de recuperação realizados em três diferentes níveis de concentração. A Tabela 6 apresenta os resultados das recuperações médias (n=5) percentuais e o coeficiente de variação (CV%), para os pesticidas fortificados no tomate, nas concentrações de 0,01; 0,1 e 0,5 mg kg⁻¹, extraídos pelo método QuEChERS e analisados por LC-MS/MS. A Figura 5 apresenta cromatograma de íon total dos 3 níveis de recuperação.

Tabela 6 - Valores de recuperação (Rec%), coeficiente de variação (CV%) e média dos valores nas concentrações do estudo

Produto	Rec%	CV%	Rec%	CV%	Rec%	CV%	Rec	CV%
	0,01 mg kg ⁻¹		0,1 mg kg ⁻¹		0,5 mg kg ⁻¹		Média global	
acefato			95	11	80	6	87	9
acetamiprido	108	12	107	6	104	5	106	7
alacloro			117	12	132	7	124	9
aldicarbe	92	12	106	6	109	19	102	12
atrazina	100	7	106	7	108	6	104	7
azoxistrobina	99	7	111	8	106	6	105	7
benalaxil	106	13	113	9	101	5	107	9
bromacila	111	11	112	6	108	6	110	7
bromuconazol	98	9	110	8	102	2	103	7
buprofezina	96	7	106	9	102	5	101	7
carbaril	91	9	101	6	108	4	100	6
carbofurano	97	6	106	6	111	6	105	6
cimoxanil	107	9	101	6	109	6	106	7
ciproconazole	104	12	110	8	100	5	104	8
clorfenvifós			108	14	109	9	109	11
clorfluazurom			640	14	304	9	472	12
clorpirifós			0	37	231	5	231	21
diclorvós	106	15	115	4	112	5	111	8
difenoconazole	125	4	130	8	119	7	125	7
diflubenzurom			109	9	112	7	110	8
dimetoato	101	9	113	5	110	5	108	6
diuron	92	6	108	8	107	5	102	6
etiona	312	23	423	10	326	7	354	13

continua

								continuação
femproximato	383	9	376	10	244	7	334	9
fempropatrina	0	16	95	33	236	8	110	19
fenamifós	99	9	112	8	101	4	104	7
fenarimol			106	11	103	8	104	10
fenoxicarb	104	20	108	10	114	5	109	12
fipronil			88	13	107	10	98	12
flazassulfurom	109	10	115	5	89	7	104	7
imidacloprido	104	4	109	7	110	6	108	6
indoxacarbe	161	28	146	11	132	11	147	17
iprodiona			107	13	106	11	106	12
linuron	71	18	107	12	109	5	96	12
malationa	108	8	106	11	108	5	107	8
metalocloro	111	6	109	8	104	5	108	6
metamidofós	91	9	93	5	98	11	94	9
metiocarbe	91	8	111	8	106	5	103	7
metribuzim	101	7	107	6	111	6	106	6
monocrotofós	102	7	105	6	105	7	104	7
monurom	107	7	102	6	103	5	104	6
oxamil	121	9	111	4	109	5	114	6
pirimetanil	96	7	98	7	101	4	98	6
pirimicarbe	105	7	111	3	110	6	109	5
pirimifós-metil	95	7	107	9	103	6	101	7
procimidona			104	17	102	17	103	17
procloraz	101	12	104	9	100	5	101	9
prometrina	101	5	103	8	102	5	102	6
tebuconazol	110	8	108	7	105	5	108	7
tiabendazol	90	6	93	7	93	3	92	5

continua

								conclusão
tiacloprido	109	7	110	6	109	6	109	6
tiametoxam	120	9	114	4	113	6	116	6
triadimenol	113	10	110	8	108	7	110	9
triazofós	98	9	110	8	105	6	104	8
trifenilfosfato	151	7	134	7	109	12	131	9
trifloxistrobina	139	4	144	8	127	5	137	6
triflumizol	130	9	124	10	111	5	122	8

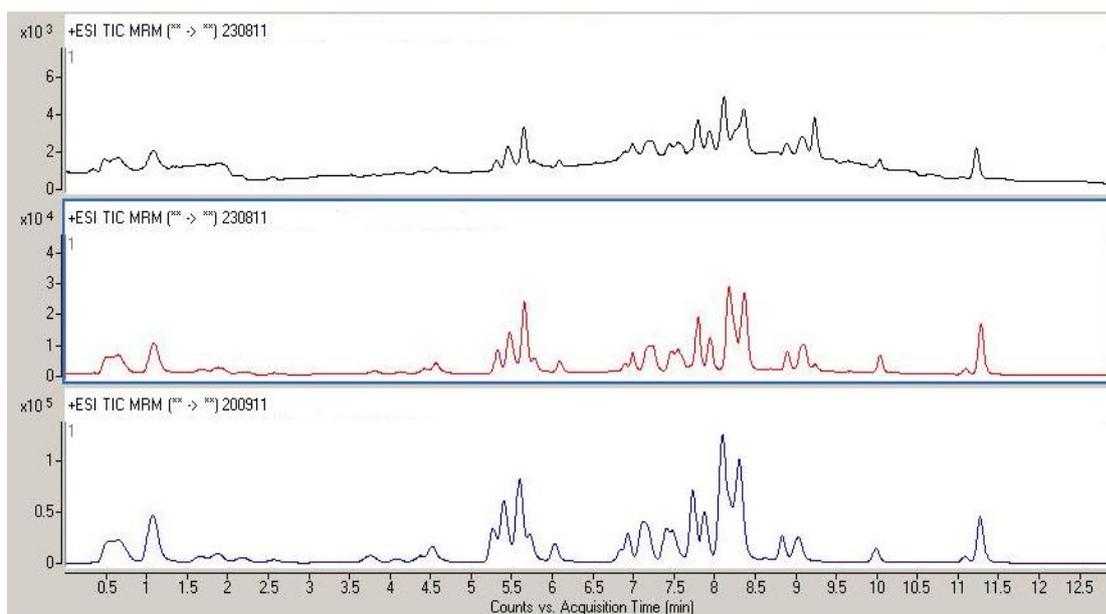


Figura 5 - Cromatograma de íon total dos pesticidas extraídos do tomate nos níveis de recuperação 0,01; 0,1 e 0,5 mg kg⁻¹

Dos 57 pesticidas que apresentaram fragmentação adequada, 81% apresentaram valores de recuperações e coeficiente de variação dentro da faixa

recomendada pela European Commission (2011), e, portanto somente esses foram quantificados nas amostras pelo método multirresíduo.

Entre os 19% dos pesticidas que apresentaram problemas na validação destacam-se o clorfluazurom e o fempiroximato que apresentaram recuperações de 472 e 334% e EM de 81,70 e 66,54% respectivamente, isto decorre provavelmente a problemas no *background* e presença de interferentes da matriz que não foram eliminados na extração, coelundo juntamente com os compostos de interesse. Na Figura 6 estão apresentados os valores de recuperação de todos os pesticidas analisados.

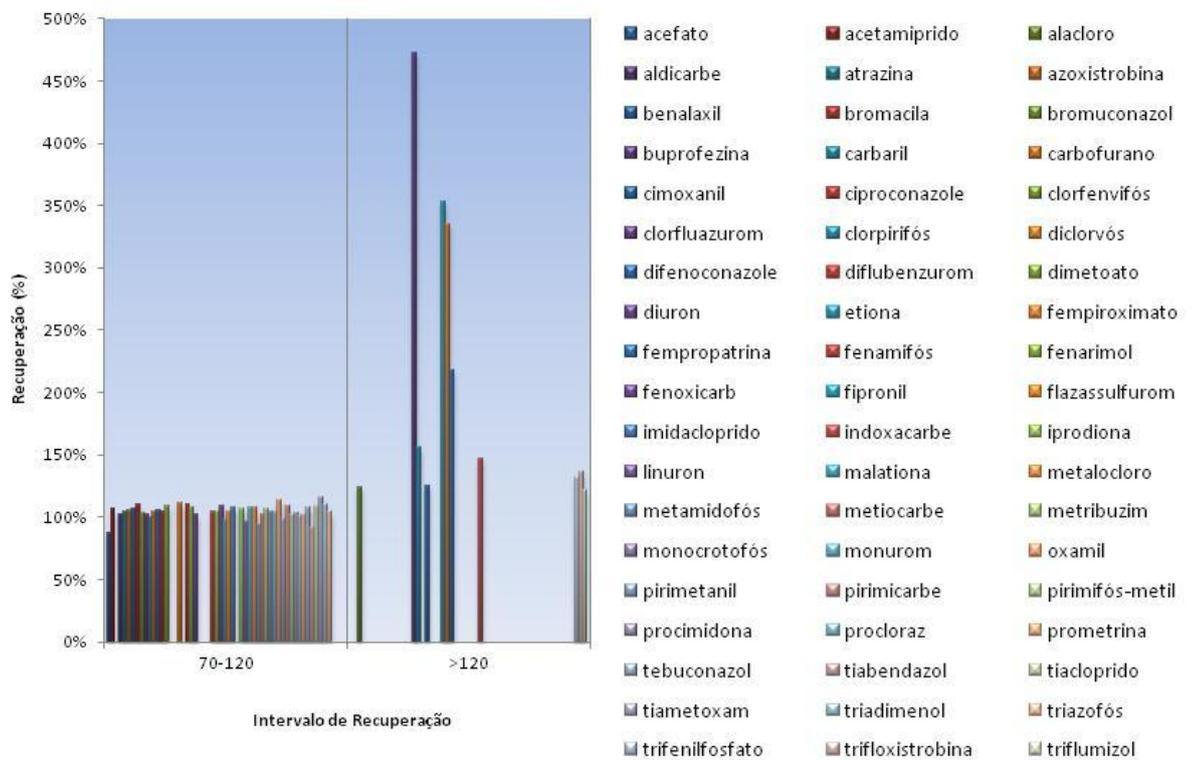


Figura 6 - Distribuição dos dados de recuperação dos pesticidas estudados

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade dos resultados e precisão intermediária.

A repetitividade foi estudada pelo cálculo da estimativa do coeficiente de variação de cinco repetições do procedimento de preparação de amostras QuEChERS (Tabelas 6 e 7).

Os resultados de coeficiente de variação obtidos variaram de 5% e 17% (Tabela 7), tendo a procimidona apresentado maior dispersão dos resultados. Entretanto, esses valores se encontram abaixo do recomendado para análises multirresíduos (EUROPEAN COMMISSION, 2011; ANVISA, 2012).

A precisão intermediária foi avaliada a partir de testes de recuperação de 5 réplicas com amostras fortificadas na concentração de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ com intervalo de 30 dias, através de seus coeficientes de variação. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7. O teste "t" de Student foi utilizado para verificar diferenças significativas entre as médias a 99% ($t=3,36$).

Tabela 7 - Valores de repetitividade (Repet.) e precisão intermediária (Prec. In) apresentados pelo CV% e teste t a 99% de significância

Produto	Rec%	CV%	Rec%	CV%	teste t
		Repet.		Prec. In	(3,36)
acefato	87	9	73	13	1,99
acetamiprido	106	7	94	12	2,11
aldicarbe	102	12	115	11	1,17
atrazina	104	7	101	8	0,31
azoxistrobina	105	7	98	10	1,99
benalaxil	107	9	88	9	3,04
bromacila	110	7	93	9	2,79

continua

					continuação
bromuconazol	103	7	92	17	1,24
buprofezina	101	7	86	11	2,52
carbaril	100	6	98	9	0,60
carbofurano	105	6	108	9	1,56
cimoxanil	106	7	108	10	1,17
ciproconazole	104	8	90	8	3,07
clorfenvifos	109	11	82	18	1,86
diclorvos	111	8	97	18	1,55
diflubenzurom	110	8	90	18	2,13
dimetoato	108	6	96	14	1,69
diurom	102	6	94	6	2,09
fenamifos	104	7	90	10	3,21
fenarimol	104	10	114	19	0,47
fenoxicarb	109	12	79	16	2,27
fipronil	98	12	86	17	1,08
flazassulfurom	104	7	71	5	5,21
imidacloprido	108	6	99	16	0,85
iprodiona	106	12	98	21	1,25
linuron	96	12	90	8	2,21
malationa	107	8	82	12	2,97
metalocloro	108	6	90	12	2,27
metamidofós	94	9	79	12	2,03
metiocarbe	103	7	99	10	1,44
metribuzim	106	6	104	8	0,03
monocrotofos	104	7	97	5	1,63
monurom	104	6	92	12	1,82
oxamil	114	6	70	18	4,38

continua

					conclusão
pirimetanil	98	6	91	9	0,99
pirimicarbe	109	5	100	7	2,47
pirimifos-metil	101	7	88	10	2,21
procimidona	103	17	76	19	1,43
procloraz	101	9	93	12	1,30
prometrina	102	6	93	8	1,75
tebuconazol	108	7	94	14	2,00
tiabendazol	92	5	77	13	2,71
tiacloprido	109	6	103	8	1,10
tiametoxam	116	6	99	15	1,21
triadimenol	110	9	94	10	2,21
triazofós	104	8	85	9	3,19

Através da análise dos resultados observou-se que dos 46 pesticidas analisados apenas 2 apresentaram valores de t maiores que 99% de significância (oxamil e flazassulfurom), mas dentro da faixa aceitável de recuperação e coeficiente de variação. Portanto, a precisão dos resultados independe do tempo que o método seja executado.

4.5.5 Estabilidade dos extratos

Na avaliação da estabilidade dos extratos, embora os valores de recuperação estejam dentro da faixa recomendada (70 - 120%), na concentração 0,1 mg kg⁻¹ a recuperação de 12% dos analitos apresentaram diferença significativa no teste t de Student e 37% na concentração 0,5 mg kg⁻¹. O coeficiente de variação de 30% dos analitos apresentaram valores acima do limite de 20% na concentração 0,1 mg kg⁻¹ e

9% na concentração $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$. Portanto, é recomendado que o extrato seja analisado logo após a extração.

4.6 Análise de amostras

A quantidade encontrada de resíduos de pesticidas em amostras de tomate, a média e o intervalo de valores encontrados estão apresentados na Tabela 8, bem como a porcentagem de amostras positivas.

Dos 46 pesticidas analisados em 58 amostras de tomate coletadas em supermercados na cidade de Piracicaba, SP, Brasil, 12 compostos foram encontrados em 35 amostras. Todas as amostras apresentaram concentrações menores que o LMR permitido no Brasil para acefato, acetamiprido, azoxistrobina, benalaxil, bromuconazol, diflubenzurom, imidacloprido, iprodiona, procloraz e tiametoxam.

Foram encontradas 15 amostras positivas para metamidofós cuja monografia foi excluída e segundo a resolução RDC 01/2011 teve sua retirada definitiva do mercado e proibição da utilização programada até 30 de junho de 2012. A decisão da ANVISA foi baseada em estudos toxicológicos que apontam o metamidofós como responsável por prejuízos ao desenvolvimento embrionário, além de características neurotóxicas, imunotóxicas e de causar toxicidade sobre os sistemas endócrino e reprodutor (ANVISA, 2011b).

O metamidofós é metabólito do acefato e apesar de serem similares como inibidores da acetilcolinesterase em insetos, o acefato é permitido para ser aplicado em frutas e vegetais, inclusive em cultura de tomate com LMR no Brasil de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$, porque é 75 a 100 vezes menos potente do que o metamidofós na inibição da acetilcolinesterase em mamíferos (WANG et al., 2013). Contudo, ele é

apontado como um dos principais metabólitos do acefato em vegetais, o que poderia explicar a detecção de resíduos de metamidofós nas amostras mesmo após sua proibição no Brasil.

Em Pequim, China foi realizado um estudo para avaliar a degradação dinâmica e os resíduos finais do acefato e seu metabólito metamidofós, em campo aberto e em estufa com repolho branco chinês entre 2004 e 2005 (TAO et al., 2010). As análises demonstraram que mais de 50% do total de resíduo de metamidofós resultaram a partir da degradação do acefato após 7 e 18 dias após aplicação em estufa, enquanto em campo aberto mais de 90% do total metamidofós foi encontrado como sendo metabólito do acefato.

Leidy, Sheets e Sorensen (1978) estudaram a ocorrência de resíduos de acefato e de metamidofós em cultura de tomate de estufa. Os resultados indicaram uma baixa dissipação do acefato e os resíduos de metamidofós, seu metabólito, foram encontrados em todas as amostras, já a partir do 1º dia de aplicação, mas em níveis de 8–10 vezes inferiores aos de acefato, e foram semelhantemente persistentes. Os resultados mostraram também que os resíduos totais (acefato + metamidofós) foram significativamente maiores após 4 aplicações espaçadas 7 dias uma da outra do que após uma única aplicação. Já no estudo realizado em tomate por (TREVIZAN; BAPTISTA; PAPA, 2005) os resíduos de acefato e metamidofós em frutos colhidos na estufa e no campo foram sempre abaixo do LMR, durante todo o período de amostragem (21 dias). A metabolização do acefato em metamidofós foi muito baixo em frutas, particularmente importante nas folhas, mas não foi bem caracterizado no solo. Os resíduos de acefato tiveram maiores concentrações na estufa do que no campo, em especial nas folhas e no solo, mostrando estabilidade e persistência de até 7 dias após a aplicação.

A molécula de acefato está sendo reavaliada pela Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA, conforme Resolução - RDC nº 10 de 22 de fevereiro de 2008,

devido aos resultados de estudos com animais e estudos epidemiológicos reportarem que o produto causa neurotoxicidade, demonstrando suspeita de carcinogênese para seres humanos e de toxicidade reprodutiva, e também devido à necessidade da revisão da Ingestão Diária Aceitável – IDA. As conclusões da reavaliação constam em Nota Técnica que está atualmente em fase de consulta pública, nela é indicada a exclusão da monografia para aplicação costal e/ou manual e exclusão das culturas de amendoim, batata, brócolis, couve, couve-flor, cravo, crisântemo, fumo, melão, pimentão, repolho, rosa; bem como a exclusão de uso domissanitário em jardins residenciais (ANVISA, 2008).

Considerando os estudos realizados na literatura e os resultados encontrados é recomendada que a reavaliação do risco da aplicação de acefato tenha consideração especial em relação à formação do metamidofós nos alimentos e o impacto na ingestão diária aceitável deste metabólito.

No Brasil o oxamil teve sua monografia excluída devido à inexistência de produtos técnicos e/ou formulados registrados no Brasil conforme Resolução - RDC nº 347, de 16 de dezembro de 2002. Este produto dissipa no ambiente do solo por degradação química e microbiana e por lixiviação, com meia-vida de 2 a 4 semanas em condições aeróbias e menos de 1 semana sob condições anaeróbias (USEPA, 2007). Foi encontrada uma amostra com concentração de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$, que embora abaixo do LMR do Codex e da União Européia, teve uso indevido e de origem ilegítima.

Considerando os LMR da União Européia, 15 amostras excederam o limite para metamidofós ($>0,01 \text{ mg kg}^{-1}$), 10 amostras para acefato ($>0,01 \text{ mg kg}^{-1}$) e 4 amostras para bromuconazol ($>0,05 \text{ mg kg}^{-1}$) (EUROPEAN COMMISSION, 2011), indicando uma diferença entre as referências entre os países, que embora regulamentadas nas condições climáticas e dietéticas de cada país, podem apresentar barreiras alfandegárias à comercialização internacional do tomate.

Tabela 8 - Quantidade média (mg kg^{-1}), intervalo de valores e porcentagem de amostras positivas de resíduos de pesticidas em tomates, coletados em supermercados em Piracicaba, SP

Produto	Média	Intervalo	Amostras Positivas	
			nº	%
acefato	0,15	0,0 – 0,36	10	17
acetamiprido	0,02	0,0 – 0,03	6	10
aldicarbe	-	0,0 - <LD	-	-
atrazina	-	0,0 - <LD	-	-
azoxistrobina	0,01	0,0 – 0,01	1	2
benalaxil	0,016	0,0 – 0,02	4	7
bromacila	-	0,0 - <LD	-	-
bromuconazol	0,05	0,0 – 0,06	4	7
buprofezina	-	0,0 - <LD	-	-
carbaril	-	0,0 - <LD	-	-
carbofurano	-	0,0 - <LD	-	-
cimoxanil	-	0,0 - <LD	-	-
ciproconazole	-	0,0 - <LD	-	-
clorfenvifós	-	0,0 - <LD	-	-
diclorvós	-	0,0 - <LQ	-	-
diflubenzurom	0,01	0,0 – 0,01	1	2
dimetoato	-	0,0 - <LD	-	-
diuron	-	0,0 - <LD	-	-
fenamifós	-	0,0 - <LD	-	-
fenarimol	-	0,0 - <LD	-	-
fenoxicarb	-	0,0 - <LD	-	-
fipronil	-	0,0 - <LD	-	-
flazassulfurom	-	0,0 - <LD	-	-

continua

				conclusão
imidacloprido	0,06	0,0 - 0,25	10	17
iprodiona	0,05	0,0 - 0,08	3	5
linurom	-	0,0 - <LD	-	-
malationa	-	0,0 - <LD	-	-
metolacloro	-	0,0 - <LD	-	-
metamidofós	0,04	0,0 - 0,11	15	26
metiocarbe	-	0,0 - <LD	-	-
metribuzim	-	0,0 - <LD	-	-
monocrotofós	-	0,0 - <LD	-	-
monurom	-	0,0 - <LD	-	-
oxamil	0,01	0,0 - 0,01	1	2
pirimetanil	-	0,0 - <LD	-	-
pirimicarbe	-	0,0 - <LD	-	-
pirimifós-metil	-	0,0 - <LQ	-	-
procimidona	-	0,0 - <LQ	-	-
procloraz	0,02	0,0 - 0,02	1	2
prometrina	-	0,0 - <LQ	-	-
tebuconazol	-	0,0 - <LQ	-	-
tiabendazol	-	0,0 - <LD	-	-
tiacloprido	-	0,0 - <LD	-	-
tiametoxam	0,04	0,0 - 0,06	2	3
triadimenol	-	0,0 - <LD	-	-
triazofós	-	0,0 - <LD	-	-

Dos 46 pesticidas determinados neste trabalho 24 não estão contemplados no programa de monitoramento da ANVISA (JARDIM; CALDAS, 2012). Dentre eles, os pesticidas: acetamiprido, benalaxil, bromuconazol, diflubenzurom, imidacloprido,

iprodiona e thiametoxam, que apesar de terem sido detectados, apresentaram resíduos abaixo do LMR permitido no Brasil.

Embora a comparação entre estudos com amostragens diferentes possam ser enganosas, comparando os resultados obtidos neste trabalho com os encontrados em amostras de tomate de outros países, observou-se que os resíduos de pesticidas em amostras positivas de tomates comercializados no Brasil apresentam valores maiores aos relatados em tomates de Portugal (MELO et al., 2012), na Turquia (SUNGUR; TUNUR, 2012), e na Espanha (KMELLAR et al., 2008).

Em estudo realizado na Colômbia com tomates em campo aberto, o cenário foi mais alarmante, 73,1% das 26 amostras analisadas apresentaram resíduos de pesticida, sendo que 53,9% excederam o LMR, entre eles, o acefato que foi encontrado em 9 amostras (LMR de 0,02 mg kg⁻¹) (BOJACÁ et al., 2013).

As diferenças entre os resultados de diferentes países sugere que uma investigação mais profunda e contínua de resíduos de pesticidas em tomate é necessária para a garantia da segurança dos consumidores.

Uma avaliação do programa de monitoramento PARA, realizada pela ANVISA no Brasil, mostra uma queda nas amostras positivas de tomate em relação há anos anteriores (BRASIL, 2011). O tomate ocupa a sexta posição do total de amostras irregulares no programa de 2006 a 2010 (entre 9 culturas), com 14,4% de amostras irregulares, (JARDIM; CALDAS, 2012). Estudo realizado de 1994-2001 aponta que 35,4% das amostras de tomate estavam contaminadas e muitas apresentavam mais de um pesticida (GEBARA et al., 2005). Este fato leva a acreditar que a divulgação de resultados de monitoramento está contribuindo para uma maior conscientização dos produtores e consumidores levando a produção de alimentos mais seguros.

4.7 Testes de Lavagem

Para o procedimento de contaminação dos tomates orgânicos foi realizado um pré teste na concentração recomendada no campo ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$) resultando em recuperações muito baixas (<1%), por isso se optou por aumentar a concentração da solução (50 mg kg^{-1}) para os resultados permanecerem dentro da curva analítica e ser possível avaliar a perda dos analitos pelos procedimentos de lavagem. A recuperação inicial e redução nos procedimentos de lavagens estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração dos pesticidas nos tratamentos de lavagens, coeficiente de variação (n=6) e redução em porcentagem

Pesticida	Tratamento	Concentração (mg kg^{-1})	CV%	Redução (%)
acetamiprido	contaminação inicial	0,036 ±	20	
	lavagem com água	0,019 ±	20	48
	lavagem bicarbonato 10%	0,015 ±	21	59
	lavagem vinagre 10%	0,005 ±	20	86
azoxistrobina	contaminação inicial	0,205 ±	19	
	lavagem com água	0,056 ±	11	73
	lavagem bicarbonato 10%	0,111 ±	8	46
	lavagem vinagre 10%	0,064 ±	4	69
diflubenzurom	contaminação inicial	0,537 ±	13	
	lavagem com água	0,138 ±	3	74
	lavagem bicarbonato 10%	0,351 ±	4	35
	lavagem vinagre 10%	0,318 ±	7	41

continua

			conclusão	
dimetoato	contaminação inicial	0,022 ±	17	
	lavagem com água	0,016 ±	4	30
	lavagem bicarbonato 10%	0,013 ±	5	43
	lavagem vinagre 10%	0,019 ±	7	14
fipronil	contaminação inicial	0,443 ±	6	
	lavagem com água	0,404 ±	4	9
	lavagem bicarbonato 10%	0,433 ±	5	2
	lavagem vinagre 10%	0,922 ±	6	*
imidacloprido	contaminação inicial	0,057 ±	18	
	lavagem com água	0,029 ±	3	49
	lavagem bicarbonato 10%	0,026 ±	6	54
	lavagem vinagre 10%	0,020 ±	5	64
procimidona	contaminação inicial	0,918 ±	7	
	lavagem com água	0,942 ±	7	*
	lavagem bicarbonato 10%	0,785 ±	5	15
	lavagem vinagre 10%	0,519 ±	7	43
tiametoxam	contaminação inicial	0,038 ±	10	
	lavagem com água	0,014 ±	3	65
	lavagem bicarbonato 10%	0,011 ±	6	72
	lavagem vinagre 10%	0,008 ±	7	78

* Pesticidas onde ocorreu aumento na concentração após tratamento de lavagem

Para a indicação do melhor tratamento de lavagem optou-se por indicar os dados absolutos da concentração final de cada tratamento para a análise estatística propiciando uma melhor interpretação dos resultados.

Foi feita uma avaliação da adequação do modelo de análise de dados e considera-se como adequado um modelo que resulte em erros normalmente distribuídos, sendo assim é necessário esclarecer o quão aderentes à distribuição gaussiana são os erros resultantes da adoção dos modelos de análise de dados adotados.

Previamente à avaliação da adequação dos modelos, foram adotadas medidas que objetivaram eliminar a existência de dados problemáticos, sendo assim, foram excluídos alguns dados da análise, os quais se mostraram excessivamente influentes e com erros muito maiores que os demais dados analisados.

Inicialmente, para todos os modelos foi suposta a aderência dos dados à distribuição Gaussiana, quando detectados modelos que geravam erros não aderentes a essa mesma distribuição, então a distribuição suposta para os dados foi alterada de acordo com um estudo gráfico.

Deste modo, na Tabela 10 são apresentados os resultados dos testes de aderência dos resíduos à distribuição gaussiana e as medidas remediadoras adotadas para melhorar a adequação dos modelos em estudo.

Tabela 10 - Medidas remediadoras adotadas e resultado do estudo para avaliação da aderência dos resíduos à distribuição gaussiana nos procedimentos de lavagens

Variável	Distribuição dos dados	Observação suprimida	Coeficientes		Teste de Shapiro-Wilk	
			assimetria	curtose	W	Valor-p
acetamiprido	lognormal	–	0,52572	-0,76861	0,91983	0,28452
azoxistrobina	lognormal	–	0,93542	1,55931	0,90709	0,07647
diflubenzurom	gaussiana	8	-0,90952	2,58654	0,93565	0,27018
dimetoato	gaussiana	–	-0,41113	-0,28020	0,95536	0,51517
fipronil	lognormal	8	0,05683	0,03340	0,97601	0,91240
imidacloprido	gaussiana	–	-0,25004	-0,77514	0,95464	0,50228
procimidona	gaussiana	8	-0,35580	-0,36571	0,94672	0,40668
tiametoxam	gaussiana	–	0,50940	-0,53419	0,94757	0,38815

Primeiramente se observa que na maioria dos casos, a hipótese de que os dados provêm de população normalmente distribuída se mostrou satisfatória, somente tendo sido necessária a adoção de modelo para dados distribuídos de maneira lognormal nos casos dos compostos acetamiprido, azoxistrobina e fipronil.

A utilização de modelos mistos generalizados permite, diferentemente de métodos anteriores, que dados oriundos de diversas distribuições sejam analisados. As técnicas anteriores se prendiam muito à exigência de que os dados fossem aderentes à distribuição gaussiana, assim como os resíduos. Nos modelos generalizados, mantém-se a necessidade de que os resíduos sejam aderentes à distribuição gaussiana, mas os dados podem ter aderência a uma série de outras distribuições (McCULLAGH; NELDER, 1989).

A exclusão de dados problemáticos somente foi necessária no caso de três moléculas: diflubenzurom (0,427342), procimidona (1,036530) e fipronil (0,535073)

tendo sido necessária a exclusão, em todos eles, da oitava observação que mostrava um valor maior que os demais do mesmo grupo e, conseqüentemente, inflacionava o erro e modificava a condição dos resultados. Os valores excluídos encontram-se destacados entre parênteses à direita do nome de cada molécula.

A exclusão dos dados fundamenta-se, principalmente, na excessiva influência que os dados exercem nos resultados. Se há um total de 18 dados sendo analisados (3 tratamentos com 6 réplicas), não é razoável crer que a presença de um único valor deva ter influência tal, que o resultado se modifique em sua presença. O ideal é que o resultado seja um somatório das influências similares de todos os dados da análise.

Adotadas as correções, passa-se a analisar a aderência dos resíduos à distribuição gaussiana e na forma tradicional de análise, parte-se do princípio de que a distribuição gaussiana é simétrica, ou seja, apresenta cauda esquerda e direita similares.

A quantificação de simetria é, tradicionalmente, analisada pelo coeficiente de assimetria e se assume que uma distribuição é simétrica quando o valor deste coeficiente é 0 (zero), sendo admitida uma faixa de tolerância entre -2 e +2 ainda como sendo razoável para que a simetria não seja exagerada.

Na análise dos coeficientes de assimetria na Tabela 10, observa-se que mesmo que se tivesse adotado uma faixa mais rigorosa e que indicasse como simétricos dados entre -1 e +1, ainda assim, em nenhuma medida haveria indícios de assimetria, indicando que as caudas são bastante similares entre si e indicando haver o atendimento de uma primeira condição, em todas as variáveis de que os dados não são discrepantes em relação à distribuição normal.

Uma segunda condição tradicionalmente associada à normalidade é o da curtose que indica a exagerada concentração de dados em um mesmo valor (leptocurtose) ou a exagerada distribuição dos dados nos diversos valores observados

(platicurtose). De maneira similar à análise de simetria, também o coeficiente de curtose não evidencia problemas quando seu valor se situa entre -2 e +2, o que é ultrapassado na molécula de diflubenzurom, onde o coeficiente calculado foi 2,59 não tendo sido detectados outros problemas.

Por fim, a terceira e mais aceita condição para avaliação da normalidade é a aplicação de um teste formal e, com esse fim, foi eleita a aplicação do teste de Shapiro-Wilk, mais apropriado para amostras pequenas (menos de 2000 dados).

Em nenhum modelo o teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) revelou indícios da não aderência dos dados à distribuição Gaussiana. Diante desse resultado, pode-se concluir que os modelos são eficientes e que as estatísticas derivadas, podem assumir o status de exatas.

A síntese da análise dos pesticidas nos tratamentos de lavagens é apresentada na Tabela 11 que combina o resultado da análise de variância e do teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias apresentadas.

Tabela 11 - Análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias dos 10 produtos nos diferentes níveis do fator Lavagem. Médias com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%

Pesticida	Lavagem	Média	Desvio padrão	Limites de confiança (95%)		Grupos de Tukey ($\alpha=0,05$)
				superior	Inferior	
Acetamiprido	Água	0,019	0,009	0,029	0,009	A
	Bicarbonato	0,015	0,007	0,022	0,007	B
	Vinagre	0,005	0,008	0,013	-0,003	C
Análise de variância: Estatística F: 90,35 – Valor-p: 0,0001 (GL _{Numerador} : 2; GL _{Denominador} : 9)						
Azoxistrobina	Bicarbonato	0,111	0,009	0,120	0,101	A
	Vinagre	0,064	0,003	0,067	0,061	B
	Água	0,056	0,006	0,063	0,050	C
Análise de variância: Estatística F: 123,49 – Valor-p: 0,0001 (GL _{Numerador} : 2; GL _{Denominador} : 15)						
Diflubenzurom	Bicarbonato	0,351	0,013	0,368	0,335	A
	Vinagre	0,318	0,022	0,342	0,295	B
	Água	0,138	0,005	0,143	0,133	C
Análise de variância: Estatística F: 317,66 – Valor-p: 0,0001 (GL _{Numerador} : 2; GL _{Denominador} : 14)						
Dimetoato	Vinagre	0,019	0,001	0,021	0,018	A
	Água	0,016	0,001	0,016	0,015	B
	Bicarbonato	0,013	0,001	0,014	0,012	C
Análise de variância: Estatística F: 72,68 – Valor-p: 0,0001 (GL _{Numerador} : 2; GL _{Denominador} : 15)						
Fipronil	Vinagre	0,922	0,054	0,979	0,865	A
	Bicarbonato	0,433	0,020	0,458	0,407	B
	Água	0,404	0,016	0,420	0,387	B
Análise de variância: Estatística F: 215,57 – Valor-p: 0,0001 (GL _{Numerador} : 2; GL _{Denominador} : 14)						
Imidacloprido	Água	0,029	0,001	0,030	0,028	A
	Bicarbonato	0,026	0,001	0,028	0,025	B
	Vinagre	0,020	0,001	0,021	0,019	C
Análise de variância: Estatística F: 92,97 – Valor-p: 0,0001 (GL _{Numerador} : 2; GL _{Denominador} : 15)						

continua

						conclusão
	Água	0,942	0,066	1,011	0,873	A
Procimidona	Bicarbonato	0,785	0,043	0,838	0,732	B
	Vinagre	0,519	0,035	0,555	0,483	C
Análise de variância: Estatística F: 109,42 – Valor-p: 0,0001 (GL _{Numerador} : 2; GL _{Denominador} : 14)						
	Água	0,014	0,000	0,014	0,013	A
Tiametoxam	Bicarbonato	0,011	0,001	0,011	0,010	B
	Vinagre	0,008	0,001	0,009	0,008	C
Análise de variância: Estatística F: 120,84 – Valor-p: 0,0001 (GL _{Numerador} : 2; GL _{Denominador} : 15)						

O resultado da análise de variância nos dá fortes indícios ($p < 0,01$) da existência de diferenças entre as médias verdadeiras de acetamiprido, azoxistrobina, diflubenzuron, dimetoato, fipronil, imidacloprido, procimidona e tiametoxam em, pelo menos, dois dentre os níveis do fator lavagem.

Para o acetamiprido, imidacloprido, procimidona e tiametoxam o teste de Tukey, por sua vez, evidencia que as três médias diferem entre si de forma significativa, sendo a maior, a média do resíduo observada na lavagem com água, seguida da média após lavagem com bicarbonato e a menor média de resíduo é observada após a lavagem com vinagre, conforme ilustra a Figura 7.

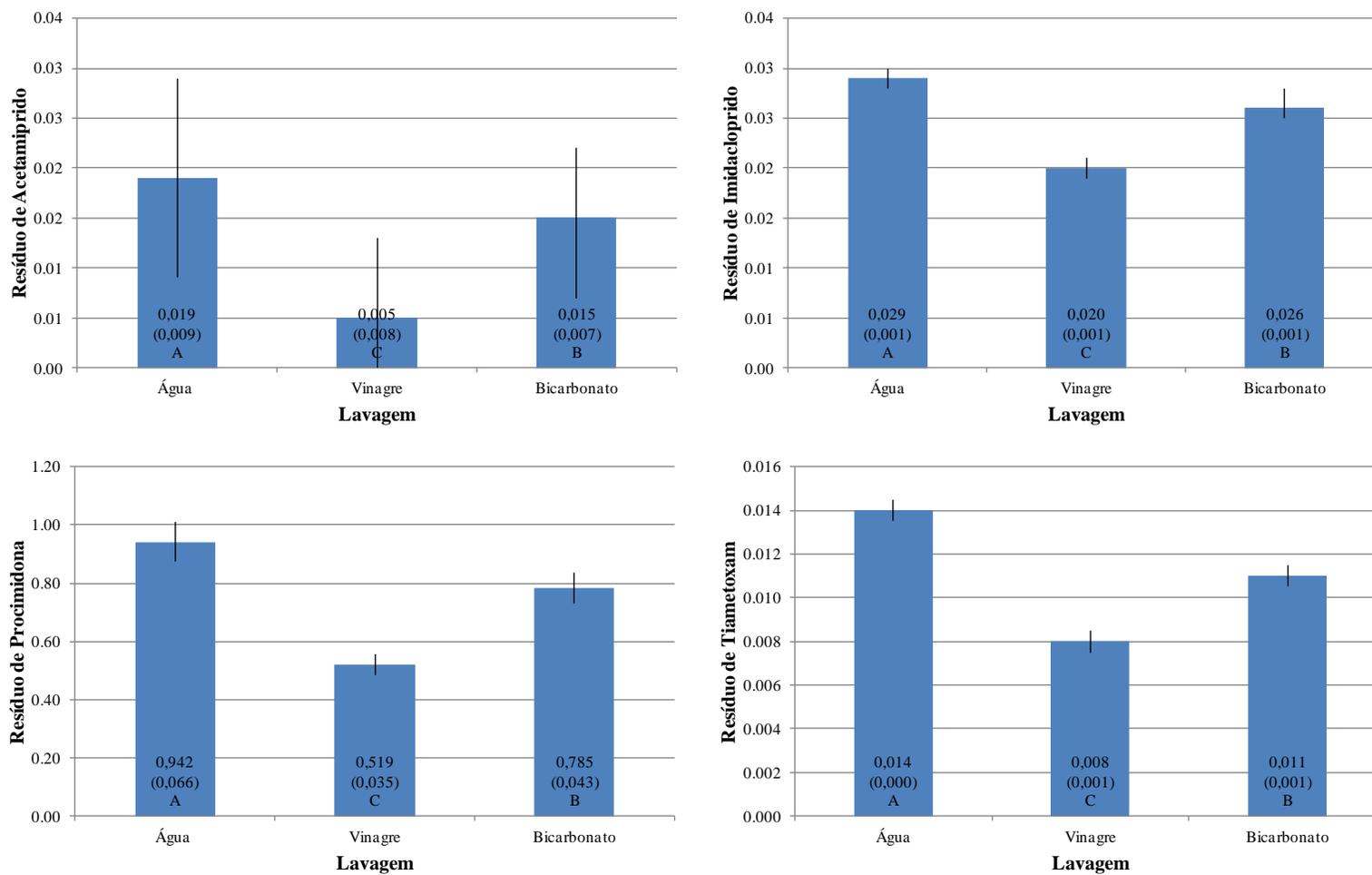


Figura 7 - Média (desvio padrão), limites do intervalo de confiança da média 95(%) e teste de Tukey para comparação das médias do resíduo de acetaminoprido, imidacloprido, procimidona e tiametoxam após a lavagem. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem entre si no nível de significância de 5%

Para o dimetoato, o teste de Tukey, evidencia que as três médias diferem entre si de forma significativa, sendo a maior, a média do resíduo observada na lavagem com vinagre, seguida da média após lavagem com água e a menor média de resíduo é observada após a lavagem com bicarbonato, conforme ilustra a Figura 8.

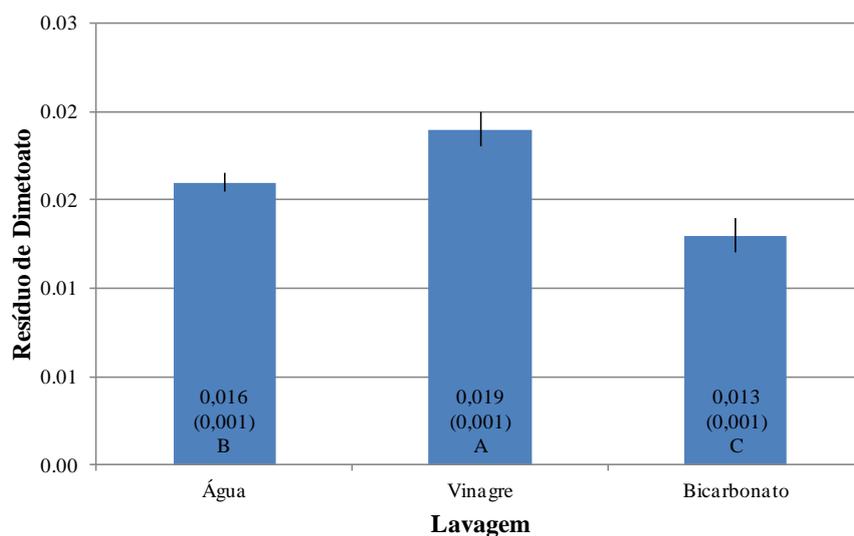


Figura 8 - Média (desvio padrão), limites do intervalo de confiança da média 95(%) e teste de Tukey para comparação das médias do resíduo de dimetoato após a lavagem. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem entre si no nível de significância de 5%

Para o azoxistrobina e diflubenzurom, o teste de Tukey, por sua vez, evidencia que as três médias diferem entre si de forma significativa, sendo a maior, a média do resíduo observada na lavagem com bicarbonato, seguida da média após lavagem com vinagre e a menor média de resíduo é observada após a lavagem com água, conforme ilustra a Figura 9.

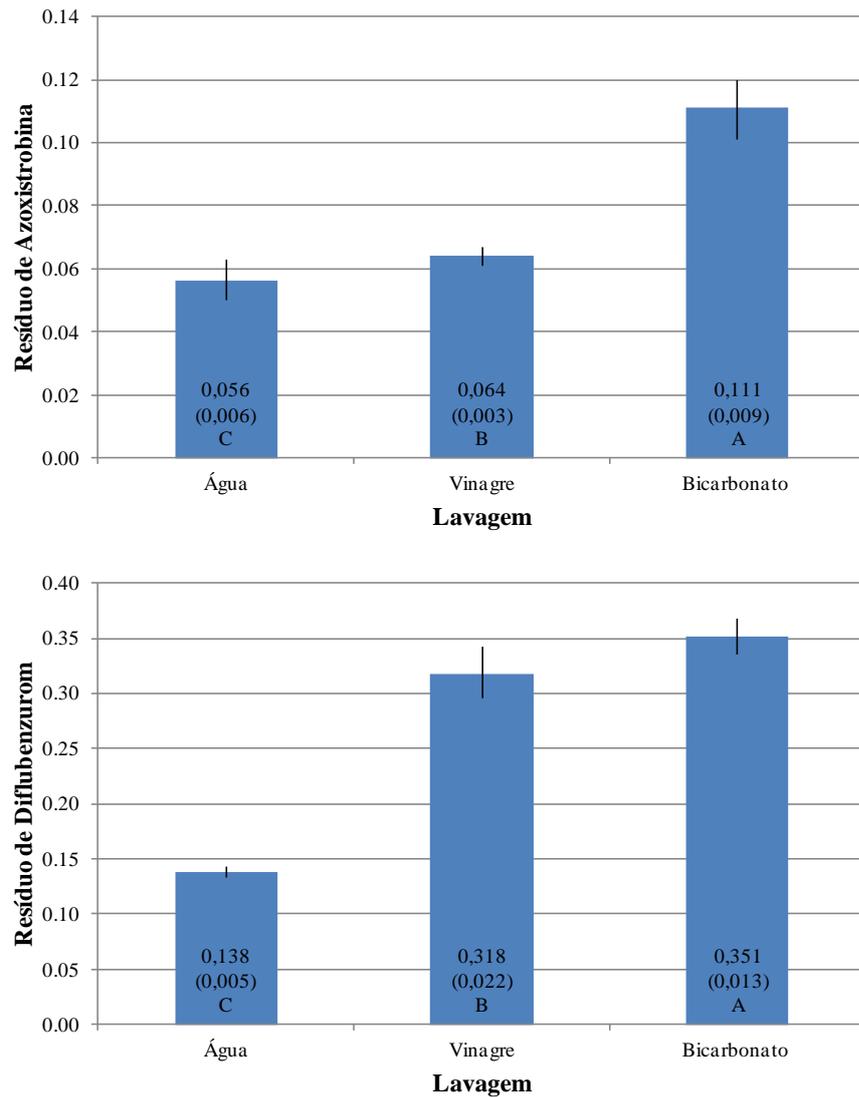


Figura 9 - Média (desvio padrão), limites do intervalo de confiança da média 95(%) e teste de Tukey para comparação das médias do resíduo de azoxistrobina e diflubenzurom após a lavagem. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem entre si no nível de significância de 5%

O teste de Tukey, por sua vez, evidencia que a média do resíduo fipronil quando há lavagem com vinagre é significativamente maior que a média de resíduo quando é feita a lavagem com água ou com bicarbonato, sendo que não há indícios de diferenças entre as médias das lavagens feitas com os dois últimos produtos, conforme ilustra a Figura 10.

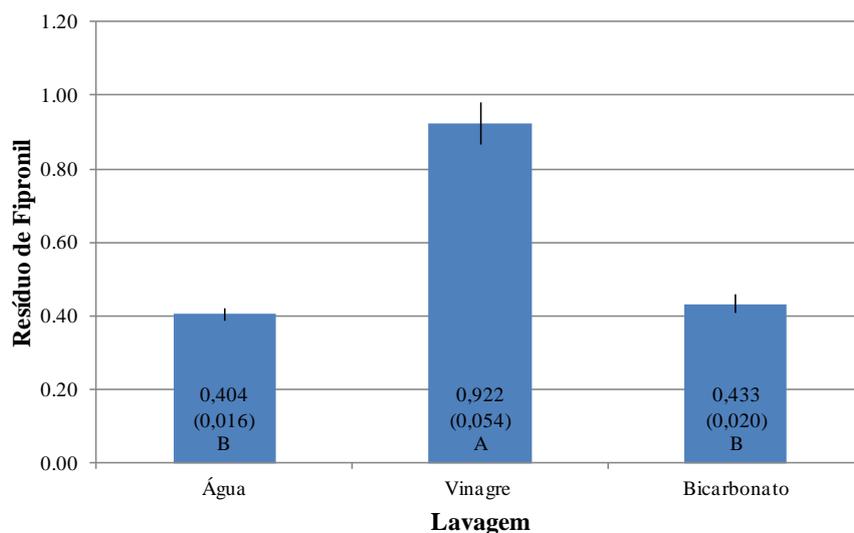


Figura 10- Média (desvio padrão), limites do intervalo de confiança da média 95(%) e teste de Tukey para comparação das médias do resíduo de fipronil após a lavagem. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem entre si no nível de significância de 5%

A lavagem com bicarbonato foi a melhor alternativa para o organofosforado dimetoato (63%) (Figura 8). Segundo estudo conduzidos em pepinos (LIANG et al., 2012) a lavagem com carbonato de sódio e solução de bicarbonato de sódio mostrou-se um método efetivo para remoção de pesticidas organofosforados (triclorfom, dimetoato, diclorvos, fenitrotion e clorpirifós).

Radwan et al. (2005) demonstraram que a lavagem com solução de ácido acético apresentou elevada remoção de resíduos do organofosforado profenofós em pimenta. (ZOHAIR, 2001) relatou que os pesticidas organofosforados (pirimifos-metil, malation e profenofós) foram eliminados de forma mais eficaz por soluções ácidas, do que por neutras e alcalinas em amostras de batata contaminadas naturalmente. Pode-se concluir que a lavagem com soluções ácidas, neutras e alcalinas é eficaz na remoção de pesticidas organofosforados, dependendo do tipo da molécula e da concentração das soluções de lavagem.

Analisando o gráfico da Figura 7 pode-se observar que a lavagem com vinagre foi a que menos apresentou resíduos dos pesticidas acetamiprido, imidacloprido, procimidona e tiametoxam e, ou seja, foi a lavagem mais eficiente para a remoção dessas moléculas.

Em estudo realizado com procimidona em amostras de pepino a lavagem com água reduziu 24% dos resíduos e 85% (PARADJIKOVIC; HRLEC; HORVAT, 2004) foi eliminado com a retirada da casca, mesmo sendo este pesticida de ação sistêmica. Em estudo realizado com pêssegos, destinados à comida para bebê, a simples lavagem com água corrente eliminou 51% dos resíduos de procimidona contidos na fruta (BALINOVA, MLADENOVA; SHTEREVA, 2006).

Analisando o gráfico da Figura 9 pode-se observar que a lavagem com água foi mais eficiente para os produtos azoxistrobina e diflubenzurom e para o fipronil não teve diferença significativa entre as lavagens com água e solução de bicarbonato, conforme Figura 10.

Em estudo conduzido em morangos com aplicação de pesticidas em campo, a lavagem com água corrente reduziu os resíduos de azoxistrobina e fenhexamida, mas não diminuiu os resíduos de pirimetanil. Conseqüentemente, quando as frutas foram lavadas com solução de detergente comercial (5:1 água/detergente), maiores valores foram removidos (cerca de 45% da azoxistrobina e pirimetanil e 60% de fenhexamida) (ANGIONI et al., 2004).

Os dados relatados na literatura sobre o efeito da lavagem de resíduos de pesticidas em frutas e legumes são contraditórias e todos mostram a falta de correlação entre a solubilidade em água e redução de pesticidas após a lavagem (ANGIONI et al., 2004). E, embora manifestem diferenças entre tipos de lavagem (com água corrente ou deixadas de molho), diferentes soluções de lavagem e congelamento antes da análise, em sua maioria observa redução de resíduos de pesticidas independentemente da solubilidade ou classe química.

Diversos estudos de remoção de pesticidas por lavagem são relatados na literatura (SOLIMAN, 2001; ZOHAIR, 2001; CHRISTENSEN; GRANBY; RABOLLE, 2003; ZHANG; LIU; HONG, 2007). Esses estudos apontam que a lavagem com água ou outras soluções, resultam em uma grande redução de resíduos de pesticidas de frutas e vegetais tornando o nível de resíduos inferiores aos limites máximos de resíduos (LMR) e, portanto são indicados.

4.8 Casca e polpa

Para a quantificação dos resíduos na casca do tomate foi considerado a massa proporcional (1kg de tomate ~ 100 g de casca). Para a avaliação da porcentagem de retenção de pesticida na casca em relação à massa de tomate foram realizados testes para avaliar qual a distribuição possui melhor ajuste dos dados verificando os gráficos residuais, os quais fornecem uma representação visual dos resultados (Figura 11). O modelo adotado foi lognormal, que apresentou coeficiente de assimetria de -0,53533, coeficiente de curtose de 0,16933 e W Shapiro-Wilk de 0,96822 e, portanto cumpriu todas as condições para avaliação da normalidade.

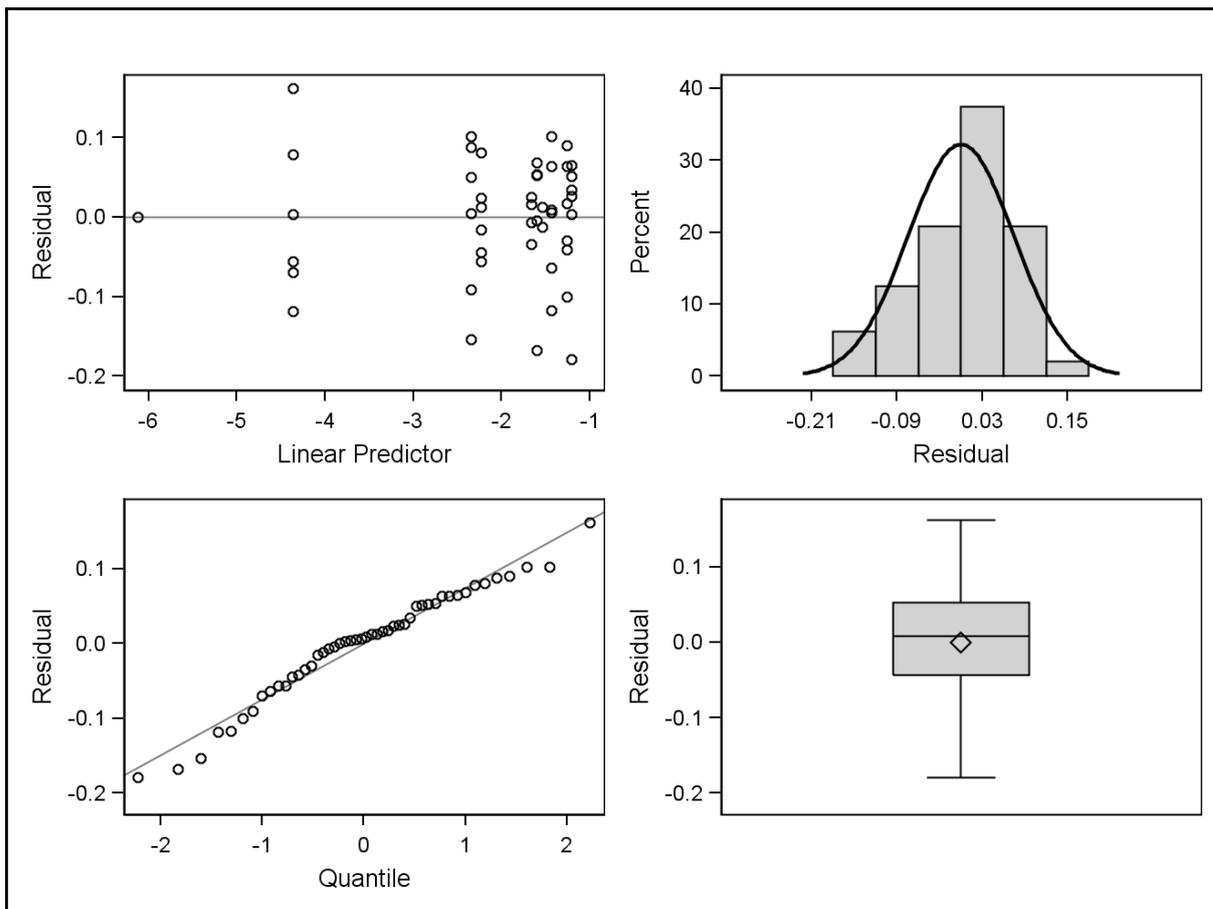


Figura 11 - Gráficos residuais da distribuição lognormal da avaliação da porcentagem de pesticidas na casca de tomate

O resultado da análise de variância e do teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias das concentrações dos pesticidas em relação ao acúmulo na casca. Médias com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%

Pesticida	Média (%)	Desvio padrão	Superior	Inferior	Grupos de Tukey ($\alpha=0,05$)
diflubenzurom	30	0,025	0,324	0,274	A
azoxistrobina	28	0,020	0,305	0,265	A
tiametoxam	24	0,019	0,258	0,220	B
acetamiprido	9	0,118	0,204	-0,032	CB
imidacloprido	17	0,085	0,254	0,085	CB
dimetoato	13	0,098	0,225	0,029	C
fipronil	11	0,005	0,113	0,102	D
procimidona	10	0,010	0,106	0,087	D

Análise de variância: Estatística F: 1005,86 – Valor-p: 0,0001 (GL_{Numerador}: 7; GL_{Denominador}: 30)

A descamação mecânica, típica do processamento doméstico e o peeling químico, aplicado na transformação industrial, são processos que fazem uma contribuição substancial para a redução dos níveis de resíduos dos frutos. A maior parte dos resíduos são removidos com a casca (BALINOVA; MLADENOVA; SHTEREVA, 2006). Os pesticidas não sistêmicos tendem a não penetrar na planta e após a aplicação podem formar um depósito sobre as superfícies das folhas e frutos, o que facilita a remoção por lavagem, descamação e branqueamento (CHAVARRI; HERRERA; ARINO, 2004).

O diflubenzurom é um pesticida não sistêmico e tem ação de contato e possui baixa solubilidade em água ($0,08 \text{ mg L}^{-1}$) e conseqüentemente alto coeficiente de Kow ($7,76 \times 10^3$) (IUPAC, 2013), o mesmo apresentou a maior concentração de pesticida na casca não diferindo estatisticamente da azoxistrobina, que embora seja sistêmica uma parte deste composto penetra progressivamente no interior da folha e

outra permanece à superfície (ação de contato) (BEESTMAN; NARAYANAN; JON, 2003), além de baixa solubilidade em água ($6,7 \text{ mg L}^{-1}$), e Kow de $3,16 \times 10^{02}$.

Foi realizado um estudo em campo, na Bélgica, com duas variedades de melão para quantificar o efeito do processamento doméstico sobre os resíduos de pesticidas (carbendazim, maneb, acetamiprido, ciromazina, imazalil e tiametoxam) (Bonnechere, Hanot *et al.*, 2012), observou-se que a redução dos pesticidas não pode ser completamente explicada pelo caráter sistêmico dos pesticidas. No entanto, as práticas agrícolas (como tempo de aplicação), a solubilidade e modo de ação dos pesticidas (sistêmico e de contato) podem ser usados para explicar a diferença nos fatores de processamento para os pesticidas estudados. O tiametoxam teve redução de 50% e o acetamiprido de mais de 90% após a retirada da casca, contrariando o comportamento esperado de sua maior concentração na polpa.

O tiametoxam embora com boa solubilidade em água pode ter ficado aderido à casca do tomate, e a forma de aplicação dos pesticidas e tempo de permanência na solução pode ter influenciado o depósito na casca. Não foi encontrada diferença significativa entre o tiametoxam, acetamiprido e imidacloprido, sendo todos sistêmicos e com boa solubilidade em água.

Os pesticidas diflubenzurom, azoxistrobina e tiametoxam, que tiveram uma maior concentração na casca do tomate, foram eficientemente retirados com os procedimentos de lavagens.

O dimetoato não apresentou diferença estatística com o acetamiprido e imidacloprido sendo também sistêmico e com alta solubilidade em água.

O fipronil e a procimidona não apresentaram diferença estatística e ambos apresentam baixa solubilidade em água e são pesticidas sistêmicos, resultando em comportamento conforme esperado de maior concentração na polpa. Resíduos de pesticidas sistêmicos penetram nos tecidos das plantas e, portanto,

comparativamente menos deles são removidos com a casca (BALINOVA; MLADENOVA; SHTEREVA, 2006).

5 CONCLUSÕES

O uso do DMRM simplificou o processo de otimização do método, uma vez que não foi necessário pré-definir os segmentos de janela de tempo e evitou-se a perda de analitos devido ao deslocamento do tempo de retenção.

A coluna empregada com tamanho de partícula 1,8 μm foi adequada, mesmo sendo utilizada em um equipamento onde a pressão máxima de trabalho é de 400 bar.

Dos 61 pesticidas inicialmente estudados utilizando método de preparação de amostras QuEChERS, 57 apresentaram fragmentação adequada, dos quais 11 não apresentaram valores de recuperações e coeficiente de variação dentro da faixa recomendada.

Dos compostos analisados, 85% apresentaram efeito matriz leve (<20%) e 15% efeito moderado, fazendo-se necessário utilizar o método de padronização com superposição da matriz para a quantificação dos pesticidas.

Os resultados demonstraram que o método é linear, seletivo, preciso e exato para 46 pesticidas.

Os LD e LQ foram adequados para a análise de pesticidas em tomate conforme LMR estabelecido pela legislação brasileira. Mais de 85% dos compostos investigados apresentaram limites de detecção igual ou menor que 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de quantificação igual ou menor que 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Todas as amostras analisadas (n=58) apresentaram concentrações menores que o LMR permitido no Brasil para acefato, acetamiprido, azoxistrobina, benalaxil, bromuconazol, diflubenzurom, imidacloprido, iprodiona, procloraz e tiametoxam e

15 amostras foram positivas para metamidofós e 1 para oxamil, que são produtos proibidos para uso no Brasil.

Considerando os LMR da União Européia, 15 amostras excederam o limite para metamidofós ($>0,01 \text{ mg kg}^{-1}$), 10 amostras para acefato ($>0,01 \text{ mg kg}^{-1}$) e 4 amostras para bromuconazol ($>0,05 \text{ mg kg}^{-1}$).

Todos os tratamentos de lavagens ($n=3$) diferiram estatisticamente para todos os pesticidas avaliados ($n=8$), com exceção do fipronil, onde as lavagens com solução de bicarbonato 10% e água não apresentaram diferença no nível de significância de 5%.

É indicada a lavagem com solução de bicarbonato 10% para o organofosforado dimetoato. Para os pesticidas imidacloprido, acetamiprido, procimidona e tiametoxam é indicada lavagem com solução de vinagre 10% e para azoxistrobina e diflubenzurom o melhor tratamento é a lavagem com água. Para o fipronil não há diferença entre água e bicarbonato.

A redução dos resíduos de pesticidas pelo descascamento não pode ser completamente explicada pelo caráter sistêmico dos pesticidas, porém a relação entre solubilidade, modo de ação e práticas agrícolas pode ser usada para elucidar essa diminuição.

A lavagem com água ou outras soluções antes do consumo é indicada para a redução de resíduos de pesticidas em tomate e a retirada da casca também contribui substancialmente para essa redução.

REFERÊNCIAS

AKTAR, M. W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, Berlin, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANGIONI, A. et al. Residues of azoxystrobin, fenhexamid and pyrimethanil in strawberry following field treatments and the effect of domestic washing. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 11, p. 1065-1070, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução - RDC nº 10, de 22 de fevereiro de 2008. Dispõe como proceder a reavaliação toxicológica dos produtos técnicos e formulados à base dos Ingredientes Ativos constantes do anexo I e conforme o cronograma do anexo II deste regulamento. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Brasília, DF, n. 37, p. 60-64, 2008.

_____. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA**. Brasília, DF, 2011a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>>. Acesso em: 03 jan. 2013.

_____. Resolução - RDC nº 1, de 14 de janeiro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para o ingrediente ativo Metamidofós em decorrência da reavaliação Toxicológica. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Brasília, DF, n. 11, p. 56, 2011b.

_____. Resolução - RDC nº 4, de 18 de janeiro de 2012. Dispõe sobre os critérios para a realização de estudos de resíduos de agrotóxicos para fins de registro de agrotóxicos no Brasil. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Brasília, DF, n. 16, p. 40-46, 2012.

_____. **Monografias de agrotóxicos**. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

AOAC. **Official Method 2007.01**: Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate. Arlington: AOAC International, 2007. Disponível em: <http://www.weber.hu/PDFs/QuEChERS/AOAC_2007_01.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2013.

ARIENZO, M.; CATALDO, D.; FERRARA, L. Pesticide residues in fresh-cut vegetables from integrated pest management by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Control**, Guildford, v. 31, n. 1, p. 108-115, 2013.

BALINOVA, A. M.; MLADENOVA, R. I.; SHTEREVA, D. D. Effects of processing on pesticide residues in peaches intended for baby food. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 23, n. 9, p. 895-901, 2006.

BEESTMAN, G. B.; NARAYANAN, K.; JON, D. Ready-to-use aqueous formulations and concentrates for strobilurin class of fungicides. In: VOLGAS, G.; DOWNER, R. A.; LOPEZ, H. B. **Pesticide formulations and application systems: 23rd Volume**. Philadelphia: ASTM, 2003. p. 106-114.

BETSY, A.; RAO, V. S.; POLASA, K. Evolution of approaches in conducting total diet studies. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 32, n. 10, p. 765-776, 2012.

BEYER, A.; BIZIUK, M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. **Food Chemistry**, Barking, v. 108, n. 2, p. 669-680, 2008.

_____. Comparison of efficiency of different sorbents used during clean-up of extracts for determination of polychlorinated biphenyls and pesticide residues in low-fat food. **Food Research International**, Essex, v. 43, n. 3, p. 831-837, 2010.

BOJACÁ, C. R. et al. Evaluation of pesticide residues in open field and greenhouse tomatoes from Colombia. **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 2, p. 400-403, 2013.

BONNECHERE, A. et al. Effect of household and industrial processing on the levels of pesticide residues and degradation products in melons. **Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, London, v. 29, n. 7, p. 1058-1066, 2012.

BOOBIS, A. R. et al. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 180, n. 2, p. 137-150, 2008.

BOTERO-COY, A. M. et al. Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 402, n. 7, p. 2287-2300, 2012.

BOTITSI, H.; ECONORNOU, A.; TSIPI, D. Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 389, n. 6, p. 1685-1695, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 03 jan. 2013.

BUNTING, H.; WANG, J.; FLANAGAN, M. **Dynamic MRM method optimization for UHPLC-QQQ multi-residue analytical applications**. Santa Clara: Agilent Technologies, 2009.

CALDAS, E. D.; JARDIM, A. N. O. Exposure to toxic chemicals in the diet: Is the Brazilian population at risk? **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, New York, v. 22, n. 1, p. 1-15, 2012.

CAMINO-SANCHEZ, F. J. et al. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005-accredited method for the determination of pesticide residues in fruit and vegetable samples by LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, London, v. 27, n. 11, p. 1532-1544, 2010.

CHAVARRI, M. J.; HERRERA, A.; ARINO, A. Pesticide residues in field-sprayed and processed fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 10, p. 1253-1259, 2004.

CHEN, Y. et al. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1184, n. 1-2, p. 191-219, 2008.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHRISTENSEN, H. B.; GRANBY, K.; RABOLLE, M. Processing factors and variability of pyrimethanil, fenhexamid and tolylfluanid in strawberries. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n. 8, p. 728-741, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Document CX/PR 07/39/06**: Proposed draft revision of the list of methods for pesticide residue analysis at step 3. Rome: FAO/WHO, 2007.

_____. **Pesticide residues in food and feed**. Rome: FAO/WHO, 2013. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html>>. Acesso em: 02 mar. 2013.

CROTTI, A. E. M. et al. Electrospray ionization mass spectrometry: Chemical processes involved in the ion formation from low molecular weight organic compounds. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DANIEL, J. M. et al. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 216, n. 1, p. 1-27, 2002.

DAVIS, A. R.; FISH, W. W.; PERKINS-VEAZIE, P. A rapid spectrophotometric method for analyzing lycopene content in tomato and tomato products. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 425-430, 2003.

DONATO, P. et al. Mass spectrometry detection in comprehensive liquid chromatography: Basic concepts, instrumental aspects, applications and trends. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 31, n. 5, p. 523-559, 2012.

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

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Parma, Italy, 2010. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1646.htm>>. Acesso em: 18 jan. 2013.

EUROPEAN COMMISSION. **EU Pesticides Database**. Brussels, 2013. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=6810784&CFTOKEN=81425617&jsessionid=0804f162da127d33733fTR>. Acesso em: 02 nov. 2012.

EUROPEAN COMMISSION. **Method Validation and Quality Control Procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Document n° SANCO/12495/2011. Brussels, 2011. 40 p.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **CEN/TC 275 - EN 15662:2008**: Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method. Brussels: CEN, 2008.

FAO. **FAOSTAT**. Rome, 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 02 abr. 2013.

FRENICH, A. G. et al. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 390, n. 3, p. 947-959, 2008.

GEBARA, A. B. et al. Pesticide residues in vegetables and fruits monitored in São Paulo city, Brazil, 1994-2001. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 75, p. 163-169, 2005.

GILBERT-LOPEZ, B. et al. Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 39, p. 6022-6035, 2010.

GONZALAZ-RODRIGUEZ, R. M. et al. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, n. 3, p. 1342-1347, 2008.

HERNANDEZ, F.; SANCHO, J. V.; POZO, O. J. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 382, n. 4, p. 934-946, 2005.

HSU, J. C. **Multiple comparisons**. Theory and methods. London: Chapman & Hall, 1996.

INSTITUTO BIODINÂMICO - IBD. Inspeções e Certificações Agropecuárias e Alimentícias. Botucatu, 2013. Disponível em: <<http://www.ibd.com.br/pt/Default.aspx>>. Acesso em: 14 mai. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. **Normais climatológicas do Brasil 1961-1990**. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisClimatologicas>>. Acesso em: 03 jan. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA - INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008 - Revisão 3. Rio de Janeiro, 2010.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC. **Azoxystrobin** (Ref: ICI 5504). Research Triangle Park, NC, 2013. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/54.htm>>. Acesso em: 03 jan. 2013.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 2, p. 607-616, 2012.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. D.; DE QUEIROZ, S. C. D. Residues of pesticides in food: a global environmental preoccupation - focussing on apples. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

KANG, S. et al. Development of a Method for the Simultaneous Determination of Six Sulfonylurea Herbicides in Wheat, Rice, and Corn by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 18, p. 9776-9781, 2011.

KANRAR, B.; MANDAL, S.; BHATTACHARYYA, A. Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 42 pesticides in made tea, tea infusion and spent leaves using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 12, p. 1926-1933, 2010.

KINSELLA, B. et al. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 637, n. 1-2, p. 196-207, 2009.

KMELLAR, B. et al. Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, London, v. 27, n. 10, p. 1415-1430, 2010.

_____. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1215, n. 1-2, p. 37-50, 2008.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 389, n. 6, p. 1663-1683, 2007.

LEHOTAY, S. J. et al. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, n. 2, p. 595-614, 2005.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 88, n. 2, p. 630-638, 2005.

LEIDY, R. B.; SHEETS, T. J.; SORENSEN, K. A. Residues of acephate and methamidophos in greenhouse tomatoes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 103, n. 3, p. 392-394, 1978.

LESUEUR, C. et al. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 9, p. 906-914, 2008.

LI, L. et al. Application of graphitized carbon black to the QuEChERS method for pesticide multiresidue analysis in spinach. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 92, n. 2, p. 538-547, 2009.

LIANG, Y. et al. Effects of home preparation on organophosphorus pesticide residues in raw cucumber. **Food Chemistry**, Barking, v. 133, n. 3, p. 636-640, 2012.

LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D.; SCHABENBERGER, O. **SAS for mixed models**. 2. ed. Cary, NC: SAS Institute, 2006.

LIU, G. Z. et al. Development of an improved method to extract pesticide residues in foods using acetonitrile with magnesium sulfate and chloroform. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, n. 11, p. 1429-1436, 2011.

LLORENT-MARTINEZ, E. J. et al. Quantitation of ochratoxin a in cereals and feedstuff using sequential injection analysis with luminescence detection. **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 2, p. 379-385, 2013.

MADEIRA, P. J. A.; FLORÊNCIO, M. H. Applications of Tandem Mass Spectrometry: from structural analysis to fundamental studies. In: PRASAIN, J. K. (Ed.). **Tandem Mass Spectrometry - Applications and principles**. East Providence, RI: InTech, 2012. chap. 1.

MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 19, p. 7001-7008, 2006.

MATOS, E. S.; SHIRAHIGE, F. H.; DE MELO, P. C. T. Performance of tomato hybrids of indeterminate growth depending on training systems. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 2, p. 240-245, 2012.

McCULLAGH, P.; NELDER, J. A. **Generalized linear models**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1989.

MELO, A. et al. Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by

gas-chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, n. 3, p. 1071-1077, 2012.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST. **Livro de química na web**. Gaithersburg, MD, 2005. Referência padrão, n. 69. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 03 jan. 2013.

PARADJIKOVIC, N.; HRLEC, G.; HORVAT, D. Residues of vinclozolin and procymidone after treatment of greenhouse grown lettuce, tomato and cucumber. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B**, Oxon, v. 54, n. 4, p. 241-248, 2004.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validation of chromatographic methods for the determination of residues of veterinary drugs in foods. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PAYA, P. et al. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 389, n. 6, p. 1697-1714, 2007.

PEREIRA, L. Transferência de método HPLC para U-HPLC de maior resolução e rapidez. **Analytica**, São Paulo, v. 6, n. 34, p. 68-76, 2008.

PICO, Y. et al. Control of pesticide residues by liquid chromatography-mass spectrometry to ensure food safety. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 25, n. 6, p. 917-960, 2006.

PLUMB, R. et al. Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 18, n. 19, p. 2331-2337, 2004.

RADWAN, M. A. et al. Residual behaviour of profenofos on some field-grown vegetables and its removal using various washing solutions and household processing. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 43, n. 4, p. 553-557, 2005.

RAHMAN, M. M. et al. Single-step modified QuEChERS for determination of chlorothalonil in shallot (*Allium ascalonicum*) using GC- μ ECD and confirmation via mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, London, v. 27, n. 4, p. 416-421, 2013.

REIS FILHO, J. S.; MARIN, J. O. B.; FERNANDES, P. M. Os agrotóxicos na produção de tomate de mesa na região de Goianópolis, Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 4, p. 307-316, 2009.

RIBANI, M. et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICE, P. J.; ARTHUR, E. L.; BAREFOOT, A. C. Advances in pesticide environmental fate and exposure assessments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 14, p. 5367-5376, 2007.

SAGRATINI, G. et al. Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1147, n. 2, p. 135-143, 2007.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Cambridge, v. 52, p. 591-611, 1965.

SOBHANZADEH, E. et al. A simple and efficient multi-residue method based on QuEChERS for pesticides determination in palm oil by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 184, n. 9, p. 5821-5828, 2012.

SOLER, C.; MANES, J.; PICO, Y. Routine application using single quadrupole liquid chromatography-mass spectrometry to pesticides analysis in citrus fruits. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1088, n. 1-2, p. 224-233, 2005.

SOLIMAN, K. M. Changes in concentration of pesticide residues in potatoes during washing and home preparation. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 39, n. 8, p. 887-891, 2001.

SPARKMAN, O. D. Mass spectrometry: A textbook. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 16, n. 5, p. 793-795, 2005.

STONE, P. et al. **New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple Quad Quantification in Complex Samples**. Technical Overview. Santa Clara: Agilent Technologies, 2009.

SUNGUR, S.; TUNUR, C. Investigation of pesticide residues in vegetables and fruits grown in various regions of Hatay, Turkey. **Food Additives & Contaminants Part B**, London, v. 5, n. 4, p. 265-267, 2012.

SWARUP, D.; PATRA, R. C. Environmental pollution and its impact on domestic animals and wildlife. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 75, n. 2, p. 231-240, 2005.

TAO, C. J. et al. Residue analysis of acephate and its metabolite methamidophos in open field and greenhouse pakchoi (*Brassica campestris* L.) by gas chromatography-

tandem mass spectrometry. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 165, n. 1-4, p. 685-692, 2010.

TREVIZAN, L. R. P.; BAPTISTA, G. C. D.; PAPA, G. Acephate and methamidophos residues in greenhouse and in field grown tomatoes. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, p. 38-43, 2005.

USEPA. **US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs**. Reregistration eligibility decision for oxamyl. Washington, DC, 2007. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/oxamyl_red.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2013.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Residue Monitoring Reports**. Silver Spring, MD, 2013.

USUI, K. et al. Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. **Legal Medicine**, Tokyo, v. 14, n. 6, p. 286-296, 2012.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Campinas: Chemkeys, 2003. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/10/17/analise-quantitativa-por-cromatografia/>>. Acesso em: 03 jan. 2013.

VANNOORT, R. W.; THOMSON, B. M. **2009 New Zealand Total Diet Study**. Agricultural compound residues, selected contaminant and nutrient elements. Wellington: Ministry of Agriculture and Forestry, 2009.

VIDAL, J. L. M. et al. Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, n. 40, p. 6767-6788, 2009.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 921, n. 2, p. 227-236, 2001.

WANG, J.; CHEUNG, W.; GRANT, D. Determination of pesticides in apple-based infant foods using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 3, p. 528-537, 2005.

WANG, X. Y. et al. Direct chiral determination of acephate and its metabolite methamidophos in vegetables using QuEChERS by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, Heidelberg, v. 6, n. 1, p. 133-140, 2013.

WASI, S.; TABREZ, S.; AHMAD, M. Toxicological effects of major environmental pollutants: an overview. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 185, n. 3, p. 2585-2593, 2013.

WIŁKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, Barking, v. 125, n. 3, p. 803-812, 2011.

YANG, X. et al. Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC-MS. **Food Chemistry**, Barking, v. 127, n. 2, p. 855-865, 2011.

ZHANG, J. M.; WU, Y. L.; LU, Y. B. Simultaneous determination of carbamate insecticides and mycotoxins in cereals by reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 915, p. 13-20, 2013.

ZHANG, L. J. et al. A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. **Central European Journal of Chemistry**, Heidelberg, v. 10, n. 3, p. 900-925, 2012.

ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, Wanchai, Hong-Kong, v. 1, n. 2, p. 125-144, 2011.

ZHANG, Z. Y.; LIU, X. J.; HONG, X. Y. Effects of home preparation on pesticide residues in cabbage. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 12, p. 1484-1487, 2007.

ZOHAIR, A. Behaviour of some organophosphorus and organochlorine pesticides in potatoes during soaking in different solutions. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 39, n. 7, p. 751-755, 2001.

ZWEIGENBAUM, J. et al. **Application Note 5990-3595EN**. Multi-Residue Pesticide Analysis with Dynamic Multiple Reaction Monitoring and Triple Quadrupole LC/MS/MS. Fast and Effective Method Development Using an Application Kit and a Pesticides Compound Parameter Database. Santa Clara: Agilent Technologies, 2009.