

## COMPARAÇÃO DE MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA NA DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MORANGOS

Daniele Oshita e Isabel C. S. F. Jardim\*

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 17/04/2015; aceito em 27/07/2015; publicado na web em 15/09/2015

COMPARISON OF METHODS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE MULTIRESIDUES IN STRAWBERRIES. Liquid chromatography is often used for the determination of pesticide multiresidues in foods. In Brazil, the strawberry crop is an example of a food with high levels of irregularities because of the application of pesticides. This is a major concern from the perspective of food safety, environmental protection, and certification for food export. The purpose of this study is to evaluate and compare chromatographic separation and detection methods in relation to a newly developed and validated method using ultra high performance liquid chromatography (LC) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) for the analytical determination of pesticides in strawberries. The comparisons were based on evaluations of the analysis time, consumption of the solvent in the mobile phase, injection volume, detectability, matrix effect, and recovery. The results showed that the LC-MS/MS and UHPLC-MS/MS techniques were both extremely efficient at analyzing pesticide residues with different physico-chemical parameters that were present at low concentrations in a complex matrix. The UHPLC separation method provided better chromatographic performance and productivity, which contributed favorably to routine analytical determinations. Detection by MS/MS had better detectability and selectivity compared with the diode array detector.

Keywords: diode array detector; liquid chromatography; mass spectrometry; strawberries; ultra high performance liquid chromatography.

### INTRODUÇÃO

#### Contaminação de morangos por agrotóxicos

Os agrotóxicos pertencem a diversas classes químicas, apresentam diferentes toxicidades e são destinados a vários tipos de organismos-alvo, sendo aplicados na agricultura com a finalidade de aumentar a produção agrícola e preservar a qualidade no pós-colheita ou no armazenamento dos alimentos.<sup>1,2</sup> Ultimamente, os resíduos de agrotóxicos em alimentos têm obtido grande destaque no desenvolvimento de métodos analíticos, pois muitos deles são cancerígenos, mimetizadores de hormônios e potencialmente tóxicos aos seres humanos, podendo causar efeitos adversos no sistema nervoso e reprodutivo.<sup>3-5</sup> Os agrotóxicos também podem contaminar o ar, solo, água e lençol freático devido às diferentes rotas que podem ter no meio ambiente.<sup>6-9</sup> Neste contexto, eles representam um perigo ocupacional aos trabalhadores rurais,<sup>5,10,11</sup> e as frutas e vegetais com resíduos de agrotóxicos acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) proporcionam falta de segurança alimentar aos consumidores e grandes prejuízos financeiros aos produtores rurais pela proibição de entrarem em mercados externos que possuem legislação mais rígida.<sup>12</sup>

Por vários anos consecutivos, o morango vem se destacando na lista dos alimentos mais contaminados por resíduos de agrotóxicos no Brasil.<sup>13</sup> Isto é preocupante, pois o morango é extensamente consumido por crianças e adultos, principalmente *in natura*, além de ser bastante usado pelas indústrias e restaurantes na produção de doces.<sup>12</sup> O morango possui propriedades funcionais diversificadas como antioxidante, anticarcinogênico, antineurodegenerativo, anti-inflamatório, diurético, laxativo, previne doenças coronarianas e tem na sua composição vitaminas e minerais.<sup>14-16</sup> Os aspectos negativos da aplicação de agrotóxicos na produção agrícola podem ser verificados pelos resultados divulgados pelo Programa de Análise de Resíduos de

Agrotóxicos em Alimentos (PARA), iniciado em 2001, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que constatou que o morango, desde 2002 até os dias atuais, está entre os alimentos que apresentam mais irregularidades, tanto pela aplicação de agrotóxicos não autorizados para a cultura, como pela presença de agrotóxicos em concentrações acima do LMR.<sup>13,17,18</sup> Consequentemente, a cultura do morango necessita de um controle rigoroso, que é realizado por meio do monitoramento de resíduos de agrotóxicos, para assegurar alimentos mais saudáveis para os consumidores e gerar menor impacto ambiental.

#### Preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos é feito empregando uma técnica de preparo de amostra, visando a extração dos analitos e o *clean-up* dos interferentes, associado a uma técnica de determinação dos agrotóxicos que engloba separação, identificação e quantificação dos analitos, sendo a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa (*Gas Chromatography* - GC) as mais utilizadas.<sup>19-21</sup>

Dentre as etapas do desenvolvimento de métodos analíticos, o preparo de amostra é considerado uma das mais críticas e importantes, uma vez que se trabalha com matrizes complexas contendo compostos com propriedades físico-químicas diversificadas e em concentrações baixas. Além disso, compreende etapas laboriosas que demandam tempo, são de custo elevado e geram grandes quantidades de resíduos tóxicos.<sup>22-24</sup>

Em 2003, Anastassiades *et al.*,<sup>25</sup> com o objetivo de superar as limitações práticas das técnicas de preparo de amostra de multirresíduos de agrotóxicos utilizadas e disponíveis, introduziram um novo procedimento denominado método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), que consiste na extração com solvente orgânico, seguida por partição líquido-líquido com adição de sais para efeito *salting out*, tamponamento quando necessário, secagem e, finalmente, uma etapa de *clean-up* por extração em fase

\*e-mail: icsfj@iqm.unicamp.br

sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction* - d-SPE).<sup>26-29</sup> Atualmente, o método QuEChERS está sendo muito empregado nas determinações de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos, devido a uma série de vantagens como porcentagens altas de recuperação dos agrotóxicos, baixo custo, manipulação fácil e não utilização de solventes clorados, o que contribui para a Química Verde.<sup>22,23</sup>

### Determinação de resíduos de agrotóxicos com destaque para cromatografia líquida

Nas últimas décadas, a LC tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada para determinações em aplicações científicas e industriais, nas áreas farmacêutica, médica, alimentícia, ambiental e polimérica.<sup>30-32</sup> As principais vantagens da LC incluem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, independente de volatilidade, estabilidade térmica e polaridade, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetibilidade.<sup>30,33</sup> A expansão do uso da LC se deve à síntese de agrotóxicos mais polares, por serem menos persistentes e tóxicos que os apolares.<sup>1,34</sup> As determinações por LC podem ser realizadas empregando-se vários tipos de detectores, sendo os mais utilizados o arranjo de diodos (*Diode Array Detector* - DAD) e o espectrômetro de massas (*Mass Spectrometry* - MS), que realizam análises qualitativas e/ou quantitativas.

### Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial

As análises de alimentos representam um campo amplo e diversificado, sendo que, na última década, o número de trabalhos empregando GC-MS e envolvendo essas matrizes dobrou, enquanto metodologias que usam LC-MS aumentaram quase dez vezes, no mesmo período.<sup>35</sup> O acoplamento de um cromatógrafo a líquido com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (informação estrutural, massa molar e aumento de seletividade e detectabilidade).<sup>1,36</sup>

A espectrometria de massas sequencial (em série ou *tandem*) tem sido considerada uma ferramenta de identificação e confirmação, na qual o monitoramento dos fragmentos fornece maior discriminação em comparação ao emprego de um único estágio (MS). Isto reduz a necessidade de etapas excessivas de preparo de amostra; diminui os resultados falsos positivo e/ou negativo em amostras complexas; permite a identificação de analitos com características físico-químicas diferentes a níveis de ultratraços; resulta em menor tempo e custo das análises pela quantidade reduzida de reagentes utilizados no preparo de amostra e fornece melhor detectabilidade e seletividade.<sup>1,12,37</sup> A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* - LC-MS/MS) está sendo cada vez mais utilizada na área química, principalmente em análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Segundo dados, 2/3 dos trabalhos no setor agroalimentar, publicados em 2011, relacionados a LC com detecção por espectrometria de massas empregaram análises em *tandem*.<sup>35</sup>

### Tendências na determinação de resíduos de agrotóxicos

Um método para determinação de resíduos de agrotóxicos deve ser eficiente, rápido, confiável, de custo baixo, ambientalmente correto e capaz de analisar diversas classes de agrotóxicos em concentrações inferiores ao LMR. Neste âmbito, existe uma diversidade de métodos

analíticos que usam a LC na determinação de resíduos de agrotóxicos em morangos.<sup>12</sup>

Porém, na última década, tem-se presenciado a busca constante por análises mais rápidas e/ou de melhor resolução, sem diminuir o desempenho cromatográfico. Para atender este quesito foi introduzida a cromatografia líquida de ultra alta eficiência (*Ultra High Performance Liquid Chromatography* - UHPLC) para distinguir da técnica convencional HPLC.<sup>32,38</sup> Atualmente, as análises de resíduos de agrotóxicos também são realizadas por UHPLC-MS/MS, que emprega menor volume de amostra e proporciona análises mais rápidas, menor consumo de fase móvel, maior resolução dos picos cromatográficos, melhor detectabilidade e maior razão sinal/ruído, que, por sua vez, diminui o valor do limite de quantificação (*Limit of Quantification* - LOQ).<sup>34,39,40</sup> Ainda não existem muitos trabalhos comparando o emprego da LC com a UHPLC na determinação analítica de resíduos de agrotóxicos, porém há uma tendência da UHPLC tornar-se uma técnica bem estabelecida devido à rapidez, economia de solvente e melhor detectabilidade.<sup>34,41-43</sup>

O objetivo deste trabalho foi comparar a determinação analítica de multirresíduos de agrotóxicos aplicados em morangos empregando a separação por LC e UHPLC e a detecção por MS/MS e DAD. Primeiramente, o método analítico foi desenvolvido, otimizado e validado por LC-MS/MS, em seguida, foi transferido para a UHPLC-MS/MS e UHPLC-DAD a fim de comparar o desempenho das técnicas analíticas em relação ao tempo de corrida analítica, vazão de fase móvel (*Mobile Phase* - MP), volume de injeção de amostra e de consumo de MP, efeito matriz, recuperação e detectabilidade dos analitos.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes

Os reagentes e os solventes utilizados no preparo de amostra e nas análises cromatográficas foram de grau analítico e HPLC, respectivamente. Acetonitrila e metanol foram obtidos da Tedia (USA), ácido fórmico foi adquirido da Synth (Brasil), sulfato de magnésio anidro da Vetec (Brasil), citrato de sódio tribásico diidratado e hidrogenocitrato de sódio sesquidratado da Sigma-Aldrich (USA), cloreto de sódio da Ecibra (Brasil) e Bondesil PSA (40 µm) da Varian (USA). A água ultrapura foi obtida no sistema Milli-Q Plus system da Millipore (USA) com 18,2 MΩ cm de resistividade.

Os agrotóxicos empregados neste trabalho foram selecionados por constarem nas listas dos órgãos reguladores nacional (ANVISA) e/ou internacional (CODEX *Alimentarius* e União Européia - EU) e apresentarem valores de LMR definidos para cultura do morango.<sup>13,44,45</sup> Também foram selecionados alguns agrotóxicos não autorizados, mas que constam frequentemente nas listas dos resultados divulgados pelo PARA.<sup>13</sup> Os agrotóxicos selecionados foram adquiridos das empresas Chem Service (USA), Dr. Ehrenstorfen GmbH (Germany), Sigma-Aldrich (Switzerland) e Pestanal (Germany), todos com pureza maior que 97%. Os compostos usados como padrões de controle do método analítico foram atrazina, da Chem Service, e trifetil fosfato (TTP), da Sigma-Aldrich.

Neste estudo foram analisados agrotóxicos de diferentes classes (acaricida, formicida, fungicida, inseticida e nematocida), grupos químicos (avermectina, organofosforado, estrobilurina, metilcarbamato de naftila, benzimidazol, ácido benzeno dicarboxílico substituído, triazol, benzoiluréia, pirimidinil carbinol, quinazolina, fenilpirrol, neonicotinóide, dicarboximida, metilcarbamato de fenila, imidazolilcarboxamida, triazina e neonicotinóide) e classificações toxicológicas (extremamente, altamente, medianamente e pouco tóxico).<sup>13,46</sup> Os agrotóxicos estudados estão listados na Tabela 1.

## Equipamentos

### Separação Cromatográfica

Nas análises cromatográficas foram utilizados dois sistemas: cromatógrafo a líquido Alliance 2695 e UPLC Acquity da Waters (Milford, MA, USA). As colunas cromatográficas para o sistema LC foram Nova-Pak<sup>®</sup> C18 (150 mm x 3,9 mm d.i., 4 µm de diâmetro de partícula) precedida da coluna de guarda C18 (20 mm x 3,9 mm d.i., 4 µm diâmetro de partícula) e para o UHPLC foram Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (50 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm de diâmetro de partícula) precedida da coluna de guarda Van Guard<sup>™</sup> BEH C18 (5 mm x 2,1 mm d.i., 1,7 µm diâmetro de partícula), todas da Waters.

As separações cromatográficas foram realizadas em temperatura de 30 °C. A fase móvel foi constituída por A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (metanol). As condições de análise empregando LC foram: volume de injeção de 20 µL; vazão da MP de 0,4 mL min<sup>-1</sup>; eluição por gradiente com os solventes variando de 70% A a 95% B em 30 min.

Com o objetivo de comparar as duas técnicas instrumentais, LC e UHPLC, em termos de tempo de corrida analítica, vazão da MP, volume de injeção de amostra e de consumo de MP e detectabilidade dos analitos, após a finalização dos estudos na LC foi realizada a transferência do gradiente de eluição estabelecido para separação cromatográfica por LC para UHPLC, com auxílio do conversor *Acquity UPLC Columns Calculator*, da empresa Waters. Neste conversor é levado em consideração dados da coluna cromatográfica (comprimento, diâmetro e tamanho da partícula), vazão da MP, temperatura do forno, volume de amostra e o programa do gradiente de eluição, para garantir a equivalência cromatográfica no momento de transferência do método. As condições cromatográficas de análise empregando a UHPLC foram: volume de injeção de 1,9 µL; vazão de MP de 0,12 mL min<sup>-1</sup>; eluição por gradiente com os solventes variando de 70% A a 95% B em 10 min.

### Detecção Analítica

Os detectores empregados nas determinações analíticas de multirresíduos de agrotóxicos estudados foram o espectrômetro de massas Micromass Quatro Micro<sup>™</sup> API, com analisador triplo quadrupolo (QqQ) e fonte de ionização por *Electrospray* (ESI), e o detector por arranjo de díodos (DAD), todos da Waters. O sistema de aquisição de dados foi o *software* MassLynx (4.1) e *software* Empower (2.0).

Para o detector de massas, o modo de aquisição dos íons foi de monitoramento de reações múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring* - MRM). As condições da fonte foram: capilar de 3,5 kV, temperatura em 130 °C, temperatura de dessolvatação em 450 °C, o gás nitrogênio foi utilizado no cone e como gás de dessolvatação nas vazões de 60 e 750 L h<sup>-1</sup>, respectivamente. O gás de colisão foi o argônio que foi fixado na pressão aproximada de  $2,5 \times 10^{-3}$  mbar. Para a detecção por DAD foram realizadas varreduras de 190-500 nm para encontrar o comprimento de onda de absorção máxima de cada agrotóxico estudado para melhor detectabilidade e seletividade. Os tempos de retenção, as transições iônicas fornecidas pelo íon precursor e pelos íons produto de quantificação e de confirmação, e os comprimentos de onda estão apresentados na Tabela 1.

### Preparo das soluções dos agrotóxicos

A solução estoque de cada agrotóxico foi preparada em metanol na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> (balança analítica CP 225 D, Sartorius, Germany), exceto para o carbendazim e a simazina que foram de 0,2 mg mL<sup>-1</sup>, devido as suas baixas solubilidades neste solvente. A partir da solução estoque foram realizadas diluições adequadas para preparar as soluções de trabalho que consistiram de uma mistura de

**Tabela 1.** Condições de aquisição empregadas nas determinações dos agrotóxicos estudados por LC-MS/MS, UHPLC-MS/MS e UHPLC-DAD

Nº	Agrotóxico	t <sub>R</sub> (min) <sup>a, b</sup>	Íon Precursor	Íons Produto	t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	λ (nm) <sup>c</sup>
1	Abamectina	29,0 10,3	895,6	327,2 / 751,4	10,2	244,7
2	Acefato	3,8 1,6	184,0	124,5 / 142,6	NA	NA
3	Azoxistrobina	16,9 5,8	404,3	344,1 / 372,0	5,7	246,5
4	Carbaril	14,6 5,2	202,1	126,6 / 144,7	5,0	221,5
5	Carbendazim	9,5 2,3	192,1	131,6 / 159,7	NA	NA
6	Clorpirifós	25,4 8,8	349,9	124,5 / 197,7	8,7	229,4
7	Clortal-dimetflico	22,0 7,8	332,9	222,7 / 300,8	NA	NA
8	Diazinona	20,7 7,2	305,2	152,8 / 168,8	NA	NA
9	Difenoconazol	22,0 7,7	406,0	250,9 / 336,9	7,5	244,1
10	Diflubenzurom	19,6 6,9	311,2	140,6 / 157,7	6,7	257,6
11	Fenarimol	18,9 6,6	331,1	138,6 / 268,0	NA	NA
12	Fenazaquim	29,7 9,9	307,3	90,3 / 160,8	9,8	217,2
13	Fludioxonil	17,6 6,2	247,2	125,6 / 179,9	6,0	265,5
14	Imidacloprido	8,0 3,0	256,2	174,8 / 209,0	NA	NA
15	Iprodiona	19,1 6,9	330,1	244,9 / 287,9	NA	NA
16	Malationa	17,8 6,2	331,0	126,5 / 284,9	NA	NA
17	Metamidofós	3,7 1,6	141,9	93,2 / 111,4	NA	NA
18	Metconazol	20,1 7,4	320,1	69,0 / 124,5	NA	NA
19	Metiocarbe	17,5 6,2	226,2	120,6 / 168,8	NA	NA
20	Mevinfós (E)	11,4 4,0	225,1	126,5 / 192,8	NA	NA
21	Mevinfós (Z)	9,1 3,4	225,1	126,5 / 192,8	NA	NA
22	Procimidona	18,9 6,7	284,2	94,3 / 255,9	6,5	210,0
23	Procloráz	24,0 7,1	376,0	265,9 / 307,9	NA	NA
24	Simazina	13,8 4,9	202,2	123,6 / 131,6	4,8	222,1
25	Tebuconazol	20,3 7,1	308,1	124,5 / 150,7	NA	NA
26	Tiabendazol	11,8 2,6	202,1	130,7 / 174,8	NA	NA
27	Tiametoxam	6,3 2,4	292,0	180,8 / 210,9	NA	NA
28	Triadimefom	18,0 6,3	294,2	196,9 / 225,0	NA	NA
29	Triclorfom	9,2 3,6	257,1	108,4 / 220,9	NA	NA
30	Atrazina <sup>d</sup>	17,2 5,5	216,3	103,3 / 173,8	5,4	222,1
31	TPP <sup>d</sup>	20,6 7,1	327,2	151,9 / 214,9	NA	NA

a: LC-MS/MS; b: UHPLC-MS/MS; c: UHPLC-DAD; d: Padrão de controle; NA: não analisado.

todos os agrotóxicos em metanol. As soluções foram estocadas em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Processamento de amostras de morango

Os morangos isentos de agrotóxicos para preparar os brancos da amostra foram obtidos em um estabelecimento comercial da cidade de Campinas-SP, especializado em produtos orgânicos.

Os morangos foram lavados em água corrente, secos à temperatura ambiente em peneiras para escorrer a água de lavagem e foram processados utilizando um liquidificador de uso doméstico. Em seguida, foram acondicionados em frascos de vidro que foram tampados e mantidos em freezer, a cerca de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o momento de utilização no preparo de amostra.

### Preparo de amostra empregando o método QuEChERS

Neste trabalho foi empregada a versão CEN 15662 modificada, na qual o extrato final foi acidificado com ácido fórmico.<sup>27-29</sup> As determinações analíticas foram feitas empregando os agrotóxicos na concentração de  $100\text{ ng g}^{-1}$ .

Pesaram-se 10 g da amostra (balança analítica A-250, Fisher Scientific, UK) em um tubo de centrífuga (50 mL) e, após a adição de 10 mL de acetonitrila, os tubos foram agitados em vórtex (AP 56, Phoenix, Brasil) por 1 min. Em seguida, foram adicionados 4,0 g sulfato de magnésio anidro; 1,0 g de cloreto de sódio; 1,0 g de citrato de sódio tribásico diidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio sesquidratado. Após a agitação por 1 min, a amostra foi centrifugada (Rotofix 32A, Hettich, Germany) por 15 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi transferido para o tubo de centrífuga contendo 25 mg de sorvente PSA e 150 mg de sulfato de magnésio por mL de solução. Retirou-se uma alíquota do sobrenadante e adicionaram-se 10  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 5% em acetonitrila por mL de sobrenadante. Agitou-se a mistura por 1 min, centrifugou-se por 5 min a 5000 rpm e evaporou-se até a secura sob fluxo de gás nitrogênio. O resíduo foi ressuspenso em 1 mL de metanol e injetado no sistema cromatográfico.

### Validação do Método Analítico

Os parâmetros analíticos como seletividade, limite de detecção (*Limit of Detection* - LOD), limite de quantificação (*Limit of Quantification* - LOQ), linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação) foram determinados para validar o método analítico empregado na análise de multirresíduos de agrotóxicos em morangos por LC-MS/MS. As formas de obtenção e os critérios de aceitação foram baseados, principalmente, no guia Sanco, por ser bem elaborado e direcionado para estas análises.<sup>47</sup>

Para avaliar as variações durante as análises foram utilizados dois padrões de controle. A atrazina, adicionada no branco da amostra, foi utilizada para controle do preparo de amostra, e o TPP, adicionado no extrato final da amostra, para o controle instrumental.

A seletividade do método foi determinada pela comparação dos cromatogramas obtidos para amostras de morangos orgânicos (brancos da amostra) com o de padrões dos agrotóxicos em solvente. Essa avaliação foi realizada para verificar se nos tempos de retenção correspondentes aos agrotóxicos estudados havia a coeluição de interferentes nos brancos da amostra.

Para determinar o LOD e LOQ foram feitas injeções dos analitos em concentrações decrescentes até que a razão sinal/ruído atingisse valores maiores que 3 e 10, respectivamente. Além disso, o limite de quantificação deve ter valor de recuperação no intervalo de 70-120% e coeficiente de variação (*Coefficient of variation* - CV) menor que 20%.

A curva analítica foi construída por superposição de matriz

“*matrix-matched calibration*” em oito níveis de concentrações (10 -  $400\text{ ng g}^{-1}$ ). A quantificação dos analitos foi feita por padronização externa com curvas construídas com 3 replicatas em cada nível de concentração.

A recuperação R (%) foi avaliada por meio da razão do sinal analítico do detector de amostras fortificadas com os agrotóxicos estudados antes e após o preparo de amostra. Esse parâmetro foi obtido pelas injeções de cinco amostras, em três níveis de concentrações (10, 25 e  $100\text{ ng g}^{-1}$ ).

A precisão foi obtida pela avaliação do CV das injeções de cinco amostras, em três níveis de concentrações (10, 25 e  $100\text{ ng g}^{-1}$ ). A repetibilidade ou precisão intra foi realizada no mesmo dia, enquanto que a precisão intermediária foi medida em dias diferentes.

### Comparação dos parâmetros envolvendo separação e detecção analítica

Para comparar os métodos de determinação foram avaliadas as separações obtidas por LC e UHPLC, em função do tempo de corrida analítica, da vazão da MP e do volume de injeção de amostra, e para a detecção empregando MS/MS e DAD, os valores do efeito matrix, da detectabilidade e da recuperação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

Inicialmente, no desenvolvimento do método de determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos, foi empregada a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. As condições experimentais no espectrômetro de massas foram otimizadas para melhor detectabilidade e foram obtidos o íon precursor e dois íons produto, ou seja, as transições iônicas de quantificação e confirmação de cada analito estudado para assegurar maior confiabilidade nas análises. No cromatógrafo a líquido buscaram-se uma corrida analítica com menor tempo possível e uma separação satisfatória dos picos para diminuir a coeluição dos agrotóxicos e favorecer as suas detectabilidades. Na Tabela 1 estão apresentadas as condições experimentais empregadas e na Figura 1 pode ser visualizado o cromatograma da corrida analítica obtida por LC-MS/MS.

### Validação analítica

Os parâmetros analíticos foram obtidos após as etapas de desenvolvimento e otimização do preparo de amostra, da separação e da determinação analítica dos analitos em morangos.

A seletividade foi determinada pela análise de brancos da amostra para monitorar e comparar, por meio dos cromatogramas, a presença de algum sinal no tempo de retenção correspondente aos agrotóxicos. Verificou-se que o método desenvolvido é seletivo, pois para a maioria dos agrotóxicos estudados não se detectou nenhum sinal analítico no seu tempo de retenção e, quando foi detectado um pico cromatográfico, o mesmo estava abaixo de 30% do valor do LOQ, o que não é considerado interferência no método.<sup>47</sup>

A maioria dos agrotóxicos estudados apresentou valores de LOQ em torno de  $10\text{ ng g}^{-1}$ , exceto acefato e metamidofós, que mostraram valores de  $25\text{ ng g}^{-1}$ . Os valores de LOD e LOQ foram inferiores ao LMR dos respectivos agrotóxicos.

As curvas analíticas para todos os analitos apresentaram, por meio da regressão linear, valores de coeficiente de correlação (r) maiores que 0,99 e valores de resíduos menores que  $\pm 20\%$ .

Todos os agrotóxicos apresentaram valores aceitáveis para recuperação, de 71,7-115,8% com CV abaixo de 20%, nos três níveis de

concentração, exceto o metamidofós, que no nível de maior concentração mostrou recuperação de 63,7% e CV de 11,9%, o que garantiu a precisão do método analítico.

Para todos agrotóxicos obtiveram-se valores de CV menores que 20% nos três níveis de concentração. Os valores de repetibilidade variaram de 1,3-16,6% e os de precisão intermediária de 1,6-17,5%. Portanto, o método analítico desenvolvido é preciso.

### Aplicação do método em amostras comerciais

Após a validação do método analítico, doze amostras de morango, sendo duas orgânicas, adquiridas em supermercados e feiras da cidade de Campinas e região, foram analisadas para avaliar a presença de resíduos dos agrotóxicos estudados. Neste estudo, verificaram-se que 75% das amostras continham pelo menos um dos agrotóxicos estudados. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Análise de morangos, adquiridos no comércio de Campinas e região, analisados por LC-MS/MS

Amostras	Agrotóxicos	Amostras	Agrotóxicos
1*	-----	7	Azoxistrobina, Carbendazim, Difenconazol, Procimidona, Procloráz e Tiametoxam
2	Azoxistrobina, Carbendazim, Difenconazol, Iprodiona, e Procimidona	8	Carbendazim, Iprodiona, Tebuconazol e Tiametoxam
3	Carbendazim	9	Acefato, Carbendazim, Imidacloprido, Metamidofós, Procloráz e Tebuconazol
4*	-----	10	-----
5	Acefato, Carbendazim, Metamidofós e Procloráz	11	Carbendazim e Procloráz
6	Azoxistrobina e Difenconazol	12	Procimidona e Imidacloprido

\* Morango orgânico.

Além do grande número de agrotóxicos presentes nas amostras analisadas, outra preocupação que deve ser considerada é a presença de alguns produtos de degradação da molécula original nas amostras analisadas. Segundo informações da ANVISA,<sup>13</sup> quando forem detectados produtos de degradação não autorizados para cultura, deverá ser acrescida uma observação no final do laudo. Neste estudo, por exemplo, o metamidofós é um produto de degradação do acefato e ambos não são autorizados, e o carbendazim é um produto de degradação do tiofanato metílico, cuja aplicação é autorizada para cultura de morango no Brasil.<sup>13,48,49</sup>

As amostras de morangos orgânicos que foram analisadas não apresentaram os agrotóxicos estudados, o que demonstra ausência de aplicação de agrotóxicos no cultivo. No entanto, as análises da maioria das amostras confirmaram a necessidade de realizar o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em morangos no Brasil.

### Transferência do método desenvolvido e validado por LC para UHPLC

Após a validação analítica do método empregando LC-MS/MS, foi feita a transferência deste para a separação empregando UHPLC, com o auxílio da ferramenta de conversão *Acquity UPLC Columns Calculator*.

Na Figura 1 estão apresentados os cromatogramas obtidos ao

empregar a cromatografia líquida. Na Figura 1A e 1B estão apresentados, respectivamente, os cromatogramas de íon total empregando LC-MS/MS e UHPLC-MS/MS no modo de aquisição por monitoramento de reações múltiplas, e na Figura 1C o cromatograma obtido por UHPLC-DAD no comprimento de onda de 254 nm. Na detecção por espectrometria de massas os agrotóxicos foram cromatografados em oito janelas de aquisição na LC e em seis janelas de aquisição na UHPLC. As janelas de aquisição foram divididas com o objetivo de englobar um menor número de analitos em cada intervalo de tempo selecionado para favorecer a detectabilidade. Na Figura 1C, os agrotóxicos analisados por UHPLC-DAD foram apresentados como: (1) Simazina, (2) Carbaril, (3) Atrazina, (4) Azoxistrobina, (5) Fludioxonil, (6) Procimidona, (7) Diflubenzurom, (8) Difenconazol, (9) Clorpirifós, (10) Fenazaquim, e (11) Abamectina.

Com base nos cromatogramas da Figura 1 foram analisados 31 compostos empregando o detector de massas e apenas 11 por DAD. No DAD foi analisado um menor número de agrotóxicos, devido à necessidade dos compostos apresentarem em suas estruturas grupos cromóforos, com absorção no UV, e tempos de retenção distintos entre os analitos e os interferentes das amostras.

### Comparação da separação cromatográfica obtida por LC e UHPLC

Na Tabela 3 estão apresentados o tempo de corrida, a vazão e o volume de MP, e o volume de injeção de amostras que permitiram comparar o desempenho das duas técnicas de separação representadas por LC (LC-MS/MS) e UHPLC (UHPLC-MS/MS e UHPLC-DAD).

Verifica-se, analisando a Tabela 3, que as vantagens marcantes do método que empregou a UHPLC foram o tempo de análise aproximadamente três vezes mais rápido que por LC, o volume de injeção de amostra e o consumo de solvente orgânico na MP de cerca de dez vezes inferior ao usado na LC.

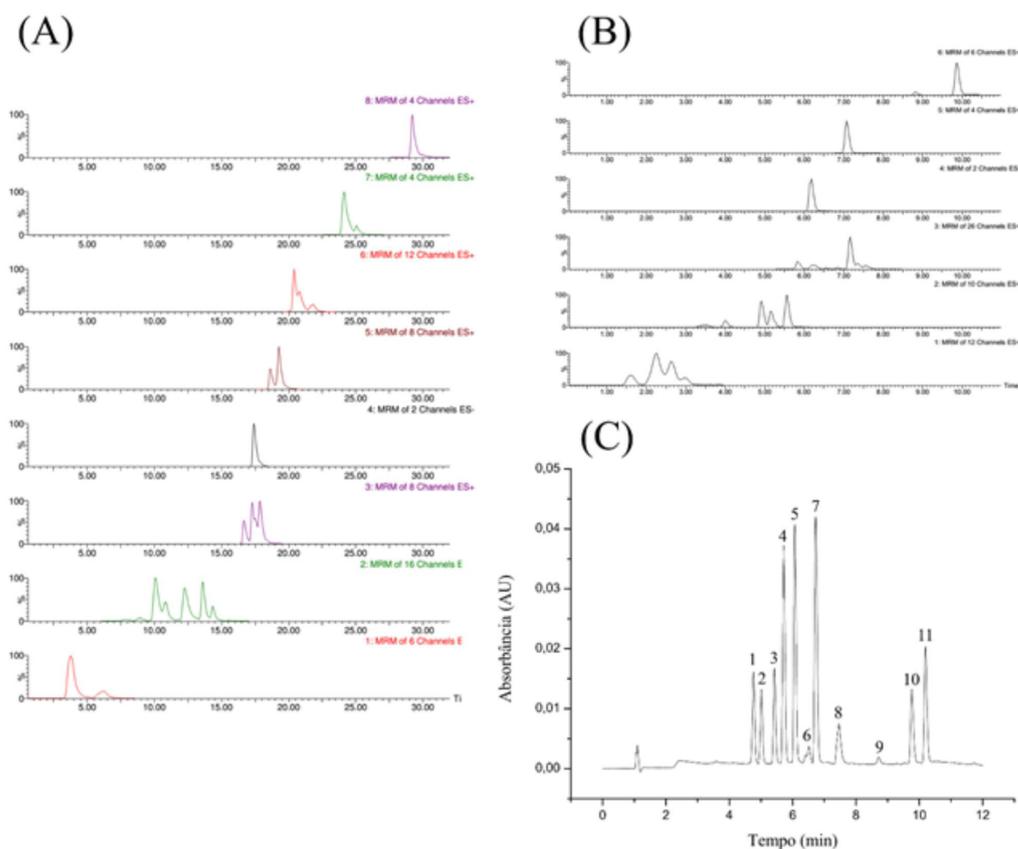
O volume injetado depende da capacidade máxima da coluna cromatográfica. Desta forma, não se deve injetar na UHPLC volumes de amostra iguais aos utilizados na LC ou aleatórios, pois pode resultar em perda de eficiência e/ou sobrecarga de amostra na coluna, com conseqüente diminuição do tempo de vida útil da coluna cromatográfica.<sup>33</sup>

É importante destacar que o volume de amostra disponível é um parâmetro relevante em muitas situações práticas como análise clínica e química forense que, muitas vezes, dispõem de volume de amostra pequeno.<sup>31</sup> Nestes casos citados, o uso da UHPLC é extremamente benéfico e adequado pois empregam volumes de amostras reduzidos devido à dimensão das colunas cromatográficas serem menores que as de LC. Neste trabalho, no qual se empregou o método QuEChERS no preparo de amostra, pode ser realizada a separação tanto por LC como UHPLC, pois o extrato foi resuspenso em 1 mL de solvente orgânico, ou seja, em um volume suficiente para ser injetado nos cromatógrafos referentes a qualquer uma das técnicas de separação cromatográfica citadas.

Outro destaque a ser feito refere-se à economia de solvente resultante do emprego de menor vazão de MP para realizar a separação cromatográfica empregando a UHPLC, o que está em concordância com os requisitos da Química Verde pelo menor volume de resíduo gerado. Portanto, a UHPLC pode ser considerada uma técnica promissora e, provavelmente, em um futuro próximo venha a se estabelecer como uma técnica analítica para análises de rotina.

### Comparação da detecção analítica obtida por MS/MS e DAD

Para uma avaliação mais detalhada sobre o emprego dos detectores, alguns parâmetros como LOQ, efeito matriz e recuperação foram determinados.



**Figura 1.** Cromatogramas obtidos na separação analítica de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de agrotóxicos em metanol, no modo MRM, em oito janelas de aquisição por LC - MS/MS (A) e em seis janelas de aquisição por UHPLC - MS/MS (B). Separação por UHPLC - DAD de uma solução de  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de agrotóxicos em metanol, detectado em comprimento de onda de 254 nm (C). Cromatograma obtido por DAD adaptado da referência 50 (Reproduced with permission of The Royal Society of Chemistry)

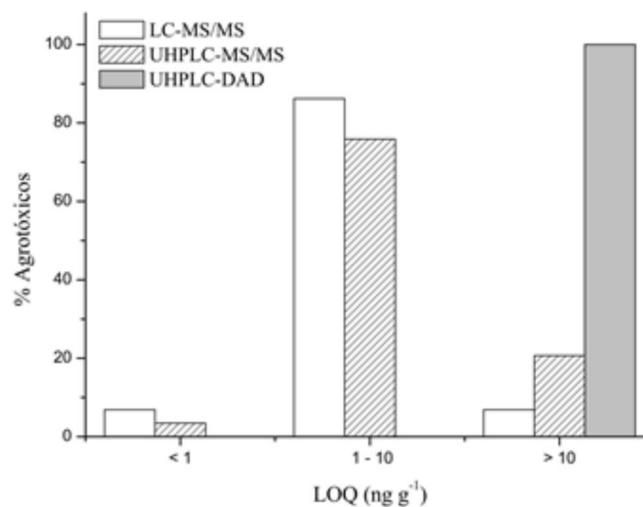
**Tabela 3.** Parâmetros cromatográficos obtidos nas análises de agrotóxicos em morango por LC e UHPLC

Parâmetros	LC	UHPLC
Tempo de corrida (min)	30	10
Vazão da MP ( $\text{mL min}^{-1}$ )	0,4	0,12
Volume de MP (mL)	12	1,2
Volume de Injeção ( $\mu\text{L}$ )	20	1,9

#### Limite de Quantificação

Na Figura 2 estão apresentadas as porcentagens de agrotóxicos detectados em função das concentrações dos LOQ, empregando LC-MS/MS, UHPLC-MS/MS e UHPLC-DAD.

A detectabilidade da determinação de resíduos de agrotóxicos em morangos empregando UHPLC-MS/MS foi afetada negativamente, pois resultou em agrotóxicos com valores de LOQ semelhantes ou maiores que os obtidos por LC-MS/MS, dependendo da faixa de concentração dos compostos analisados. Geralmente, a separação empregando UHPLC possui melhor detectabilidade, pois apresenta uma maior resolução, o que melhora o formato do pico e aumenta a razão sinal/ruído.<sup>41,42</sup> Porém, esta perda na detectabilidade pode estar relacionada às inúmeras transições MRM monitoradas simultaneamente, pelo maior número de agrotóxicos que coeluíram na corrida cromatográfica em um menor intervalo empregando UHPLC. Consequentemente, para conseguir monitorar todas as transições iônicas, foi necessário diminuir o tempo de aquisição (*dwelt time*), o que influenciou negativamente na detectabilidade do método.<sup>51</sup> Entretanto, o emprego da UHPLC neste trabalho, mesmo fornecendo alguns valores maiores de LOQ, atendeu às concentrações do LMR. Dessa forma, comprovou-se que a detectabilidade da técnica não



**Figura 2.** Porcentagem dos agrotóxicos em morangos distribuídos em função dos LOQ que foram obtidos por diferentes métodos de determinação

depende apenas das características físico-químicas dos analitos, mas também do número dos agrotóxicos analisados e da velocidade de aquisição das transições MRM do equipamento.

No caso do DAD, os agrotóxicos apresentaram concentrações de LOQ maiores que as obtidas usando os métodos que empregaram a detecção por MS/MS. Isto já era esperado, pois o DAD apresenta seletividade e detectabilidade inferiores ao detector de massas. Porém, esta desvantagem poderia ser contornada com um preparo de amostra que apresentasse um fator de concentração maior que o do método QuEChERS.

### Efeito matriz

A separação empregando UHPLC proporciona picos mais estreitos devido à melhor resolução. Consequentemente, os analitos coeluem com menos interferentes e, durante a ionização, o efeito matriz é minimizado ou inexistente.<sup>51</sup>

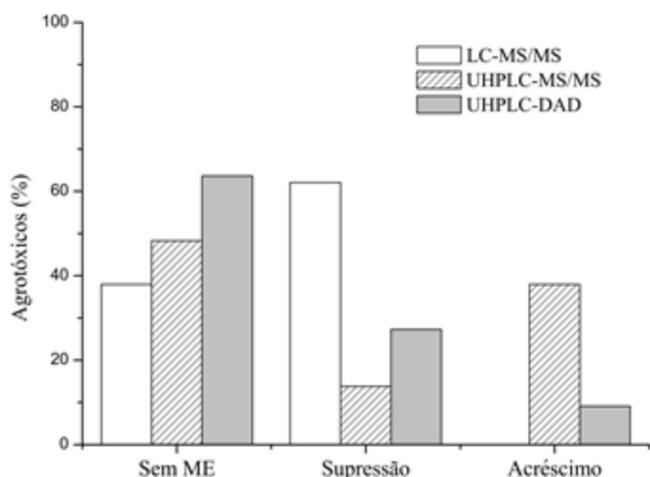
O efeito matriz é utilizado para verificar a eficiência de ionização do analito no detector, que pode causar alterações negativa ou positiva no sinal do detector, devido à supressão iônica ou acréscimo de sinal, respectivamente. O mecanismo exato do efeito matriz ainda não é conhecido, mas é comum assumir que os compostos coeluídos competem com os analitos e a ionização será favorecida para as moléculas que são mais ionizáveis e estão em maiores concentrações na amostra. Este efeito interfere na quantificação dos analitos e deixa de ser confiável pela alteração causada na precisão, exatidão e detectabilidade do método.<sup>52,53</sup>

O efeito matriz depende da complexidade das amostras, ou seja, do número e quantidade de substâncias que estão na sua composição e podem interferir na determinação analítica. O preparo de amostra, principalmente a etapa de limpeza, é essencial para reduzir o efeito matriz pela remoção dos interferentes. Outras alternativas para a diminuição do efeito matriz consistem em construir a curva analítica na própria matriz, diluir a amostra, utilizar padrão interno, otimizar a separação cromatográfica e alterar as condições do detector, como modo de ionização, tipo de fonte ou transições MRM não interferentes.<sup>52,54,55</sup>

Este efeito é calculado pela razão da resposta analítica do extrato final da amostra fortificado com a solução dos agrotóxicos pela resposta analítica da solução dos padrões em solvente, ambos na mesma concentração.<sup>56,57</sup> Quando as variações nas respostas do detector forem menores que  $\pm 20\%$  considera que não há efeito matriz. Valores superiores a  $\pm 20\%$  apontam que o efeito matriz é significativo e ele pode ser causado por supressão ou acréscimo de sinal.<sup>56,58,59</sup> Em trabalhos empregando o detector DAD não há muitos estudos sobre o efeito matriz, mas neste trabalho ele foi avaliado para comparação com a detecção por MS/MS.

A Figura 3 apresenta os resultados do efeito matriz em amostras de morango empregando os diferentes métodos de determinação analítica.

Observa-se, pela Figura 3, que nenhum agrotóxico mostrou acréscimo de sinal nas análises por LC-MS/MS. O emprego da UHPLC-MS/MS apresentou um número maior de agrotóxicos que não apresentaram efeito matriz em relação a separação por LC-MS/MS, o que já era esperado pela melhor separação cromatográfica, porém alguns analitos apresentaram acréscimo de sinal, principalmente os agrotóxicos presentes na terceira janela de aquisição



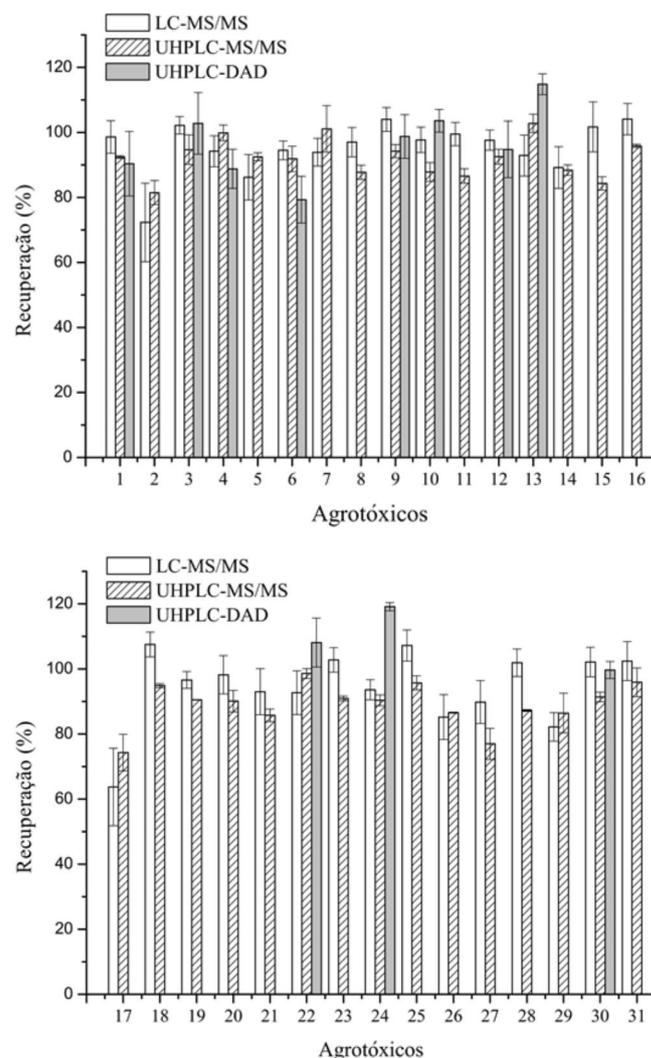
**Figura 3.** Porcentagem de agrotóxicos em amostras de morango que apresentaram efeito matriz empregando diferentes métodos analíticos

por conterem maior número de componentes que são conduzidos a uma competição mais intensa na etapa de ionização. Nas análises empregando UHPLC-DAD, verifica-se uma maior porcentagem de agrotóxicos que não sofreram efeito matriz significativo e apenas a simazina apresentou acréscimo de sinal, provavelmente devido ao seu menor tempo de retenção (Tabela 1), eluindo no início da corrida cromatográfica, momento no qual eluem diversos interferentes. Na composição do morango existe uma grande quantidade de água, açúcares, minerais, vitaminas e pigmentos, tais como antocianinas, sendo que principalmente o último componente pode contribuir com o aumento do efeito matriz.

A menor quantidade de interferentes colabora com a recuperação e valores de LOQ mais baixos devido à menor intensidade do ruído no sinal cromatográfico, com a diminuição da necessidade de manutenção e de limpeza dos equipamentos e com o aumento do tempo de vida útil da coluna cromatográfica.

### Recuperação

Para análises de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, os valores aceitáveis de recuperação estão na faixa de 70 - 120% e CV menores que 20%.<sup>47</sup> Pela Figura 4, pode-se verificar que os agrotóxicos apresentaram recuperações de 72,3-107,5% para LC-MS/MS; 74,3-102,8% para UHPLC-MS/MS e 79,3-119,1% para UHPLC-DAD, sendo que em todas as determinações os valores de CV



**Figura 4.** Recuperações (%) e CV (%) dos agrotóxicos, na concentração de 100 ng g<sup>-1</sup>, obtidas por diferentes métodos de determinação analítica

estavam abaixo de 20% para todos os agrotóxicos. A única exceção foi o metamidofós, que apresentou recuperação de 63,7% e CV de 11,9% na determinação por LC-MS/MS, garantindo a precisão do método analítico.

Excelentes valores de recuperação foram obtidos com os três métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em morangos, sendo que, empregando o detector de massas, obteve-se uma similaridade nos valores de recuperação entre os dois métodos cromatográficos, LC e UHPLC, e valores menores de CV nas injeções da maioria dos agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS.

## CONCLUSÃO

O método desenvolvido e validado para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos empregando LC-MS/MS apresentou-se seletivo, exato e preciso, com valores de recuperação e CV nos intervalos recomendados. O preparo de amostra empregado foi o método QuEChERS na versão CEN 15662 modificada, que extraiu analitos com características físico-químicas diferenciadas, em concentrações baixas, em uma matriz complexa como o morango. Além disso, utilizou pouca vidraria e instrumentos, o tempo foi relativamente curto por preparar várias amostras simultaneamente, gerou um volume de resíduo menor que os produzidos com o uso das técnicas tradicionais e não utilizou solventes clorados.

Amostras de morango disponíveis no comércio puderam ser analisadas para verificar a presença de resíduos dos agrotóxicos estudados, permitindo que a qualidade do alimento fosse avaliada. Irregularidades como um grande número de agrotóxicos e presença de agrotóxicos não autorizados foram constatadas nos morangos analisados.

Verificou-se que o emprego das técnicas LC-MS/MS e UHPLC-MS/MS na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de morangos é extremamente eficiente, devido à seletividade e detectabilidade. As vantagens mais significativas do método desenvolvido utilizando a UHPLC foram o tempo de análise reduzido, o menor volume de injeção de amostra e de consumo de solvente orgânico na MP. Em contraste, a detectabilidade ficou semelhante ou superior à obtida por LC-MS/MS para alguns agrotóxicos, porém permitiu detectar e quantificar analitos em concentrações inferiores aos LMR impostos pelas agências reguladoras. Por outro lado, a determinação analítica empregando UHPLC-DAD também pode ser empregada, com a vantagem de menor custo da análise, porém, seu uso requer uma separação cromatográfica eficiente, analitos que contenham grupos cromóforos em suas estruturas e uma técnica de preparo de amostra que forneça fatores de concentração elevados que permitam atingir a detectabilidade desejada.

A transição da separação analítica de LC para UHPLC é uma tendência nos laboratórios, pois a UHPLC-MS/MS possui muitas vantagens para cada vez mais se consolidar como uma técnica instrumental eficiente, rápida, econômica, de maior produtividade e ambientalmente correta para ser aplicada na área de determinação de resíduos de agrotóxicos.

## AGRADECIMENTOS

Às agências de fomentos FAPESP pelo suporte financeiro (Projeto Temático FAPESP número 2006/57897-9), CAPES, CNPq e INCTAA.

## REFERÊNCIAS

- Hiemstra, M.; Kok, A.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1154*, 3.
- Jardim, I. C. S. F.; Andrade, J.A.; Queiroz, S. C. N.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 996.
- Lintelmann, J.; Katayama, A.; Kurihara, N.; Shore, L.; Wenzel, A.; *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 631.
- Ward, M. H.; Nuckols, J. R.; Weigel, S. J.; Maxwell, S. K.; Cantor, K. P.; Miller, R. S.; *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108*, 5.
- Faria, N. M. X.; Fassa, A. C. F.; Meucci, R. D.; Fiori, N. S.; Miranda, V. I.; *Neurotoxicology* **2014**, *45*, 347.
- Dores, E. F. G. C.; De-Lamonica-Freire, E. M.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 27.
- Sanches, S. M.; Silva, C. H. T. P.; Campos, S. X.; Vieira, E. M.; *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* **2003**, *13*, 53.
- Gil, Y.; Sinfort, C.; *Atmos. Environ.* **2005**, *39*, 5183.
- Arias-Esteévez, M.; López-Periago, E.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J.; Mejuto, J.C.; García-Río, L.; *Agric., Ecosyst. Environ.* **2008**, *123*, 247.
- [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo\\_atencao\\_saude\\_trab\\_exp\\_agrotoxicos.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_atencao_saude_trab_exp_agrotoxicos.pdf), acessada em Setembro de 2015.
- Silva, J. J. O.; Alves, S. R.; Meyer, A.; Perez, F.; Sarcinelli, P. N.; Mattos, R. C. O. C.; Moreira, J. C.; *Rev. Saude Publica* **2001**, *35*, 130.
- Oshita, D.; Jardim, I. C. S. F.; *Scientia Chromatographica* **2012**, *4*, 52.
- <http://www.anvisa.gov.br>, acessada em Setembro de 2015.
- Hakkinen, S. H.; Torronen, A. R.; *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 517.
- Seeram, N. P.; Lee, R.; Scheuller, H. S.; Heber, D.; *Food Chem.* **2006**, *97*, 1.
- Rocha, D. A.; Abreu, C. M. P.; Corrêa, A. D.; Santos, C. D.; Fonseca, E. W. N.; *Rev. Bras. Frutic.* **2008**, *30*, 1124.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Minuta de nota técnica para divulgação dos resultados do PARA 2008. Brasília, 15 de abril de 2009.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Minuta de nota técnica para divulgação de relatório de atividades de 2011 e 2012. Brasília, 29 de outubro de 2013.
- Wan, H. B.; Wong, M. K.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *754*, 43.
- Vidal, L. M.; Arrebola, F. J.; Sánche, M. M.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *959*, 203.
- Cajka, T.; Hajslova, J.; Lacina, O.; Mastovska, K.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 281.
- Prestes, O. D.; Friggi, C. A.; Adaiame, M. B.; Zanella, R.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1620.
- Wilkowska, A.; Biziuk, M.; *Food Chem.* **2011**, *125*, 803.
- LeDoux, M.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1021.
- Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J.; *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412.
- Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615.
- <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/reality.pdf>, acessada em Setembro de 2015.
- Lehotay, S. J.; Son, K. A.; Kwon, H.; Koesukiwat, U.; Fu, W.; Mastovska, K.; Hoh, E.; Leepipatiboon, N.; *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 2548.
- Lehotay, S. J.; Anastassiades, M.; Majors, R. E.; *LCGC North Am.* **2010**, *28*, 504.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Fundamentos de Cromatografia*, Editora da UNICAMP: Campinas, 2006.
- Laças, F. M.; *Cromatografia Líquida Moderna*. Editora Átomo: Campinas, 2009.
- Maldaner, L.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 214.
- Meyer, V. R.; *Practical High Performance Liquid Chromatography*, 4<sup>th</sup> ed., John Wiley & Sons: New York, 2004.
- Kovalczuk, T.; Jech, M.; Poustka, J.; Hajslová, J.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *8*, 577.

35. Di Stefano, V.; Avellone, G.; Bongiorno, D.; Cunsolo, V.; Muccilli, V.; Sforza, S.; Dossena, A.; Drahos, L.; Vekey, K.; *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, 74.
36. Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 623.
37. Zamora, T.; Pozo, O. J.; López, F. J.; Hernández, F.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1045*, 137.
38. Kmellár, B.; Pareja, L.; Ferrer, C.; Fodor, P.; Fernández-Alba, A. R.; *Talanta* **2011**, *84*, 262.
39. Frenich, A. G.; Vidal, J. L. M.; Pastor-Montoro E.; Romero-González, R.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 947.
40. Queiroz, S. C. N.; Ferracini, V. L.; Rosa, M. A.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 185.
41. Churchwell, M. I.; Twaddle, N. C.; Meeker, L. R.; Doerge, D. R.; *J. Chromatogr. B* **2005**, *825*, 134.
42. Leandro, C. C.; Hancock, P.; Fussell, R. J.; Keely, B. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1103*, 94.
43. Wang, J.; Chow, W.; Leung, D.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 1513.
44. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>, acessada em Setembro de 2015.
45. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/>, acessada em Setembro de 2015.
46. <http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>, acessada em Setembro de 2015.
47. Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document n°. SANCO/10684/2009. Supersedes Document n° SANCO/3131/2007. Implementado em: 01/01/2010.
48. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Toxicologia. Nota Técnica - Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Metamidofós.
49. Reemtsma, T.; Alder, L.; Banasiak, U.; *J. Chromatogr. A* **2013**, *1271*, 95.
50. Oshita, D.; Jardim, I. C. S. F.; *Anal. Methods* **2015**, *7*, 982.
51. Van De Steene, J. C.; Lambert, W. E.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 713.
52. Trufelli, H.; Palma, P.; Famiglini, G.; Cappiello, A.; *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, *30*, 491.
53. Marín, J. M.; Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V.; López, F. J.; Hernández, F.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 1410.
54. Krueve, A.; Künnapas, A.; Herodes, K.; Leito, I.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1187*, 58.
55. Niessen, W. M. A.; Manini, P.; Andreoli, R.; *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 881.
56. Pizzutti, I. R.; Kok, A.; Hiemstra, M.; Wickert, C.; Prestes, O. D.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 4539.
57. Lee, S. W.; Choi, J.; Cho, S.; Yu, H.; Abd El-Aty, A. M.; Shim, J.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4366.
58. Kmellár, B.; Fodor, P.; Pareja, L.; Ferrer, C.; Martínez-Uroz, M. A.; Valverde, A.; Fernández-Alba, A. R.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1215*, 37.
59. Oshita, D.; Jardim, I. C. S. F.; *Chromatographia* **2014**, *77*, 1291.