

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**AGROTÓXICOS EM DOCES DE FRUTAS EM PASTA:
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS POR
 μ LC-QTRAP-MS/MS E ESTUDO DE ESTABILIDADE**

TESE DE DOUTORADO

Bárbara Reichert

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**AGROTÓXICOS EM DOCES DE FRUTAS EM PASTA:
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS POR μ LC-QTRAP-MS/MS
E ESTUDO DE ESTABILIDADE**

Bárbara Reichert

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientadora: Profa. Dra. Ijoni Hilda Costabeber

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Reichert, Bárbara

Agrotóxicos em Doces de Frutas em Pasta: Determinação de Resíduos por MicroLC-QTRAP-MS/MS e Estudo de Estabilidade / Bárbara Reichert.-2015.

135 p.; 30cm

Orientadora: Ijoni Hilda Costabeber

Coorientadores: Ionara Regina Pizzutti, Amadeo R. Fernández-Alba

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2015

1. Resíduos de agrotóxicos 2. Doces de frutas em pasta
3. μ LC-QTRAP-MS/MS 4. LC-QTOF-MS 5. GC-IT-MS I.
Costabeber, Ijoni Hilda II. Pizzutti, Ionara Regina
III. R. Fernández-Alba, Amadeo IV. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Bárbara Reichert. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Rio Grande do Sul, 2564, Bairro Centro, Cascavel, PR. CEP: 858010-011. Fone: (45) 32203213; E-mail: reichert.farmacia@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado**

**AGROTÓXICOS EM DOCES DE FRUTAS EM PASTA:
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS POR μ LC-QTRAP-MS/MS
E ESTUDO DE ESTABILIDADE**

elaborada por
Bárbara Reichert

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ijoni Hilda Costabeber, Dra.
(Presidenta/Orientadora)

Carmem Dickow Cardoso, Dra. (UFSM)

Fernanda Leal Leães, Dra. (UERGS)

Roger Wagner, Dr. (UFSM)

Rosselei Caiél da Silva, Dra. (URI)

Santa Maria, 24 de julho de 2015.

AGRADECIMENTOS

- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, agradeço pela concessão das bolsas de doutorado e doutorado sanduíche (Processo 14234-13-0).
- À professora Ijoni Costabeber, agradeço pela oportunidade, pela confiança e pela orientação neste trabalho.
- À Professora Ionara Pizzutti, pela gentileza da utilização dos equipamentos e laboratórios para os testes iniciais de desenvolvimento do projeto desta tese, pelo apoio, amizade, ensinamentos e pela coorientação.
- Ao Professor Amadeo R. Fernández-Alba, por ter aceitado ser meu coorientador no exterior e ter me recebido em seu laboratório possibilitando a realização da pesquisa relativa a esta tese.
- Ao grupo de colegas do EURL-FV obrigada pelos ensinamentos, apoio e amizade. Em especial a Sonia, a Noelia, a Ana Uclés e a Ana Martinez.
- Aos colegas de doutorado e ao grupo do LAPP, em especial a Giane, a Joseane e a Vanusa, pelo apoio, companheirismo e amizade.
- Aos colegas do CEPARC, em especial ao Jonatan, a Cátia, à Giovana, à Ingrid e a Profa. Carmem.
- Ao Prof. Roger Wagner, muito obrigada pela ajuda, sugestões e ensinamentos.
- Aos professores(as) integrantes da banca, agradeço pelas correções, sugestões e por terem aceitado o convite.
- À Lia e às professoras Neidi e Luisa, muito obrigada por toda ajuda e atenção.
- Ao meu amado namorado Cesar, agradeço pela compreensão, paciência e incentivo.
- Aos meus pais, Egon e Nelci e a meus irmãos pelo apoio e incentivo.
- Às amigas e colegas de apartamento, Mônica, Marina e Estefânia, que estiveram comigo durante grande parte dessa caminhada e acompanharam de perto todo esforço para alcançar esta conquista, obrigada pela amizade, parceria, festas e apoio.
- E a todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram com esta conquista.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

AGROTÓXICOS EM DOCES DE FRUTAS EM PASTA: DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS POR μ LC-QTRAP-MS/MS E ESTUDO DE ESTABILIDADE

AUTORA: BÁRBARA REICHERT

ORIENTADORA: IJONI HILDA COSTABEBER

COORIENTADORA: IONARA REGINA PIZZUTTI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de julho de 2015.

Este trabalho apresenta um método multiresidual para determinação de resíduos de agrotóxicos em doces de fruta em pasta. Para obter-se amostras homogêneas e de fácil manipulação preparou-se uma mistura (*slurry*) dos doces de frutas e água ultrapura (u.p.). O preparo das amostras foi feito utilizando o método QuEChERS modificado. Com o objetivo de diminuir o efeito matriz (%) das amostras e pela alta detectabilidade do equipamento de cromatografia de micro vazão a líquido acoplada à espectrometria de massas híbrida triplo quadrupolo-armadilha de íons linear (μ LC-QTRAP-MS/MS) os extratos de acetonitrila foram diluídos na razão de 1:30 (v/v) antes da análise. A validação do método analítico foi feita pela análise de amostras de doces de uva fortificadas nas concentrações de 9 e 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=5). Dos 107 agrotóxicos avaliados 93% (99) obtiveram recuperações de 70 a 120% e desvio padrão relativo (RSD) $\leq 20\%$. Os limites de notificação (RL) foram de 9 e 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para, respectivamente, 66% e 26% dos agrotóxicos avaliados, 5% dos compostos não alcançaram os pré-requisitos necessários para a validação e 3% não foram detectados nas concentrações estudadas. Após a validação do método, foram analisadas 51 amostras de doces de frutas provenientes do Brasil e da Espanha. Em 80% amostras foram detectados resíduos de agrotóxicos, 51% destas continham no mínimo um agrotóxico em concentração maior que 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Além disso, avaliou-se a estabilidade de cinco agrotóxicos no preparo de doces de frutas caseiros. Para isso, cinco tipos de frutas (laranja, maçã, morango, pera e pêssego, com n=2 para cada tipo de fruta) foram trituradas e fortificadas com uma mistura de carbendazim, clorpirifós, imidacloprido, iprodiona e propargito a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Essas amostras foram utilizadas no preparo de doces de frutas caseiros. Para isso, as frutas trituradas e fortificadas foram cozidas com açúcar e água u.p. (proporção de 5:5:2, m/m/m) em panela aberta sob fogo médio durante 30 min. O método QuEChERS modificado foi aplicado às frutas não fortificadas, às frutas fortificadas (500 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e aos doces de frutas caseiros (preparados com frutas fortificadas a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Os extratos dessas amostras foram analisados por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas híbrida quadrupolo-de tempo de voo (LC-QTOF-MS), com o objetivo de verificar a presença dos metabólitos conhecidos dos agrotóxicos e determinar o número de componentes co-extraídos das matrizes. Todas as amostras foram analisadas também por μ LC-QTRAP-MS/MS com o objetivo de comparar a concentração dos agrotóxicos nas frutas fortificadas com as concentrações nos doces de frutas correspondentes. A partir dessa relação foi possível estimar um fator de processamento (FP) para os agrotóxicos no preparo dos doces de frutas caseiros (concentração do agrotóxico no doce de fruta/concentração do agrotóxico na fruta fortificada).

Palavras-chave: Doces de frutas em pasta. Agrotóxicos. μ LC-QTRAP-MS/MS. LC-QTOF-MS.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Post-Graduation Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

PESTICIDES IN FRUIT JAMS: RESIDUES DETERMINATION BY μ LC-QTRAP-MS/MS AND STABILITY STUDY

AUTHOR: BÁRBARA REICHERT

ADVISER: IJONI HILDA COSTABEBER

CO-ADVISER: IONARA REGINA PIZZUTTI

Place and Date of Defense: Santa Maria, July 24, 2015.

This work presents multi-method for pesticide residues determination in fruit jams. Slurries of the fruit jams and ultrapure (u.p.) water were prepared to yield homogeneous samples and to facilitate the sample handling. The modified QuEChERS method was used for the sample preparation. Due the high detectability of the micro flow liquid chromatography triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry equipment (μ LC-QTRAP-MS/MS) and to minimize the matrix effect (%) the acetonitrile extracts were diluted 30-fold before analysis. The method validation was performed analyzing spiked samples at the concentrations of 9 and 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=5). The method met validation criteria of 70–120% recovery and relative standard deviation (RSD) $\leq 20\%$ for 93% (99) of the 107 pesticides evaluated. The reporting limit (RL) was 9 and 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for, respectively, 66% and 26% of the analytes, 5% of the compounds did not fulfill the requirements for validation and 3% were not detected at the studied concentrations. The validated method was applied to the analysis of 51 different fruit jam samples from Brazil and from Spain. Pesticide residues were detected in 80% of the samples, 51% of which contained at least one pesticide at concentration higher than 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Moreover, the stability of five pesticides was evaluated in the preparation of home-made fruit jams from spiked fruits. Thereunto, five types of fruits (orange, apple, strawberry, pear and peach, with n=2 for each type of fruit) were grinded and spiked at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ with a mixture of carbendazim, chlorpyrifos, imidacloprid, iprodione and propargite. Home-made jams were prepared with these spiked samples by cooking, over medium heat, the grinded spiked fruit with sugar and u.p. water (ratio, 5:5:2, w/w/w), in an open pan for 30 min. The modified QuEChERS extraction method was applied either to blank fruits, to the fruits spiked at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and to the home-made jams (prepared from spiked fruits at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The extracts of home-made jams and blank fruits were analyzed by liquid chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) to ascertain the occurrence of the known metabolites of the spiked pesticides and to determine the number of co-extracted matrix components from the fruits and from the jams. All samples were also analyzed by μ LC-QTRAP-MS/MS for estimation of the pesticides processing factors. So the pesticide concentrations found in the spiked fruits were compared to the concentrations found in the home-made jams (pesticide concentration measured in the jams/pesticide concentration measured in the raw fruits).

Keywords: Fruit Jams. Pesticides. μ LC-QTRAP-MS/MS. LC-QTOF-MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1 - Produção agrícola e consumo de agrotóxicos nas lavouras brasileiras de 2002 a 2011..... 30
- Figura 2 - Produção agrícola brasileira por cultura (milhões de hectares) no ano de 2011..... 30

MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 3 - Esquema do procedimento de preparo de amostras - método QuEChERS modificado (A), etapa de purificação do extrato de doce de uva em pasta (B)..... 53

ARTIGO 1

- Figure 1 - Total ion chromatograms obtained by analysis via μ LC-MS/MS of (A) standard pesticide mixture solution in acetonitrile at $100 \mu\text{g L}^{-1}$, (B) standard pesticide mixture solution in blank grape jam extract at $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ($150 \mu\text{g kg}^{-1}$) and (C) blank grape jam extract, showing the small matrix effect (suppression) of the jam grape extract..... 64
- Figure 2 - SRM transitions of positive samples obtained by analysis via μ LC-MS/MS for carbendazim at $221 \mu\text{g kg}^{-1}$ in (A) strawberry jam sample, (B) pyrimethanil at $62 \mu\text{g kg}^{-1}$ in a grape jam sample and (C) difenoconazole at $64 \mu\text{g kg}^{-1}$ in a strawberry jam sample..... 64

MANUSCRITO 1

- Figure 1 - Home-made fruit jams preparation scheme (A) and QuEChERS citrate extraction procedure (B)..... 96
- Figure 2 - Total ion chromatograms of apple, pear (spiked at $500 \mu\text{g kg}^{-1}$), apple jam and pear jam (prepared from spiked fruits at $500 \mu\text{g kg}^{-1}$), obtained by LC-QTOF-MS analysis, showing the peaks of the 5 pesticides..... 97
- Figure 3 - Co-extracted matrix components according to the retention times (min). Data was acquired by LC-ESI-QTOF-MS and just peaks with an absolute high $> 10^4$ are represented..... 98
- Figure 4 - Areas repeatability of the procedure internal standards (P.I.S.), diclorvos- d_6 and malathion- d_{10} added to the acetonitrile at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ before the QuEChERS sample preparation and diluted 30-fold; injection internal standard (I.I.S.), dimethoate- d_6 added after sample dilution and before injection at $1 \mu\text{g kg}^{-1}$; and the dilution internal standard (D.I.S.) linuron- d_6 added before sample dilution at $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ and diluted 30-fold. The data were acquired by μ LC-QTRAP-MS/MS... 99

DISCUSSÃO

Figura 4 - Porcentagem de agrotóxicos com recuperações (%) e RSD (%) satisfatórios e agrotóxicos n.d. em amostras sem *slurry*, com *slurry* 1:1,25 (fortificados a $20 \mu\text{g kg}^{-1}$) e com *slurry* 1:1,5 (fortificado a $30 \mu\text{g kg}^{-1}$). Total de 41 agrotóxicos determinados por GC-IT-MS..... 102

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS E MÉTODOS

- Tabela 1 - Agrotóxicos determinados por GC--IT-MS, com informações de pureza, classe, fornecedor, grupo químico e fórmula molecular..... 49
- Tabela 2 - Agrotóxicos determinados por GC-IT-MS, juntamente com sua massa molecular, tempo de retenção e íon de quantificação..... 55

ARTIGO 1

- Table 1 - Chromatographic parameters of the compounds determined by μ LC–MS/MS. Retention time (t_R), declustering potential (DP) and collision energy (CE)..... 59
- Table 2 - Average recoveries (%), RSD (%) ($n=5$), matrix effect (M.E.%) and reporting limit (RL) calculated from the standard solutions in blank grape jam extract and in acetonitrile. RL is referred to the concentration in the sample. Detection was performed by μ LC–MS/MS..... 62
- Table 3 - Pesticides more frequently detected in the fruit jams, percentage of positive samples (where at least one pesticide was detected) and samples and samples with pesticides at concentrations $\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ according to fruit jam and country of origin..... 65

MANUSCRITO 1

- Table 1 - Chromatographic parameters of the LC-ESI-QTOF-MS method..... 92
- Table 2 - Number of co-extracted components from the fruits, from the home-made jams and number of components common to both..... 93
- Table 3 - Processing factors estimated for the five studied pesticides (pesticide concentration measured in the jams/pesticide concentration measured in the raw fruits)..... 94
- Table 4 - Average recoveries (%) and relative standard deviation (RSD%) calculated for the five target pesticides in the grinded fruits at the spike concentration of $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=2$) and for home-made peach jams ($n=2$) at the spike concentration of $9 \mu\text{g kg}^{-1}$. Matrix effect (M.E.%) was calculated from the slopes of the calibration curves prepared in blank matrix extracts of one representative commodity of each group of samples (matrix-matched calibration standards) and in acetonitrile. Data were acquired by μ LC-QTRAP-MS/MS analysis..... 95

DISCUSSÃO

- Tabela 3 - Recuperações (%), RSD (%) para os agrotóxicos avaliados para amostras de doce de uva sem *slurry*, com *slurry* 1:1,25 e com *slurry* 1:1,5 por GC-IT-MS..... 101
- Tabela 4 - Relação de agrotóxicos detectados nas amostras e concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) conforme o tipo de doce de fruta e país de origem e LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para as frutas utilizadas na produção dos doces..... 105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva;
AcNa – Acetato de sódio anidro;
ANDEF – Associação Nacional de Defesa Vegetal;
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
APCI – Ionização química à pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*;
BR – Brasil;
CEPARC – Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes;
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;
C₁₈ – Sílica modificada com hidrocarboneto linear octadecilsilano;
CI – Ionização química, do inglês *chemical ionization*;
CID – Dissociação induzida por colisão, do inglês *collision-induced dissociation*;
CNNPA – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos;
d. – Detectado em concentração inferior ao RL;
d.i. – Diâmetro interno da coluna cromatográfica;
D.I.S. – Padrão interno da diluição, do inglês *dilution internal standard*;
DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano, do inglês *dichlorodiphenyltrichloroethane*;
DL50 – Dose Letal 50;
d-SPE – Extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid phase extraction*;
EC – Comissão Europeia, do inglês *European Commission*;
ECD – Detector por captura de elétrons, do inglês *electron capture detector*;
EI – Ionização por impacto de elétrons, do inglês *electron ionization*;
EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*;
ES – Espanha;
ESI – Ionização por eletronebulização, do inglês *electrospray ionization*;
EU – União Europeia, do inglês *European Union*;
EUA – Estados Unidos da América;
EURL-FV – Laboratório Referência da União Europeia para os Resíduos de Pesticidas em Frutas e Legumes, do inglês *European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues in Fruits and Vegetables*;
FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*;
FE – Fase estacionária;
FM – Fase móvel;
FP – Fator de processamento;
FPD – Detector fotométrico de chama, do inglês *flame photometric detector*;
g – Grama;
GAP – Boas práticas agrícolas, do inglês *good agricultural practices*;
GC – Cromatografia a gás, do inglês *gas chromatography*;
GC-MS – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography-tandem mass spectrometry*;
GC-IT-MS – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas de armadilha de íons, do inglês *gas chromatography-tandem mass spectrometry-ion trap detector*;
HR – Alta resolução, do inglês *high resolution*;

IA – Ingrediente ativo;
IDA – Ingestão diária aceitável;
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial;
I.I.S. – Padrão interno do equipamento, do inglês *instrument internal standard*;
I.S. – Padrão interno, do inglês *internal standard*;
IT – Espectrômetro de massas de armadilha de íons, do inglês *ion trap*;
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*;
JMPR – Do inglês *Joint Meeting on Pesticide Residues*;
kg – Quilograma;
L – Litro;
LC – Cromatografia a líquido, do inglês *liquid chromatography*;
LC-MS – Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography tandem mass spectrometry*;
LC-QTOF-MS – Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas híbrida quadrupolo-tempo de voo, do inglês *liquid chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry*;
LIT – Armadilha de íons linear, do inglês *linear ion trap*;
LMR – Limite máximo de resíduos;
LOD – Limite de detecção, do inglês *limit of detection*;
LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *limit of quantification*;
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
mL – Mililitro;
m/m – Razão massa/massa;
m/z – Razão massa/carga;
MRM – Monitoramento de múltiplas reações, do inglês *multiple-reaction monitoring*;
MS – Espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*;
MS/MS – Espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas, do inglês *tandem mass spectrometry*;
 μ – Micro;
 μ g – Micrograma;
 μ LC-QTRAP-MS/MS – Cromatografia de micro vazão a líquido acoplada à espectrometria de massas híbrida triplo quadrupolo-armadilha de íons linear, do inglês *micro flow liquid chromatography triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry*;
n – Número de repetições;
NA – Produto ainda não autorizado no Brasil;
n.d. – Não detectado;
NPC – Não autorizado para a cultura;
NPD – Detector de nitrogênio e fósforo, do inglês *nitrogen-phosphorus detector*;
NVWA – Do inglês *The Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority*;
OIT – Organização Internacional do Trabalho;
OMS – Organização Mundial da Saúde;
ORBITRAP – Armadilha de íons orbital, do inglês *orbital ion trap*;
PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos;
Pa – Pascal;
pH – Potencial hidrogeniônico;
P.I.S. – Padrão interno do procedimento, do inglês *procedure internal standard*;
PSA – Amina primária e secundária, do inglês *primary and secondary amine*;

PTFE – Politetrafluoretileno;
QP – Espectrômetro de massas do tipo Quadrupolo;
QTRAP – Espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-armadilha de íons linear;
QTOF - Espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-de tempo de voo;
QuEChERS – Método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*;
r – Coeficiente de correlação;
 r^2 – Coeficiente de determinação;
RDC – Resolução da diretoria colegiada;
Rio+20 – Conferência das Nações Unidas sobre Desenvolvimento Sustentável;
RL – Limite de notificação, do inglês *reporting limit*;
RP – Fase reversa, do inglês *reverse phase*;
RS – Rio Grande do Sul;
RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*;
SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas;
TOF – Espectrômetro de massas de tempo de voo, do inglês *time of flight*;
TPP – Trifenil fosfato, do inglês *triphenyl phosphate*;
 t_R – Tempo de retenção de um analito, do inglês *retention time*;
TQ – Espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo;
UFSM – Universidade Federal de Santa Maria;
US\$ – Dolar norte americano, do inglês *United States dollar*;
u.p. – Ultrapura, do inglês *ultrapure water*;
v/v – Razão volume/volume.

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Amostras utilizadas no Artigo 1.....	122
Apêndice B - Determinação da linearidade das curvas analíticas para a validação do método por μ LC-QTRAP-MS/MS.....	123
Apêndice C - Avaliação da exatidão do método analítico para a validação por μ LC-QTRAP-MS/MS.....	124
Apêndice D - Preparo dos doces de frutas caseiros.....	125
Apêndice E - Artigo.....	126
Apêndice F - Verificação da exatidão do método durante o estabelecimento dos fatores de processamento dos agrotóxicos nos doces de frutas caseiros.....	135

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
Geleias de fruta, doces em pasta, produtos de vegetais e produtos de Frutas	25
Agrotóxicos	27
O aumento da produção agrícola e a contaminação dos alimentos	28
O impacto dos agrotóxicos na saúde humana e no meio ambiente	31
A persistência dos agrotóxicos	33
Preparo de amostras para determinação de resíduos de agrotóxicos	35
Método QuEChERS	36
A cromatografia na determinação de resíduos de agrotóxicos	37
Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas	38
Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas	39
Espectrômetros de massas	41
Validação de métodos analíticos	43
OBJETIVOS	44
Objetivo geral	44
Objetivos específicos	44
MATERIAIS E MÉTODOS	45
Amostras	45
Instrumentação	46
Gases	47
Materiais, reagentes e solventes	47
O preparo de <i>slurry</i>	48
Os agrotóxicos determinados	48
O preparo das soluções analíticas dos padrões internos	50
O preparo das soluções analíticas dos padrões de agrotóxicos	50
O solvente utilizado no preparo das amostras	51
Extração com o método QuEChERS modificado	52
As análises cromatográficas	53
Condições de análise por GC-IT-MS	54
ARTIGOS	56
Artigo 1 - Validation and application of micro flow liquid chromatography –tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams	56
Abstract	57
Introduction	57
Material and methods	58
Results and discussion	61
Conclusion	65
References	65

Manuscrito 1 - Pesticides stability study in home-made jams preparation and estimation of processing factors.....	67
Abstract.....	68
Introduction.....	69
Material and methods.....	73
Results and discussion.....	80
Conclusion.....	85
References.....	86
DISCUSSÃO.....	100
CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS.....	113
APÊNDICES.....	122

INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos pertencem a um grande grupo de compostos orgânicos que apresentam propriedades físico-químicas variadas e são amplamente utilizados para combater, controlar ou prevenir plantas invasoras ou doenças em plantas (PIZZUTTI et al., 2007). Mesmo quando aplicadas de acordo com as boas práticas agrícolas (GAP), os agrotóxicos podem deixar resíduos. Por isso, muitos países estabeleceram diretrizes legais e programas de monitoramento para controlar o uso de agrotóxicos em culturas agrícolas e verificar se as concentrações de resíduos estão em conformidade com os limites máximos de resíduos (LMR) legais (WALORCZYK, 2007).

Considerando que as frutas e legumes, utilizados na alimentação humana, são susceptíveis a aplicação de agrotóxicos durante o cultivo e que servem de base para a produção de doces em pasta, é de grande interesse mensurar os níveis de contaminação desses alimentos com relação a resíduos dessas substâncias tóxicas, pois a presença de contaminantes, dependendo da concentração, pode oferecer sérios riscos ao consumo humano.

Os doces de frutas são uma forma de agregar valor econômico e de conservar das frutas durante períodos de entressafra. Esses produtos acabaram se tornando alimentos muito populares em virtude do seu baixo custo, longo tempo de prateleira e propriedades organolépticas agradáveis (MOHD NAEEM et al., 2015; TAUATI et al., 2014). No Brasil, segundo a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 272 de 2005, os doces de frutas são definidos como “produtos de frutas” e são elaborados a partir de frutas, inteiras ou em partes e/ou sementes, obtidos por secagem e/ou desidratação e/ou laminação e/ou cocção e/ou fermentação e/ou concentração e/ou congelamento e/ou outros processos tecnológicos considerados seguros para a produção de alimentos. Podem ser apresentados com ou sem líquido de cobertura e adicionados de açúcar, sal, tempero, especiaria e ou outro ingrediente desde que não descaracterize o produto, podendo também ser recobertos. Com relação à denominação, podem ser designados pelas denominações consagradas pelo uso (BRASIL, 2005).

Anualmente, diversos novos métodos multirresiduais são desenvolvidos para determinar agrotóxicos em alimentos *in natura*. Porém, o mesmo não acontece quando se trata de monitorar agrotóxicos e seus metabólitos em alimentos processados. O cozimento pode alterar e degradar a estrutura química de analitos, assim, a fim de avaliar mais detalhadamente a contaminação desses produtos, determinar resíduos em alimentos processados é de suma importância (PARK et al., 2011; MARTIN et al., 2013).

Portanto, este trabalho teve como objetivos desenvolver um método multirresidual para a determinação de resíduos de agrotóxicos em doces de frutas em pasta e aplicá-lo no monitoramento de amostras para verificar os níveis de contaminação desses alimentos. Além disso, visou-se estudar a estabilidade de agrotóxicos no preparo de doces de frutas caseiros a partir de frutas fortificadas e estimar fatores de processamento para esses compostos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Geleias de fruta, doces em pasta, produtos de vegetais e produtos de frutas

Segundo a Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA nº 12, de 1978, “geleia de fruta” era definida como: O produto obtido pela cocção de frutas inteiras ou em pedaços, polpa ou suco de frutas, com açúcar e água e concentrado até consistência gelatinosa. O produto deveria ser designado, genericamente, "geleia", seguido do nome da fruta de origem (BRASIL, 1978a).

Já o "doce em pasta" de acordo com a Resolução Normativa nº 9 de 1978 seria: O produto resultante do processamento adequado das partes comestíveis desintegradas de vegetais com açúcares, com ou sem adição de água, pectina, ajustador do pH e outros ingredientes e aditivos permitidos por estes padrões até uma consistência apropriada, sendo finalmente, acondicionado de forma a assegurar sua perfeita conservação. Os doces em pasta poderiam apresentar eventualmente pedaços de vegetais (BRASIL, 1978b).

A Resolução Normativa nº 9 e a CNNPA nº 12, ambas de 1978, foram revogadas pelo Regulamento Técnico para Produtos de Vegetais, Produtos de Frutas e Cogumelos Comestíveis - RDC nº 272 de 2005, o qual está atualmente em vigor. No RDC nº 272/05, não se encontra mais as definições de “doce em pasta” e “geleia de fruta”, mas sim as definições de “produtos de vegetais” e “produtos de frutas”, sendo:

- Produtos de vegetais: são os produtos obtidos a partir de partes comestíveis de espécies vegetais tradicionalmente consumidas como alimento, incluindo as sementes oleaginosas, submetidos a processos de secagem e ou desidratação e ou cocção e ou salga e ou fermentação e ou laminação e ou floculação e ou extrusão e ou congelamento e ou outros processos tecnológicos considerados seguros para a produção de alimentos. Podem ser apresentados com líquido de cobertura e adicionados de sal, açúcar, tempero ou especiaria e ou outro ingrediente

desde que não descaracterize o produto. Excluem-se desta definição os produtos de frutas, produtos de cereais e farinhas (cereais, tubérculos e raízes).

- Produtos de frutas: são os produtos elaborados a partir de fruta(s), inteira(s) ou em parte(s) e ou semente(s), obtidos por secagem e ou desidratação e ou laminação e ou cocção e ou fermentação e ou concentração e ou congelamento e ou outros processos tecnológicos considerados seguros para a produção de alimentos. Podem ser apresentados com ou sem líquido de cobertura e adicionados de açúcar, sal, tempero, especiaria e ou outro ingrediente desde que não descaracterize o produto. Podem ser recobertos.

Quanto a designação a RDC nº 272/05, diz que produtos de vegetais e produtos de frutas, devem ser designados por denominações consagradas pelo uso, seguida de expressão(ões) relativa(s) ao(s) ingrediente(s) que caracteriza(m) o produto. A designação pode ser seguida de expressões relativas ao processo de obtenção e ou forma de apresentação e ou característica específica.

Nessa RDC são definidos também os requisitos específicos, como o pH (máximo de 4,5) e umidade (produtos de vegetais secos ou desidratados máxima 12 %, produtos de frutas secos ou desidratados máxima 25 %), requisitos gerais, como sanidade dos produtos, atendimento aos regulamentos técnicos de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação; contaminantes; características macroscópicas, microscópicas e microbiológicas; rotulagem de alimentos embalados; rotulagem nutricional de alimentos embalados; informação nutricional complementar, quando houver; e outras legislações pertinentes (BRASIL, 2005).

Dessa forma, mesmo que as definições de “geleia de fruta” e “doce em pasta” tenham sido substituídas pelas definições de “produtos de vegetais” e “produtos de frutas” na RDC nº 272, as duas primeiras ainda podem ser consideradas adequadas para a denominação dos produtos, pois são consagradas pelo uso.

Agrotóxicos

Os agrotóxicos, também denominados de pesticidas, agrotóxicos ou defensivos agrícolas, são responsáveis pelo comércio de bilhões de dólares em todo o mundo (STOPPELLI & MAGALHÃES, 2005). São substâncias que, apesar de serem cada vez mais utilizadas na agricultura, podem oferecer perigo para o homem, dependendo da toxicidade, do grau de contaminação e do tempo de exposição durante sua aplicação (CASTRO & CONFALONIERI, 2005).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), define os agrotóxicos como produtos químicos ou quaisquer substâncias ou misturas de substâncias destinadas à prevenção, à destruição ou ao controle de qualquer praga, incluindo os vetores de doenças humanas ou de animais, que causam prejuízo ou interferem de qualquer forma na produção, elaboração ou armazenagem, transporte ou comercialização de alimentos, produtos agrícolas, madeira e produtos da madeira.

Esse termo inclui também as substâncias destinadas a serem usadas como reguladoras do crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes para reduzir a densidade ou evitar a queda prematura dos frutos, e as substâncias aplicadas nas culturas, antes ou após a colheita para proteger o produto durante o depósito ou transporte. São usados, sobretudo, na agricultura para combater pragas, ervas daninhas ou doenças nas plantas e também como agentes de controle de vetores nos programas de saúde pública e, em menor quantidade, na pecuária e na silvicultura.

Definição semelhante à da FAO é usada na legislação brasileira, para agrotóxico, que substitui o termo defensivo agrícola, para denominar os venenos agrícolas, colocando em evidência a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e à saúde humana. Essa definição exclui os fertilizantes e os produtos químicos (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) os agrotóxicos podem ser classificados em função do tipo de praga que controlam e em função da classe química a qual pertencem. As principais classes químicas são: Organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides. Outras categorias

incluem biopesticidas, antimicrobianos e dispositivos de controle de pragas (EPA, 2010).

No Brasil (BR), de acordo com o Decreto nº 4.074 de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, agrotóxicos são produtos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas e de outros ecossistemas, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Segundo um estudo encomendado pela Associação Nacional de Defesa de Vegetal (ANDEF) à consultoria alemã Kleffmann Group, o BR é o maior mercado de agrotóxicos do mundo. O levantamento mostrou que a indústria de agrotóxicos movimentou 7,1 bilhões de dólares norte americanos (US\$) no ano de 2009, em comparação a US\$ 6,6 bilhões do segundo colocado, os Estados Unidos da América (EUA). Em 2007, a indústria nacional brasileira girou US\$ 5,4 bilhões, o consumo cresceu no país, apesar de a área plantada ter encolhido 2% em 2008.

Apesar do grande volume de recursos movimentados pela indústria no mercado nacional, o gasto do produtor brasileiro com agrotóxico ainda é pequeno, se comparado a outros países como a França e o Japão. Em 2007, gastou-se US\$ 87,83 por hectare na França, e os produtores desembolsaram US\$ 196,79 por hectare, enquanto no Japão a despesa foi de US\$ 851,04. Por esse motivo, acredita-se que a tendência nos próximos anos é que o BR se estabilize na primeira colocação no consumo de agrotóxicos (PACHECO, 2009).

O aumento da produção agrícola e a contaminação dos alimentos

A produção de alimentos sempre foi um dos maiores desafios da humanidade. Visando assegurar maior produtividade, uma quantidade considerável de agrotóxicos é empregada em alguma etapa da produção agrícola, quer seja no tratamento prévio das sementes, durante o cultivo ou após a colheita (VARELI, 2008). A liberação do comércio de agrotóxicos para uso na agricultura elevou

rapidamente seu consumo, especialmente de forma indiscriminada, o que constituiu-se num dos principais problemas de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (WAICHMAN et al., 2007; VARELI, 2008).

A partir da segunda guerra mundial, visando aumentar a provisão de alimentos para atender a explosão demográfica mundial, houve a necessidade de se buscar produtos mais eficientes. Após um lento desenvolvimento tecnológico, houve a introdução dos primeiros agrotóxicos, destacando-se a ação inseticida do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Este episódio deu uma nova importância aos agrotóxicos à base de compostos orgânicos no que se referia à saúde pública, tanto no aumento da produtividade agrícola quanto no controle de vetores de doenças.

Da mesma forma que algumas características químicas, como a persistência, eram acrescentadas à função biocida dos agrotóxicos organoclorados, resultando num fator positivo para a agricultura (o mesmo agrotóxico eliminaria mais pragas por um período maior de tempo) também representavam maiores riscos à saúde humana e ao meio ambiente (VEIGA; SILVA; VEIGA, 2005).

Para se ter uma ideia, entre 1964 e 1991, o consumo de agrotóxicos no país aumentou 276,2%, frente a um aumento de 76% na área plantada. Já no período entre 1991 e 2000, observou-se um aumento de quase 400% no consumo desses agentes químicos, frente a um aumento de 7,5% na área plantada (PERES & MOREIRA, 2007).

No BR, os agrotóxicos apareceram na década de 1960-1970, como solução para o controle das pragas que atingiam lavouras e rebanhos. Tal visão, reforçada pela forte e crescente atuação da indústria química no país, passou a legitimar o uso indiscriminado de agrotóxicos no meio rural (PERES et al., 2005).

Segundo um dossiê divulgado pela Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO), na Conferência das Nações Unidas sobre Desenvolvimento Sustentável (Rio+20), a utilização de agrotóxicos nas lavouras do BR saltou de 599,5 milhões de litros no ano 2002 para 852,8 milhões de litros em 2011 conforme pode ser visto na Figura 1, a qual também ilustra o aumento da produção agrícola no período. Esse aumento também foi proporcional ao aumento de monoculturas como soja e milho (Figura 2). De acordo com o estudo, existe ainda uma concentração do mercado de agrotóxicos em determinadas categorias de produtos. Os herbicidas, por exemplo, representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados. Os

fungicidas responderam por 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos, 29% (ABRASCO, 2012).

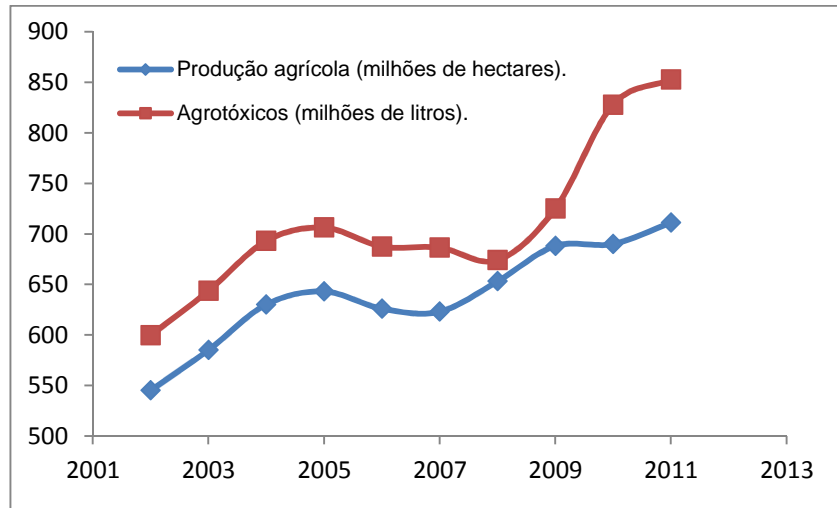


Figura 1 – Produção agrícola e consumo de agrotóxicos nas lavouras brasileiras de 2002 a 2011.

Fonte: ABRASCO (2012).

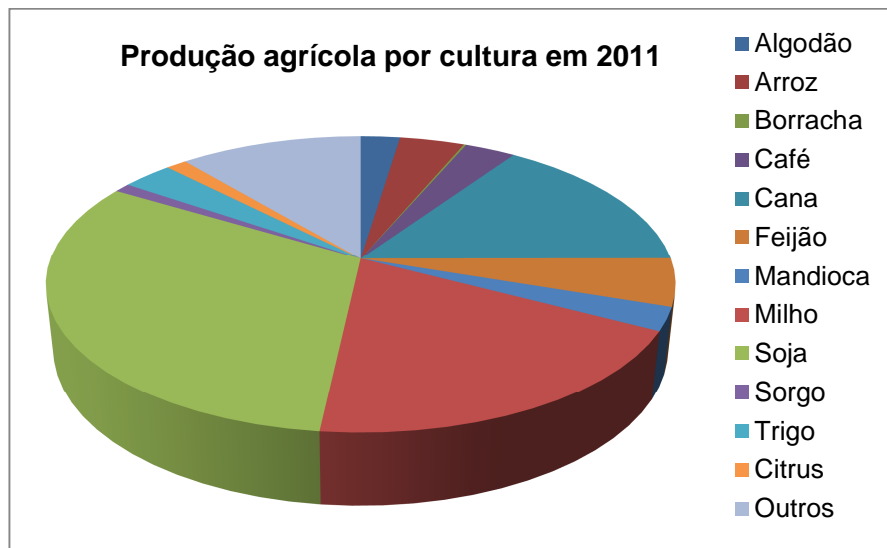


Figura 2 – Produção agrícola brasileira por cultura (milhões de hectares) no ano de 2011.

Fonte: ABRASCO (2012).

Em 2001 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) iniciou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* (ANVISA, 2010). Segundo os dados do PARA de 2011 e 2012, a contaminação dos alimentos que chegam à mesa do brasileiro é uma realidade. Do total de 1.397 amostras analisadas, 347 (25%) foram consideradas insatisfatórias. Os problemas constatados foram: Presença de agrotóxicos em concentrações acima do LMR em 26 amostras (1,9%), agrotóxicos não autorizados (NA) para as culturas em 294 amostras (21%) e agrotóxicos acima do LMR e NA simultaneamente, em 27 amostras (1,9%) (ANVISA, 2014).

Destaca-se ainda, o grande número de amostras insatisfatórias nas culturas pimentão (90%), morango (59%), abobrinha (48%), alface (45%), pepino (42%), abacaxi (41%), cenoura (33%), uva (29%) e laranja (28%) (ANVISA, 2013; ANVISA, 2014).

Os dados de monitoramento do PARA revelaram também, que amostras de algumas culturas apresentaram resíduos de vários ingredientes ativos (IA). Tal constatação reforça a necessidade de melhoria na formação dos produtores rurais e o acompanhamento do uso de agrotóxicos na agricultura brasileira, de modo a garantir as GAP e, conseqüentemente, diminuir a exposição a substâncias tóxicas (ANVISA, 2014).

O impacto dos agrotóxicos para a saúde humana e no meio ambiente

A extensiva utilização de agrotóxicos representa um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, especialmente naqueles com economias baseadas no agronegócio, caso do BR. Somente nos EUA, segundo a EPA, existem mais de 18 mil produtos licenciados para uso, e a cada ano cerca de 1 bilhão de litros de agrotóxicos são aplicados na produção agrícola, residências, escolas, parques e florestas (EPA, 2002).

Nos últimos anos, o grande crescimento na utilização de agrotóxicos no BR tem sido associado ao aumento vertiginoso dos riscos de contaminação prejudiciais

à saúde. O descuido com os agrotóxicos pode ser fatal e causar agravos à saúde, tais como: irritações na pele e nos olhos, problemas respiratórios, câncer em vários órgãos e distúrbios sexuais, como a impotência e a esterilidade (STOPPELLI & MAGALHÃES, 2005).

A contaminação ambiental por agrotóxicos caracteriza-se pela dispersão desses ao longo dos diversos componentes do meio ambiente, a contaminação das águas, atmosférica e dos solos. A contribuição da via ambiental é de fundamental importância para o entendimento da contaminação humana por agrotóxicos. Acredita-se que um maior número de pessoas esteja exposto por essa via, do que pela via ocupacional. Entretanto, o impacto resultante da contaminação ambiental é, em geral, consideravelmente menor que o impacto resultante da via ocupacional (MOREIRA, 2002).

Existe uma grande dificuldade de avaliar os riscos associados à contaminação do meio ambiente. Os agrotóxicos podem ser persistentes, móveis e tóxicos no solo, na água e no ar. Tendem a se acumular no solo e na biota e seus resíduos podem chegar aos sistemas superficiais por deflúvio superficial e aos sistemas subterrâneos por lixiviação. A contaminação por essas substâncias ainda pode afetar o meio ambiente indiretamente, aumentando a virulência das pragas ou por eliminação indesejável dos predadores naturais de certos micro-organismos.

Os agrotóxicos são desenvolvidos para terem ação biocida, e por isso são potencialmente danosos para todos os organismos vivos. Seus efeitos podem ser crônicos quando interferem na expectativa de vida, crescimento, fisiologia, e reprodução dos organismos e/ou podem ser ecológicos quando interferem na disponibilidade de alimentos, de habitat e na biodiversidade, incluindo os efeitos sobre os inimigos naturais das pragas e a resistência induzida aos próprios agrotóxicos (VEIGA; SILVA; VEIGA, 2005).

O monitoramento da exposição humana a agentes tóxicos contribui significativamente para a redução do número de pessoas a serem avaliadas clinicamente, impede o estabelecimento de quadros individuais de intoxicação – a partir do afastamento do trabalhador da fonte de contaminação – e atenua a gravidade deste quadro, nos casos em que os indivíduos já se encontram intoxicados. Adicionalmente, facilita o processo de tratamento dos indivíduos intoxicados, pela indicação terapêutica mais adequada ao agente (químico ou biológico) encontrado (PERES et al., 2005).

Segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX), foram registrados no ano de 2011, no Brasil, 11.106 casos de intoxicação por agrotóxicos. Sendo que a maioria dos casos foram registrados na região sudoeste (53,4%) e na região sul (17,8%) do país (SINITOX, 2011).

Embora as pesquisas brasileiras sobre o impacto do uso de agrotóxicos na saúde humana também tenha crescido nos últimos anos, ainda é insuficiente para conhecer a extensão da carga química de exposição ocupacional e a dimensão dos danos à saúde, decorrentes do uso intensivo desses agentes. Um dos problemas apontados é a falta de informações a respeito do consumo de agrotóxicos e a insuficiência dos dados sobre intoxicações por estes produtos. A relevância do tema é destacada ao se considerar a dimensão e a diversidade dos grupos expostos: os trabalhadores da agropecuária, saúde pública (controle de vetores), empresas desinsetizadoras, indústrias de agrotóxicos e do transporte e comércio de produtos agropecuários (FARIA; FASSA; FACCHINI, 2007).

A persistência dos agrotóxicos

Embora o controle químico de pragas tenha reduzido a incidência de doenças em homens e animais e incrementado a produção agrícola, agentes químicos podem permanecer ativos no meio ambiente por longos períodos, afetando os ecossistemas. Os efeitos desses agentes ao longo do tempo representam grande risco para a saúde pública, sendo necessário o monitoramento dessas substâncias em águas, solos, alimentos e no ar (FLORES et al., 2004).

Os agrotóxicos podem ser divididos, quanto ao modo de ação, entre sistêmicos e de contato. Os sistêmicos quando aplicados nas plantas circulam através da seiva por todos os tecidos vegetais, de forma a se distribuir uniformemente e ampliar o seu tempo de ação. Os de contato agem externamente no vegetal, tendo necessariamente que entrar em contato com o alvo biológico. E mesmo os últimos são também, em boa parte, absorvidos pela planta, penetrando em seu interior. Uma lavagem dos alimentos em água corrente só poderia remover parte dos resíduos tóxicos presentes na superfície dos mesmos. Os agrotóxicos sistêmicos e uma parte dos de contato, por serem absorvidos por tecidos internos da

planta, caso não sejam degradados pelo metabolismo do vegetal, permanecerão nos alimentos mesmo que esses sejam lavados. Neste caso, uma vez contaminados, os alimentos levarão o consumidor a ingerir resíduos de agrotóxicos (ANVISA, 2012).

No caso dos agrotóxicos de ação sistêmica, a fervura poderia inativar a substância tóxica. No entanto, grande parte dessas substâncias possuem metais em sua estrutura, como zinco ou estanho e são estáveis a altas temperaturas, dessa forma o ato de cozinhar o alimento não inativa o contaminante (THENÓRIO & MUNIZ, 2010).

Além disso, estudos tem evidenciado que os agrotóxicos podem permanecer ativos no ambiente durante longo tempo, causando grandes mudanças ecológicas e efeito ambiental negativo. Um exemplo disso, são os compostos organoclorados, em sua maioria persistentes e de ampla aplicação. A ação residual dos organoclorados é devido à sua estabilidade química, que lhes confere prolongada persistência no ambiente (FLORES et al., 2004).

Dentre os contaminantes químicos persistentes, destacam-se ainda os bifenilos policlorados (PCB), compostos pertencentes à classe dos poluentes orgânicos persistentes (POP), presentes em inúmeras amostras indicadoras da contaminação ambiental (MOHR & COSTABEBER, 2012).

A persistência de alguns agrotóxicos foi evidenciada recentemente em uma publicação de NÖRNBERG et al. (2011), onde foi avaliada a persistência de agrotóxicos usados no controle biológico de pragas na produção de maçãs. Dentre os compostos avaliados, os inseticidas fosmete, carbaril e o fungicida/acaricida enxofre foram classificados como persistentes nas plantas por apresentarem mais de 31 dias de ação nociva contra insetos adultos do parasita da espécie *Trichogramma pretiosum*.

FRIAR & REYNOLDS (1993), avaliaram a persistência de resíduos de fungicidas em doce de laranja, aplicados às frutas após a colheita. A concentração dos resíduos dos fungicidas em laranjas *in natura* foi comparado às concentrações determinadas em doces de laranja preparados em duas diferentes condições: Em forno de micro-ondas e em panela aberta sob fogão a gás. Foram avaliados 3 fungicidas: imazalil, 2-fenilfenol e tiabendazol. Para o imazalil a concentração determinada no doce de laranja foi aproximadamente 50% maior do que na fruta, independente do modo de preparo. O cozimento das laranjas em panela usando fogão a gás, reduziu a concentração de 2-fenilfenol em aproximadamente 50%

comparado a uma redução de 13% quando o doce foi preparado em micro-ondas. Com relação ao tiabendazol, as concentrações determinadas foram as mesmas tanto nas laranjas *in natura* como no doce preparado em micro-ondas, já no doce preparado em panela aberta houve uma redução de 22% na concentração do tiabendazol.

Em outra pesquisa realizada na Espanha (ES) por COSTABEBER (1999), foram detectados agroquímicos organoclorados em amostras de tecido adiposo humano. No total foram analisadas 134 amostras e dentre os compostos investigados, detectou-se o diclorodifenildicloroetileno (DDE) e o hexacloro de benzeno (BHC) nas concentrações de $1.870 \mu\text{g L}^{-1}$ e $240 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A elevada concentração de DDE, pode ser devida ao fato de este composto ser o último e mais estável metabólito do diclorodifeniltricloroetano (DDT). Os resultados expostos comprovaram a afinidade dos agrotóxicos organoclorados pelas gorduras, mostrando a evidente e crescente contaminação através da cadeia alimentar (FLORES et al., 2004).

O fato de grande parte dos agrotóxicos serem persistentes no ambiente e estáveis ao aquecimento, abre caminho para a hipótese de que a exposição humana a essas substâncias tóxicas ocorre não só pelo consumo de alimentos e bebidas *in natura* como frutas, vegetais e sucos naturais, mas também, pelo consumo de alimentos e bebidas processados, como geleias, doces de frutas, café, sucos pasteurizados, óleo de soja, extrato de tomate, biscoitos, massas, entre outros.

Preparo de amostras para determinação de resíduos de agrotóxicos

Uma das etapas fundamentais no desenvolvimento de métodos multirresiduais é a seleção do solvente extrator. Um solvente ideal para determinação de múltiplas classes de agrotóxicos deve ser compatível com os analitos, com o preparo da amostra e com a análise cromatográfica. Os fatores que devem ser levados em consideração na escolha do solvente extrator são: compatibilidade com os analitos (eficiência na extração para o intervalo desejado de polaridades, estabilidade dos analitos durante o preparo da amostra e estocagem do extrato final), seletividade (habilidade de evitar potenciais interferentes da matriz no

extrato final), habilidade de particionamento com água (imiscibilidade com água ou possibilidade de induzir particionamento usando aditivos), compatibilidade com técnicas usadas para purificação do extrato e/ou determinação dos agrotóxicos, volatilidade caso a evaporação do solvente seja desejada, segurança para os analistas e para o meio ambiente, além de baixo custo (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Método QuEChERS

Em 2003 Anastassiades et al. relataram um atraente método para preparo de amostras denominado QuEChERS (rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro do inglês, *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*). Este método cobre um grande escopo de analitos, incluindo analitos polares, semi-polares, e não polares em várias matrizes. O procedimento envolve uma etapa única de extração da amostra com acetonitrila, seguido de um particionamento líquido-líquido pela adição de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) anidro e cloreto de sódio ($NaCl$). A remoção de água e a purificação (*clean-up*) são realizadas simultaneamente com extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), $MgSO_4$ e adsorvente de amina primária e secundária ligada à sílica (PSA) (ANASTASSIADES et al., 2003).

O método QuEChERS e várias versões modificadas tem sido utilizados com sucesso para a extração de agrotóxicos de uma variedade de alimentos, acima de tudo em frutas e vegetais (HÚŠKOVÁ et al., 2009; LESUEUR et al., 2008; NGUYEN et al., 2008). Anastassiades et al. (2003) e Lehotay et al. (2005) modificaram o QuEChERS original, não tamponado, passando a utilizar um tampão acetato e citrato respectivamente, para evitar a degradação de certos analitos sob condições alcalinas (LEHOTAY, 2007).

A cromatografia na determinação de resíduos de agrotóxicos

Com os valores dos LMR de agrotóxicos em alimentos em redução, aumenta-se a demanda por alimentos de melhor qualidade por parte do governo e consumidores, direcionando as análises de agrotóxicos para métodos mais sensíveis e mais adequadas. Os métodos de análises devem ter detectabilidade o suficiente para cobrir não somente os limites permitidos pela legislação, mas também a determinação de substâncias já proibidas, especialmente para compostos potencialmente genotóxicos e carcinogênicos.

A praticidade tem grande importância na seleção de métodos analíticos em monitorização biológica de exposição aos agrotóxicos, pois a dificuldade da preservação e transporte das amostras, a complexidade técnica e o alto custo das medidas laboratoriais frequentemente limitam a aplicação de biomarcadores disponíveis. Neste contexto, as separações cromatográficas tornaram-se um instrumento fundamental para análises de amostras ambientais e biológicas contendo agrotóxicos (RIDGWAY; LALLJIE; SMITH, 2007; VARELI, 2008).

A cromatografia é uma poderosa técnica analítica que pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas mais utilizadas e de melhor desempenho na análise de resíduos. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação de componentes de misturas) com as vantagens da espectrometria de massas (MS), como obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade na determinação de analitos. 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 perda de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas. As técnicas cromatográficas mais comumente acopladas à MS são a cromatografia a gás (GC) e a cromatografia a líquido (LC) de alta eficiência (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é uma ferramenta analítica poderosa, utilizada usualmente na análise de misturas complexas de compostos em fase gasosa. Isso limita a técnica à análise de compostos voláteis e semivoláteis, de baixa polaridade e baixa massa (LANÇAS, 2009). Na década de 1960, a GC utilizando colunas empacotadas foi adotada devido a sua capacidade de determinação multirresidual de agrotóxicos. Os primeiros analistas utilizavam detectores como o detector por captura de elétrons (ECD), que possibilita a determinação simultânea de vários agrotóxicos halogenados. O sucesso do ECD levou ao desenvolvimento de outros detectores seletivos como o detector de nitrogênio e fósforo (NPD), seletivo para compostos contendo esses elementos em sua estrutura, e o detector fotométrico de chama (FPD), seletivo para compostos contendo enxofre e fósforo em sua estrutura. Esses detectores possuem alta sensibilidade, porém não permitem a obtenção de informações estruturais dos analitos, assim as informações para a confirmação da identidade dos analitos são escassas.

A alta vazão do gás de arraste utilizado com as colunas empacotadas é incompatível com o vácuo necessário na câmara de ionização dos espectrômetros de massas (VAN DER HOFF & VAN ZONEN, 1999). Porém, o advento das colunas capilares permitiu a redução da vazão do gás de arraste e tornou possível o acoplamento de espectrômetros de massa como detectores para GC (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005). A combinação da GC com a MS tornou-se relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Na década de 1980 surgiram os primeiros sistemas GC-MS baseados em analisadores de massa do tipo quadrupolo. Porém, esses sistemas eram muito caros e pouco sensíveis. Assim, a aplicação da GC-MS na análise de resíduos de agrotóxicos somente se tornou viável na década de 1990 com a introdução do detector tipo armadilha de íons (IT) (VAN DER HOFF & VAN ZONEN, 1999).

Os métodos de ionização mais empregados em GC-MS são ionização por impacto de elétrons (EI) e a ionização química (CI). Na EI o analito de interesse, em

fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron (M^+).

A CI é a técnica que foi desenvolvida especialmente para aumentar a produção do íon molecular e reduzir as fragmentações associadas à ionização por elétrons. Nesta técnica, as moléculas do analito, em fase gasosa, são introduzidas na câmara de ionização do espectrômetro de massas, que contém um gás reagente. Esta mistura (moléculas do analito mais gás reagente) é bombardeada com elétrons, assim como na EI. Mas, como o gás reagente está em excesso em relação ao analito (geralmente em proporção maior que 1000:1), ele é ionizado quase que exclusivamente e passam a ocorrer reações entre os íons em fase gasosa do gás reagente e as moléculas neutras do analito, dando origem aos íons pseudomoleculares do analito $[M+H]^+$. Por este processo ser relativamente de baixa energia, quase não é observada fragmentação (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas

Para a análise de compostos de grande massa molecular, elevada polaridade e menor volatilidade, a cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é a técnica de preferência (LANÇAS, 2009). Nessa técnica são 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. As vazões utilizadas em LC são relativamente grandes (da ordem de 1 mL min^{-1}), de maneira que não é possível bombear o eluente de um cromatógrafo a líquido diretamente para o interior da fonte do espectrômetro, que opera a pressões de cerca de $1,3 \times 10^{-4} \text{ Pa}$. 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). 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 ionizá-los 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.

Na tentativa de minimizar os problemas encontrados no interfaceamento do sistema LC com MS foram desenvolvidas várias interfaces, nas quais, muitas vezes, também é realizada a ionização do analito. Dentre as fontes de ionização desenvolvidas, as mais empregadas são ionização por eletronebulização (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI).

Em ESI, o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido (na FM, no caso do eluente da LC) passa através de um capilar, à 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. 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 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.

Como em ESI a ionização ocorre diretamente na solução, compostos sensíveis à temperatura podem ser ionizados sem sofrer degradação. Uma vez que em ESI são gerados íons com múltiplas cargas, esta técnica pode ser aplicada a compostos com massas molares relativamente grandes.

Na APCI, o eluente da coluna cromatográfica passa através de um nebulizador pneumático no qual gotas são geradas e dessolvatadas. O *spray* formado passa por uma região aquecida na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga. Um campo suficiente para gerar ionização é aplicado na corona. Como o solvente (proveniente da FM) encontra-se em maior concentração no *spray* que o analito, este é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito (CI). A APCI pode

ser considerada uma fonte de ionização complementar à ESI, pois é aplicável a compostos apolares ou de média polaridade, voláteis e termicamente estáveis, uma vez que a ionização ocorre em fase gasosa e também porque APCI é aplicável a vazões de eluente cromatográfico maiores que as suportadas por ESI - 0,5 a 2,0 mL min⁻¹ (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Espectrômetros de massas

O efluente da coluna cromatográfica, após ser ionizado é direcionado para o analisador de massas. Os analisadores de massas separam os íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão m/z . As características de construção e operação diferem de um analisador para outro, assim como seus benefícios e limitações. Uma vez que existe hoje uma grande diversidade de analisadores de massas, a escolha do mais apropriado deve ser efetuada considerando-se a aplicação (ex. faixa de massas desejada), desempenho (ex. resolução) desejado e custo (em função do tipo de analisador, um MS para o acoplamento LC-MS pode variar desde algumas dezenas de milhares de dólares, até valores superiores a um milhão de dólares). Em função destes fatores, não existe um analisador de massas o qual seja ideal para todas as aplicações (LANÇAS, 2009).

Dentre os analisadores disponíveis hoje temos os quadropolos (QP), os triplo quadropolos (TQ), de armadilha de íons (IT), a armadilha de íons orbital (ORBITRAP), de tempo de voo (TOF), além dos analisadores híbridos como o quadropolo-de tempo de voo (QTOF) e triplo quadropolo-armadilha de íons linear (QTRAP).

O QP é constituído de 4 hastes. Os pares opostos das hastes estão conectados eletricamente e uma voltagem com radiofrequência de 180° fora de fase é aplicada entre eles. Em um valor específico de voltagem, íons de uma determinada razão m/z atravessam o quadropolo descrevendo uma trajetória estável. Já o TQ é constituído por três quadropolos em série, sendo que o segundo quadropolo não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro

quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão (CID) com um gás inerte, e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo.

O IT é um QP tridimensional que “captura” todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantém “aprisionados” até que uma determinada radiofrequência seja aplicada e torna os íons de certa razão m/z instáveis, de forma que são libertados do *trap* (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Esses analisadores de massa são de suma importância, mas possuem algumas deficiências como a falta de exatidão de massas, estreita faixa linear de trabalho e reduzida capacidade de carga. Introduzido Makarov nos anos 90, o ORBITRAP surgiu de uma modificação da armadilha de íons de Kingdon (1920) e também é baseado na técnica da armadilha de íons. Porém, eles se diferenciam dos anteriores por seu desempenho analítico em termos de resolução, exatidão de massa, faixa linear dinâmica e capacidade de carga. O ORBITRAP consiste de um fio metálico central esticado ao longo do eixo de um eletrodo cilíndrico externo que encerra o material da armadilha. Se uma voltagem é aplicada entre o fio metálico e o cilindro, os íons são atraídos para o fio metálico. Íons com suficiente velocidade tangencial percorrerão uma trajetória circular ao redor do fio metálico (MAKAROV, 1999).

No TOF, os íons produzidos na fonte de ionização do espectrômetro são acelerados através de um “tubo de voo” para serem identificados, uma vez que o tempo que levam para atravessá-lo está relacionado com a razão m/z de cada íon.

Em um QTOF o último estágio do TQ é substituído por um TOF disposto ortogonalmente ao segundo quadrupolo. Este instrumento, ao invés de varrer sequencialmente um intervalo de razões m/z selecionadas e gerar o espectro MS/MS das massas selecionadas, detecta todos os íons que entram no tubo de voo em um tempo específico, o que só é possível devido à sua alta velocidade de varredura (*scan*) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Os QTRAP tem a mesma configuração típica dos TQ, porém, o último QP é híbrido e chamado de prisão de íons armadilha de íons linear (LIT), dessa forma, o equipamento pode funcionar como um TQ ou como um IT. Quando operado no modo de monitoramento avançado (*enhanced scan mode*) o QTRAP opera o terceiro QP como um LIT e apresenta vantagens como: Sensibilidade 20 a 500 vezes maior que quando operado como um TQ-MS e permite uma velocidade de

varredura muito elevada sem que a sensibilidade seja comprometida (VÖLKOPF, 2010).

Validação de métodos analíticos

Dentro de um laboratório a validação de um método deve ser feita para evidenciar que o método é adequado ao fim proposto. Validação de métodos é um requisito dos organismos de acreditação e deve ser assistido pela verificação de desempenho do método durante análises de rotina (controle de qualidade analítico e constante validação de método). Todos os procedimentos que fazem parte de um método devem ser validados.

Tanto para métodos multirresiduais como para métodos para determinação de um só composto (*single*), matrizes representativas podem ser usadas. No mínimo uma *commodity* representativa de cada grupo deve ser validada dependendo do escopo pretendido pelo método (SANCO, 2013).

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade (capacidade de diferenciar entre analitos e interferentes e entre diferentes analitos), linearidade (coeficiente de determinação - r^2 e/ou coeficiente de correlação linear - r), faixa de aplicação, precisão (desvio padrão relativo - RSD%), exatidão (recuperação%), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e robustez (RIBANI et al., 2004). São necessárias no mínimo 5 replicatas (para verificar a precisão) em ambos limites de reportagem (para verificar a sensibilidade) e pelo menos uma concentração mais alta como, por exemplo, o LMR (SANCO, 2013).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar 51 amostras de doces em pasta das seguintes frutas: abacaxi, morango, uva, damasco e pêsego. Determinar os níveis de contaminação dessas amostras com agrotóxicos e verificar se esses alimentos contribuem para a ingestão humana de agrotóxicos. Além disso, estudar a estabilidade dos agrotóxicos, carbendazim, clorpirifós, imidacloprido, irpodiona e propargito, no preparo de doces de frutas caseiros, elaborados em panela aberta, sob fogo médio por 30 min, e estimar um fator de processamento (FP) para os analitos no preparo dos doces caseiros.

Objetivos específicos

Como objetivos específicos deste trabalho pode-se citar:

- Desenvolver um método adequado de preparo da amostra;
- Desenvolver um método cromatográfico para determinação multirresidual de agrotóxicos na matriz em questão;
- Validar o método analítico desenvolvido;
- Aplicar o método validado no monitoramento de amostras produzidas e comercializadas no estado de Rio Grande do Sul (RS), BR e no Sul da ES, no intuito de verificar os níveis de contaminação das mesmas;
- Preparar doces de frutas caseiros a partir de frutas fortificadas com agrotóxicos para estudar a estabilidade dos mesmos;
- Estimar um FP para os agrotóxicos no preparo dos doces de frutas caseiros;
- Fazer um estudo dos componentes das matrizes (doces de frutas caseiros e frutas), co-extraídos pelo método QuEChERS modificado e fazer a correlação entre eles.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos que compõem esta Tese foram realizados em duas etapas. A primeira etapa, na qual foi feita a coleta de amostras em Santa Maria no BR, os estudos preliminares de preparo do *slurry* dos doces de frutas em pasta e seleção da proporção de *slurry* adequada, foi desenvolvida nas instalações do Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC), laboratório do Departamento de Química da UFSM. A segunda etapa, na qual foi feita a validação e aplicação do método de μ LC-QTRAP-MS/MS na determinação de resíduos de agrotóxicos em doces de frutas em pasta e o estudo de estabilidade de agrotóxicos no preparo de doces de frutas caseiros e estabelecimento de fatores de processamento, foi realizada no Laboratório Referência da União Europeia para Resíduos de Pesticidas em Frutas e Legumes (EURL-FV) na Universidade de Almería, ES.

Assim, neste capítulo será descrita somente a coleta das amostras e os materiais e métodos relativos à primeira etapa deste trabalho, pois a metodologia relativa à segunda etapa está relatada a seguir, no Artigo 1 e no Manuscrito 1.

Amostras

Para a realização deste estudo foram adquiridas amostras de doces de frutas em pasta, no comércio local de Santa Maria, RS, BR e de Almería, Sul da ES. A coleta das amostras provenientes do BR foi iniciada em março de 2012 e finalizada em dezembro de 2013. As amostras consistiram de doces de três diferentes frutas (abacaxi, morango e uva) e de três diferentes marcas, fabricadas no RS. Sendo que ao total a amostragem deveria fornecer 4 amostras de cada fruta (abacaxi, morango e uva) e de cada marca, total de 36 amostras, de lotes distintos. Mas, pela indisponibilidade de doces de abacaxi de uma das marcas, puderam ser adquiridas somente 10 amostras de doce de abacaxi - 4 replicatas de duas marcas e duas replicatas de uma marca. Portanto, o total de amostras brasileiras foi de 34.

As amostras provenientes da ES foram adquiridas no período de janeiro a junho de 2014. Essas consistiram de doces de morango (n=5), de damasco (n=4) pêssego (n=8), total de 17 amostras de 5 marcas distintas e diferentes lotes. Algumas amostras que foram utilizadas neste trabalho podem ser vistas no Apêndice A. Uma vez adquiridas, as amostras foram identificadas e refrigeradas até o momento do preparo do *slurry* e análise.

Instrumentação

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica com precisão de 2 casas decimais (Mettler, Suíça);
- Balança analítica com precisão de 4 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Banho de ultrassom (Branson, Alemanha);
- Homogeneizador Ultra-Turrax (Polytron, Suíça);
- Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, Alemanha);
- Mesa agitadora (GFL, Alemanha);
- Vortex (Scientific Industries, EUA);
- Pipetador automático (Brand, Alemanha);
- Sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de armadilha de íons (GC-IT-MS): Cromatógrafo a gás CP 3800 (Varian, EUA), equipado com:
 - Amostrador automático CP 8400 (Varian, EUA);
 - Seringa de vidro de 10 μ L (Hamilton, EUA);
 - Injetor 1079, de vaporização por temperatura programada (PTV) com insensor de vidro silanizado, de diâmetro interno (d.i.) de 3,4 mm e comprimento de 54 mm, contendo cerca de 0,5 cm de carbofrita;
 - Coluna capilar FactorFour VF-5ms (5% fenil 95% metilpolisiloxano) de sílica fundida, 30 m de comprimento 0,25 mm de d.i. e 0,25 μ m de espessura de filme (Varian, Holanda);

- Detector IT Saturn 2000, atuando no modo de ionização por impacto de elétrons (EI) e monitoramento de íons no modo varredura (Varian, EUA);
- Sistema de aquisição de dados com o *software MS Workstation 6.5* (Varian, EUA).

Gases

Gases usados no GC-IT-MS:

- Hélio Premier 99,999% de pureza - fase móvel do cromatógrafo a gás (Air Products, Brasil);
- Nitrogênio de pureza 99,999% (Air Liquide, Brasil).

Materiais, reagentes e solventes

- Tubos cônicos de teflon com tampa rosqueável, com capacidade para 15 e 50 mL (Corning, México);
- Frascos de vidro âmbar, com capacidades para 20, 50 e 100 mL, com tampa rosqueável e batoque de teflon e silicone (Bester, Holanda);
- *Vials* de vidro com capacidade para 1,5 mL (Alltech Associates, Holanda);
- Vidrarias comuns de laboratório;
- Acetonitrila, grau resíduo de pesticida 99,9% (Mallinckrodt, EUA);
- Isooctano (2,2,4-trimetilpentano), grau resíduo de pesticida 99,5% (Mallinckrodt, EUA);
- Tolueno, grau LC 99,8% (Mallinckrodt, EUA);
- Acido acético glacial grau HPLC 99,9% (J.T. Baker, EUA);
- Sulfato de magnésio anidro 98,0% (Sigma-Aldrich, Japão);
- Acetato de sódio anidro (AcNa) p.a. 99,0% (Vetec, Brasil);
- PSA (Supelco, EUA);

- Padrões sólidos de agrotóxicos com pureza maior que 98% (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha).

O preparo do *slurry*

Os doces de frutas possuem uma consistência pastosa, fato que dificulta a manipulação na ocasião da pesagem. Por isso, testou-se sua utilização sob forma pura (sem *slurry*) e diluído com água (*slurry*) nas seguintes proporções: 1:2; 1:1,5 e 1:1,25 (m/m). Teste que foi realizado com amostras de doce de uva, previamente aos estudos discutidos no Artigo 1 e não relatado no mesmo.

Para a obtenção das três proporções de *slurry* pesou-se, com o auxílio de uma balança analítica, em 3 diferentes béqueres de plástico, 135 g de homogênea dos doces de uva. A cada um dos béqueres foi adicionado, em separado, respectivamente, 135, 67,5 e 33,75 g de água ultrapura (u.p.), e os mesmos foram levados para homogeneização em Ultra-Turrax, por 2 minutos. Por último, fez-se a seleção da proporção de *slurry* mais adequada, pela facilidade de manipulação (praticidade), homogeneidade da amostra e por testes de fortificação e avaliação da recuperação (%) dos agrotóxicos por GC-IT-MS, único equipamento que está disponível para ser usado nesse momento.

As proporções de *slurry* foram calculadas da seguinte forma: Massa do doce de fruta dividido pela soma da massa de doce de fruta e de água. Para efeito simplificação dividiu-se ambas as frações numéricas pelo máximo divisor comum. Por exemplo, o *slurry* de razão 1:2 foi obtido dividindo-se 135 (massa do doce de fruta em g) e 270 (soma da massa do doce e da água u.p. em g) por 135.

Os agrotóxicos determinados

Os agrotóxicos estudados na avaliação das recuperações (%) por GC-IT-MS estão listados na Tabela 1, com as respectivas informações de pureza, classe, fornecedor, grupo químico e fórmula molecular. Foram estudados 41 agrotóxicos

(incluindo alguns de seus isômeros) e 2 padrões internos (I.S.), total de 43 compostos. As análises foram realizadas por GC-IT-MS no modo EI e monitoramento de íons no modo varredura, em uma única análise cromatográfica.

Tabela 1 - Agrotóxicos determinados por GC-IT-MS, com informações de pureza, classe, fornecedor, grupo químico e fórmula molecular.

Agrotóxico	Pureza (%)	Classe	Fornecedor	Grupo químico	Fórmula molecular
Aldrin	96,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado ciclodieno	C ₁₂ H ₈ Cl ₆
Azoxistrobina	99,5	Fg	Dr. Ehrenstorfer	Estrobirulina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅
Bromofós etílico	98,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	C ₈ H ₈ BrCl ₂ O ₃ PS
Cloropirifós-etílico	99,0	A/I	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Cloropirifós-metilico	97,0	A/I	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS
Cloroprofam	99,5	H	Dr. Ehrenstorfer	Carbamato	C ₁₀ H ₁₂ ClNO ₂
DDD-2,4*	99,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄
DDD-4,4*	99,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄
DDE-2,4*	99,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	C ₁₄ H ₈ Cl ₄
DDE-4,4*	99,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	C ₁₄ H ₈ Cl ₄
DDT-2,4*	98,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	C ₁₄ H ₉ Cl ₁₅
DDT-4,4*	99,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	C ₁₄ H ₉ Cl ₁₅
Diazinona	95,9	I/A	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS
Diclorana	98,0	Fg	Dr. Ehrenstorfer	Cloroaromático	C ₆ H ₄ Cl ₂ N ₂ O ₂
Dicofol	97,3	A	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O
Dieldrin	98,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado ciclodieno	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O
Endossulfam-alfa	98,5	I/F/A	Dr. Ehrenstorfer	Clorociclodieno	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S
Endossulfam-beta	98,0	I/F/A	Dr. Ehrenstorfer	Clorociclodieno	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S
Endossulfam-sulfato	99,5	I/F/A	Dr. Ehrenstorfer	Clorociclodieno	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S
Endrin	97,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado ciclodieno	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O
EPN	99,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	C ₁₄ H ₁₄ NO ₄ PS
Fentoato	96,6	I/A	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ PS ₂
Fludioxonil	98,5	Fg	Dr. Ehrenstorfer	Fenilpirrole	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂
Fosalona	98,5	I/A	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂
HCH-alfa	98,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	C ₆ H ₆ Cl ₆
HCH-beta	98,4	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	C ₆ H ₆ Cl ₆
HCH-gama (Lindano)	98,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	C ₆ H ₆ Cl ₆
Heptacloro	98,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado ciclodieno	C ₁₀ H ₅ Cl ₇
Heptacloro-epóxido	98,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado ciclodieno	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O
Hexaclorobenzeno	99,5	Fg	Dr. Ehrenstorfer	Hidrocarboneto clorado	C ₆ Cl ₆
Metoxicloro	99,5	I	Dr. Ehrenstorfer	Organoclorado	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₃ O ₂
Pirazofós	97,0	I/Fg	Dr. Ehrenstorfer	Fosforotioato de heterociclo	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS
Pirimifós-metilico	99,0	I/A	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS
Profam	98,0	H	Dr. Ehrenstorfer	Carbamato	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂
Prometrina	96,0	H	Dr. Ehrenstorfer	Triazina	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S
Propargito	93,5	A	Dr. Ehrenstorfer	Sulfito de alquila	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S
Quinalfós	99,0	I/A	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS
Quinoxifeno	99,0	Fg	Dr. Ehrenstorfer	Quinolona	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO
Quintozeno	97,0	Fg	Dr. Ehrenstorfer	Cloroaromático	C ₆ Cl ₅ NO ₂
Tris(1,3-dicloroisopropil) fosfato (TDCPP)	99,0	-	Dr. Ehrenstorfer	Organofosforado	C ₉ H ₁₅ Cl ₆ O ₄ P
Tequinazeno	99,5	Fg	Dr. Ehrenstorfer	Cloronitrofenil	C ₆ HCl ₄ NO ₂
Tetradifona	99,9	A	Dr. Ehrenstorfer	Clorodifenilsulfona	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S
Tetrametrina	98,0	I	Dr. Ehrenstorfer	Piretróide	C ₁₉ H ₂₅ NO ₄

O preparo das soluções analíticas dos padrões internos

Nas análises realizadas por GC-IT-MS utilizou-se como padrão interno do procedimento (P.I.S.) o tris(1,3-dicloroisopropil)fosfato (TDCPP) e como padrão interno do equipamento (I.I.S.) o bromofós etílico.

As soluções analíticas dos I.S. (concentração 1000 mg L⁻¹) foram preparadas separadamente. Para isso, primeiramente, os padrões foram pesados em frascos de vidro âmbar (20 mL) com tampa rosqueável e batoque de politetrafluoretileno (PTFE) e posteriormente, dissolvidos com os respectivos solventes (acetonitrila para o tris(1,3-dicloroisopropil)fosfato e tolueno para o bromofós etílico). Após a dissolução, as soluções analíticas foram homogeneizadas durante 5 minutos em banho de ultrassom. A partir da solução de bromofós etílico de concentração 1000 mg L⁻¹ preparou-se uma solução de concentração de 5000 µg L⁻¹ por diluição com acetonitrila.

O P.I.S. foi adicionado (volume de 200 µL) ao solvente extrator (acetonitrila contendo 1% de ácido acético), fornecendo uma concentração de 200 µg L⁻¹, e o I.I.S. foi adicionado (volume de 10 µL) diretamente aos *vials* antes da injeção das amostras no GC-IT-MS, obtendo-se uma concentração final de 50 µg L⁻¹.

O preparo das soluções analíticas dos padrões de agrotóxicos

Inicialmente, foram preparadas soluções analíticas individuais dos agrotóxicos de concentração 1000 mg L⁻¹. Para preparar essas soluções, pesou-se diretamente em frascos de vidro âmbar de 20 mL, a massa mais próxima possível de 10 mg dos padrões sólidos dos agrotóxicos. Em seguida, fez-se o cálculo de ajuste de volume, levando em conta a pureza (%) e a massa exata pesada de cada padrão sólido e dissolveu-se o sólido pesado com o volume exato de tolueno necessário para ter soluções individuais de concentração igual a 1000 mg L⁻¹.

A partir das soluções estoque de concentração 1000 mg L⁻¹ preparou-se soluções intermediárias de concentração 100 mg L⁻¹ transferindo-se 1 mL da solução 1000 mg L⁻¹ para frascos âmbar com capacidade para 10 mL e adicionou-se mais 9

mL de tolueno para os 24 agrotóxicos organoclorados e 9 mL de isooctano para os demais 17 agrotóxicos (pertencentes a diferentes classes químicas e analisáveis por GC).

Também foram preparadas, separadamente, duas soluções mistura dos agrotóxicos ambas de concentração $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, a primeira contendo 24 agrotóxicos organoclorados em isooctano/tolueno (75:25, v/v) e a segunda contendo os demais 17 agrotóxicos em isooctano/tolueno (9:1, v/v). Para preparar a solução mistura de agrotóxicos organoclorados transferiu-se 2 mL de cada solução intermediária (concentração 100mg L^{-1}) para um balão volumétrico de 200 mL, já contendo 2 mL de tolueno e um certo volume de isooctano, sendo o volume do balão posteriormente completado com o mesmo solvente. A solução mistura contendo os demais 17 agrotóxicos foi preparada transferindo-se 1 mL de cada solução intermediária (100mg L^{-1} em isooctano/tolueno) para um balão volumétrico de 100 mL, já contendo um pequeno volume de isooctano/tolueno (9:1), sendo o volume posteriormente completado com a mistura desses solventes.

Finalmente, a partir das duas soluções de concentração $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, preparou-se uma única solução de concentração $500 \mu\text{g L}^{-1}$, contendo 41 agrotóxicos. Para preparar essa solução, foram transferidos 20 mL de cada uma das duas soluções de concentração $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ para dentro de um frasco âmbar com batoque de PTFE.

Todas as soluções foram homogeneizadas em banho de ultrassom durante 15 minutos, armazenadas em frascos de vidro âmbar (tampa com batoque de PTFE) e levadas ao *freezer* a $-28 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da análise. Antes do uso, foram retiradas do *freezer* e deixadas à temperatura ambiente por uma hora e novamente homogeneizadas em ultrassom por 5 minutos.

O solvente utilizado no preparo das amostras

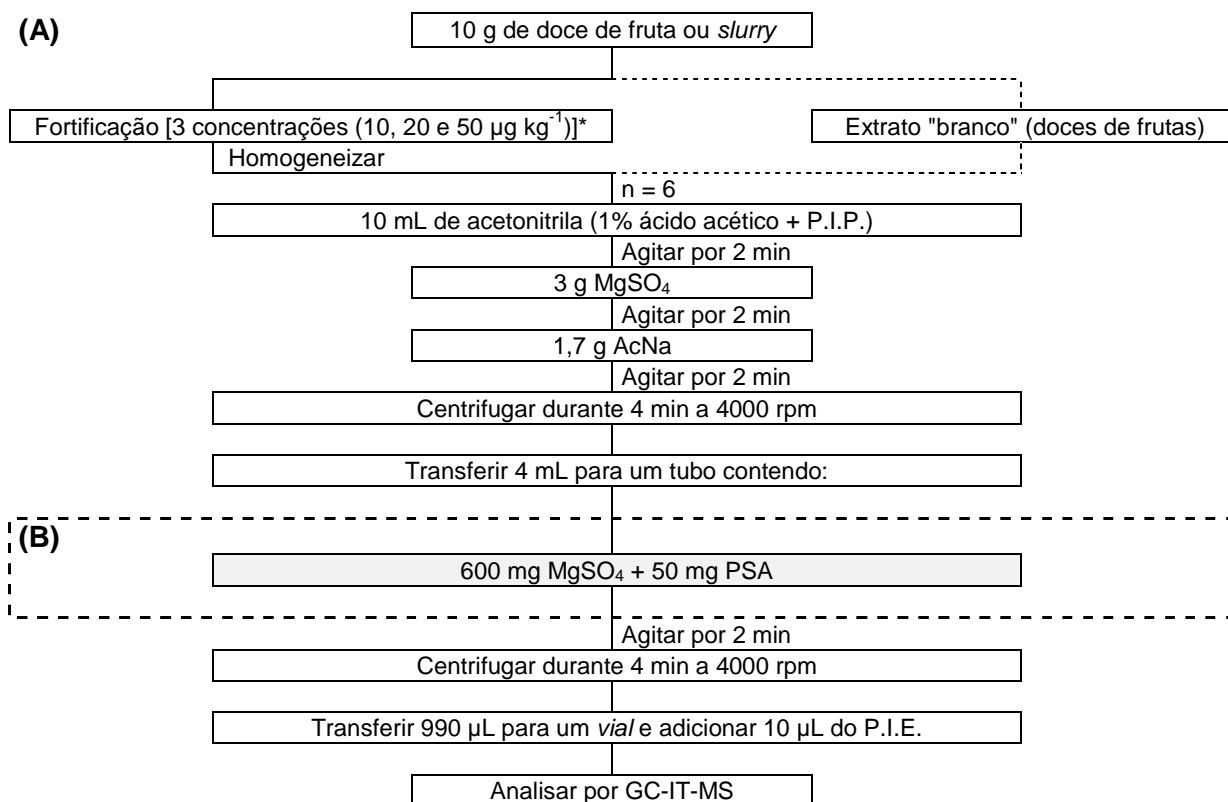
Para o preparo das amostras utilizou-se uma solução de acetonitrila contendo 1% de ácido acético e TDCPP (P.I.S.) na concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$. O preparo dessa solução foi feito da seguinte forma: transferiu-se cerca de 500 mL de acetonitrila para um balão volumétrico de 1 L e adicionou-se 10 mL de ácido acético

concentrado e 200 μL de solução de TDCPP. Completou-se o volume do balão com acetonitrila que foi tampado e homogeneizado.

Extração com método QuEChERS modificado

O preparo de amostras foi feita da seguinte forma: em tubos de centrífuga de 45 mL, pesou-se $10,0 \pm 0,05$ g de amostra (doce de uva em pasta ou *slurry* – 1:1,5 ou 1:1,25), as amostras foram fortificadas com a solução analítica contendo a mistura de 41 agrotóxicos (concentração $500 \mu\text{g L}^{-1}$) e adicionadas de 10 mL de acetonitrila contendo 1% ácido acético e o P.I.P. ($200 \mu\text{g L}^{-1}$). Os tubos foram levados para agitação em mesa agitadora por 2 min. Acrescentou-se 3 g de MgSO_4 e agitou-se em mesa agitadora por mais 2 min. Em seguida, adicionou-se 1,7 g de NaAc e agitou-se novamente em mesa agitadora (2 min). Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm durante 4 min e transferiu-se 4 mL de sobrenadante para tubos de centrífuga de 15 mL, já contendo 600 mg de MgSO_4 e 50 mg de PSA, agitando-se em mesa agitadora por mais 2 min.

Após a agitação, os tubos foram novamente levados à centrífuga por 4 min e centrifugados a 4000 rpm. Finalmente, pipetou-se 990 μL do sobrenadante para *vials* com capacidade para 1,5 mL e adicionou-se 10 μL da solução padrão de P.I.E., fornecendo uma concentração final de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Os *vials* foram tampados e levados ao GC-IT-MS para análise. O esquema do procedimento de extração pode ser visualizado na Figura 3.



*recuperações (%)

P.I.S. = TDCPP;

I.I.S. = Bromofós etílico.

Figura 3 - Esquema do procedimento de preparo de amostras - método QuEChERS modificado (A), etapa de purificação do extrato de doce de uva em pasta (B).

As análises cromatográficas

Os extratos dos doces de uva em pasta, obtidos pelo método QuEChERS modificado, foram analisados em um GC-IT-MS, operado no modo de ionização EI e monitoramento de íons no modo varredura. As condições cromatográficas utilizadas foram desenvolvidas por de Kok, Van Bodegraven e Hiemstra, no *The Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority* (NVWA), laboratório holandês, estão descritas no procedimento operacional padrão CHE01-WV624 (NVWA, 2005) e foram otimizadas para este trabalho.

Condições de análise por GC-IT-MS

As condições instrumentais empregadas para as análises realizadas foram, para o cromatógrafo a gás:

- Programação de temperatura do injetor PTV (do inglês, *Programmed Temperature Vaporizing*): temperatura inicial do injetor 80 °C (0,1 min) com aumento de temperatura de 200 °C min⁻¹ até 300 °C (21,2 min).
- Programação da válvula *split* do injetor: inicialmente aberta (1:10), sendo fechada após 0,1 min e aberta novamente após 1,75 min (1:80);
- O volume de injeção foi de 5 µL;
- A injeção efetuada com o auxílio de amostrador automático consistiu na aspiração de 1,0 µL de ar, 3,0 µL de extrato ou de solução analítica e de 1,0 µL de ar, com velocidade de injeção de 50 µL s⁻¹.
- Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 80 °C, com (1,0 min), com incremento de temperatura de 25 °C min⁻¹ até 180°C; posteriormente 5 °C min⁻¹ até 280°C, e de 10 °C min⁻¹ até 300 °C;
- Vazão do gás de arraste (hélio) constante em 1,2 mL min⁻¹;
- Tempo total de corrida de 37 min.

Para o espectrômetro de massas:

- Temperatura da *transferline*: 290 °C;
- Temperatura do IT: 240 °C;
- Temperatura do *manifold*: 80 °C;
- Monitoramento de íons no modo varredura, dos 4,20 min aos 32 min, monitorando íon com razão m/z entre 60 e 550;
- Modo de ionização EI positivo;
- Tempo de varredura de 0,9 segundos/*scan*.

Os agrotóxicos monitorados, juntamente com suas respectivas massas moleculares, seus tempos de retenção e íons de quantificação estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Agrotóxicos determinados por GC-IT-MS, juntamente com sua massa molecular, tempo de retenção e íon de quantificação.

Agrotóxico	Massa molecular (g)	t _R (min)	Íon de quantificação (m/z)
Profam	179,2	6,43	179,0
Tequinazeno	260,8	7,75	261,0
Clorprofam	213,5	8,28	213,0
HCH-alfa	290,8	8,96	181,0
Hexaclorobenzeno	284,7	9,05	284,0
Diclorana	207,0	9,27	206,0
HCH-beta	290,8	9,53	181,0
Quintozeno	295,3	9,61	295,0
Diazinona	304,3	9,73	304,0
HCH-gama (Lindano)	290,8	9,76	183,0
Clorpirifós-metílico	322,5	11,12	288,0
Prometrina	241,3	11,55	241,0
Heptacloro	373,3	11,59	272,0
Pirimifós-metílico	305,3	11,82	290,0
Clorpirifós-etílico	350,6	12,41	316,0
Aldrin	364,9	12,65	293,0
Dicofol	370,4	12,97	139,0
Heptacloro-epóxido	389,3	13,84	289,0
Fentoato	320,3	13,93	274,0
Quinalfós	298,2	13,97	146,0
Bromofós-etílico (P.I.P.)	394,0	14,39	303,0
DDE-2,4	318,0	14,59	247,0
Endossulfam-alfa	406,9	15,00	241,0
Fludioxonil	248,1	15,42	248,0
DDE-4,4	318,0	15,65	318,0
DDD-2,4	318,0	15,88	237,0
Dieldrin	380,9	16,58	279,0
Endrin	380,9	16,60	281,0
Endossulfam-beta	406,9	16,95	267,0
DDD-4,4	318,0	17,03	235,0
DDT-2,4	352,0	17,13	235,0
TDCPP (P.I.P.)	430,9	17,72	191,0
Quinoxifeno	308,1	18,18	272,0
Endossulfam-sulfato	422,9	18,25	387,0
DDT-4,4	354,4	18,33	235,0
Metoxicloro	345,6	18,80	227,0
Propargito	350,4	18,83	135,0
EPN	323,3	20,05	169,0
Tetrametrina	331,4	20,07	164,0
Tetradifona	356,0	21,02	356,0
Fosalona	367,8	21,18	182,0
Pirazofós	373,3	22,16	221,0
Azoxistrobina	403,3	29,65	344,0

ARTIGOS

Artigo 1 - Validation and application of micro flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams

Bárbara Reichert, Ionara Regina Pizzutti, Ijoni Hilda Costabeber, Ana Uclés, Sonia Herrera, Amadeo R. Fernández-Alba. Validation and application of micro flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams. **Talanta**, v. 134 p. 415–424, 2015. doi: 10.1016/j.talanta.2014.11.047.



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Validation and application of micro flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams



Bárbara Reichert^{a,b}, Ionara Regina Pizzutti^c, Ijoni Hilda Costabeber^d, Ana Uclés^e,
Sonia Herrera^e, Amadeo R. Fernández-Alba^{e,*}

^a Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Roraima 1000/42, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília-DF 70040-020, Brazil

^c Federal University of Santa Maria, Chemistry Department, Center of Research and Analysis of Residues and Contaminants (CEPARC), Santa Maria, RS, Brazil

^d Department of Morphology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Roraima 1000/19, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^e European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues in Fruit & Vegetables, University of Almería, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Agrifood, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2014

Received in revised form

19 November 2014

Accepted 22 November 2014

Available online 29 November 2014

Keywords:

Fruit jams

μ LC–MS/MS

Pesticides residues determination

QuEChERS sample preparation

ABSTRACT

In this study, a very sensitive method was validated to determine pesticides residues in fruit jams using micro flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry (μ LC–MS/MS). A slurry of the fruit jams and water was prepared to yield homogeneous samples. Because of the high sensitivity achieved with the μ LC–MS/MS equipment and to minimize matrix effects, the QuEChERS extracts were diluted 30-fold before the analysis. The validation was performed analyzing spiked samples at 9 and 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=5$). The method met validation criteria of 70–120% recovery and $\text{RSD} \leq 20\%$ for 92% of the 107 pesticides evaluated. The reporting limit (RL) was 9 and 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for respectively 66% and 26% of the analytes, 5% of the compounds did not fulfill the requirements for validation and 3% were not detected at the studied concentrations. The validated method was applied to the analysis of 51 different fruit jam samples from Brazil and Spain and pesticide residues were detected in 41 samples, 26 of which contained at least one pesticide at concentration $> 10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Historically, jams originated as an early effort to preserve fruit for consumption during the fruit off-season. It is an intermediate moisture food prepared by boiling fruit pulp with sugar, pectin, acid and other ingredients (preservatives, coloring and flavoring substances) until obtaining a reasonably thick consistency [1] and a final water content of 32–34% [2]. According to the Document SANCO 12571/2013 [3] fruit jams are classified as high sugar and low water content commodities, together with honey and dried fruits and these characters of the fruit jams can represent a challenge in pesticide determination in such matrices [4].

Pesticides are chemical substances applied to crops at various stages of cultivation and during the post-harvest storage of crops. The use of pesticides is intended to prevent the destruction of food crops by controlling agricultural pests or unwanted plants and to improve plant quality [5]. In Brazil, one of the world's major food

producers, over 90% of farmers rely on pesticide use and the country has ranked first in pesticide use worldwide in recent years, with over 673 million tons applied in 2008 [6].

Although pesticides help to control agricultural pests and organisms harming human activities, they may present a risk for human health. In the European Union (EU), the evaluation of plant protection products and the monitoring of pesticide residues in food are harmonized through Regulation EC No 1107/2009 and Regulation EC No 396/2005 [7]. In Brazil, the basis for pesticide regulation was set by Federal Law No. 7802, enacted in 1989, and later by Acts 4074/2002 and 5981/2006. Two monitoring programs for pesticide residues are currently in place in Brazil that aim to evaluate compliance with national MRLs: the Program on Pesticide Residue Analysis in Food (PARA), coordinated by the National Health Surveillance Agency (ANVISA), which aims to analyze fruits and vegetables, and the National Residue and Contaminant Control Program (PNCRC), coordinated by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supplies (MAPA), that intent to control animal products, fruit and vegetables products [6,8,9]. None of these programs aims to evaluate processed food products, like e.g. fruit jams, juices or tomato purees, for pesticide residues.

* Corresponding author. Tel.: +34950015034; fax: +34950015483.
E-mail address: amadeo@ual.es (A.R. Fernández-Alba).

Liquid chromatography (LC) is used in many analytical applications worldwide and is commonly coupled to mass spectrometry (MS) to detect, to identify and to monitor compounds [10]. The development of miniaturized LC started by the mid-1970s but the first commercially available micro (μ) LC system was announced in late 1975 [11]. μ LC typically uses columns with an internal diameter (I.D.) of 0.5 to 1 mm [12], lower mobile phase flow rates (1 to 40 $\mu\text{L min}^{-1}$) and present numerous advantages compared to conventional LC [13] like the ability to work with smaller sample sizes, lower volumetric flow-rates and the improvement in detection performance with the use of concentration-sensitive detectors as a result of the reduced chromatographic dilution [12,14].

It is considered that the increase of detection sensitivity in tubing with a small inner diameter is due to reduced axial sample band diffusion [15,16]. The following rationale suggests the selection of capillary LC. During chromatographic separation, the dilution (D) of an injected sample ($D = C_{\text{end}}/C_{\text{inj}}$, where C_{end} is the concentration after chromatography and C_{inj} is the concentration injected) is given by

$$D = \frac{\epsilon \pi r^2 (1+k)(2LH)^2}{V_{\text{inj}}}$$

where ϵ is the column porosity, r is the column radius, k is the retention factor, L is the column length, H is the plate height, and V_{inj} is the injection volume. If conditions are otherwise equal, D is in direct proportion to the square of column radius. When compared to conventional LC, μ LC increases the signal-to-noise ratio (S/N) drastically when electrospray ionization (ESI) coupled to MS/MS is employed [14,17]. For example, from the previous equation it can be calculated that this will result in a 235-fold increase in peak height and mass sensitivity for a reduction in the diameter of a column from 4.6 mm to 300 μm I.D. [14], when all the other parameters are kept constant.

ESI is a soft ionization technique and these techniques perform considerably better if most of the eluate solvents are removed before the ionization process takes place. μ LC delivers sharper and narrower solute bands to the interface nebulizer using a minimal amount of an appropriate solvent mixture. Consequently, smaller droplets are generated carrying less solvent to evaporate. The solute, which is distributed among a larger number of lower mass particles, is rapidly vaporized into the ion source minimizing thermal decomposition [18].

Due to the increase of pesticides applied in agriculture, their potential accumulation in both the environment and foods and their toxicities to humans a stricter control of residues in food commodities should be applied. Considering the decrease of the maximum residue limits (MRL) in most countries and continuous further prohibition of older, more harmful pesticides there is a need for sensitive multi-residue methods for monitoring and enforcement of the residues that may be present in food [19] including for processed food crops like fruit jams. The goal of this work was to develop and validate a selective, robust and highly sensitive μ LC-MS/MS method to determine pesticides residues in fruit jams and later apply it to the analysis of samples to verify the existence of pesticides in these commodities.

2. Material and methods

2.1. Reagents and materials

Acetonitrile, HPLC grade (99.9%), formic acid, analytical grade ($\geq 96.0\%$) and magnesium sulfate (98.0%) were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Water, Optima[®], HPLC grade was supplied by Fisher Scientific (New Jersey, USA). Sodium chloride (99.0%) was obtained from J.T. Baker (Deventer, Netherlands). Ethyl

acetate, HPLC grade, sodium citrate tribasic dehydrate (99.0%) and disodium hydrogencitratetribasic dehydrate (99.0%) from Fluka (Steinheim, Germany). C_{18} (40 μm) was from Varian (Middelburg, The Netherlands) and Primary-Secondary Amine (PSA) Bond-Elut from Supelco (Bellefonte, USA). Pesticides standards (purity $> 98.0\%$) were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), from Riedel-de Haën (Seelze, Germany) and from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and stored in a freezer at -30°C .

2.2. Pesticide standard solutions

Individual pesticide standard stock solutions were prepared in acetonitrile and in ethyl acetate, at 1000–2000 mg L^{-1} and stored in amber screw-capped glass vials at -20°C . A standard mixture solution of 107 pesticides was prepared in acetonitrile at the concentration of 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. This solution was used as spiking solution for recovery experiments and also to prepare the standard solutions in matrix (matrix-matched calibration standards) and organic solvent to obtain the calibration curves, by dilution with blank fruit jam extract or acetonitrile, respectively. The standards in blank matrix extract were used for the determination of the matrix effect and also for the recovery calculations.

2.3. Instrumentation

The chromatographic system consisted of an Eksigent ekspert[™] μ LC 200 (Eksigent, Redwood City, CA, USA) integrated to a hybrid quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (QTRAP[®] 4500 MS/MS, AB Sciex Instruments, Foster City, CA, USA). Chromatographic separations were performed using an Halo C_{18} column 50×0.5 mm I.D. and 2.7 μm particle size (Eksigent, AB Sciex Instruments, Foster City, CA, USA) held at 30°C by a column heater. The mobile phases consisted of water with 0.1% formic acid (mobile phase A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (mobile phase B). The injection volume was 3 μL , the flow rate used was kept constant at 30 $\mu\text{L min}^{-1}$ and the gradient program in positive mode was set as follows: 20% B (initial conditions) was kept constant for 1 min followed by a linear gradient up to 98% B in 9 min, after which the mobile phase composition was maintained at 98% A for 3 min, the re-equilibration time was 1 min and the total run time was 14 min.

The QTRAP[®] 4500 MS/MS system was equipped with an ESI source with μ -Flow electrode (50 mm I.D.), operating in positive and negative ionization mode, there was applied scheduled multiple reaction monitoring (sMRM) software features. The Turbo Ion Spray source settings were ion spray voltage, 5000 V; temperature, 400°C ; curtain gas flow, 20 L min^{-1} ; collision gas, medium; and ion source gas (nebulizer gas and turbo gas), at a pressure of 30 psi. Nitrogen was used as the nebulizer gas, turbo gas, curtain gas and collision gas. The data were acquired and processed with the Analyst software version 1.6.2.

2.4. Selected μ LC-MS/MS parameters

To optimize the mass spectrometer parameters an individual solution of each target compound was prepared in methanol at the concentration of 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Using flow injection analysis of these solutions, it was possible to optimize all the parameters including declustering potential, entrance potential, collision energy and collision cell exit potential for each single compound. The system was operated in a sMRM mode, through the acquisition of single reaction monitoring (SRM) transitions for each analyte with resolution set to Unit at the first and third quadrupoles. The time window was from 30 s for each SRM transition. According to Lozano et al. [20] the sMRM enables optimized cycle time and maximized dwell times to be used during acquisition to provide higher multiplexing with good analytical precision.

Table 1
Chromatographic parameters of the compounds determined by μ LC–MS/MS. Retention time (t_R), declustering potential (DP) and collision energy (CE).

Compound	t_R (min)	DP (V)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)–SRM1	CE 1 (V)	Product ion (m/z) –SRM2	CE 2 (V)	Ionization mode
Acephate	0.44	50	184.0	94.9	30	143.0	11	ESI (+)
Acetamidiprid	1.02	77	223.0	126.0	30	56.0	28	ESI (+)
Azinphos-methyl	4.15	55	318.0	132.1	21	261.0	8	ESI (+)
Azoxystrobin	4.48	57	404.0	372.0	20	344.0	33	ESI (+)
Bitertanol	4.94	60	338.0	269.1	14	99.1	24	ESI (+)
Boscalid	4.55	105	343.0	307.0	27	140.0	24	ESI (+)
Bromuconazole	4.24	100	378.0	159.0	40	70.0	59	ESI (+)
Bupirimate	3.57	100	317.0	166.1	32	272.1	27	ESI (+)
Buprofezin	4.60	62	306.0	201.0	17	116.0	23	ESI (+)
Carbaryl	2.92	56	202.0	145.0	13	127.0	37	ESI (+)
Carbendazim	0.45	113	192.0	160.0	26	132.0	43	ESI (+)
Carbofuran	2.69	56	222.0	165.0	16	123.0	26	ESI (+)
Chlorpyrifos	6.92	66	352.0	200.0	28	125.0	27	ESI (+)
Chlorpyrifos methyl	5.96	65	321.8	125.0	26	289.7	23	ESI (+)
Cyproconazole	4.16	85	292.0	125.0	48	139.0	32	ESI (+)
Cyprodinil	3.22	130	225.6	93.1	48	108.1	33	ESI (+)
Diazinon	5.60	102	304.8	169.2	29	153.1	28	ESI (+)
Diclorvos	2.33	77	220.9	109.0	24	127.0	24	ESI (+)
Diclorvos- d_6 (I.S.)	2.18	66	226.8	115.0	25	83.0	37	ESI (+)
Dicrotophos	0.49	63	238.0	112.0	17	193.1	13	ESI (+)
Diethofencarb	4.13	61	268.0	226.1	13	180.1	25	ESI (+)
Difenoconazole	5.44	105	406.0	251.0	35	337.0	25	ESI (+)
Dimethoate	0.94	50	230.0	199.0	12	171.0	19	ESI (+)
Dimethoate- d_6 (I.S.)	0.91	62	236.0	205.0	11	177.1	21	ESI (+)
Dimethomorph	4.06	127	388.0	301.0	33	273.0	42	ESI (+)
Diniconazole	4.99	85	326.0	70.0	60	159.0	45	ESI (+)
Dodine	3.87	132	228.0	57.0	37	71.0	29	ESI (+)
Epoxiconazole	4.49	90	330.0	121.1	22	141.1	23	ESI (+)
Ethirimol	0.48	100	210.0	140.0	28	98.0	34	ESI (+)
Ethofenprox	8.35	60	394.1	177.1	20	359.2	15	ESI (+)
Ethoprophos	4.43	65	243.0	131.0	27	215.0	16	ESI (+)
Fenamidone	4.45	75	312.0	236.0	21	92.1	40	ESI (+)
Fenarimol	4.24	110	331.0	268.0	32	259.3	35	ESI (+)
Fenbuconazole	4.86	90	337.0	125.0	50	70.0	50	ESI (+)
Fenhexamid	4.52	100	302.0	97.0	30	55.0	60	ESI (+)
Fenitrothion	4.99	86	278.0	125.0	26	109.0	21	ESI (+)
Fenpropathrin	6.92	80	350.0	125.0	21	97.1	44	ESI (+)
Fenpropimorph	3.06	150	304.0	147.0	39	130.0	35	ESI (+)
Fenpyroximate	7.03	110	422.0	366.0	21	215.2	34	ESI (+)
Fenthion	5.59	80	279.0	247.0	17	169.1	23	ESI (+)
Fludioxonil	4.35	141.7	246.6	125.9	37	179.9	38	ESI (-)
Flusilazole	4.77	97	316.0	247.0	25	165.0	39	ESI (+)
Flutriafol	3.09	80	302.0	70.0	55	123.0	35	ESI (+)
Fosthiazate	2.99	62	284.0	228.0	13	104.0	32	ESI (+)
Hexaconazole	4.77	95	314.0	70.0	55	159.1	45	ESI (+)
Hexythiazox	6.94	51	353.0	228.0	19	271.0	20	ESI (+)
Imazalil	2.29	110	297.0	159.0	29	201.0	25	ESI (+)
Imidacloprid	0.84	65	256.0	209.0	22	175.0	27	ESI (+)
Iprodione	4.90	80	330.0	245.0	21	288.0	25	ESI (+)
Iprovalicarb	4.33	60	321.1	119.0	30	203.1	12	ESI (+)
Kresoxim-methyl	5.41	64	314.0	267.0	10	282.1	11	ESI (+)
Linuron- d_6 (I.S.)	4.05	74	255.0	160.0	26	185.0	24	ESI (+)
Malathion	4.98	75	331.0	127.0	16	285.0	10	ESI (+)
Malathion- d_{10} (I.S.)	4.86	76	341.0	132.0	19	100.0	37	ESI (+)
Mandipropamid	4.67	80	412.0	328.0	20	356.0	15	ESI (+)
Mepanipyridin	4.59	160	224.0	106.0	33	130.9	48	ESI (+)
Metalaxyl	3.24	62	280.2	220.0	19	191.9	32	ESI (+)
Metconazole	4.90	90	320.0	70.0	65	125.0	60	ESI (+)
Methamidophos	0.42	71	142.0	94.0	20	125.0	19	ESI (+)
Methidathion	4.06	55	303.0	145.0	14	85.0	28	ESI (+)
Methiocarb	3.99	60	226.0	169.0	13	121.0	25	ESI (+)
Methomyl	0.51	37	163.0	106.0	14	88.1	12	ESI (+)
Methoxyfenozide	4.81	50	369.0	313.2	11	149.1	28	ESI (+)
Myclobutanil	4.47	86	289.0	70.0	52	125.0	45	ESI (+)
Oxadixyl	2.14	67	279.0	219.2	14	102.0	14	ESI (+)
Oxydemeton-methyl	0.46	48	247.0	169.0	18	105.0	17	ESI (+)
Pacllobutrazole	3.91	90	294.0	70.0	50	125.0	55	ESI (+)
Parathion	5.59	60	292.0	236.0	20	264.1	13	ESI (+)
Parathion-Methyl	4.58	70	264.0	232.0	23	125.0	23	ESI (+)
Penconazole	4.78	77	284.0	70.0	42	159.0	45	ESI (+)
Pencycuron	5.90	95	329.0	125.0	55	218.0	22	ESI (+)
Pendimethalin	6.89	40	282.0	212.1	16	194.0	26	ESI (+)
Phenthoate	5.65	66	321.0	163.0	15	247.0	15	ESI (+)
Phosalone	6.04	75	368.0	182.0	23	322.0	14	ESI (+)
Phosmet	4.44	62	318.0	160.0	21	133.0	63	ESI (+)

Table 1 (continued)

Compound	t_R (min)	DP (V)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)—SRM1	CE 1 (V)	Product ion (m/z)—SRM2	CE 2 (V)	Ionization mode
Phoxim	6.01	65	299.0	129.0	16	153.1	9	ESI (+)
Pirimicarb	0.52	70	239.0	182.1	21	72.1	39	ESI (+)
Pirimiphos-methyl	5.28	110	306.0	164.1	30	108.1	43	ESI (+)
Prochloraz	3.87	53	376.0	308.0	16	266.0	23	ESI (+)
Procimidone	5.00	80	283.9	256.0	25	228.0	30	ESI (+)
Profenofos	6.15	66	373.0	303.0	26	344.8	18	ESI (+)
Propargite	7.34	60	368.0	231.0	15	175.0	21	ESI (+)
Propiconazole	5.01	100	342.0	159.0	41	69.0	35	ESI (+)
Propoxur	2.48	50	210.0	168.0	11	111.1	20	ESI (+)
Propyzamide	4.51	70	256.0	190.0	21	173.0	33	ESI (+)
Prothiofos	7.92	80	344.8	241.0	25	269.0	16	ESI (+)
Pyraclostrobin	5.79	64	388.0	194.0	16	164.0	24	ESI (+)
Pyrethrins	7.32	62	329.0	161.0	13	143.0	23	ESI (+)
Pyridaben	7.57	90	365.1	309.0	19	147.0	35	ESI (+)
Pyrimethanil	2.04	135	200.0	107.1	32	168.1	40	ESI (+)
Pyriproxyfen	6.71	70	322.0	96.0	20	227.0	20	ESI (+)
Quinoxifen	5.99	120	308.0	197.0	44	272.0	40	ESI (+)
Rotenone	5.04	120	395.0	213.0	35	192.0	36	ESI (+)
Spinosyn A	4.03	147	732.5	142.0	34	98.0	100	ESI (+)
Spinosyn D	4.27	154	746.5	142.0	36	98.0	97	ESI (+)
Tebuconazole	4.63	96	308.0	70.1	51	125.1	53	ESI (+)
Tebufenpyrad	6.23	110	334.0	145.0	35	117.0	60	ESI (+)
Teflubenzuron	6.07	46.6	378.9	338.8	12	358.9	11	ESI (-)
Tetraconazole	4.68	100	372.0	159.0	43	70.0	65	ESI (+)
Thiabendazole	0.46	142	202.0	174.9	37	131.1	44	ESI (+)
Thiacloprid	1.77	73	253.1	126.0	27	186.0	19	ESI (+)
Thiametoxam	0.55	58	291.9	211.0	17	131.9	36	ESI (+)
Thiodicarb	2.81	63	355.0	88.0	27	108.0	21	ESI (+)
Thiophanate-methyl	2.5	75	343.0	151.0	27	311.0	16	ESI (+)
Tolclofos-methyl	5.92	84	301.0	125.0	26	269.0	22	ESI (+)
TPP (I.S.)	5.62	106	326.8	77.0	63	152.0	53	ESI (+)
Triadimefon	4.49	70	294.0	197.0	22	225.1	18	ESI (+)
Trifloxistrobin	6.32	81	409.0	186.0	26	206.0	20	ESI (+)
Triflumuron	5.59	68	359.0	156.0	21	139.0	50	ESI (+)
Triticonazole	4.06	80	318.0	70.0	55	125.0	50	ESI (+)
Vamidothion	0.55	61	288.0	146.0	19	118.0	32	ESI (+)
Zoxamide	5.64	107	336.0	187.0	31	204.0	23	ESI (+)

I.S.: Internal standard.

For the correct identification and quantification of the pesticides the criteria from the EU guideline were adopted. The SRM transition with the best signal-to-noise ratio (SRM1) was used as quantifier transition and a second and more specific transition (SRM2) was used for identification. Moreover, was required the retention time coincidence with the standard (matrix-matched standard, with tolerance of ± 0.2 min), the real acquisition of two monitored SRM transitions and the compliance of the SRM ratio (ratio between SRM2/SRM1), when compared with calibration standard at comparable concentrations and measured under the same conditions [3]. The optimized parameters from the μ LC-MS/MS acquisition method can be seen in Table 1.

2.5. Samples

Fifty-one fruit jam samples from eight different commercial brands were purchased in local markets of Santa Maria (South of Brazil), $n=34$ and Almería (South-eastern of Spain), $n=17$. The samples consisted of jams from five different fruits types, strawberry 300 g of slurry of each sample by the homogenization of 200 g of fruit jam with 100 g of ultra-purified water, in a Polytron-PT 10–35 (Switzerland) homogenizer during 2 min at 3000 rpm. The slurry portions were stored in a freezer at -20 °C until the analysis.

2.6. Extraction procedure

For recovery studies, the samples were spiked with the studied pesticides before the QuEChERS extraction procedure. Some samples

obtained from the local markets were analyzed in order to provide a blank sample for the validation. An amount of 10 g of slurry (corresponding to 6.7 g of fruit jam) was weighed in a 50 mL PTFE centrifuge tube. The blank slurries of fruit jam were spiked with a volume of 60 or 300 μ L of a mixture standard solution containing 1000 μ g L⁻¹ of each pesticide in order to provide spike concentrations of 9 and 45 μ g kg⁻¹, respectively, with five replicates at each concentration. For the extraction step, a volume of 10 mL of acetonitrile containing the procedure internal standards (I.S.), diclorvos-d₆, malathion-d₁₀ and triphenyl phosphate (TPP) at 50 μ g L⁻¹, was added to the tubes and the samples were shaken in an automatic axial extractor (AGYTAX®, Cirta Lab. S.L., Spain) for 4 min. Afterwards, 4 g of magnesium sulfate, 1 g of sodium chloride, 1 g of trisodium citrate dihydrate and 0.5 g of disodium hydrogensulfate were added and the samples were again shaken in the automatic axial extractor for 4 min. The extracts were then centrifuged (3700 rpm) for 5 min and 5 mL were transferred to a 15 mL PTFE centrifuge tube containing 750 mg of magnesium sulfate, 125 mg of PSA and 125 mg of C₁₈, for clean-up. The tubes were shaken in a vortex for 30 s and centrifuged again (3700 rpm) for further 5 min. Hereafter, 4 mL of the extracts were transferred to a vial and acidified with 50 μ L of formic acid (5% in acetonitrile). Before the μ LC-MS/MS injection the extracts were diluted 30-fold with a mixture of acetonitrile/water (1:9), this corresponded to the injection of just 0.022 g of sample per milliliter of diluted extract.

As already demonstrated in previous works, dilution of extracts is a good way to eliminate matrix effects [21,22]. Even when they are commodity dependent it was demonstrated that dilution factors of 25–40 can eliminate the majority of them [22].

Thereby, to verify the correct execution of the dilution step, linuron- d_6 was added to acetonitrile extracts at the concentration of $10 \mu\text{g L}^{-1}$, before the dilution. That was done by pipetting $96 \mu\text{L}$ of the acidified acetonitrile extract to an 1.5 mL vial and adding $4 \mu\text{L}$ of Linuron- d_6 solution ($250 \mu\text{g L}^{-1}$), providing a concentration of $10 \mu\text{g L}^{-1}$. These solutions were used for the following 30-fold dilution step, which was performed in another 1.5 mL vial by transferring $570 \mu\text{L}$ of acetonitrile/water (1:9), $20 \mu\text{L}$ of the acetonitrile solution with linuron- d_6 at $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (prepared in the previous step) and $10 \mu\text{L}$ of dimethoate- d^9 ($60 \mu\text{g L}^{-1}$), as injection I.S., providing a concentration of $1 \mu\text{g L}^{-1}$. These vials were taken for injection in the $\mu\text{LC-MS/MS}$ equipment.

2.7. Method validation

All the 107 target pesticides of this study and 5 I.S., were evaluated in one single chromatographic run by $\mu\text{LC-MS/MS}$ in the positive and negative ESI-sMRM mode.

2.7.1. Calibration curves, linearity and matrix effect

The calibration curves were constructed based on peak areas obtained from injection of standard solutions prepared in blank grape jam extracts and in neat acetonitrile, at the following concentrations: 6, 30, 60, 100, 200, 300 and $400 \mu\text{g L}^{-1}$ (corresponding to pesticide residue concentrations of 9, 45, 90, 150, 300, 450 and $600 \mu\text{g kg}^{-1}$ in the grape jam samples). Because of the high sensitivity of the $\mu\text{LC-MS/MS}$ equipment and to minimize the matrix effect, these solutions were diluted 30-fold before injection providing the concentration of 0.2, 1.0, 2.0, 3.3, 6.6, 10.0 and $13.3 \mu\text{g L}^{-1}$ (corresponding to 0.3; 1.5; 3.0; 5.0; 10.0; 15.0; 20.0 in blank grape jam extract).

The linearity of the calibration curves was assessed by calculating the determination coefficients (r^2). The linear range was also determined for each analyzed pesticide.

The matrix effect was calculated comparing the slope of the calibration curves in matrix (grape jam extract) and acetonitrile using the following equation:

$$\text{Matrix effect (\%)} = \left[\left(\frac{\text{slope curve, standard in matrix}}{\text{slope curve, standard in acetonitrile}} \right) - 1 \right] \times 100$$

2.7.2. Accuracy (trueness and precision)

Accuracy is the closeness of agreement between a test result and the true or the accepted reference value. When applied to a set of test results, it involves a combination of random error (estimated as precision) and a common systematic error (trueness or bias). Precision is defined as the closeness of agreement between independent analytical results obtained by applying the experimental procedure under stipulated conditions. The smaller the random part of the experimental error which affects the results, the more precise the procedure. A measure of precision (or imprecision) is the standard deviation [3].

The accuracy (trueness and precision) of the method was evaluated through recovery experiments by spiking pesticides to a blank grape jam slurry, at two different concentrations (9 and $45 \mu\text{g kg}^{-1}$), with five replicates at each concentration ($n=5$). The spiking procedure was performed by adding the standard mixture solution containing the pesticides to the jam slurry. The average peak areas were used to calculate recoveries (%) and the RSD% at the different spike concentrations.

2.7.3. Reporting limit (RL) or limit of quantification (LOQ)

According to SANCO [3] the RL is the lowest level at which residues will be reported as absolute numbers and it is equal to, or higher than

the LOQ. In this study it was based on the accuracy and precision data, obtained via the recovery determinations and was defined as the lowest validated spike concentration meeting the requirements of an average recovery within the range 70–120% and an RSD $\leq 20\%$.

3. Results and discussion

3.1. Accuracy (recovery), precision, RL and selectivity

The method was assessed for accuracy and precision by the analysis of spiked grape jam samples at two concentrations, 9 and $45 \mu\text{g kg}^{-1}$, with five replicates at each concentration. The individual recovery results are reported in Table 2. For the spike concentrations of 9 and $45 \mu\text{g kg}^{-1}$, the number of compounds that fulfilled the requirements for validation (recoveries 70–120% and RSD $\leq 20\%$) was 71 and 94, respectively.

Dodine was detected at the concentration of $45 \mu\text{g kg}^{-1}$, in the calibration standards in matrix and in acetonitrile but was not detected at the recovery samples at the same concentration. That can be explained by its specific properties like molecular structure, (*n*-dodecylguanidine acetate) and its relatively high solubility in water at acidic pH (around 5) so it could have been not completely extracted from the fruit jam slurry [23].

Mepanipyridin first transition was detected at both concentrations studied but could not be confirmed due the low signal of its second transition. Thiodicarb was not detected at the both spike concentrations studied and even at concentrations higher than $45 \mu\text{g kg}^{-1}$. This pesticide belongs to class of the carbamate pesticides and has methomyl as metabolite [24]. Methomyl was not in the standard pesticide mixture solution ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$), but was detected in the recovery samples with recoveries of 97% (RSD=21%) at the spike concentration of $9 \mu\text{g kg}^{-1}$ and rec. of 91% (RSD=10%) at the concentration of $45 \mu\text{g kg}^{-1}$, it is a consequence of thiodicarb degradation to methomyl.

The recovery (%) and RSD% data were also used for the establishment of the RL which are also reported in Table 2. According to this table, 66% and 26% of the analytes had the RL established at 9 and $45 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Three percent were not detected and 5% had recoveries outside the range of 70–120% and/or RSD $> 20\%$ at both concentrations. Thus, in total 92% of the compounds satisfied the validation requirements at the studied levels.

In order to maintain the selectivity of the method and correct identification of the pesticides, besides the correct relative intensities of the SRM transitions of each pesticide, the retention times of the analytes are also very important and have to be reproducible [25,26]. Clean-up and/or dilution steps reduce matrix interferences also resulting in improved selectivity and reduce contamination of the instrument systems leading to improved robustness [3].

In this method the selectivity can be seen in Fig. 1, where are shown the overlapped total ion chromatograms of standard solutions in acetonitrile and grape jam extract and a blank grape jam extract. But the selectivity is illustrated even better in Fig. 2, where are shown the SRM transitions of carbendazim, pyrimethanil and difenoconazole, that were detected in positive strawberry and grape jam samples.

Finally, to ensure the correct identification of all analytes, in the case of occurrence of signals in blank matrix extracts in the range of $\pm 0.2 \text{ min}$ of the pesticide retention time, it was ensured that it did not exceed the expected analyte peak intensity at 30% at the LOQ.

3.2. Calibration curves, linearity and linear range

The method showed to be linear ($r^2 \geq 0.99$) in the range of $6\text{--}400 \mu\text{g L}^{-1}$ (corresponding to the range of $9\text{--}600 \mu\text{g kg}^{-1}$ in fruit jam) for the majority of the pesticides. Between the 99 fully validated compounds just fenitrothion had an $r^2 < 0.99$ (0.98)

Table 2
Average recoveries (%), RSD (%) ($n=5$), matrix effect (M.E.%) and reporting limit (RL) calculated from the standard solutions prepared in blank grape jam extract and in acetonitrile. RL is referred to the concentration in the sample. Detection was performed by μ LC–MS/MS.

Compound	Spike concentration				M.E. (%)	RL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	$9 \mu\text{g kg}^{-1}$		$45 \mu\text{g kg}^{-1}$			
	Average recovery (%)	RSD (%)	Average recovery (%)	RSD (%)		
Acephate	142	20	111	6	–60	45
Acetamidrid	96	4	92	4	–4	9
Azinphos-methyl	n.d.	n.d.	109	39	n.f.r.	n.f.r.
Azoxystrobin	82	16	117	41	–1	9
Bitertanol	111	18	90	15	4	9
Boscalid	n.d.	n.d.	118	7	–4	45
Bromuconazole	n.d.	n.d.	97	31	n.f.r.	n.f.r.
Bupirimate	104	3	91	3	1	9
Buprofezin	152	14	89	13	10	45
Carbaryl	97	6	92	4	–8	9
Carbendazim	75	6	61	4	–25	9
Carbofuran	128	6	109	4	–10	45
Chlorpyrifos	111	6	89	3	–1	9
Chlorpyrifos methyl	140	20	89	10	4	45
Cyproconazole	159	8	92	7	–4	45
Cyprodinil	n.d.	n.d.	95	5	18	45
Diazinon	n.d.	n.d.	36	5	n.f.r.	n.f.r.
Diclorvos	n.d.	n.d.	104	9	–7	45
Diclotophos	84	9	82	5	–12	9
Diethofencarb	158	32	91	16	–5	45
Difenoconazole	104	6	90	4	0	9
Dimethoate	103	5	91	4	–7	9
Dimethomorph	116	8	91	2	–8	9
Diniconazole	105	4	88	5	–1	9
Dodine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epoxiconazole	134	19	97	6	4	45
Ethirimol	94	10	65	7	–6	9
Ethofenprox	120	6	113	4	–33	9
Ethoprophos	n.d.	n.d.	42	10	n.f.r.	n.f.r.
Fenamidone	107	15	91	5	–3	9
Fenarimol	n.d.	n.d.	97	10	–8	45
Fenbuconazole	107	6	94	5	2	9
Fenhexamid	133	8	77	16	5	45
Fenitrothion	n.d.	n.d.	98	11	9	45
Fenpropathrin	110	12	89	6	–3	9
Fenpropimorph	91	9	81	4	14	9
Fenpyroximate	118	7	95	5	–19	9
Fenthion	110	11	88	3	–1	9
Fludioxonil	n.d.	n.d.	100	13	0	45
Flusilazole	97	7	89	3	0	9
Flutriafol	104	6	89	3	–5	9
Fosthiazate	104	5	92	4	–7	9
Hexaconazole	102	5	86	5	0	9
Hexythiazox	113	4	89	1	0	9
Imazalil	104	11	83	3	8	9
Imidacloprid	106	5	87	6	–4	9
Iprodione	n.d.	n.d.	102	7	16	45
Iprovalicarb	108	31	88	11	–5	45
Kresoxim-methyl	101	6	90	5	–4	9
Malathion	108	5	89	3	–14	9
Mandipropamid	94	13	92	3	–4	9
Mepanipyridin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Metalaxyl	107	5	92	4	0	9
Metconazole	123	10	89	8	1	45
Methamidophos	n.d.	n.d.	75	6	–59	45
Methidathion	107	13	82	9	–7	9
Methiocarb	111	5	91	4	–1	9
Methomyl	97	21	91	10	–16	9
Methoxyfenozide	115	9	92	6	–5	9
Myclobutanil	92	5	88	8	3	9
Oxadixyl	117	21	89	14	–6	9
Oxydemeton-methyl	92	12	78	6	–21	9
Paclbutrazole	106	7	98	18	–2	9
Parathion	82	11	90	7	16	9
Parathion-Methyl	n.d.	n.d.	100	19	18	45
Penconazole	113	6	89	5	2	9
Pencycuron	121	11	88	5	–6	45
Pendimethalin	110	5	88	3	–3	9
Phenthoate	117	7	93	3	2	9

Table 2 (continued)

Compound	Spike concentration				M.E. (%)	RL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	$9 \mu\text{g kg}^{-1}$		$45 \mu\text{g kg}^{-1}$			
	Average recovery (%)	RSD (%)	Average recovery (%)	RSD (%)		
Phosalone	118	20	85	11	1	9
Phosmet	107	26	89	9	-7	45
Phoxim	n.d.	n.d.	96	2	-5	45
Pirimicarb	108	8	90	5	-7	9
Pirimiphos-methyl	104	5	88	4	1	9
Prochloraz	104	7	87	5	0	9
Prochloraz	n.d.	n.d.	98	6	10	45
Profenofos	118	35	93	4	-2	45
Propargite	115	6	96	3	-16	9
Propiconazole	107	7	88	3	1	9
Propoxur	113	6	93	3	-7	9
Propyzamide	114	15	90	9	-4	9
Prothiofos	114	3	90	3	-23	9
Pyraclostrobin	110	8	93	3	1	9
Pyrethrins	108	3	95	3	-10	9
Pyridaben	119	4	102	4	-26	9
Pyrimethanil	101	10	87	6	-1	9
Pyriproxyfen	104	4	88	2	0	9
Quinoxifen	99	10	87	3	2	9
Rotenone	105	4	89	4	-2	9
Spinosyn A	78	5	65	7	38	9
Spinosyn D	n.d.	n.d.	62	15	n.f.r.	n.f.r.
Tebuconazole	107	7	93	7	-3	9
Tebuconazole	113	33	91	2	-5	45
Teflubenzuron	120	42	91	10	3	45
Tetraconazole	108	8	94	4	5	9
Thiabendazole	107	2	65	6	-14	9
Thiacloprid	96	4	90	6	54	9
Thiametoxam	91	7	91	5	-13	9
Thiodicarb	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Thiophanate-methyl	115	7	115	6	-2	9
Tolclofos-methyl	87	23	86	7	1	45
Triadimefon	102	9	87	6	-2	9
Trifloxistrobin	106	7	92	3	-2	9
Triflumuron	113	7	92	3	-6	9
Triticonazole	107	10	90	4	1	9
Vamidothion	98	3	92	4	-13	9
Zoxamide	n.d.	n.d.	96	2	0	45

n.f.r.: not fulfilling requirements for quantitative method (recovery: 70–120%, RSD \leq 20%); n.d.: not detected.

considering the calibration curves prepared in blank grape jam extracts. For the calibration curves in acetonitrile just carbendazim and thiabendazole presented $r^2 < 0.99$, both had $r^2 = 0.98$.

3.3. Matrix effect

The matrix effect (%) was calculated by comparing the slope of the calibration curves in blank grape jam extract (matrix matched calibration standards) and in acetonitrile of each pesticide. In order to reduce the matrix effect, or matrix interference, a clean-up step was used during the extraction procedure and later the acetonitrile extract was diluted 30-fold before the $\mu\text{LC-MS/MS}$ injection. The individual matrix effect can be seen in Table 2 and were under 20% for the most of the pesticides (92%). It was also observed that the matrix effect was negative (suppression) in the majority of the cases. In LC the negative matrix effect represents a loss of the analytical signal (ion suppression) due to alterations in the ionization efficiency [27,28]. Thus it is likely to use matrix matched calibration for the analytes that the matrix effect exceeds 20%.

3.4. Fruit jam samples analysis

As a part of this study were analyzed 51 samples of apricot, grape, peach, pineapple and strawberry jams belonging to eight different brands from Brazil and from Spain. To ensure the veracity

of the results, even when the detected pesticides fulfilled the prerequisites of the correct retention time and ion ratio in comparison with the standards in matrix, the positive samples with pesticides at concentrations $\geq 20 \mu\text{g kg}^{-1}$ were re-analyzed by LC-QqQ-MS/MS, GC-QqQ-MS/MS and/or LC-Orbitrap-MS/MS in order to confirm the results (pesticide and concentrations) and when the detected pesticides did not fulfill all prerequisites in both systems they were not reported as positives.

As can be seen at Table 3, 80% of the samples were positive for at least one pesticide and in total were detected 42 pesticides. The most contaminated samples were the strawberry jam samples. In all the strawberry jam samples from Brazil was found difenoconazole (at concentrations up to $64 \mu\text{g kg}^{-1}$), procimidone (conc. up to $1575 \mu\text{g kg}^{-1}$) and thiophanate-methyl (conc. up to $959 \mu\text{g kg}^{-1}$). In almost all these samples was also detected azoxystrobin (conc. from 10 to $151 \mu\text{g kg}^{-1}$), carbendazim (conc. from 20 to $221 \mu\text{g kg}^{-1}$), fenpyroximate (conc. up to $18 \mu\text{g kg}^{-1}$), imidacloprid (conc. from 10 to $67 \mu\text{g kg}^{-1}$), iprodione (conc. up to $654 \mu\text{g kg}^{-1}$) and pyrimethanil (conc. up to $202 \mu\text{g kg}^{-1}$). In the strawberry jams from Spain, penconazole and spinosyn A were the top detected analytes, but at concentrations lower than the RL and azoxystrobin was found at the highest concentration $33 \mu\text{g kg}^{-1}$ in one sample.

In grape jams from Brazil, pyrimethanil was detected most frequently and it was also the one detected at the highest concentration ($81 \mu\text{g kg}^{-1}$). In pineapple jam, also samples from

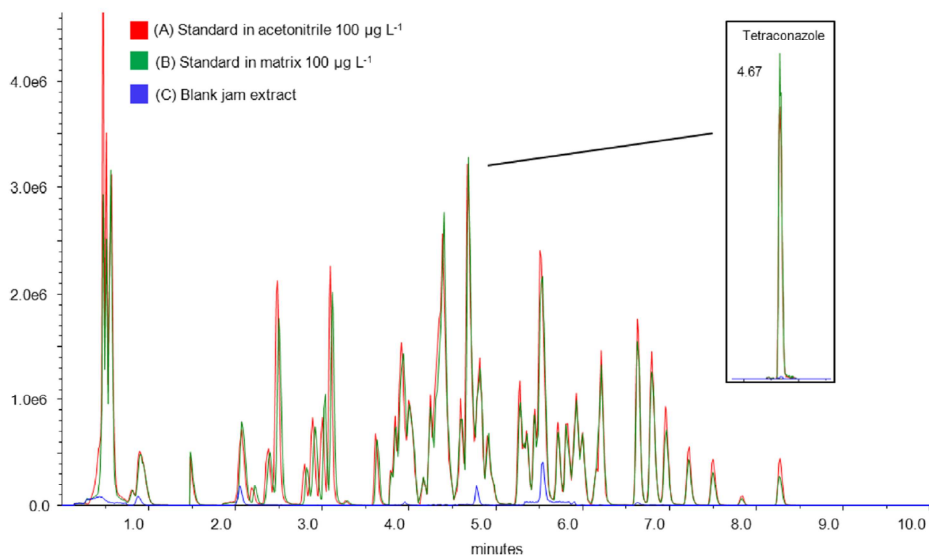


Fig. 1. Total ion chromatograms obtained by analysis via μ LC–MS/MS of (A) standard pesticide mixture solution in acetonitrile at $100 \mu\text{g L}^{-1}$, (B) standard pesticide mixture solution in blank grape jam extract at $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ($150 \mu\text{g kg}^{-1}$) and (C) blank grape jam extract, showing the small matrix effect (suppression) of the jam grape extract.

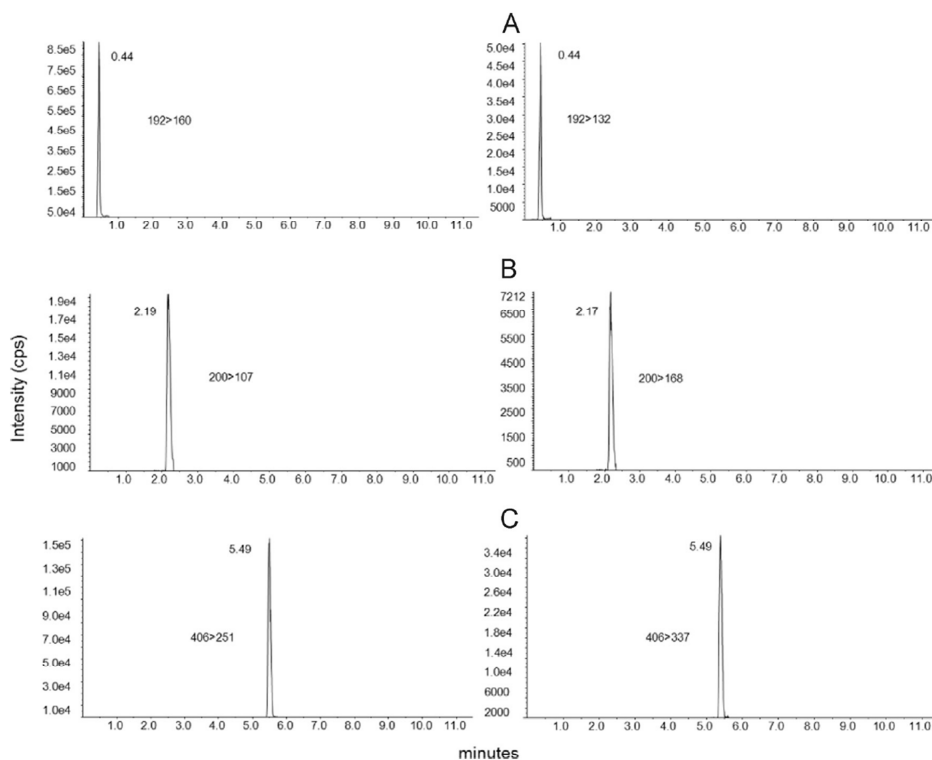


Fig. 2. SRM transitions of positive samples obtained by analysis via μ LC–MS/MS for carbendazim at $221 \mu\text{g kg}^{-1}$ in (A) strawberry jam sample, (B) pyrimethanil at $62 \mu\text{g kg}^{-1}$ in a grape jam sample and (C) difenoconazole at $64 \mu\text{g kg}^{-1}$ in a strawberry jam sample.

Brazil, carbendazim was found more frequently and at the highest concentration ($32 \mu\text{g kg}^{-1}$).

The peach and apricot jams (from Spain) presented less pesticide residues when compared to the other samples. Apricot

jam presented most frequently imidacloprid at low concentrations from 9 to $11 \mu\text{g kg}^{-1}$ and myclobutanil (conc. 12 and $13 \mu\text{g kg}^{-1}$). In peach jam was detected more frequently chlorpyrifos but at concentrations lower than the RL.

Table 3

Pesticides more frequently detected in the fruit jams, percentage of positive samples (where at least one pesticide was detected) and samples with pesticides at concentrations $\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ according to fruit jam and country of origin.

Pesticide	Positive samples (%)						Total (n=51)
	Strawberry jam		Grape jam	Pineapple jam	Peach jam	Apricot jam	
	Brazil (n=12)	Spain (n=5)	Brazil (n=12)	Brazil (n=10)	Spain (n=8)	Spain (n=4)	
Carbendazim	75	0	25	30	13	0	31
Difenoconazole	100	0	8	0	13	0	27
Imidacloprid	50	40	25	0	0	75	27
Pyrimethanil	75	0	33	0	0	0	25
Fenprothion	75	60	0	0	0	0	24
Procimidone	100	0	0	0	0	0	24
Thiophanate-methyl	100	0	0	0	0	0	24
Iprodione	75	0	8	0	0	0	20
Tebuconazole	42	0	8	10	13	25	18
Azoxystrobin	58	20	0	0	0	0	16
Fenhexamid	25	20	17	20	0	0	16
Metalaxyl	50	0	8	0	0	0	14
Spinosyn A	25	80	0	0	0	0	14
Penconazole	0	80	0	20	0	0	12
Chlorpyrifos	17	0	0	0	25	0	8
Kresoxim-methyl	33	0	0	0	0	0	8
Myclobutanil	0	40	0	0	0	50	8
Boscalid	8	40	0	0	0	0	6
Propargite	25	0	0	0	0	0	6
Thiametoxam	25	0	0	0	0	0	6
Total	100	100	67	70	75	75	80
$\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	100	60	42	20	13	75	51

As the fruit jam can be prepared according to different industrial procedures, differing in to amount of fruits (g of fruit/g of jam), water, sugar as well as different cooking times and ways and presence or absence of additives, it is difficult to know exactly the influence of each factor on the pesticide residue concentration in the final fruit jam. But it is clearly evident that the pesticides, independent from where they come from e.g. fruits, water or sugar, remain present in the final fruit jam and contribute for the pesticide daily intake of human beings inferring that these products should be controlled for pesticides residues.

Either in Brazil and in the EU there are no MRL established for this type of commodities, but as the presence of pesticides was demonstrated by this study the need of control the occurrence of residues in these products should be considered.

4. Conclusions

In this study a very sensitive $\mu\text{LC-MS/MS}$ multi-residue method was developed and validated for the determination of 99 pesticides in fruit jams. To minimize the matrix effect (or matrix interference) and increase the selectivity of the method, a clean-up and a dilution step were applied to the fruit jam extracts, before $\mu\text{LC-MS/MS}$ analysis. The method presented good accuracy (recoveries%) and precision (RSD%) for 92% of the pesticides studied. Furthermore, the method had also a wide linear range (from 9 to $600 \mu\text{g kg}^{-1}$), good linearity ($r^2 \geq 0.99$) and low RL ($9 \mu\text{g kg}^{-1}$) for the majority of the analytes evaluated. Fifty-one jam samples of apricot, grape, peach, pineapple and strawberry (from Brazil and from Spain) were analyzed in order to evaluate the presence of pesticide residues. In total 80% of the samples were positive for at least one pesticide. The most contaminated samples of this study were the strawberry jams with 100% of positive samples and among them, the samples from Brazil were the ones with the largest number of detected pesticides and with the highest concentrations, e.g. procimidone at $1575 \mu\text{g kg}^{-1}$ in

one sample. The pesticide more frequently detected was carbendazim, present in 31% of the samples.

According to the results presented in this study, is clearly evident the occurrence of pesticide residues in fruit jams. Thus the control of pesticide residues in these food commodities should be applied because certainly fruit jams contribute for pesticide daily intake of human beings.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the EU Reference Laboratory for Fruits and Vegetables for the instrumental and technical support. B. Reichert was supported by a scholarship from the CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil (Process 14234-13-0).

References

- [1] N. Touati, M.P. Tarazona-Díaz, E. Aguayo, H. Louaileche, *Food Chem.* 145 (2014) 23–27.
- [2] FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Food Sugar Preserves Technology: Jams, Jellies, Marmalade, Fruit Paste (<http://www.fao.org/docrep/v5030e/v5030e0m.htm>) (accessed 24.10.14).
- [3] European Commission, DG-SANCO, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, No. SANCO/12571/2013, 2014.
- [4] V.C. Fernandes, V.F. Domingues, N. Mateus, C. Delerue-Matos, *Food Addit. Contam.* 29 (2012) 1074–1084.
- [5] EU (European Commission), Pesticides—EU Rules, 2014 (http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/index_en.htm) (accessed 30.10.14).
- [6] A.N.O. Jardim, E.D. Caldas, *Food Control* 25 (2012) 607–616.
- [7] A. Nougadère, M. Merlo, F. Héraud, J. Rêty, E. Truchot, G. Vial, J.P. Cravedi, J.C. Leblanc, *Food Control* 41 (2014) 32–48.
- [8] ANVISA (Brazilian Sanitary Surveillance Agency), Agrotóxicos e Toxicologia, Legislação, 2011 (<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicocototoxicologia/>) (accessed 24.06.14).
- [9] MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supplies), Análise de Resíduos e Contaminantes em Alimentos, 2011, ([www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/An%C3%A1lise%20de%20Res%C3%ADduos%20e%20Contaminantes%20em%20Alimentos\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/An%C3%A1lise%20de%20Res%C3%ADduos%20e%20Contaminantes%20em%20Alimentos(1).pdf)) (accessed 27.06.14).
- [10] S.J. Hird, B.P.-Y. Lau, R. Schuhmacher, R. Krška, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 59 (2014) 59–72.

- [11] J. Henion, *J. Chromatogr. Library* (1984) 260–300.
- [12] D. Guillaume, S. Rudaz, C. Schelling, M. Dreux, J.-L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* 1192 (2008) 103–112.
- [13] A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, *Biomed. Chromatogr.* 27 (2013) 1225–1233.
- [14] J.R.C. Vissers, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 1–28.
- [15] K. Murata, N. Mano, N. Asakawa, *J. Chromatogr. A* 1106 (2006) 146–151.
- [16] E.J. Sneekes, L. Rieux, R. Swart, *Miniaturization of Liquid Chromatography: Why Do We Do It?* Thermo Fisher Scientific, 2013 (<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/114984-WP-RSLCnano-WP70817.pdf>) (accessed 26.06.14).
- [17] J. Qu, Y. Qu, R.M. Straubinger, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3786–3793.
- [18] A. Cappiello, G. Famiglioni, A. Berloni, *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 215–222.
- [19] C. Lesueur, P. Knittel, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Food Control* 19 (2008) 906–914.
- [20] A. Lozano, Ł. Rajska, N. Belmonte-Valles, A. Uclés, S. Ucles, M. Mezcuca, A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 1268 (2012) 109–122.
- [21] C. Ferrer, A. Lozano, A. Agüera, A.J. Girón, A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7634–7639.
- [22] H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1474–1482.
- [23] A. Koiuss, A. Zoubodis, C. Samars, T. Kouimtzir, *Chemosphere* 30 (1995) 2307–2315.
- [24] S.K. Mocolini, I.C. Vieira, F. de Lima, B.G. Lucca, A.M.J. Barbosa, V.S. Ferreira, *Talanta* 82 (2010) 164–170.
- [25] K. Patel, R.J. Fussell, M. Hetmanski, D.M. Goodall, B.J. Keely, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 289–296.
- [26] I.R. Pizzutti, A. de Kok, C.D. Cardoso, B. Reichert, M. de Kroon, W. Wind, L.W. Righi, R.C. da Silva, *J. Chromatogr. A* 1251 (2012) 16–26.
- [27] A. Krueve, A. Künnapas, K. Herodes, I. Leito, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 58–66.
- [28] E.T. Gangl, M. Annan, N. Spooner, P. Vouros, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5635–5644.

Manuscrito 1 - Pesticides stability study in home-made fruit jams preparation and estimation of processing factors

Bárbara Reichert, María Del Mar Gómez-Ramos, Ionara Regina Pizzutti, Ijoni Hilda Costabeber, Amadeo R. Fernández-Alba

Artigo em fase final de revisão pelos autores, a ser submetido para periódico da área da Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Pesticides Stability Study in Home-Made Fruit Jams

Preparation and Estimation of Processing Factors

Bárbara Reichert^{a,b,c}, María Del Mar Gómez-Ramos^d, Ionara Regina Pizzutti^e, Ijoni Hilda Costabeber^f, Amadeo R. Fernández-Alba^{d,*}

^aDepartment of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Roraima 1000/42, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^bCAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília-DF 70040-020, Brazil

^cCenter of Medical and Pharmaceutical Sciences, State University of West Paraná (UNIOESTE), Brazil

^dEuropean Union Reference Laboratory for Pesticide Residues in Fruit & Vegetables. University of Almeria, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3)

^eChemistry Department, UFSM, Center of Research and Analysis of Residues and Contaminants (CEPARC), Santa Maria, RS, Brazil

^fMorphology Department, UFSM, Roraima 1000/19, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +34950015034; fax: +34950015483

E-mail: address: amadeo@ual.es (A.R. Fernández-Alba)

ABSTRACT

A mixture of five pesticides, namely carbendazim, chlorpyrifos, imidacloprid, iprodione and propargite, were spiked to different types of fruits (apple, orange, peach, pear and strawberry) at the concentration of 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$, with $n=2$ for each type of fruit. Home-made jams were prepared with these samples by cooking the grinded spiked fruits with sugar and ultra-purified water (ratio, 5:5:2, m/m/m), in an open pan for 30 min. The QuEChERS extraction method was applied either to blank fruits, to the fruits spiked at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and to the home-made jams.

The acetonitrile extracts of home-made jams and fruits were analyzed by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) to ascertain the occurrence of the pesticides metabolites and to determine the number of co-extracted matrix components from the fruits and from the jams. All samples were also analyzed by micro flow liquid chromatography-triple quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry (μ LC-QTRAP-MS/MS) and the concentration of the spiked pesticides in the fruits was compared to the concentration in the home-made jams for the estimation of a processing factor for each analyte (pesticide concentration measured in the jams/pesticide concentration measured in the raw fruits).

Keywords: Home-Made Jams; Pesticides; Stability Study; Processing Factors; LC-QTOF-MS; μ LC- QTRAP-MS/MS

1. Introduction

The concerns about pesticide residues in food have increased in recent years due the fact that residues may have negative health effects. Every year many new multiresidue methods are developed for test different raw foods for pesticides. But, not so many efforts have been made to monitor pesticides and metabolites in processed foods. Cooking might alter and degrade the chemical structure of analytes. Therefore, in order to evaluate in detail the hazardous effects of pesticides on human health, cooked foodstuffs appear to be a more reasonable choice of sample [1,2].

Many studies have shown significant reductions in pesticide residues during household or industrial food processing [3,4,5,6]. However, it should be noted that

processing can concentrate residues or convert residues to more toxic metabolites in food like thermal processing [7].

Primary processed foods result from the application of physical, chemical, biological processes, or a combination of them, to raw agricultural commodities (RAC). Up to now, there has been no international agreement on setting maximum residue limits (MRL) for primary processed commodities, with the exception of some specific commodities such as spices; despite in some countries (e.g. European Union - EU member states) the common practice is to derive them from the MRL set for the RAC by applying the corresponding processing factors [8].

Pesticide metabolites and breakdown products may occur in many environmental compartments, animal feed or food for human consumption. In food analysis the most relevant metabolites and degradation products are specifically included in the definition of residue, on the basis of their toxicology and presence in significant amounts [9]. In recent year the detection and characterization of relevant pesticide metabolites in food is an important task in order to evaluate their formation, kinetics, stability, and toxicity [10].

Multiresidue method development is difficult, but as they can be applied for determinations of several pesticides of different polarities in just one chromatographic analysis, saving a lot of time, work and money they became very popular worldwide [11,12,13]. However, the main drawback associated the multiresidue methods is that they are “blind” to any compound present in the sample but not included in the list of monitored analytes. Thus, unregistered metabolites or pesticides that are not commonly applied or banned are usually not covered by such methods. The lack of comprehensive information on pesticide metabolites, and the low number of available metabolite standards also limits the applicability of such targeted methods.

Metabolite standards are readily available only for special cases when metabolites are included in the residue definition of the parent species [10,14]; the development of methods that are capable of discovering unexpected (untargeted) or unknown (e.g., pesticide derivatives and metabolites) compounds is a priority [10].

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with a triple quadrupole (TQ) analyzer is the most popular, widely used methodology for pesticide testing in foodstuffs worldwide [15,16]. Besides, in recent years, the development of new LC-MS systems with time-of-flight (TOF) analyzers has featured convenient quantitation. This technique can generate high specificity without limiting the number of simultaneously observed target compounds. The advantage of a TOF-MS analyzer for screening is the ability to examine a data file for theoretically unlimited number of pesticides (e.g., 300 compounds) with high sensitivity within one run [16,17].

The higher polarity of metabolites compared to their parent pesticides makes the combination of LC with TOF-MS one of the most appropriate techniques for their analysis, mainly from a qualitative determination. LC-TOF-MS, thanks to its intrinsic characteristics of high sensitivity in full-scan acquisition mode and elevated mass accuracy, has great potential for qualitative purposes, and it allows detection and reliable identification of a large number of metabolites in just one chromatographic run without the need for re-analysis.

LC-TOF-MS can be efficient in target analysis of pesticide metabolites. In this application, the theoretical exact masses of the target analytes are extracted from the full spectrum acquisition data to reconstruct exact-mass chromatograms, which can depict the presence of the selected pesticides and metabolites in the samples. The accurate-mass capability of TOF analyzers allows reliable confirmation of the

detected compounds identity, normally with mass errors below 5 mg kg⁻¹ in routine analysis [9,18].

The increased resolution (between 10,000 and 100,000) and high mass accuracy (relative mass error < 3 mg kg⁻¹) [10,19,20] offer the ability to perform accurate mass measurements of ions of interest, facilitating the elucidation of the elemental composition for confirmation/elucidation studies. In contrast, quantitation capabilities are yet a drawback of LC–high resolution (HR) MS instruments compared with TQ technology, at least in terms of linearity and linear dynamic range [10].

Mass accuracy is critical to identification because it limits the number of empirical formula for correct identification. The accurate-mass analysis of the protonated molecule and characteristic fragment ion(s), including characteristic isotopic signals and retention times, has enabled unambiguous identification and confirmation of around 100 pesticides in food and water at low-concentration levels, as well as a few pesticide metabolites [9,21]. Although none of the bench-top TOF systems available can reach the resolving power required according to the EU definition of HR [9,22], TOF instruments have sufficient resolution and accuracy to meet the demands of correct identification [9,23,24].

Bearing the information described above the goals of this study were: First, to investigate the effect of cooking on pesticides spiked to the fruits; Second, to compare the pesticides concentrations found in the spiked home-made jams and in the spiked fruits, to estimate processing factors; And third, to quantify and relate the co-extracted matrix components from the fruits and derived jams.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

2.1.1. Standards

The analytical-grade standards, purity higher than 98%, were acquired from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), Riedel-de Haën (Seelze, Germany), Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) and CDN Isotopes (Quebec, Canada). They were stored in a freezer at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. The standards consisted of five pesticides and four isotopically–labeled internal standards (I.S.), namely dichlorvos- d_6 , dimethoate- d_6 , linuron- d_6 and malathion- d_{10} . The individual standard stock solutions were prepared in acetonitrile at concentration of 1000 mg L^{-1} and stored in freezer at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

The metabolites standards were not purchased immediately, due the fact that their MS search parameters for the liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry system (LC-QTOF-MS) were available in the literature and because the analyses were done by HR-MS which enable analytes identification without previous injection of the standards [25,26]. Thereby, the criterion adopted was first search the metabolites in the home-made jams and then, if necessary purchase the standards to do the quantification.

2.1.2. Solvents

HPLC grade acetonitrile (99.9%) was supplied by Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Ethyl acetate, HPLC grade, was purchased from Fluka (Steinheim, Germany). HPLC grade Water Optima[®], was from Fisher Scientific (New Jersey,

USA) and from a Milli-Q-Plus ultra-pure water system from Millipore (Milford, MA, USA).

2.1.3. Reagents

Magnesium sulphate (98.0%) was purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Sodium chloride (99.0%) was obtained from J.T. Baker (Deventer, Netherlands). Formic acid, analytical grade ($\geq 96.0\%$), sodium citrate tribasic dehydrate (99.0%) and disodium hydrogencitrate sesquihydrate (99.0%) were supplied by Fluka (Steinheim, Germany). C_{18} (40 μm) was from Varian (Middelburg, The Netherlands) and Primary-Secondary Amine (PSA) Bond-Elut from Supelco (Bellefonte, USA).

2.2. Pesticide standard solutions

The individual standard stock solutions of 5 pesticides (1000 mg L^{-1}) were used to prepare a solution containing a mixture of the 5 studied compounds (carbendazim, imidacloprid, iprodione, chlorpyrifos and propargite) at 100 mg L^{-1} , in acetonitrile.

The standard mixture solution of 100 mg L^{-1} was used to spike the fruits previously to the preparation of the home-made fruit jams and to spike fruits ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$) to perform recovery studies. A second standard mixture solution of 1 mg L^{-1} was prepared by successive dilution of the previous one with acetonitrile. This second standard solution (1 mg L^{-1}) was used to spike blank home-made peach jam samples at $9 \mu\text{g kg}^{-1}$ for recovery experiments, as well to prepare calibration solutions in acetonitrile and in blank matrix extracts for the calibration curves.

2.3. Instrumentation

2.3.1. Liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry

The UHPLC instrument was equipped with an autosampler, a binary pump (Agilent 1290 Serie Infinity LC, Agilent Technologies) and a Zorbax Extend-C₁₈ column (50 mm x 2.1 mm and 1.8 μm particle size) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The injection volume was 10 μL and two mobile phases were used. The mobile phase A, consisted of acetonitrile with 0.1% formic acid and 5% ultra-pure water. Mobile phase B consisted of 0.1% formic acid in ultra-pure water (pH 3.5). The flow rate was kept at 0.3 mL min^{-1} with the elution gradient starting with 10% of A (1 min), 9 min linear gradient to 100% A (4 min) and 6 min post-run time back to the initial conditions.

The QTOF (Agilent 6550 Accurate Mass QTOF-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) system was equipped with a Dual Spray Agilent Jet Stream ion source working in the positive ESI mode with the super-heated nitrogen sheath gas temperature at 400 $^{\circ}\text{C}$ and the flow rate of 12 L min^{-1} . The ESI conditions were capillary, 4000 V; nebulizer, 40 psi; drying gas, 11 L min^{-1} ; gas temperature, 290 $^{\circ}\text{C}$; skimmer voltage, 65 V; octapole RF Peak, 750 V; fragmentor (in-source CID fragmentation), 90 V. The QTOF was operated at 4 GHz HR mode. The mass axis was calibrated using a mixture provided by the manufacturer over the range of m/z 80-120. The positive ions were calibrated using a sprayer with a reference solution as continuous calibration using the reference masses of 121.0509 and 922.0098 m/z (resolution: 38,000 \pm 500 at 922.0098 m/z). The QTOF-MS/MS was

used as a TOF-MS system working in the full-scan mode [27,28] and Agilent MassHunter Workstation Software (version B.06.00) was used for data processing.

The Table 1 shows the settings for each compound determined by LC-QTOF-MS. As already mentioned, the metabolites were not acquired immediately, therefore, their retention times are not shown.

2.3.2. Micro flow liquid chromatography- triple quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry-mass spectrometry (μ LC-QTRAP-MS/MS)

In our previous article [29,30] we described the development and validation of multi-methods for pesticides determination in fruit jams [29] and in fruits [30] using μ LC-QTRAP-MS/MS. Thereby the same methodology, equipment and conditions were used here.

2.4. Samples

Fruits samples from 5 different types were purchased from local markets of Almería (south of Spain). They consisted of 2 different samples (bought at different places) of apples, oranges, peaches, pears and strawberries. All samples were grinded individually in a Thermomix[®] homogenizer for 1 min. In the case of the peaches, oranges, pears and apples, the fruits were cut in pieces and seeds removed before the grinding. For the strawberries the stems were removed.

Next, a portion of the homogeneous sample was used to prepare the home-made fruit jams and the other portion was used to prepare the acetonitrile extract to verify the presence of pesticides (ascertain if the samples were blank or not) and spiked samples to calculate recoveries (%).

2.5. Fruits spiking procedure and the home-made jam making process

For the fruits spiking procedure the grinded and homogenized samples were weighted into a pot and spiked at the level of $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ with a standard solution (100 mg L^{-1}) containing the 5 pesticides studied.

Each individual grinded fruit sample was mixed with sugar and ultra-purified (u.p.) water at the ratio of 5:5:2, (m/m/m), respectively. Later, the content was cooked over medium heat in open pan for 30 minutes with occasional stirring. After cooking and cool down, the jams were transferred to pots and stored in freezer at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6. Slurry preparation and extraction procedure

To facilitate the samples handling and to minimize the interference of the sugar and other compounds from the matrix a slurry of the home-made fruit jams and water was prepared (1:1.5, m/m). The QuEChERS sample preparation was applied to both the home-made jams and grinded fruits according to described in our previous articles [29,30]. The Fig. 1 shows the sample preparation scheme used.

2.7. The pesticides stability study

Carbendazim, chlorpyrifos, imidacloprid, iprodione and propargite were selected for this work because they have known metabolites. The standard solution with the compounds was spiked to the grinded fruits ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$) before the cooking process to prepare the home-made jams. As described in the literature, carbendazim has as metabolite benzimidazole, chlorpyrifos can be metabolized into 3,5,6-

trichloro-2-pyridinil; imidacloprid has 2 known metabolites, imidacloprid olefin and imidacloprid-5 hidroxil, iprodione has dichloroaniline, 3,5- as metabolite and propargite can generate cyclohexanol-2-(4-tert butyl-phenoxy) [31]. Thus, the acetonitrile extracts of the home-made jams were analyzed via LC-QTOF-MS to ascertain the presence or absence of the spiked pesticides metabolites.

2.8. Determination of matrix co-extracted components

The co-extraction of certain compounds from complex matrices can cause problems with the ionization efficiency in the detection systems of the analytical instruments. Depending on the matrix, the interfering components vary greatly. The algorithm of the MassHunter Workstation Software called Molecular Feature Extractor (MFE) when used examines entire chromatograms in order to search for and group all the ions that can be logically associated with a real chromatographic peak and may represent a “feature” of a molecule. Finally, the MFE creates a compound list of all the peaks in the data file that represent real molecules [32]. The MFE algorithm of the MassHunter Workstation Software was used here to retrieve and count the matrix compounds of the fruits and home-made jams for further comparison. There were considered just the components with an absolute high $\geq 10,000$ counts.

2.9. Processing factors estimation

To estimate a processing factor for each of the five pesticides in the home-made jams, the samples were analyzed via μ LC-QTRAP-MS/MS. So, the pesticide concentrations measured in the home-made jams (prepared from the fruits spiked at

500 $\mu\text{g kg}^{-1}$) were compared with the pesticide concentrations in the fruits also spiked at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (pesticide concentration found in the jams/pesticide concentration found in the raw fruits). As the fruits were purchased from local markets, they were also analyzed to ascertain if they were blanks or not. In case any fruit was not blank for some pesticide, the area of the compound in the specific sample was not considered to calculate that pesticide processing factor.

2.10. Method performance

The method was fully validated for all the groups of commodities (raw fruits and jams) and reported in previous publications [29,30], however to ensure the quality of the results on going method performance verification was done as advised by SANCO [33]. That was done by the analysis of recovery samples for the studied pesticides spiked to the grinded fruit samples at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and to peach home-made jam sample at 9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, with $n=2$ for all samples. These samples were extracted using the QuEChERS method and the acetonitrile extracts were analyzed by $\mu\text{LC-QTRAP-MS/MS}$, the pesticides areas were used to calculate recoveries (%), relative standard deviation (RSD%) and matrix effect (M.E.%).

The fruits were divided into two commodity groups [33]: Group 1 - "high water content" matrices (apple, pear and peach); and Group 2 - "high acid content and high water content" commodities (orange and strawberry). All fruits were spiked at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$, the same concentration spiked to the grinded fruits used to prepare the home-made jams. That was also the spike concentration used to calculate the pesticides processing factors. The quantification was done with matrix-matched calibration standards prepared using blank matrix extract of one representative

commodity of each group. Blank apple and orange extracts were used for the groups 1 and 2, respectively.

In contrast, the jams recovery studies were performed using just blank home-made peach jams. That was because [SANCO \[33\]](#) classifies jams as “high sugar and low water content” commodities, independently from the fruit(s) used in their preparation. Thereby, the peach jam samples were spiked at $9 \mu\text{g kg}^{-1}$, level which according to [Reichert et al. \[29\]](#) it was the reporting limit (RL) for studied pesticides in the fruit jams, except for iprodione which had the RL of $45 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Furthermore, four I.S. were used to control the extraction method, sample dilution and chromatographic injection. Diclorvos- d_6 and malation- d_{10} were used as procedure internal standards (P.I.S.) and were added to the acetonitrile ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) previously to the sample extraction procedure. Linuron- d_6 was used to verify the correct dilution (D.I.I.), therefore it was added to sample extracts ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) just before the 30-fold dilution step. To ascertain the injection of the samples into the chromatographic system, dimethoato- d_6 (I.I.S.) was added to the diluted sample vials at $1 \mu\text{g L}^{-1}$ immediately before the analysis.

3. Results and discussion

3.1. Pesticides stability study via LC-QTOF-MS

By the analysis of the acetonitrile extracts of home-made jams via HR LC-QTOF-MS, none of the 6 known metabolites was detected. Thereby, it was not really necessary to buy the metabolites standards.

In the Fig. 2 are displayed the total ion chromatograms of spiked fruits and home-made jams obtained by LC-QTOF-MS analysis, where can be seen the peaks relative to the pesticides. The absence of the metabolites indicated that the pesticides remained stable across the conditions used for the jams preparation, e.g. medium cooking temperatures for 30 min, presence of water and sugar, pH variations (according to the different fruit types), etc. The other small peaks that can be eventually noticed in the chromatograms correspond to co-extracted matrix components and/or to compounds that were not the focus in this study.

3.2. Matrix co-extracted components

The type and number of co-extracted matrix compounds and consequently the matrix effect depends on several factors as e.g. the matrix constitution, the equipment and extraction method used [34]. In LC-MS analysis, the matrix effect occurs mainly due the ionization suppression or enhancement in the ESI source because of the co-eluting matrix components [35]. When a clean-up or/and a dilution of extracts is applied before injection the matrix interferences can be reduced significantly [36]. A high amount of ions can saturate the detector and there is a high probability of overlap between the co-extracted compounds and the target pesticides. The main problem comes from compounds with similar masses to pesticides (isobaric compounds), which may lead to false positives or false negatives [32].

Here, the number of co-extracted matrix components from 5 different fruits and their jams were investigated. The Table 2 lists the number of components detected in each of the analyzed fruits, in the derived jams and the number of compounds that is common to both fruits and jams. From the matrices, apple and

apple jam were the ones with the smallest amount of co-extracted compounds, consequently the cleanest ones. Contrariwise, orange, both pure fruit and jam were the matrices that presented the largest number of interferences. In the Fig. 3 is possible to see that the majority of the compounds elutes in the first 10 min of analysis. Precisely, the most of the interfering are eluting in the part of the chromatogram (range of retention times) which is of major interest. Fortunately, that is not such a problem when HR-MS is used for identification and quantification of analytes. Anyway, when the identification is done by HR-MS or not the analyte retention time always have to be considered to avoid misidentifications.

3.3. *Estimation of the pesticides processing factors*

Comparing the concentrations of the pesticides in the home-made jams and in the spiked fruits, variations were observed, depending on the analyte and the fruit type used to prepare the jam. But, the average percentage of carbendazim, chlorpyrifos, imidacloprid, iprodione and propargite that was measured in the jams corresponded to, respectively, 50%, 30%, 60%, 50% and 50% of the concentration found in the spiked fruits. So, as demonstrated in the Table 3, the factors of 0.5, 0.3, 0.6, 0.5, 0.5, respectively, could be estimated for pesticides.

Two logical explanations have been found for lower concentration of the pesticides in the jams in comparison to the fruits. The first one is the dilution of the compounds, due the fact that to prepare the home-made jams the fruits (spiked at $500 \mu\text{g kg}^{-1}$) were mixed with sugar and u.p. water in the proportion of 5:5:1 (m/m/m). So, the pesticides concentration in the mixture (fruit, sugar and water), was divided by a factor of 2.4, resulting in the concentration of $208 \mu\text{g kg}^{-1}$ (before the cooking).

But, as most of the water evaporates during the cooking process, the pesticide concentration probably changed again when the cooking finished.

Dilution is compatible with factors predicted for carbendazim, iprodione, propargite (0.5) and imidacloprid (0.6). As the water evaporates during cooking, the final jam products had basically the components from the fruits and sugar, which were in equal proportions, resulting in 2-fold dilution for the pesticides.

Contrariwise, the dilution did not explain completely the processing factor of chlorpyrifos (0.3). In consequence, an additional possibility, that pesticide may be in part volatilized was raised. According to [Bonnehère et al. \[3\]](#) and [Keikotlhaile, Spanoghe & Steurbaut \[4\]](#) during cooking the pesticides can volatilize, hydrolyze and suffer thermal breakdown. It has been already demonstrated in other publications [\[3,4,37,38\]](#), high temperatures increase the volatilization of the pesticides that were investigated here. Among the studied analytes, chlorpyrifos has the highest vapour pressure, 1.34 mPa at 20 °C, compared to carbendazim, imidacloprid, iprodione and propargite, that present the vapour pressures of, respectively, 0.09, 0.0000004, 0.0005, 0.04 mPa at 20 °C [\[31\]](#). Thus, apparently chlorpyrifos was diluted (as the other compounds) and in part, volatilized in the cooking process.

3.4. Method performance verification

3.4.1. Recoveries (%), RSD (%) and matrix effect (%)

To ensure the method accuracy and the correct execution of the QuEChERS sample preparation, recovery studies were performed analysing the acetonitrile extracts of grinded fruit samples spiked at 500 µg kg⁻¹ and home-made peach jams spiked at 9 µg kg⁻¹. The results of recovery (%), RSD% and M.E. (%) for the 5 target

pesticides in each type of fruit sample and in the jam sample are shown in [Table 4](#). For the apple samples and home-made peach jam all the pesticides had average recoveries 70-120% and $RSD \leq 20\%$. Carbendazim presented recoveries $< 70\%$ in pear, peach, orange and strawberry samples but the results were consistent and the RSD were $< 20\%$. For orange and strawberry (group 2 of fruits) a possible cause is the high negative matrix effect (suppression). Imidacloprid could not be completely recovered in both strawberry samples, the recoveries were from 58 and 67% in the two samples. Iprodione exceeded the recovery limit of 120% in one of the replicates of pear and peach resulting in $RSD > 20\%$ in both fruits. Even with a high matrix suppression propargite showed satisfactory results for the group 1 of commodities, but could not be good recovered in both orange samples tested.

3.4.2. *Internal standards*

The I.S. peak areas were used to ascertain repeatability of the extraction method, dilution and chromatographic injection due to the calculation of the RSD (%). The P.I.S., Diclorvos- d_6 and malathion- d_{10} , presented an $RSD < 10\%$ calculated from 35 injections. The I.I.S., dimethoato- d_6 , also had an $RSD < 10\%$ and Linuron- d_6 the D.I.S. showed an RSD of 13%, both calculated from more than 56 injections. These data are shown in the [Fig. 4](#) which presents the graphics of the I.S. peak areas with respect to the number of injections for each standard and are highlights the variation ranges of 10% and 20% of the average areas.

4. Conclusions

By the LC-QTOF-MS analysis of the home-made jams none of the pesticides metabolites was detected. Due this fact, it was plausible to conclude that the pesticides remained stable over the jam preparation process. The MFE algorithm of the MassHunter Software was used to retrieve and count the fruit and jams co-extracted matrix components demonstrating that the matrix with the largest number of endogenous compounds is orange and consequently orange jam. Further, the analysis of the home-made jams and spiked fruits via μ LC-QTRAP-MS/MS showed that the pesticides concentration was 40 to 70% lower in the jams than in the fruits. This was mainly attributed to the dilution caused by the addition of sugar and u.p. water to the spiked fruits in the cases of carbendazim, imidacloprid, iprodione and propargite and to the dilution followed by a volatilization during cooking process, as observed for chlorpyrifos. Therefore, the processing factors of 0.5, 0.3, 0.6, 0.5 and 0.5 have been estimated for carbendazim, chlorpyrifos, imidacloprid, iprodione and propargite, respectively, in the home-made jam making process.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the EU Reference Laboratory for Fruits and Vegetables for the instrumental and technical support. Bárbara Reichert acknowledges the PhD scholarship from the CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil (Process 14234-13-0).

References

- [1] J.Y. Park, J.H. Choi, A.M.A. El-Aty, B.M. Kim, J.H. Oh, J.A. Do, K. S. Kwon, K.H. Shim, O.J. Choi, S.C. Shin, J.H. Shim, Simultaneous multiresidue analysis of 41 pesticide residues in cooked foodstuff using QuEChERS: Comparison with classical method, *Food Chem.* 128 (2011) 241–253.
- [2] L. Martin, M. Mezcua, C. Ferrer, M.D. Gil Garcia, O. Malato, A.R. Fernandez-Alba, Prediction of the processing factor for pesticides in apple juice by principal component analysis and multiple linear regression, *Food Addit. Contam.* 30 (2013) 466–476.
- [3] A. Bonnechère, V. Hanot, R. Jolie, M. Hendrickx, C. Bragard, T. Bedoret, J. Van Loco, Effect of household and industrial processing on levels of five pesticide residues and two degradation products in spinach, *Food Control* 25 (2012) 397-406.
- [4] B.M. Keikotlhaile, P. Spanoghe, W. Steurbaut, Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach, *Food and Chem. Toxicol.* 48 (2010) 1–6.
- [5] A.A.K. Abou-Arab, Behavior of pesticides in tomatoes during commercial and home preparation. *Food Chemistry* 65 (1999) 509–514.
- [6] G. Kaushik, S. Satya, S.N. Naik, Food processing a tool to pesticide residue dissipation – A review, *Food Res. In.* 42 (2009) 26–40.
- [7] Z. Huan, Z. Xu, W. Jiang, Z. Chen, J. Luo, Effect of Chinese traditional cooking on eight pesticides residue during cowpea processing, *Food Chem.* 170 (2015) 118–122.

- [8] T. Pazzirota, L. Martin, M. Mezcua, C. Ferrer, A.R. Fernandez-Alba, Processing factor for a selected group of pesticides in a wine-making process: distribution of pesticides during grape processing, *Food Addit. Contam.* 30 (2013) 1752-1760.
- [9] F. Hernández, J.V. Sancho, M. Ibáñez, S. Grimalt, Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 27 (2008) 862-872.
- [10] L. Polgár, J.F. García-Reyes, P. Fodor, A. Gyepes, M. Dernovics, L. Abrankó, B. Gilbert-López, A. Molina-Díaz, Retrospective screening of relevant pesticide metabolites in food using liquid chromatography high resolution mass spectrometry and accurate-mass databases of parent molecules and diagnostic fragment ions, *J. Chromatogr. A* 1249 (2012) 83– 91.
- [11] T.D. Nguyen, J.E. Yu, D.M. Lee, G.H. Lee, A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry, *Food Chem.* 110 (2008) 207–213.
- [12] D. Štajnbaher, L. Zupančič-Kralj, Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 185–198.
- [13] T. Pihlström, G. Blomkvist, P. Friman, U. Pagard, B.G. Österdahl, Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007)1773–1789.
- [14] A.C. Belfroid, M. van Drunen, M.A. Beek, S.M. Schrap, C.A.M. van Gestel, B. van Hattum, Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems. *SCI Total Environ.* 222 (1998) 167-183.

- [15] C. Soler, Y. Picó, Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 26 (2007) 103-115.
- [16] A.R. Fernández-Alba, J.F. García-Reyes, Large-scale multi-residue methods for pesticides and their degradation products in food by advanced LC-MS, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 27 (2008) 973-990.
- [17] J.F. García-Reyes, M.D. Hernando, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba, Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 26 (2007) 828-841.
- [18] I. Ferrer, A. Fernandez-Alba, J.A. Zweigenbaum, E.M. Thurman, Exact-mass Library for pesticides using a molecular feature database, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 3659–3668.
- [19] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, M. Mezcua, N. Ramos-Martos, A.R. Fernández-Alba, A. Molina-Díaz, Multi-residue determination of pesticides in fruit-based soft drinks by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *Talanta* 81 (2010) 1310–1321.
- [20] O. Lacina, J. Urbanova, J. Poustka, J. Hajslova, Identification/quantification of multiple pesticide residues in food plants by ultra-high-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 648–659.
- [21] I. Ferrer, E.M. Thurman, Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 24–37.

- [22] EU (European Commission), European Union Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, EU Off. J. L 221 (2002) pp. 8–36. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF> > (accessed 21.05.15).
- [23] F. Hernández, M. Ibáñez, J.V. Sancho, O.J. Pozo, Comparison of different mass spectrometry techniques combined with liquid chromatography for confirmation of pesticides in environmental water based on the use of identification points, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4349-4357.
- [24] E.M. Thurman, I. Ferrer, J.A. Zweigenbaum, High Resolution and accurate mass analysis of xenobiotics in food, *Anal. Chem.* 78 (2006) 6702-6708.
- [25] L. Alder, A. Steinborn, S. Bergelt, Suitability of an Orbitrap mass spectrometer for the screening of pesticide residues in extracts of fruits and vegetables, *J. AOAC Int.* 94 (2011) 1661–1673.
- [26] Ł. Rajski, M.M. Gómez-Ramos, A.R. Fernández-Alba, Large pesticide multiresidue screening method by liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry in full scan mode applied to fruit and vegetables, *J. Chromatogr. A* 1360 (2014) 119–127.
- [27] O. Malato, A. Lozano, M. Mezcua, A. Agüera, A.R. Fernandez-Alba, Benefits and pitfalls of the application of screening methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7615–7626.

- [28] M.M. Gómez-Ramos, A. Pérez-Parada, J.F. García-Reyes, A.R. Fernández-Alba, A. Agüera, Use of an accurate-mass database for the systematic identification of transformation products of organic contaminants in wastewater effluents, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8002–8012.
- [29] B. Reichert, I.R. Pizzutti, I.H. Costabeber, A. Uclés, S. Herrera, A.R. Fernández-Alba, Validation and application of micro flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams, *Talanta* 134 (2015) 415–424.
- [30] A. Uclés Moreno, S. Herrera López, B. Reichert, A. Lozano Fernández, M.D. Hernando Guil, A.R. Fernández-Alba, Microflow Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry-An Approach to Significantly Increase Sensitivity, Decrease Matrix Effects, and Reduce Organic Solvent Usage in Pesticide Residue Analysis, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1018–1025.
- [31] EURL (European Union Reference Laboratories for Residues of Pesticides), DataPool, 2013, <<http://www.eurl-pesticides-datapool.eu/>> (accessed 19.05.2015).
- [32] M.M. Gómez-Ramos, C. Ferrer, O. Malato, A. Agüera, A.R. Fernandez-Alba, Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: Screening and quantitative studies, *J. Chromatogr. A* 1287 (2013) 24–37.
- [33] European Commission, DG-SANCO, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, No. SANCO/12571/2013, 2014.

- [34] H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder, Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed?, *Anal. Chem.* 84, (2012) 1474–1482.
- [35] A. Krueve, A. Künnapas, K. Herodes, I. Leito, Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 58–66.
- [36] C. Ferrer, A. Lozano, A. Agüera, A. Jiménez Girón, A.R. Fernández-Alba, Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7634– 7639.
- [37] O. Yarden, A. Gamliel, N. Aharonson, J. Katan, Solarization enhances dissipation of carbendazim (MBC) in soil, *Soil Biol. Biochem.* 21 (1989) 857-861.
- [38] V. Kumar, C. Sood, S. Jaggi, S.D. Ravindranath, S.P. Bhardwaj, A. Shanker, Dissipation behavior of propargite—an acaricide residues in soil, apple (*Malus pumila*) and tea (*Camellia sinensis*), *Chemosphere* 58 (2005) 837–843.

Table 1

Chromatographic parameters of the LC-ESI-QTOF-MS method.

Compound	t _R (min)	Neutral Mass	(M+H) ⁺	Description
3,5,6-Trichloro-2-pyridinil	-	196.9202	197.9275	Metabolite of chlorpyrifos
Benzimidazole	-	118.0531	119.0604	Metabolite of carbendazim
Carbendazim	0.98	191.0695	192.0768	Pesticide
Chlorpyrifos	8.95	348.9263	349.9336	Pesticide
Cyclohexanol-2-(4-Tert Butyl-Phenoxy)	-	248.1776	249.1849	Metabolite of propargite
Dichloroaniline, 3,5-	-	510.6684	511.6757	Metabolite of iprodione
Imidacloprid	3.17	255.0523	256.0596	Pesticide
Imidacloprid, Olefin	-	253.0367	254.0439	Metabolite of imidacloprid
Imidacloprid-5 hidroxi	-	271.0472	272.0545	Metabolite of imidacloprid
Iprodione	6.90	329.0334	330.0407	Pesticide
Propargite	9.27	350.1552	351.1625	Pesticide

Table 2

Number of co-extracted components from the fruits, from the home-made jams and number of components common to both.

	Number of components		
	Fruit extract	Jam extract	Common ones
Apple	3065	2840	2256
Orange	5667	4987	3978
Peach	4570	3734	3093
Pear	4237	3544	2981
Strawberry	3665	3082	2298

Table 3

Processing factors estimated for the five studied pesticides (pesticide concentration measured in the jams/pesticide concentration measured in the raw fruits).

Pesticide	Processing Factor					Average
	Apple Jam	Orange Jam	Peach Jam	Pear Jam	Strawberry Jam	
Carbendazim	0.6	0.4	0.6	0.6	0.5	0.5
Chlorpyrifos	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3
Imidacloprid	0.6	0.6	0.5	0.5	0.7	0.6
Iprodione	0.5	0.6	0.5	0.4	0.6	0.5
Propargite	0.4	0.7	0.4	0.3	0.4	0.5

Table 4

Average recoveries (%) and relative standard deviation (RSD%) calculated for the five target pesticides in the grinded fruits at the spike concentration of 500 µg kg⁻¹ (n=2) and for home-made peach jams (n=2) at the spike concentration of 9 µg kg⁻¹. Matrix effect (M.E.%) was calculated from the slopes of the calibration curves prepared in blank matrix extracts of one representative commodity of each group of samples (matrix-matched calibration standards) and in acetonitrile. Data were acquired by µLC-QTRAP-MS/MS analysis.

Pesticide	Fruits - Group 1							Fruits - Group 2					Jam		
	Apple		Pear		Peach		ME ^a (%)	Orange		Strawberry		ME ^b (%)	Peach Jam		ME (%)
	Average Recovery (%)	RSD (%)	Average Recovery (%)	RSD (%)	Average Recovery (%)	RSD (%)		Average Recovery (%)	RSD (%)	Average Recovery (%)	RSD (%)		Average Recovery (%)	RSD (%)	
Carbendazim	78	1	69	13	60	2	-2	64	3	67	16	-21	86	3	-31
Chlorpyrifos	95	1	93	6	84	9	-11	70	19	90	6	-10	94	8	6
Imidacloprid	88	1	84	2	81	14	-7	77	13	63	10	-2	102	1	-20
Iprodione	92	1	108	29	117	30	1	87	1	78	7	-2	91	6	48
Propargite	81	4	92	3	81	9	-26	58	19	74	7	-12	92	2	18

^aCalibration standards were prepared in apple blank extract. ^bCalibration standards were prepared in blank orange extract.

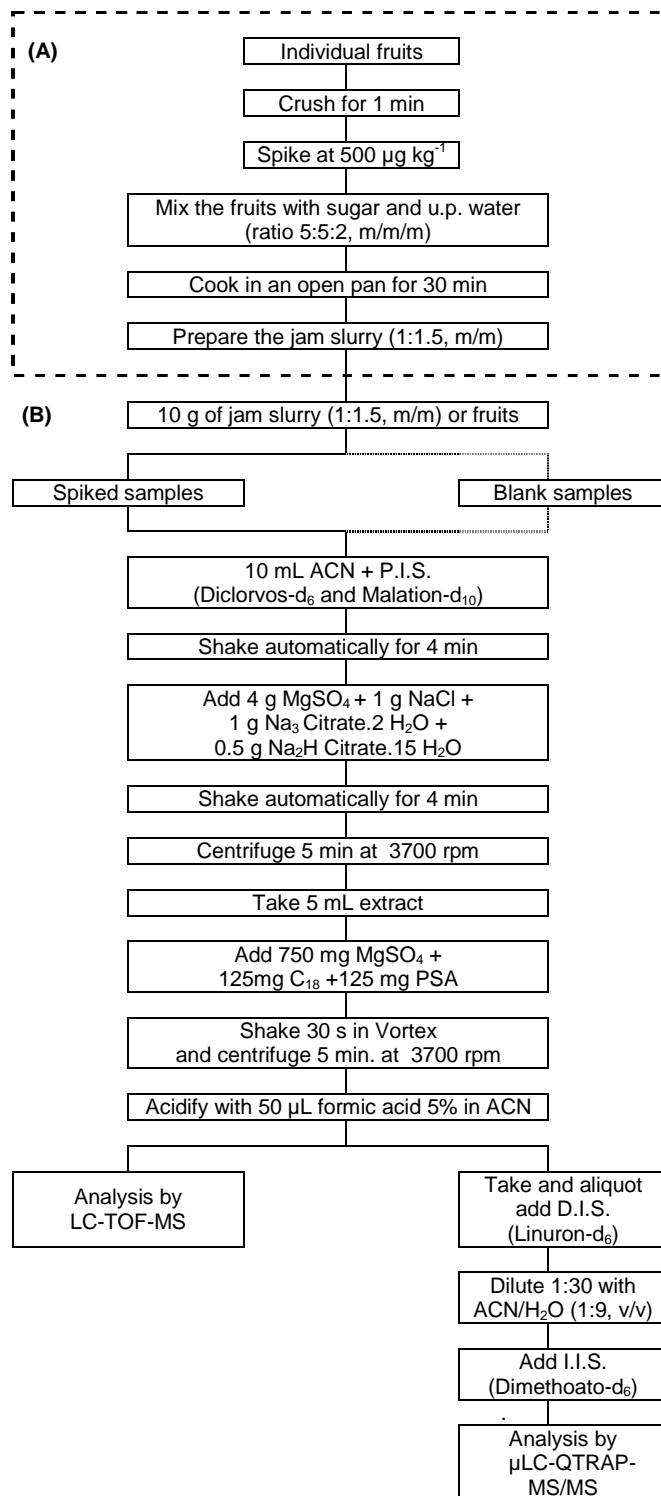


Fig. 1. Home-made fruit jams preparation scheme (A) and QuEChERS citrate extraction procedure (B).

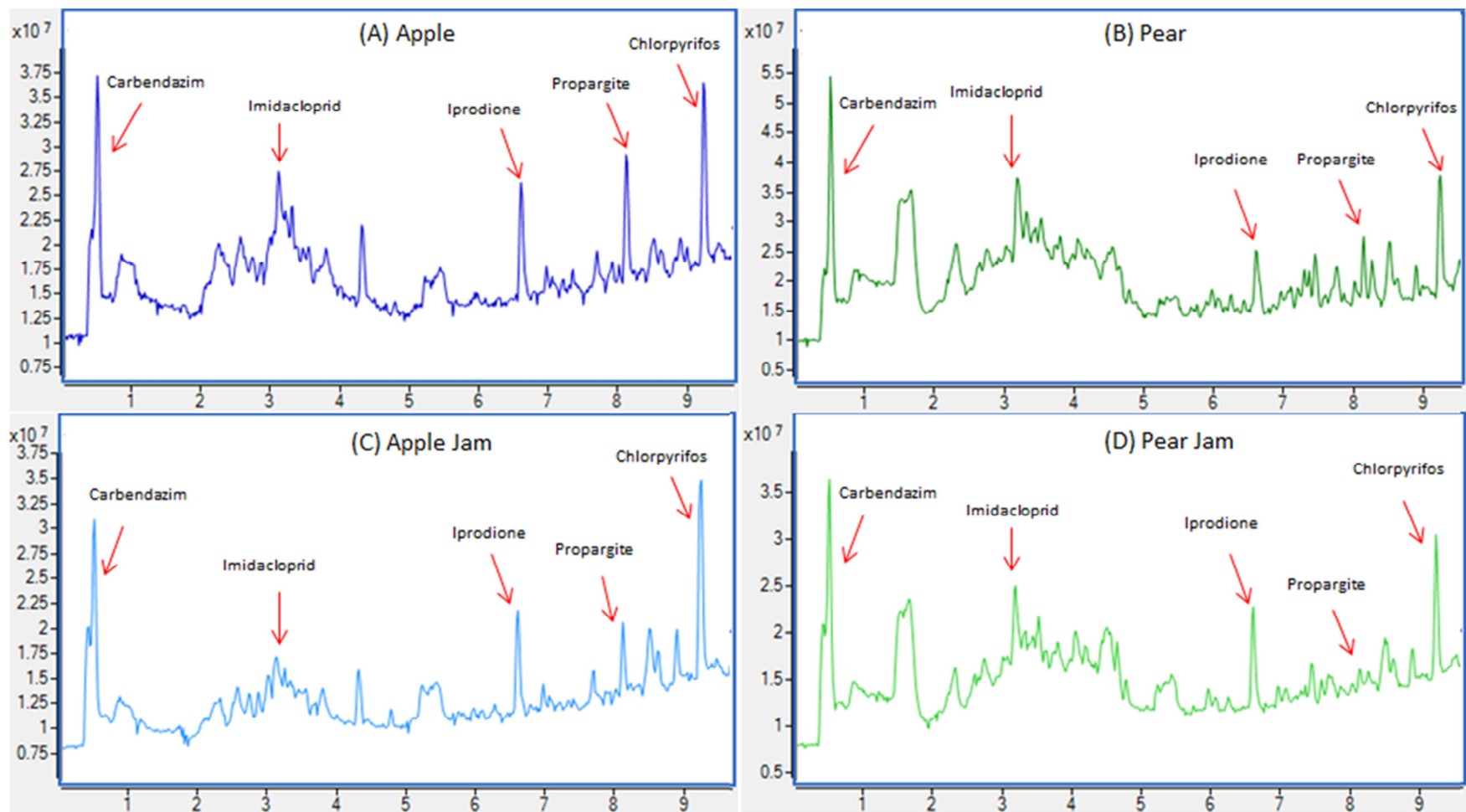


Fig. 2. Total ion chromatograms of apple, pear (spiked at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$), apple jam and pear jam (prepared from spiked fruits at 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$), obtained by LC-QTOF-MS analysis, showing the peaks of the 5 pesticides.

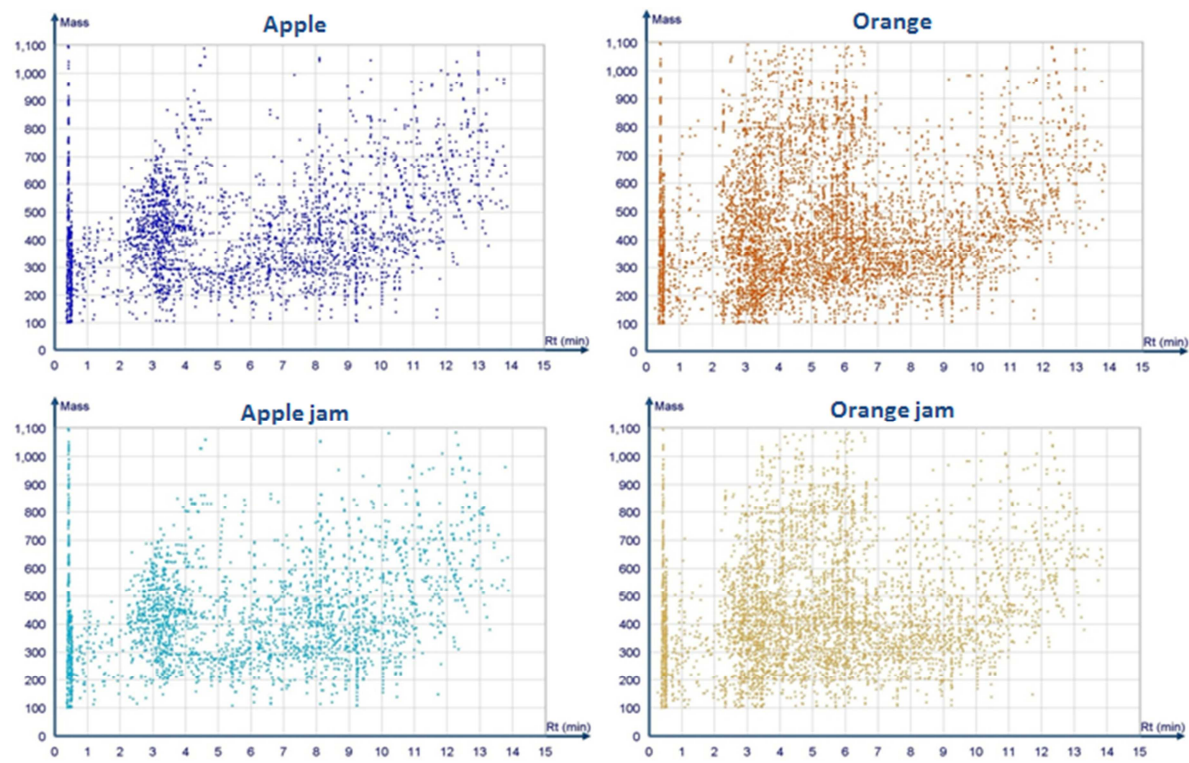


Fig. 3.

Co-extracted matrix components according to the retention times (min). Data was acquired by LC-ESI-QTOF-MS and just peaks with an absolute high $> 10^4$ are represented.

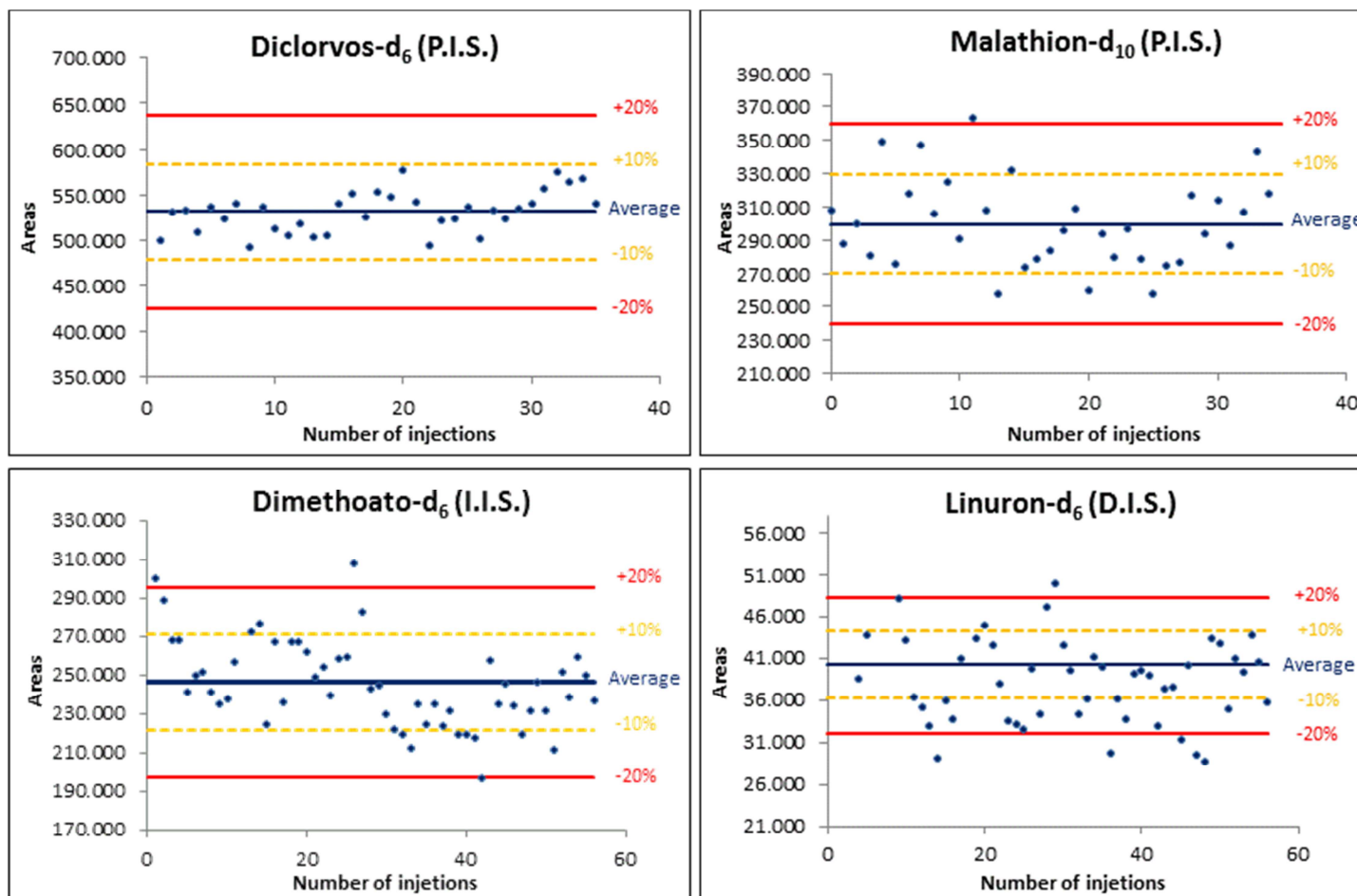


Fig. 4.

Areas repeatability of the procedure internal standards (P.I.S.), diclorvos- d_6 and malathion- d_{10} added to the acetonitrile at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ before the QuEChERS sample preparation and diluted 30-fold; injection internal standard (I.I.S.), dimethoate- d_6 added after sample dilution and before injection at $1 \mu\text{g kg}^{-1}$; and the dilution internal standard (D.I.S.) linuron- d_6 added before sample dilution at $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ and diluted 30-fold. The data were acquired by $\mu\text{LC-QTRAP-MS/MS}$.

DISCUSSÃO

A aplicação de agrotóxicos durante o cultivo de plantas, objetivando a proteção contra pragas, é uma prática costumeira em todo o mundo. Mesmo quando as GAP são respeitadas, sua aplicação oferece riscos ao meio ambiente, às plantas e aos animais.

Essa intensa e desmedida utilização de agrotóxicos tem causado muitas preocupações com o consumo de alimentos contaminados. Inicialmente, focava-se no monitoramento de resíduos em alimentos de origem vegetal *in natura*. Porém, com a informação de que muitos contaminantes são estáveis, persistentes e que se acumulam na cadeia alimentar, a preocupação com a contaminação se estendeu aos alimentos processados e alimentos de origem animal, como por exemplo, o mel e o leite (MOHR et al., 2013; GRANELLA et al., 2013).

Os doces de frutas são consumidos mundialmente devido a suas propriedades organolépticas agradáveis e seu longo tempo de prateleira (MOHD NAEEM et al., 2015; TOUATI et al., 2014). A ausência de LMR para essas *commodities* facilita o uso indevido de frutas e vegetais com elevados níveis de agrotóxicos na fabricação desses produtos, fato que justificou a importância deste trabalho.

Como já relatado no capítulo Materiais e Métodos, este trabalho foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, fez-se a coleta de amostras em Santa Maria no BR, estudos preliminares de preparo do *slurry* dos doces de frutas em pasta e a seleção da proporção adequada de *slurry*. Dessa forma, a decisão da proporção de *slurry* a ser utilizada nos estudos posteriores foi tomada tendo-se em vista a aparência homogênea de amostras, a facilidade de manipulação no momento da pesagem e resultados de ensaios de exatidão e precisão.

Dentre as proporções de *slurry* avaliadas, o razão 1:2 foi considerado inadequado imediatamente após o preparo por ser muito fluido. As outras proporções de *slurry* foram avaliadas com base nos resultados de recuperação (%) e RSD (%) obtidos por análise via GC-IT-MS. Assim, conforme pode ser visto na Tabela 3 e na Figura 4, optou-se por utilizar o *slurry* 1:1,5, por ter recuperações (%) e RSD % satisfatórios e o menor número de agrotóxicos não detectados (n.d.).

Tabela 3 – Recuperações (%), RSD (%) para os agrotóxicos avaliados para amostras de doce de uva sem *slurry*, com *slurry* 1:1,25 e com *slurry* 1:1,5 por GC-IT-MS.

Agrotóxicos	Concentração de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	20				30	
	Sem <i>slurry</i>		<i>Slurry</i> 1:1,25		<i>Slurry</i> 1:1,5	
	Recuperação média (%)	RSD (%)	Recuperação média (%)	RSD (%)	Recuperação média (%)	RSD (%)
Aldrin	83	7	93	10	92	11
Azoxistrobina	n.d.	n.d.	94	28	147	16
Clorpirifós-etílico	95	7	76	5	96	4
Clorpirifós-metílico	92	10	80	4	98	7
Clorprofam	85	5	80	8	99	7
DDD-2,4	91	7	75	5	96	7
DDD-4,4	87	13	71	4	97	7
DDE-2,4	93	7	78	12	87	17
DDE-4,4	90	6	73	7	95	6
DDT-2,4	91	12	91	15	128	14
DDT-4,4	82	31	84	19	155	18
Diazinona	88	10	79	4	98	8
Diclorana	89	9	77	14	109	8
Dicofol	80	12	98	13	88	20
Dieldrin	104	10	97	27	101	12
Endossulfam-alfa	100	32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Endossulfam-beta	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	118	16
Endossulfam-sulfato	76	71	n.d.	n.d.	75	13
Endrin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	115	7
EPN	83	21	70	4	110	3
Fentoato	76	16	75	7	109	8
Fludioxonil	66	22	72	3	98	5
Fosalona	85	41	74	7	129	9
HCH-alfa	90	6	72	6	96	6
HCH-beta	86	13	77	11	73	20
HCH-gama (Lindano)	86	7	73	4	100	8
Heptacloro	86	12	59	12	99	5
Heptacloro-epóxido	113	17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hexaclorobenzeno	89	9	n.d.	n.d.	100	4
Metoxicloro	87	28	77	15	148	15
Pirazofós	n.d.	n.d.	76	11	111	13
Pirimifós-metílico	91	5	82	4	98	6
Profam	86	11	76	5	100	3
Prometrina	81	17	72	6	98	3
Propargito	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quinalfós	89	17	78	5	108	8
Quinoxifeno	81	15	78	5	104	5
Quintozeno	86	11	n.d.	n.d.	88	15
Tequinazeno	89	6	n.d.	n.d.	94	6
Tetradifona	88	5	79	9	101	5
Tetrametrina	89	24	77	2	102	4

n.d.: não detectado.

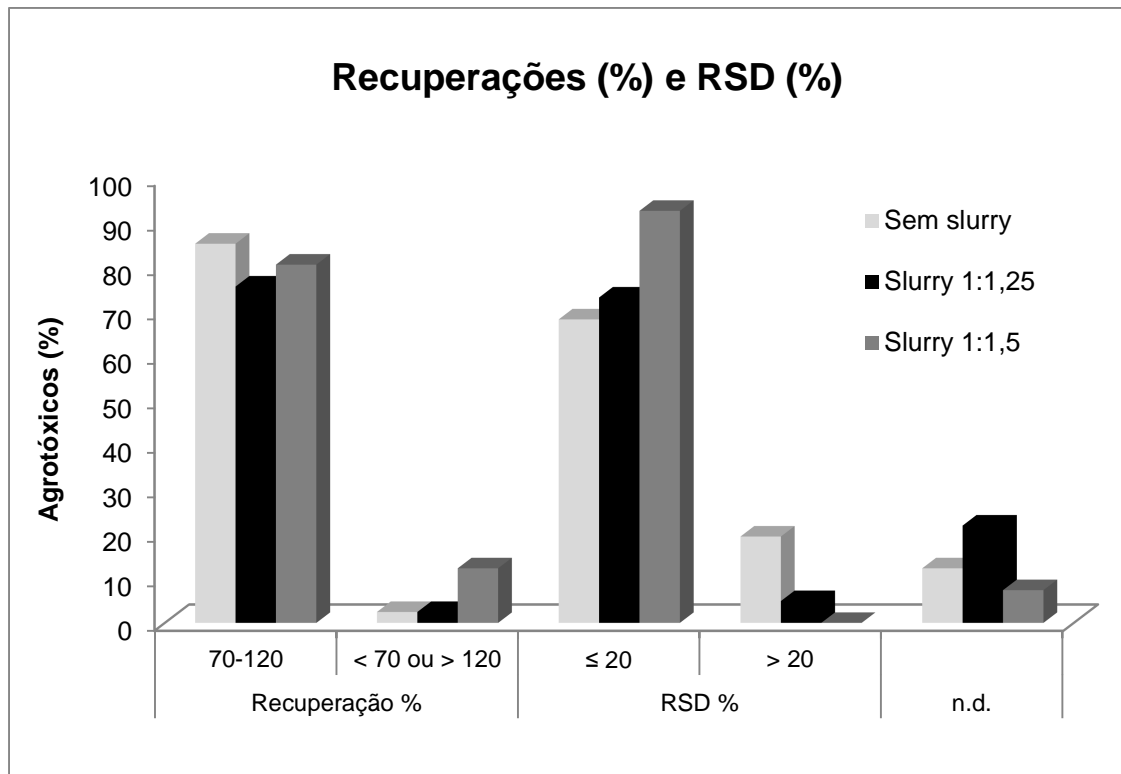


Figura 4 – Porcentagem de agrotóxicos com recuperações (%) e RSD (%) satisfatórios e agrotóxicos n.d. em amostras sem *slurry*, com *slurry* 1:1,25 (fortificados a $20 \mu\text{g kg}^{-1}$) e com *slurry* 1:1,5 (fortificado a $30 \mu\text{g kg}^{-1}$). Total de 41 compostos determinados por GC-IT-MS.

O preparo das amostras foi feito com o método QuEChERS modificado, esse método é muito utilizado atualmente para análises multirresiduais de agrotóxicos, pois tem muitas vantagens, entre elas, a de ser efetivo na extração dos compostos de baixa, média e alta polaridade em vários tipos de matrizes, a de fornecer recuperações (%) adequadas para a maioria dos agrotóxicos (entre 70 e 120%) e permitir que os extratos de acetonitrila sejam injetados diretamente em equipamentos de GC e LC, sem que seja necessária a troca do solvente (HERRERO MARTÍN et al., 2010).

A validação do método analítico e o monitoramento de resíduos nas amostras foram feitos com um $\mu\text{LC-QTRAP-MS/MS}$. Esses tipos de instrumentos são equipados com μ -colunas de diâmetro interno de 0,5 a 1 mm, usam vazões de FM $\leq 40 \mu\text{L min}^{-1}$ e apresentam uma série de vantagens como a redução da quantidade de amostra necessária, FM e fase estacionária (FE), maior facilidade de

acoplamento com MS em virtude da menor vazão de FM. Isso resulta numa redução de custos e em maior sensibilidade de massa pela menor diluição da banda cromatográfica durante a análise (GUILLARME et al., 2008; TAKEUCHI, 2004). Devido à elevada detectabilidade, precisão e exatidão do μ LC-QTRAP-MS/MS foi possível validar o RL de $9 \mu\text{g kg}^{-1}$ para 71 dos 107 analitos avaliados. As Tabelas usadas no preparo das soluções de calibração para a avaliação da linearidade das curvas analíticas (em solvente orgânico e em matriz) e para avaliação da exatidão e da precisão podem ser vistas nos Apêndices B e C, respectivamente.

Apesar das vantagens, as μ -colunas também apresentam alguns problemas, como a maior sensibilidade aos interferentes co-extraídos da matriz quando comparadas as colunas de LC convencionais e a introdução de grandes quantidades de amostra pode danificar ou entupir os μ -poros da coluna.

Dessa forma, com o objetivo de preservar o μ LC-QTRAP-MS/MS e eliminar o efeito matriz das amostras os extratos de QuEChERS foram diluídos antes da injeção no equipamento. Apesar da diluição ser um passo extra no preparo das amostras, o que demanda tempo, ela foi vantajosa por reduzir o efeito matriz e aumentar a durabilidade da coluna cromatográfica.

A diluição dos extratos foi na proporção de 1:30 (v/v), com uma mistura de acetonitrila/água (1:9, v/v), pois em estudos prévios constatou-se que essa é uma proporção adequada para reduzir o efeito matriz e manter o sinal cromatográfico dos agrotóxicos a uma boa intensidade (FERRER et al., 2011; STAHNKE, et al., 2012; UCLÉS MORENO et al., 2015). Assim, após a diluição, o extrato final possuía apenas 0,022 g de matriz por mL de extrato e o efeito matriz foi menor 20% para 90 analitos (84%).

Com relação ao monitoramento de resíduos nas 51 amostras, descrito no Artigo 1, 41 (80%) foram positivas. Sendo que as amostras com maior número de agrotóxicos e em concentrações mais elevadas foram os doces de morango provenientes do BR, conforme pode ser visto na Tabela 3 do Artigo 1.

Como doces de frutas em pasta são alimentos processados, nem o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) e nem a Comissão Europeia (EC) estabelecem LMR para agrotóxicos nessas *commodities*, existem somente LMR para as frutas utilizadas no preparo dos doces (MAPA, 2012; EU, 2015).

Dessa forma, conforme pode ser visto na Tabela 4, nas amostras originárias do BR, foram detectados nos doces de abacaxi, carbendazim, dimetoato, fenhexamida e penconazol, entre outros, sendo os 2 primeiros não autorizados para a cultura (NPC) e os 2 últimos são produtos ainda não autorizados no BR (NA). Os doces de morango foram positivos para: acefato, acetamiprido, boscalida, carbaril, carbendazim, carbofurano, clorpirifós, imidacloprido, kresoxim-metílico, metalaxil, profenofós, propiconazol e piraclostrobina que são agrotóxicos NPC, fenhexamida e spinosin A que são NA, fenpiroximato e tiofanato-metílico estavam presentes em concentrações acima do LMR para morango. Nos doces de uva detectou-se: carbendazim e mandipropamida que são NPC e fenhexamida que é NA. Esses resultados sugerem que muitas das frutas utilizadas no preparo dos doces não estavam de acordo com os LMR estabelecidos pelo MAPA.

Nas amostras da ES, nenhum dos agrotóxicos determinados é de uso proibido, não permitido e/ou estava em concentrações acima do LMR para as frutas utilizadas no preparo dos produtos processados. Isso reflete a maior adequação dos produtores rurais desse país às GAP.

Com relação a esses dados, ainda pode-se afirmar que provavelmente as concentrações dos agrotóxicos nas frutas *in natura* eram superiores aos níveis mensurados nos doces delas derivados. Pois, conforme demonstrado no Manuscrito 1, os agrotóxicos fortificados às frutas foram diluídos no preparo dos doces de frutas caseiros.

Portanto, no Artigo 1 provou-se a importância de se estabelecer LMR para produtos processados derivados de frutas e de vegetais e a necessidade de se realizar o monitoramento de resíduos de agrotóxicos nesses alimentos antes de serem disponibilizados ao mercado de consumidores.

Tabela 4 – Relação de agrotóxicos detectados nas amostras e concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$), conforme o tipo de doce de fruta e país de origem e LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para as frutas utilizadas na produção dos doces.

Agrotóxicos detectados	Faixa de concentrações em $\mu\text{g kg}^{-1}$ (número de amostras positivas)						LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	Amostras do Brasil			Amostras da Espanha			MAPA (2012)			EC (2015)		
	Doce de abacaxi (n=10)	Doce de morango (n=12)	Doce de uva (n=12)	Doce de damasco (n=4)	Doce de morango (n=5)	Doce de pêsego (n=8)	Abacaxi	Morango	Uva	Damasco	Morango	Pêssego
Acefato		239 (1)					NPC	NPC	NPC	10	10	10
Acetamiprido		d. (1)		d. (1)			NPC	NPC	NPC	800	500	700
Azoxistrobina		10 a 151 (7)			33 (1)		NPC	300	500	2000	10000	2000
Boscalida		d. (1)			d. (2)		NPC	NPC	3000	3000	10000	3000
Bupirinato					9 e 11 (2)		NA	NA	NA	200	1000	200
Carbaril	d. (1)	d. (1)					500	NPC	NPC	10	10	10
Carbendazim	d. a 32 (3)	20 a 221 (9)	d. a 21 (3)			13 (1)	NPC	NPC	NPC	200	100	200
Carbofurano		d. (1)					NPC	NPC	NPC	10	10	10
Clorpirifós		d. (2)				d. (2)	NPC	NPC	NPC	50	200	200
Ciprodinil					d. (1)	d. (1)	NPC	NPC	NPC	2000	5000	2000
Difenoconazol		d. a 64 (12)	d. (1)			d. (1)	NPC	500	200	500	400	500
Dimetoato	d. (1)						NPC	NPC	NPC	20	20	20
Etirimol					d. (1)		NA	NA	NA	50	200	50
Fenbuconazol						9 (1)	NA	NA	NA	1000	50	500
Fenhexamida	d. (2)	d. (3)	d. (2)		d. (1)		NA	NA	NA	5000	5000	5000
Fenpropatrina						9 (1)	NPC	2000	NPC	10	2000	10
Fenpiroximato		d. a 18 (9)			d. a 9 (3)		NPC	10	NPC	300	1000	300
Flutriafol					d. (2)		NPC	NPC	NPC	50	500	50
Flusilazole				d. (1)			NA	NA	NA	10	20	200
Imidacloprido		10 a 67 (6)	9 a 10 (3)	9 a 11 (3)	10 e 10 (2)		50	NPC	1000	500	500	500
Iprodiona		d. a 654 (9)	75 (1)				NPC	2000	1000	3000	15000	3000
Kresoxim-metílico		13 a 49 (4)					NPC	NPC	500	50	1000	50
Malationa		d. (1)					NPC	1000	NPC	20	20	20
Mandipropamida			d. (1)				NPC	NPC	NPC	10	10	10

Tabela 4 – Continuação.

Agrotóxicos detectados	Faixa de concentrações em $\mu\text{g kg}^{-1}$ (número de amostras positivas)						LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	Amostras do Brasil			Amostras da Espanha			MAPA (2012)			EC (2015)		
	Doce de abacaxi (n=10)	Doce de morango (n=12)	Doce de uva (n=12)	Doce de damasco (n=4)	Doce de morango (n=5)	Doce de pêsego (n=8)	Abacaxi	Morango	Uva	Damasco	Morango	Pêssego
Metalaxil		d. (6)	d. (1)				NPC	NPC	1000	50	500	50
Metconazol			d. (1)				NPC	100	1000	100	20	100
Miclobutanil				12 e 13 (2)	d. e 14 (2)		NPC	NPC	500	300	1000	500
Penconazol	d. (1)				d.		NA	NA	NA	100	500	100
Pirimicarbe					d. (1)		NPC	NPC	NPC	2000	3000	2000
Procimidona		d. a 1575 (12)					NPC	3000	5000	10	10	10
Profenofos		d. (1)					NPC	NPC	NPC	10	10	10
Propargito		d. (3)					NPC	500	NPC	4000	10	4000
Propiconazol		d. (1)					NPC	NPC	NPC	200	50	200
Piraclostrobina		d. (1)					NPC	NPC	2000	1000	1500	300
Pirimetanil		d. a 202 (9)	d. a 81 (4)				NPC	1000	5000	10000	5000	10000
Quinoxifeno					d. (1)		NA	NA	NA	50	300	50
Spinosin A		d. (3)			d. (4)		NA	NA	NA	1000	300	1000
Tebuconazol	d.	d. a 34 (5)	16 (1)	d. (1)		d. (1)	100	100	2000	600	50	1000
Tebufenpirade					d. (2)		NA	NA	NA	500	500	300
Tiametoxam		d. a 12 (3)					20	100	20	300	500	300
Tiofanato-metílico		d. a 959 (12)					500	500	700	2000	100	2000
Trifloxistrobina					d. (2)		NPC	NPC	NPC	1000	500	1000
Total de amostras positivas	7	12	8	3	5	6	$\Sigma=41$					
Total de amostras negativas	3	0	4	1	0	2	$\Sigma=10$					

d.: Detectado em concentração inferior ao RL; NPC: Não autorizado para a cultura; NA: Produto ainda não autorizado no Brasil.

No Manuscrito 1, os objetivos principais foram, avaliar se os 5 agrotóxicos estudados permaneceriam estáveis no preparo dos doces de frutas caseiros ou se ocorreria a formação de seus metabólitos conhecidos; estabelecer um FP para os agrotóxicos no preparo de doces de frutas caseiros e determinar os componentes co-extraídos das matrizes.

Os agrotóxicos estudados foram selecionados considerando-se os compostos detectados com grande frequência nas amostras monitoradas no Artigo 1 e por terem metabólitos conhecidos descritos na literatura.

O carbendazim foi encontrado em 31% das amostras, o clorpirifós em 8%, o imidacloprido em 27%, a iprodiona 20% e o propargito em 6%. Esses compostos possuem como metabólitos, benzimidazol, 3,5,6-tricloro-2-piridinil, imidacloprido olefin e 5-hidroxi-imidacloprido (ambos metabólitos do imidacloprido), 3,5-dicloroanilina, 2-(4-tert butil-fenoxi)-ciclohexanol, respectivamente.

As frutas utilizadas para o estudo foram selecionadas pela sua disponibilidade em mercados fornecedores locais de Almería, ES, e pela possibilidade da aquisição em duplicatas. Com relação à concentração de fortificação das frutas, que foi de $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Apêndice D), decidiu-se pela fortificação nessa concentração porque se obteria boa detectabilidade e não seria uma concentração tão elevada a ponto de contaminar os equipamentos de cromatografia.

Depois de trituradas e fortificadas as frutas foram misturadas com açúcar e água u.p. na proporção de (5:5:2, m/m/m) (Apêndice D). O preparo dos doces foi feito dessa forma para representar uma preparação simples e caseira. Além do mais, segundo a legislação europeia, como regra geral, na manufatura de 1000 g de produto final, a quantidade de polpa e/ou puré de fruta usado não deve ser menor que 350 g, correspondendo a 35% (EC, 2001).

Após o preparo dos doces caseiros, os mesmos foram submetidos ao método QuEChERS de preparo de amostras, previamente validado e reportado no Artigo 1, para doces de frutas e para as frutas foi utilizado o procedimento validado e reportado por Uclés Moreno et al. (2015), disponível no Apêndice E. Os extratos de acetonitrila foram analisados por dois equipamentos, por LC-QTOF-MS para verificar a presença de metabólitos e por $\mu\text{LC-QTRAP-MS/MS}$ para a determinação de fatores de processamento para os agrotóxicos.

A análise via LC-QTOF-MS foi realizada operando o espectrômetro de massas no modo de alta resolução objetivando uma elevada exatidão na identificação dos metabólitos. Porém, nenhum dos metabólitos foi detectado. Esse fato, inicialmente pareceu peculiar, pois após a determinação das concentrações dos agrotóxicos, via μ LC-QTRAP-MS/MS, foi evidenciada uma concentração 40 a 70 % menor nos doces caseiros que nas frutas fortificadas, mas, pode ser explicado posteriormente pela diluição e/ou volatilização dos agrotóxicos no preparo dos doces caseiros.

Reduções na concentração de agrotóxicos em alimentos após processamento térmico já foram constatadas em outros trabalhos (ABOU-ARAB, 1999; ABOU-ARAB & ABOU DONIA, 2001; BALINOVA; MLADENOVA; SHTEREVA, 2006; YANG et al., 2012). Abou-Arab (1999), após o aquecimento de tomates, relatou reduções de 71 a 81,6% nas concentrações de agrotóxicos organofosforados e de 30,7 a 45,4% em organoclorados, e afirma que os agrotóxicos teriam sido decompostos pelo aquecimento. Bonnechère et al. (2012) verificaram que o cozimento de espinafre em forno de micro-ondas e esterilização diminui as concentrações de agrotóxicos de 50 a 80% e 50 a 100%, respectivamente. Esses autores também observaram um aumento dos níveis de 3,5-dicloroanilina (metabólito da iprodiona) e etilnotiouréia (metabólito do mancozebe) após o aquecimento. Porém, a decomposição de agrotóxicos e/ou detecção de metabólitos não foi observada neste estudo.

A primeira hipótese levantada para explicar a menor concentração dos agrotóxicos nos doces caseiros foi a diluição dos analitos devido a adição de açúcar e água u.p., demonstrado através de cálculos no Apêndice D, e compatível com os FP estimados para carbendazim, iprodiona, propargito (0,5) e imidacloprido (0,6). Mas só a diluição não explicou totalmente o FP do clorpirifós (0,3). Assim, foi levantada uma segunda hipótese, a da volatilização do clorpirifós devido ao cozimento.

A volatilização de agrotóxicos já foi objetivo de muitos estudos (BEDOS et al., 2002a; BEDOS et al., 2009; KUBIAK; MAURER; EICHHORN, 1993; LICHHEB et al., 2014). Quando utilizados na agricultura e aplicados sobre solos ou plantas, sabe-se que essas substâncias podem aparecer na água da chuva (KUBIAK; MAURER; EICHHORN, 1993). Alguns fatores que influenciam na volatilização são a pressão de vapor, hidrossolubilidade, a forma de aplicação do agrotóxico, condições climáticas,

a área superficial de aplicação, radiação solar, temperaturas elevadas, alta umidade de solos e a ventilação elevada (BEDOS et al., 2009; KUBIAK; MAURER; EICHHORN, 1993).

Em contrapartida fatores que reduzem a dissipação dos agrotóxicos de solos seriam uma grande quantidade de argila e humos, a lixiviação para camadas de solo profundas e a degradação pela ação de microrganismos (KUBIAK; MAURER; EICHHORN, 1993).

Com relação à superfície de plantas, a dissipação dos agrotóxicos seria diminuída pela presença de pelos e camada de cera na superfície da planta (KUBIAK; MAURER; EICHHORN, 1993). Porém, é mais intensa e ocorre mais rapidamente do que a dos solos (BEDOS et al., 2002b). Segundo Rüdell (1997) a volatilização da parationa metílica, endossulfam e fenpropimorfe de plantas é 5 a 13 vezes maior que a volatilização a partir do solo.

Segundo Holland et al. (1994), Balinova, Mladenova, & Shtereva (2006) e Keikotlhaile, Spanoghe & Steurbaut (2010) a volatilização dos agrotóxicos durante o processamento térmico de alimentos também ocorre. Portanto, a hipótese de que certa quantidade de clorpirifós tenha sido volatilizada durante o cozimento dos doces de frutas caseiros é aceitável.

Para o estabelecimento dos FP para os agrotóxicos na fabricação dos doces caseiros, fez-se a comparação das concentrações dos mesmos nas frutas (obtidos por ensaios de recuperação a $500 \mu\text{g kg}^{-1}$) com as concentrações detectadas nos doces (obtidos a partir de frutas fortificadas a $500 \mu\text{g kg}^{-1}$). Para garantir a exatidão na execução dos procedimentos, fez-se também ensaios de recuperações com as frutas (a $500 \mu\text{g kg}^{-1}$) e com os doces caseiros (a $9 \mu\text{g kg}^{-1}$), conforme aconselhado pela SANCO (2013). A Tabela usada para a realização das fortificações pode ser visualizada no Apêndice F. Os FP obtidos estão demonstrados na Tabela 3 do Manuscrito 1. Pela análise dos dados percebe-se que os FP variaram, dependendo do analito e da fruta usada, porém as médias estão entre 0,3 e 0,6 e o fator com maior frequência foi de 0,5.

Esses resultados são plausíveis, porque para a fabricação dos doces caseiros, as frutas foram fortificadas a $500 \mu\text{g kg}^{-1}$, a elas acrescentou-se açúcar e água u.p. em proporções de (5:5:2, m/m/m), em consequência a concentração dos agrotóxicos na mistura foi reduzida a $208 \mu\text{g kg}^{-1}$, conforme demonstrado no

Apêndice D. A água é majoritariamente evaporada durante o cozimento, e a parte restante é particionada da acetonitrila pelo uso dos sais de sódio e magnésio durante a execução do método QuEChERS modificado. Portanto, após o cozimento, a concentração dos agrotóxicos nos doces foi novamente alterada.

Compostos interferentes co-extraídos de matrizes ainda são um desafio na determinação de resíduos em alimentos. Dessa maneira, o algoritmo do *software MassHunter Workstation*, denominado *Molecular Feature Extractor* (MFE) representa um avanço na análise de matrizes complexas. Neste trabalho o MFE foi usado para verificar os cromatogramas e procurar por componentes da matriz capazes de gerar picos e fazer a quantificação do número total desses compostos em cada matriz. Além disso, O MFE é capaz de gerar gráficos que relacionam a massa dos compostos com o tempo no qual eluem, facilitando a visualização do tempo de retenção dos interferentes (Figura 3 do Manuscrito 1).

A quantificação do número de componentes co-extraídos das frutas e dos doces de frutas caseiros (Tabela 2 do Manuscrito 1) demonstrou que, para os 5 tipos de frutas investigadas, o total de interferentes co-extraídos da fruta *in natura* foi maior que para seu doce derivado, por exemplo, para o extrato de morango foram determinados 3665 interferentes e para o doce de morango esse número foi de 3082 (16% menor), destes 2298 são comuns a ambos.

Outro fato de destaque é o dos agrotóxicos carbendazim, imidacloprido e propargito, analitos que apresentaram recuperações inferiores a 70% em algumas matrizes. No caso do carbendazim, por exemplo, as recuperações foram de 60 a 69% para pera, pêssago, laranja e morango e o efeito matriz (%) foi superior a -20% para o grupo 2 de frutas e para doce de pêssago (Tabela 4, Manuscrito 1). Esse composto elui no primeiro minuto de análise ($t_R = 0,98$ min), período de tempo no qual eluem muitos interferentes (Figura 3, Manuscrito 1) explicando, portanto, as baixas recuperações e presença de efeito matriz.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi desenvolvido um método multirresidual para determinação de agrotóxicos em doces de frutas em pasta utilizando μ LC-QTRAP-MS/MS. Do total de 107 agrotóxicos estudados, 99 preencheram todos os requisitos necessários para a validação. O RL foi de 9 e 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para 71 e 28 compostos, respectivamente. O efeito matriz foi menor que 20% para 90 dos 99 agrotóxicos validados. Avaliou-se também, a linearidade e faixa linear de trabalho, sendo que a maioria dos compostos obteve um $r^2 \geq 0,99$ na faixa 9 a 600 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Após a validação do método, realizou-se o monitoramento de resíduos em amostras adquiridas em mercados locais de Santa Maria, BR e de Almería, ES. Dentre as 17 amostras espanholas, 14 (82%) foram positivas, mas nenhuma apresentou agrotóxicos de uso proibido ou em concentrações acima dos LMR estabelecidos para as frutas utilizadas no preparo dos doces. Das 34 amostras brasileiras, 27 (79%) foram positivas, dentre essas, os doces de morango apresentaram maior número de contaminantes e em concentrações mais elevadas. Todos os doces de morango apresentaram pelo menos 1 agrotóxico classificado como NPC e/ou NA e/ou acima do LMR para a fruta. Os doces de morango que apresentaram menor e maior número de contaminantes tiveram um total de 7 e 15, respectivamente.

Ademais, após o preparo de doces de frutas caseiros, com amostras de frutas moídas e fortificadas com 5 agrotóxicos (a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$), as amostras foram submetidas a extração com método QuEChERS modificado. Os extratos de acetonitrila das 10 amostras foram analisados via LC-QTOF-MS, para verificar a presença dos metabólitos dos agrotóxicos, e por μ LC-QTRAP-MS/MS para determinar a concentração dos compostos nos doces de frutas. Assim, observou-se uma redução de 40 a 70% na concentração dos analitos e nenhum dos metabólitos foi detectado.

Comparando-se os níveis dos agrotóxicos nas frutas e nos doces (concentração dos agrotóxico no doce de fruta/concentração do agrotóxico na fruta fortificada) foi estimado um FP para cada um dos compostos. Sendo eles de 0,5;

0,3; 0,6; 0,5 e 0,5 para carbedazim, clorpirifós, imidacloprido iprodiona e propargito, respectivamente.

As hipóteses mais plausíveis para explicar a redução na concentração dos agrotóxicos no preparo dos doces de frutas são: diluição dos analitos, causada pela adição de açúcar e água u.p. às frutas fortificadas, como foi observado para carbendazim, imidacloprido, iprodiona e propargito, e diluição seguida de uma volatilização durante o cozimento como observado para o clorpirifós.

Portanto, conclui-se que o cozimento contribuiu para a redução da concentração do clorpirifós nos doces de frutas. Porém, não foram encontradas evidências de que os outros agrotóxicos tenham sido afetados pelas altas temperaturas, ou que algum composto tenha sido degradado, pois nenhum dos metabólitos dos agrotóxicos foi detectado nas amostras analisadas. Concluiu-se também, que o consumo de doces de frutas em pasta contribui para a ingestão humana de agrotóxicos, em consequência, deveriam ser estabelecidos LMR para agrotóxicos em doces de frutas em pasta.

REFERÊNCIAS

ABRASCO, Associação Brasileira de Saúde Coletiva, **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**, Parte 1 - Segurança Alimentar e Saúde, 2012. 1ª Parte. 98p. Disponível em: <<http://www.cfn.org.br/eficiente/repositorio/Artigos/405.pdf>> Acesso em: 28 ago. 2012.

ABOU-ARAB, A. A. K. Behavior of pesticides in tomatoes during commercial and home preparation. **Food Chemistry**, v. 65 p. 509-514, 1999.

ABOU-ARAB, A. A. K.; ABOU DONIA, M. A. Pesticide residues in some Egyptian spices and medicinal plants as affected by processing. **Food Chemistry**, v. 72, p. 439-445, 2001.

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**, v. 86, p. 412–431, 2003.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos: relatório de atividades de 2009**. 2010. Disponível em: <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/agroecologia/documentos/anvisaanaliseresiduos.pdf>. Acesso em: 27 maio 2015.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos: Relatório de atividades de 2011 e 2012**. 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/58a5580041a4f6669e579ede61db78cc/Relat%C3%B3rio+PARA+2011-12+-+30_10_13_1.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 30 jul. 2015.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d67107004634368583a5bfec1b28f937/Relat%C3%B3rio+PARA+2012+2%C2%AA+Etapa+-+17_10_14-Final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 30 jul. 2015.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica de Esclarecimento sobre o Risco de Consumo de Frutas e Hortaliças Cultivadas com Agrotóxicos.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d0c9f980474575dd83f3d73fbc4c6735/nota+tecnica+risco+consumo+frutas+e+hortalicas.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 30 set. 2012.

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**, v. 23, p. 895-901, 2006.

BEDOS, C. et al., Rate of pesticide volatilization from soil: An experimental approach with a wind tunnel system applied to trifluralin. **Atmospheric Environment**, v. 36 p. 5917–5925, 2002a.

BEDOS, C. et al., Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: overview. **Agronomie**, v. 22, p. 21-33, 2002b.

BEDOS C. et al. Modelling pesticide volatilization after soil application using the mechanistic model Volt'Air. **Atmospheric Environment**, v. 43, p. 3630–3639, 2009.

BONNECHÈRE, A. et al. Effect of household and industrial processing on levels of five pesticide residues and two degradation products in spinach. **Food Control**, v. 25, p. 397-406, 2012.

BRASIL, Resolução CNNPA n. 12, de 1978a - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 jul. 1978. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/12_78.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2015.

BRASIL, Resolução Normativa n. 9, de 1978b. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 dez. 1978. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7dbc1e80474587f89185d53fbc4c6735/Resolucao_9_1978.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 9 jun. 2015.

BRASIL, RDC n. 272 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ac09380047457ea18a84de3fbc4c6735/RDC_272_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 9 jun. 2015.

BRASIL, Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da República Federal do Brasil**, Brasília, DF. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm>. Acesso em: 16 dez. 2010.

CASTRO, J. S. M.; CONFALONIERI, U. Uso de Agrotóxicos no Município de Cachoeiras de Macau (RJ). **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 473-482, 2005.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

COSTABEBER, I.H. Tratamiento de muestras humanas para el análisis de residuos organoclorados. In: X ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 1999, **Resumos**, p.TA16. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, 1999.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency. **About Pesticides. Type of Pesticides**. 2010. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>>. Acesso em: 30 jul. 2015.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency. **Pesticide Program. Promoting Safety for America's Future**. EPA-735-R-03-001, FY 2002 Annual Report. EPA, 2002. Disponível em: <<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/>>. Acesso em: 8 dez. 2011.

EC, European Commission. **EU Pesticides database, 2015**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=product.selection&language=EN>. Acesso em: 11 jun. 2015.

EC, European Commission. **Council Directive 2001/113/EC of 20 December 2001 relating to fruit jams, jellies and marmalades and sweetened chestnut purée intended for human consumption, 2001**. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32001L0113>>. Acesso em: 14 jun. 2015.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos, **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12 p. 25-38, 2007.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Comprehensive analytical chemistry: Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues.** Elsevier, 2005. p. 279-282.

FERRER, C. et al., Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218 p. 7634–7639, 2011.

FLORES, A.V. et al. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 111-125, 2004.

FRIAR, P. M. K.; REYNOLDS, S. L. The effect of home processing on postharvest fungicide residues in citrus fruit: residues of imazalil, 2-phenylphenol and thiabendazole in 'home-made' marmalade, prepared from Late Valencia oranges. **Food Additives and Contaminants**, v. 11, n. 1, p. 57-70, 1994.

GUILLARME, D. et al., Micro liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector at ambient and high temperature: Optimization of the nebulization cell geometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1192 p. 103–112, 2008.

GRANELLA, V. **Qualidade do leite produzido em sistemas orgânico e convencional.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

HERRERO MARTÍN, S. Determination of trihalomethanes in soil matrices by simplified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction and fast gas chromatography with electron capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4883–4889, 2010.

HOLLAND, P. T., et al., Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 335–356, 1994.

HÚŠKOVÁ, R. et al. Analysis of pesticide residues by fast gas chromatography in combination with negative chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1216, p. 6326–6334, 2009.

KEIKOTLHAILE, B. M.; SPANOGHE, P.; STEURBAUT, W. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1–6, 2010.

KUBIAK, R.; MAURER T. EICHHORN, K. W. A new laboratory model for studying the volatilization of pesticides under controlled conditions. **The Science of the Total Environment**, v. 132, p. 115-123, 1993.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

LEHOTAY, S. J. et al. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of 229 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC**, v. 88, p. 595-614, 2005.

LEHOTAY, S. J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 485–520, 2007.

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

LICHIHEB, N. et al. Adaptation of a resistive model to pesticide volatilization from plants at the field scale: Comparison with a dataset. **Atmospheric Environment**, v. 83 p. 260-268, 2014.

MAKAROV, A. **Mass spectrometer**. United States Patent No US 5886346. 23 março 1999.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Legislação**, 2012. **Instrução normativa nº 27, de 11 de dezembro de 2012**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/Ano%20safra%202012%20-%202013.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2015.

MARTIN, L, et al. Prediction of the processing factor for pesticides in apple juice by principal component analysis and multiple linear regression. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30 p. 466–476, 2013.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259-272, 2004.

MOHD NAEEM, M. N. et al. The nutritional composition of fruit jams in the Malaysian Market. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2015. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1658077X15000119/1-s2.0-S1658077X15000119-main.pdf?_tid=057537f6-19ac-11e5-8cda-00000aab0f01&acdnat=1435066412_0f4437dabf695a10c8df6580498b96a6>. Acesso em: 23 jun. 2015.

MOHR, S. **Resíduos de poluentes orgânicos persistentes em mel de abelhas: Repercussões da contaminação ambiental**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

MOHR, S.; COSTABEBER, I.H. Aspectos toxicológicos e ocorrência dos bifenilos policlorados em alimentos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 3, p. 559-566, 2012.

MOREIRA J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ, **Ciência & Saúde Coletiva**, 7(2):299-311, 2002.

NGUYEN, T. D. et al. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS simple preparation method and gas chromatography mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, p. 207–213, 2008.

NÖRNBERG, S.D. et al. Persistência de agrotóxicos utilizados na produção integrada de maçã a *Trichogramma pretiosum*. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, p. 305-313, 2011.

NVWA, The Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority. **Bepaling van bestrijdingsmiddelen in groente-fruit-en graanproducten m.b.v. gas chromatografie-massaspectrometrie**, CHE01-WV624, 2^a versão, Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague, Holanda, 2005.

OGA S.; CAMARGO M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**, São Paulo, Ed. Atheneu, 2008, 677 p.

PACHECO, P. Brasil lidera o consumo mundial de agrotóxicos. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 7 de ago. 2009. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/impresso,brasil-lidera-uso-mundial-de-agrotoxicos,414820,0.htm>>. Acesso em: 8 dez. 2011.

PERES et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos, **Ciência & Saúde Coletiva**, 10(Sup):27-37, 2005.

PERES, F.; MOREIRA, J.C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um polo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 23, p. 612-621, 2007.

PARK, J. Simultaneous multiresidue analysis of 41 pesticide residues in cooked foodstuff using QuEChERS: Comparison with classical method. **Food Chemistry**, v. 128 p. 241–253, 2011.

PIZZUTTI, I. R. et al. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1142, P. 123–136, 2007.

RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 36-53, 2007.

RÜDEL, H. Volatilisation of pesticides from soil and plant surfaces. **Chemosphere**, v. 35, p. 143-152, 1997.

SANCO, **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, Document No. SANCO/12571, 2013.

SINITOX, Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. Casos de Intoxicação por Agrotóxicos em Geral por Unidade Federada, Segundo Circunstância Registrado em 2011. 2011. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox/media/Agrotoxicos%20em%20geral%202011%20-Tabela%201.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2015.

STAHNKE, H. et al. Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed? **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 1474–1482, 2012.

STOPPELLI, I. M. B.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.10, p. 91-100, 2005.

TAKEUCHI, T. Development of capillary liquid chromatography. **Chromatography**, v. 26, p. 7-10, 2005.

THENÓRIO, I.; MUNIZ, R. Lavar alimentos pode ser inútil para tirar agrotóxicos, dizem especialistas. G1, Ciência e Saúde. 2010. Disponível em: <<http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2010/06/lavar-alimentos-pode-ser-inutil-para-tirar-agrotoxicos-dizem-especialistas.html>>. Acesso em: 28 nov. 2012.

TOUATI, N. et al. Effect of storage time and temperature on the physicochemical and sensory characteristics of commercial apricot jam. **Food Chemistry**. v. 145 p.23–27, 2014.

UCLÉS MORENO, A. et al. Microflow Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry-An Approach to Significantly Increase Sensitivity, Decrease Matrix Effects, and Reduce Organic Solvent Usage in Pesticide Residue Analysis, **Analytical Chemistry**, v. 87 p. 1018–1025, 2015.

VAN DER HOFF, G. R.; VAN ZONNEN, P. Trace analysis of pesticides by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 843, p. 301-322, 1999.

VARELI, C. S. **Desenvolvimento e validação de método para determinação de etilenotiouréia em urina empregando HPLC-UV**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

VEIGA, M. M.; SILVA D. M.; VEIGA L. B. E. Análise do Risco de Contaminação Ambiental por Agrotóxicos nos Sistemas Hídricos do Município de Paty do Alferes, RJ. In: XXV ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO (ENEGERP), **Anais**, Porto Alegre, 2005, p. 4259-4264.

VÖLKOPF, U. Generate more valuable information from your sample applying the unique QTRAP workflows. **AB Sciex**. 2010. Disponível em: <http://www.perform.hu/dokumentacio/generate_more_valuable_information.pdf>. Acesso em: 31 maio 2015.

WAICHMAN, A.V. et al. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian, **Crop Protection**, v. 26, p. 576-583, abr. 2007.

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, p 200–212, 2007.

YANG, A. Synergistic effect of washing and cooking on the removal of multi-classes of pesticides from various food samples. **Food Control**, v. 28, p. 99-105, 2012.

APÊNDICES

Apêndice A – Amostras utilizadas no Artigo 1.

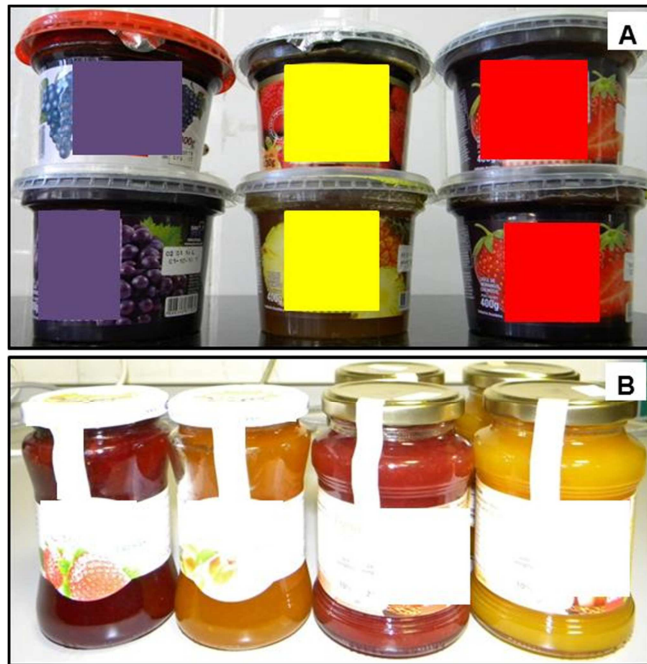


Figura 1 – Amostras de doces de frutas utilizadas no monitoramento de resíduos de agrotóxicos. Sendo (A) amostras do Brasil e (B) amostras da Espanha.

Apêndice B – Determinação da linearidade das curvas analíticas para a validação do método por μ LC-QTRAP-MS/MS.

Tabela 1 – Preparo das soluções para avaliação da linearidade das curvas analíticas em acetonitrila (ACN) e em extrato “branco” de doces de uva (*slurry* 1:1,5; m/m), as soluções foram diluídas de 1:30 (v/v) com uma mistura de acetonitrila/água (1:9, v/v) antes da análise.

Concentração de fortificação da matriz ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração da solução padrão ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Volume de solução padrão (μL)	Massa absoluta adicionada à solução (ng)	Volume total de solução preparada (μL)	Concentração inicial dos agrotóxicos ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Volume final após diluição 1:30 com ACN:H₂O (μL)	Concentração dos agrotóxicos na solução diluída ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	Concentração dos agrotóxicos na solução diluída ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
0	100	0	0	200	0	600	0,0	0,0
9	100	12	0,6	200	6	600	0,2	0,3
45	100	60	3	200	30	600	1,0	1,5
90	1000	12	6	200	60	600	2,0	3,0
150	1000	20	10	200	100	600	3,3	5,0
300	1000	40	20	200	200	600	6,7	10,0
450	1000	60	30	200	300	600	10,0	15,0
600	1000	80	40	200	400	600	13,3	20,0

*Concentrações dos P.I.S.: Malationa-d₁₀ e diclorvos-d₆ = 1,7 $\mu\text{g L}^{-1}$; D.I.S.: Linuron-d₆ = 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$; I.I.S.: Dimetoato-d₆ = 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Apêndice C – Avaliação da exatidão do método analítico para a validação por $\mu\text{LC-QTRAP-MS/MS}$.

Tabela 2 – Preparo das amostras de doces de frutas fortificados para avaliação das recuperações (%). Foram usadas doces de frutas de uva com *slurry* 1:1,5 (m/m), os extratos foram diluídos de 1:30 (v/v) com uma mistura de acetonitrila/água (1:9, v/v) antes da análise.

Concentração de fortificação da matriz ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração da solução padrão ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Volume de solução padrão (μL)	Massa absoluta adicionada à solução (ng)	Volume de solvente extrator - acetonitrila (mL)	Massa de <i>slurry</i> (e doce de frutas) em g	Concentração inicial dos agrotóxicos ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Volume final após diluição 1:30 com ACN:H ₂ O (μL)	Concentração dos agrotóxicos na solução diluída ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	Concentração dos agrotóxicos na solução diluída ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
0	1000	0	0	10	10 (6,7)	0	600	0,0	0,0
9	1000	60	60	10	10 (6,7)	6	600	0,2	0,3
45	1000	300	300	10	10 (6,7)	30	600	1,0	1,5

*Concentrações dos P.I.S.: Malationa-d₁₀ e diclorvos-d₆ = 1,7 $\mu\text{g L}^{-1}$; D.I.S.: Linuron-d₆ = 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$; I.I.S.: Dimetoato-d₆ = 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Apêndice D – Preparo dos doces de frutas caseiros.

Tabela 3 – Fortificação das frutas antes do preparo dos doces de frutas caseiros.

Concentração de fortificação das frutas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração da solução padrão (mg L^{-1})	Volume de solução adicionada às frutas (mL)	Massa absoluta adicionada às frutas (μg)	Massa de frutas (g)	Massa de açúcar adicionado (g)	Massa de água u.p. adicionado (g)	Massa total da mistura antes do cozimento (g)	Concentração dos agrotóxicos na mistura antes do cozimento ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
0	100	0	0	250	250	100	600	0
500	100	1,25	125	250	250	100	600	208

Apêndice E – Artigo.**Microflow Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry-An Approach to Significantly Increase Sensitivity, Decrease Matrix Effects, and Reduce Organic Solvent Usage in Pesticide Residue Analysis**

Ana Uclés Moreno, Sonia Herrera López, Barbara Reichert, Ana Lozano Fernández, María Dolores Hernando Guil, Amadeo Rodríguez Fernandez-Alba. Microflow Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry—An Approach to Significantly Increase Sensitivity, Decrease Matrix Effects, and Reduce Organic Solvent Usage in Pesticide Residue Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 1018–1025, 2015. DOI: 10.1021/ac5035852.

Microflow Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry—An Approach to Significantly Increase Sensitivity, Decrease Matrix Effects, and Reduce Organic Solvent Usage in Pesticide Residue Analysis

Ana Uclés Moreno,[†] Sonia Herrera López,[†] Barbara Reichert,^{‡,§} Ana Lozano Fernández,[†] María Dolores Hernando Guil,^{||} and Amadeo Rodríguez Fernández-Alba^{*,†}

[†]Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues in Fruit & Vegetables, University of Almeria, Ctra. Sacramento, s/n, 04120 La Cañada de San Urbano, Almería, Spain

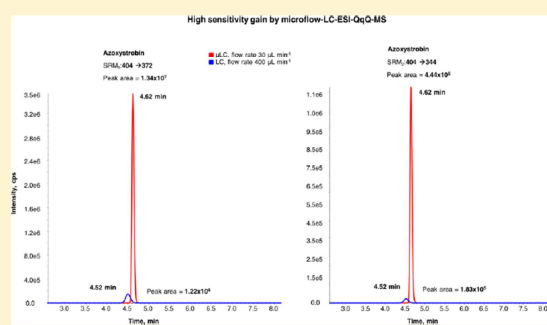
[‡]Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria (UFPSM), Roraima 1000/42, 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

[§]CAPES Foundation, Brazilian Ministry of Education, 70040-020 Brasília, Distrito Federal, Brazil

^{||}National Institute for Agriculture and Food Research and Technology, INIA, 28040, Madrid, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: This manuscript reports a new pesticide residue analysis method employing a microflow-liquid chromatography system coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (microflow-LC-ESI-QqQ-MS). This uses an electrospray ionization source with a narrow tip emitter to generate smaller droplets. A validation study was undertaken to establish performance characteristics for this new approach on 90 pesticide residues, including their degradation products, in three commodities (tomato, pepper, and orange). The significant benefits of the microflow-LC-MS/MS-based method were a high sensitivity gain and a notable reduction in matrix effects delivered by a dilution of the sample (up to 30-fold); this is as a result of competition reduction between the matrix compounds and analytes for charge during ionization. Overall robustness and a capability to withstand long analytical runs using the microflow-LC-MS system have been demonstrated (for 100 consecutive injections without any maintenance being required). Quality controls based on the results of internal standards added at the samples' extraction, dilution, and injection steps were also satisfactory. The LOQ values were mostly $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ for almost all pesticide residues. Other benefits were a substantial reduction in solvent usage and waste disposal as well as a decrease in the run-time. The method was successfully applied in the routine analysis of 50 fruit and vegetable samples labeled as organically produced.



Mass spectrometry (MS) currently makes up the core of multiple workflows in the analytical/bioanalytical sciences. Since the 1980s, matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and electrospray ionization sources (ESI) have undergone an impressive growth in the number of applications available for the analysis of molecules with high molecular weights.^{1,2} The remarkable success of a significantly reduced liquid flow rate and ESI, in particular micro-ESI and nano-ESI, is the direct result of the greater sensitivity required to better detect macromolecules of high interest in biomedical sciences.^{3,4} In these applications, the small droplets generated by the emitters, having internal diameters of only a few microns, increase the number of ions generated by ESI which are then introduced into the MS.^{5,6} Likewise, sensitivity improvement has been largely achieved by introducing miniaturization approaches into liquid chromatography

(LC).^{7,8} LC miniaturization has evolved providing drivers such as narrow-bore columns, packed- and monolithic capillary columns, ultra high performance (UHPLC), multidimensional separation (LCxLC), and lab-on-a-chip devices (microfluidic devices).^{9,10} Another important advantage of reducing the LC flow and the emitter diameter is that ion suppression effects are reduced along with a reduction in the number of analyte molecules per droplet, and consequently the competition for charges at the ion source. Nonetheless, there is no publication, to the best of our knowledge, which confirms either its applicability or analytical performance in routine food analysis, greatly impacting data quality.^{7,8}

Received: September 22, 2014

Accepted: December 12, 2014

Published: December 12, 2014

Ultrasensitive quantification capacity is desirable in the field of food safety, especially in pesticide residues control, although it is still a challenging task due to matrix effects.^{11,12} Other challenges facing routine laboratories are the need to reduce costs, faster high quality results, and the implementation of sustainable practices for reducing organic solvents and toxic waste. The benefits of LC-MS based on low-flow-rate LC (mainly referring to sensitivity, matrix effects, laboratory efficiency, and being more environmentally responsible) over conventional-flow-rate LC (presently the preferred separation strategy in pesticide residues analysis^{13,14}) seems a valuable opportunity to explore.

Several previous studies have been carried out to advance understanding of how ionization efficiency and ion transmission efficiency affect mass spectrometric (MS) sensitivity.^{15,16} Ionization and ion sampling efficiency increase inversely with flow rate.^{17,18} According to the study by Wilm and Mann,¹⁵ overall efficiency is about one ion in 200 800 under conventional ESI conditions, while it is about one ion in 390 analyte molecules detected by MS—510-times higher under nanoflow rates. A key factor in obtaining greater ionization efficiency, and a more effective way of reducing the Rayleigh limit, is to decrease the ESI droplet's initial radius by means of a low flow rate.¹⁹ Microdroplets require fewer desolvation and fission events than for a conventional flow rate (typically in the $\mu\text{L min}^{-1}$ range), from the perspective of the charge residue model proposed by Dole et al.²⁰ The process of solvent evaporation and Coulomb fission occurs repeatedly, disintegrating droplets into much smaller offspring. As a result, droplets have higher surface area-to-volume ratios, which enhances the desorption of gas-phase molecules from the droplet's surface, based on the ion evaporation model.²¹ Consequently, a greater number of ions can be completely desolvated by the time they reach the MS inlet. Ion sampling from the atmospheric pressure to the low-pressure region of the mass analyzer strongly affects transmission efficiency, limited by losses at the mass spectrometer inlet and at the skimmer. More efficient ion sampling using low flow rate is a consequence of the reduced spatial dispersion of the charged droplets/ion plume. Additionally, because it takes less time for the ions to be completely desolvated and due to the reduced size of the Taylor cone produced, the needle can be positioned much closer to the MS inlet; this allows more of the spray plume to be sampled, resulting in more efficient transportation. The net result is an increase in sensitivity when compared to conventional flow rate.⁷ Detection sensitivity gain can be achieved when small-diameter chromatographic columns are used, as are required in low-flow-rate ESI-MS.^{22,23}

Due to their nature, MS detectors are sensitive to operational fluctuations of any kind. The sensitivity gain in ESI analysis using low flow rate LC may be neutralized in long-term operation. In daily practice, there are certain constraints in achieving efficient, robust, and reproducible chromatographic separation, for instance the delivery of accurate and reproducible gradients and accurate mixing of low volumes in microflow-LC systems. Effects causing peak distortion such as extra-column band broadening, or overloading, may be exacerbated. Ambient temperature fluctuation may also significantly influence small-diameter columns. Clogging and contamination are very likely to occur when switching between different matrix samples for analysis. A fully validated analytical method is of the utmost importance for the functional characterization of the microflow-LC system hyphenated to

MS, as well as for demonstrating that the developed method meets method validation and quality control requirements.

This study is aimed at developing and validating a new method to decrease matrix effects in pesticide residues quantification of fruit and vegetables using a microflow-LC-ESI-QqQ-MS system, which employs an ESI emitter to provide a microflow rate. The study comprises an achievements assessment in terms of microflow-LC performance, sensitivity gain evaluation and matrix effects. Multiresidue method validation and quality control were carried out on 90 pesticide residues, including their degradation products, in three commodities (tomato, pepper, and orange), in line with the framework of European regulatory controls on pesticide residues.²⁴

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Reagents. Analytical-grade standards of insecticides, fungicides, and acaricides (in total, 80 pesticides and 10 degradation products) of high purity (>98%) were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) and from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Isotope-labeled internal standards of Dichlorvos- d_6 , Dimethoate- d_6 , Linuron- d_6 , and Malathion- d_{10} were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) and from CDN Isotopes (Quebec, Canada). For optimization of ion-source-dependent parameters for MS/MS operation, working solutions of individual standards were prepared in methanol at $100 \mu\text{g L}^{-1}$. For the calibration study, working standards solution mixtures were prepared at different concentration levels in AcN/ H_2O (20:80, v/v), which were kept at -20°C . HPLC-grade acetonitrile was supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and HPLC-grade water from Thermo Fisher scientific (Waltham, MA, USA). Formic acid and trisodium citrate dihydrate were purchased from Fluka (Steinheim, Germany). Primary-secondary amine (PSA) Bond-Elut was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA) and Bondesil-C18 from Agilent technologies (Wilmington, DE, USA). Sodium chloride was purchased from J.T Baker (Deventer, Netherlands). Disodium hydrogencitrate sesquihydrate was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Anhydrous magnesium sulfate was supplied by Panreac (Barcelona, Spain).

Sample Preparation and Processing. Samples of different commodities (tomato, green pepper, and orange) were purchased in a local market. The samples were stored at -4°C ; then they were homogenized frozen before spiking and sample extraction. Samples were prepared and processed according to the SANCO guidelines for pesticide residue analysis in food.²⁴ Blank samples were examined to confirm the absence of the target pesticide residues and used for preparing matrix-matched standards. The well-known QuEChERS sample preparation procedure was performed according to a validated method, previously published.²⁵ The internal standards used for recovery experiments were dichlorvos- d_6 and malathion- d_{10} . As a final step, the upper organic phase was separated, diluted with a mixture of AcN/ H_2O , filtered using a $0.2 \mu\text{m}$ PTFE syringe filter (Millex, Bedford, MA, USA), spiked with $10 \mu\text{L}$ of dimethoate- d_6 , at $60 \mu\text{g L}^{-1}$ (injection standard) to obtain a concentration of 0.001 mg kg^{-1} and then analyzed by injecting $3 \mu\text{L}$ into the microflow-LC-ESI-QqQ-MS system.

Analysis by Microflow-LC-ESI-QqQ-MS. A hybrid quadrupole/linear ion trap mass spectrometer system (4500 QTRAP, AB Sciex Instruments, Foster City, CA) with an ESI source coupled to an Eksigent ekspert microflow-LC 200

system (Eksigent, Redwood City, CA, USA) was used for method development and validation. The LC analysis was performed with a reversed-phase C18 column of 50×0.5 mm i.d. and $2.7 \mu\text{m}$, 90 Å particle size (Halo C18, Eksigent, AB SCIEX Instruments, Foster City, CA). The column temperature was maintained at 30°C . The microflow-LC system operated with mobile phase A (HPLC-grade water) and mobile phase B (AcN), both with 0.1% formic acid. The microflow-LC system incorporates micropumps especially designed for operating at flow rates from 5 to $200 \mu\text{L min}^{-1}$. The micropump is equipped with a binary pressure gradient former with high-speed microproportioning valves. The microflow-LC system was operated at pressures approaching 3500 psi. The gradient used ranged from 20 to 98% of mobile phase B: 20% of B was kept constant for 1 min followed by a linear gradient up to 98% B in 9 min and maintained at 98% B for 3 min. The injection volume was $3 \mu\text{L}$. The microflow rate was set to $30 \mu\text{L min}^{-1}$. The column outlet was connected online to the ESI source. For microspray ionization, the standard electrode was replaced by a smaller-diameter electrospray ionization ESI emitter electrode (microLC hybrid PEEKSIL/stainless steel tip $50 \mu\text{m}$ i.d. electrode, Eksigent, AB SCIEX Instruments, Foster City, CA). The ionization source settings were ion spray voltage (IS), 5000 V; temperature (TEM), 300°C ; curtain gas flow (CUR), 20 L min^{-1} ; collision gas (CAD), medium; and ion source gas (GS1 and GS2), at a pressure of 30 psi and in positive ionization mode. Nitrogen was used as the nebulizer gas, curtain gas, and collision gas.

The microflow-LC-ESI-QqQ-MS system was operated in SRM (selected reaction monitoring) mode with unit resolution for Q1 and Q3. Declustering potential (DP), entrance potential (EP), collision energy (CE), and collision cell exit potential (CXP) were optimized using flow injection analysis (FIA). The best sensitivity in SRM mode was achieved under time-scheduled conditions and with a time window of 30 s. The scheduled SRM enabled optimized cycle time and maximized dwell times to be used during acquisition to provide higher multiplexing with good analytical precision. The most intense SRM_1 transition was selected for quantitation. Identification was based on the EU guideline for LC-MS/MS analysis:²⁶ the acquisition of two SRM transitions, the retention time (a tolerance of ± 0.2 min), and SRM ratio compliance (the relationship between the abundance of transitions selected for identification and for quantification, $\text{SRM}_2/\text{SRM}_1$ with a tolerance of $\pm 30\%$). Analyst software 1.6.2 was used for data acquisition and processing.

Method Validation. In relation to quantitative methods, both validation and performance criteria were tested by assessing, mean recovery, linearity, precision (as repeatability and reproducibility, RSD), matrix effects, and quantitation limits (LOQ) following the SANCO guideline on analytical quality control and validation procedures.²⁴ Spiked extracts of blank tomato, pepper, and orange matrices were used to validate the multiresidue method. A minimum of five replicates was required to check recovery, within-laboratory repeatability, and reproducibility. Recovery and precision of the extraction method was determined at two concentration levels, 5 and $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Acceptable mean recoveries are those within the 70–120% range with an associated precision $\text{RSD} \leq 20\%$.²⁴ The method-LOQ should be the lowest validation spiked level meeting this criteria. The LOQ was set as the minimum concentration that can be quantified with acceptable accuracy and precision, as described in the Guidance document.²⁴

Within-laboratory repeatability (RSD_r) and reproducibility (RSD_{WR}) were both tested for the 5 and $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ spiked levels, over 1 and 5 days, respectively. Linearity was evaluated both in standard solutions and matrix-matched calibration solutions. Matrix-matched calibration curves were prepared at eight concentration levels, from 0.16 to $13.3 \mu\text{g L}^{-1}$, corresponding to 5– $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ in the sample. Matrix effects were evaluated based on the slopes of regression lines plotted from results obtained in matrices versus standard solutions. Dilution of sample extracts was tested as a compromise approach between matrix-effect reduction, if any, and method sensitivity. The reduction in matrix effects was evaluated at four dilution levels, 10-, 20-, 30-, and 50-fold. For that, aliquots of spiked extracts were diluted with a mixture of AcN/high purity water (20:80, v/v). Prior to microflow-LC-MS/MS analysis, the extracts were filtered through a $0.2 \mu\text{m}$ PTFE filter (Millex FG, Millipore, Milford, MA, USA). Internal standards (dimethoate- d_6 and linuron- d_6) were used at the dilution step and at the injection of the samples into the microflow-LC-MS system to test the overall robustness of the analysis. Dimethoate- d_6 was added just prior to the determination step and, at injection, to check possible variations in the injection volume. Linuron- d_6 was added at the sample extract dilution step to account for random errors that might occur at this stage. Robustness of the microflow-LC system and its capability to withstand long analytical runs was evaluated as a function of the reproducibility of both peak area and retention time.

Analysis of Real Samples. The methodology described above was applied to monitor pesticide residues in organically labeled fruit and vegetables. A total of 50 samples were purchased in Almería at specialized local shops. The organically produced fruit and vegetables were tomato, cucumber, potato, golden apple, cauliflower, lettuce, red pepper, green pepper, strawberry, lemon, kiwi, broccoli, leek, onion, melon, white cabbage, spinach, carrot, orange, aubergine, pear, garlic, grapefruit, and pumpkin. All samples were stored in their original packaging under the recommended conditions prior to use.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of Microflow-LC-ESI-QqQ-MS Parameters. The Guidance document SANCO/12571/2013²⁴ recommends that, if possible, the ions selected for unit resolution MS/MS should be characteristic of the analyte, providing at least two transitions, which is sufficient for the selectivity/confirmation of peak identity. The optimal SRM transitions with sufficient abundance for pesticide residue identification and quantification are included in Table S-1, Supporting Information. This table provides a set of 188 SRM transitions of the selected precursor and product ions, retention times, optimized collision energies, and declustering potential values. Identification was also based on the variation of the intensity ratios of both transitions (SRM_1 and SRM_2) in the standard and in the matrix, which was always less than 15%. Some chromatographic conditions and ionization source parameters were assayed in order to obtain the optimal conditions. Because the injection volume has a significant loadability limitation when the column diameter becomes smaller, and the fact that a lower sample volume may potentially negate the sensitivity gains delivered by the ESI source operating at a microflow rate, different injection volume responses were compared. A $5 \mu\text{L}$ sample volume was found to influence peak broadening, and carryover was observed when analyzing blank samples

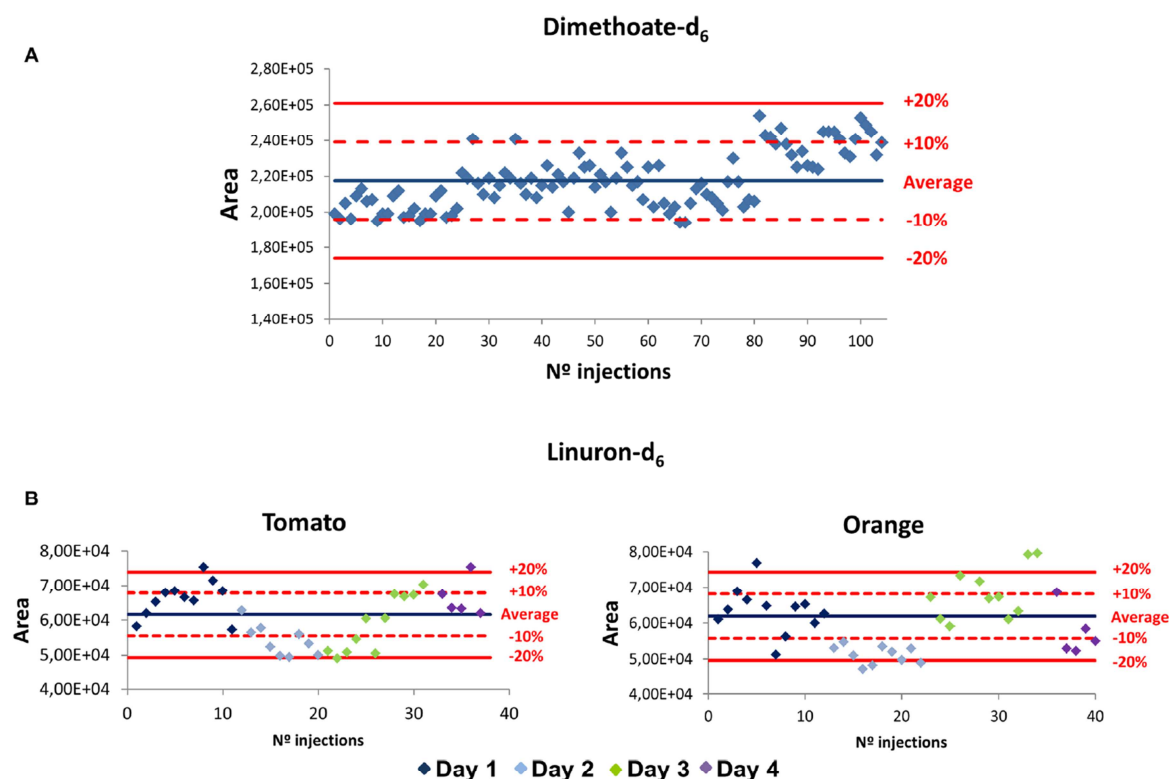


Figure 1. Reproducibility of the peak area of the injection and dilution internal standards for (A) dimethoate-d₆ added after sample dilution and before injection of different matrices spiked at 1 μg kg⁻¹ over 100 injections and for (B) linuron-d₆ added before sample dilution in different injections of tomato and orange spiked at 10 μg kg⁻¹ and diluted 30 times over 4 days.

immediately after spiked samples. For a lower injection volume (2 μL), there was a significant reduction in sensitivity, with loss of identification capability for some pesticide residues, such as Fenthion, whose second transition was negligible. Analyses performed with an injection volume of 3 μL resulted in a sensitivity gain of around 2 times for most of the compounds with respect to other injection volumes—even rising to 4 times for some, such as for Azinphos-methyl, while chromatographic performance was not compromised.

By reducing the ESI microflow rate to 20 μL min⁻¹, no further improvements in sensitivity nor in the run-time were noted. Microflow rates of approximately 30 μL min⁻¹ demonstrated significantly increased sensitivity for most of the tested compounds compared with 50 μL min⁻¹ flow rates. This flow rate difference may be the cause of a lower solvent evaporation rate and a decrease in the rate of smaller-size droplet formation. More efficient transportation, and therefore sampling efficiency enhancement, was also achieved because the 50 μm i.d. ESI emitter could be positioned much closer to the MS inlet.

Optimization of Ion-Source Operational Parameters.

The ESI source settings were setup for low flow, utilizing a lower source temperature and lower gas flow settings as a more efficient approach than under conventional conditions. The results clearly demonstrated an increase in response at a 300 °C ion-source temperature and a gas flow of 20 L min⁻¹. Ion-source temperatures within the 400–500 °C range did not lead to increased desolvation and ionization efficiency. Loss of

sensitivity was observed for some compounds such as azinphos-methyl and methidathion, sacrificing identification capacity. Lower temperatures were also assayed with no improvements. An example of the influence of the ion source temperature is shown in Figure S-1, Supporting Information, for the case of methidathion. It was found that higher ion source temperatures were inadequate because sensitivity loss, both at the SRM₁ and SRM₂ transitions, was not detected at a temperature of 500 °C.

Analytical Method Performance. Using the microflow-LC-ESI-QqQ-MS-based method, a mixture of 90 pesticides was well resolved and eluted within 9 min on a reversed-phase microLC C18 column at a microflow rate of 30 μL per minute. The abstract graphic shows the extracted ion chromatograms (XIC) for azoxystrobin in orange at 10 μg kg⁻¹, corresponding to SRM₁ 404 → 372 and SRM₂ 404 → 344. Besides the sensitivity of the mass analyzer itself, and especially when working in SRM mode, a significant sensitivity improvement was obtained with microflow-LC and microspray ionization. Using a 0.5 mm i.d. microLC column and a flow rate of 30 μL per min, there was a sensitivity improvement by a factor of about 10 in the peak area when comparing the low flow rate to the conventional HPLC method, as is shown with the example in the abstract graphic. This graphic also presents XIC chromatograms obtained by HPLC at a flow rate of 400 μL per minute. Better results, in terms of sensitivity, compared with classical HPLC, have already been reported in other applications.^{23,26} Since the Guidance document SANCO/12571/2013²⁴ also recommends LC-MS performance require-

ments, a mixture of pesticides and internal standards was used to assess the stability and repeatability of retention times and peak areas. Mixtures containing 90 pesticides in a solvent and in the selected matrices (within a $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ to $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ concentration range) were analyzed over 3 days to assess the stability of chromatographic conditions, and thus the repeatability of retention times. For the duration of the 96 injections, the obtained results showed less than 0.1 min of difference in retention times. Therefore, the tolerance of retention-time matching did not exceed $\pm 0.2\%$ relative to the standards retention time.²⁴ The reproducibility achieved is attributable to stability in the gradient mixing, temperature, and pressure curves (reaching modest values of approximately 3500 psi) as well as a rapid column reequilibration. As a result, the underlying concern of dead volume and band broadening, potentially observed when working with micro columns and low flow rates, did not compromise chromatographic performance. A reflection of this is the precision peak area values obtained which confirm the precise delivery of a very low injection volume ($3 \mu\text{L}$). A low flow rate and microcolumn resulted in separations with sharper and narrower sample peaks. A difference of less than 10% in peak areas for single compounds was observed in accordance with the criteria for ensuring correct method performance as required by the guidance document.²⁴ The stability of the flow rate working in gradient mode was excellent with no deterioration in response, even after 100 injections and including difficult-to-analyze matrices such as the orange.

Another important consideration is that when using microflow-LC, mobile phase consumption can be substantially reduced by over 90%. Consequently, due to less solvent going into the mass spectrometer, its maintenance requirements may be notably reduced. Additionally, given that microflow-LC enables faster analysis while maintaining equivalent resolution to conventional HPLC, throughput in high volume testing laboratories can be greatly improved.²⁷ In addition, there is a substantial reduction in waste generation that will be beneficial to the environment.²⁷

To better assess microflow-LC performance and the correct execution of extract dilution as an approach for reducing matrix effects, the peak area ratio of internal standards (dimethoate- d_6 and linuron- d_6) was plotted with respect to the number of injections. For the most part, RSDs below 10% in peak area were observed across the 100 replicate injections of dimethoate- d_6 , which was used as an injection internal standard to check whether variations in the injection volume might be present over long injection-to-injection cycle times. Figure 1A displays the analysis results for dimethoate- d_6 in orange, pepper, and tomato spiked at $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ and shows that at least 100 injections can be routinely carried out with no deterioration in microLC performance. Linuron- d_6 was used at the sample extract dilution step to account for random errors that might occur during this stage. In Figure 1B, the results showed outstanding reproducibility over the duration of the 40 replicate injections corresponding to the analysis of linuron- d_6 in tomato and orange extracts diluted 30-fold, with a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ concentration. When dealing with sample dilution, extreme care should be taken to ensure error is not introduced during sample preparation. The peak area RSD values obtained over 4 days fell within a $\pm 20\%$ window. All these results demonstrate that it seems to be plausible to employ microflow-LC-MS as a reliable method in pesticide residues analysis.

Analytical Method Validation. The results of the recovery study are presented in Table S-2, Supporting Information, as mean percentage recoveries (of five replicates). Most of the pesticide residues showed a satisfactory recovery value according to the above-mentioned SANCO guideline²⁴ criteria for quantitative methods—of between 70 and 120% at both concentration levels tested ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $50 \mu\text{g kg}^{-1}$). The RSD values (in %) for the recoveries obtained in the three matrices (tomato, pepper, and orange) ranged from 2 to 15% and were homogeneous between the two fortification levels. These values showed that precision was better than 20% RSD (results not shown in Table S-2). When broken down into matrices—for tomato, nearly 94.5% of the pesticide residues tested showed recovery values which fell within the 70–120% range. Four compounds (fenhexamid, fenpropathrin, fenthion sulfoxide, and iprodione) did not show satisfactory recovery values or could not be detected at levels required by the regulations. For pepper, the acceptance criteria were met for 94.5% of the pesticide residues analyzed. Fenthion oxon, pencycuron, and thiophanate-methyl showed the lowest recovery values but were still above 52%. For orange, the acceptance criteria were met for 95.6% of the pesticide residues analyzed. Fenthion oxonsulfone and fenthion sulfoxide were recovered at a percentage value greater than 65% at the two fortification levels. A lower recovery value can also be acceptable if precision is low.²⁴ In both pepper and orange matrices, pesticide residues which had recovery values above 52 and 65% also showed RSDs below 20%, indicating that the method can be accepted for the analysis of such pesticide residues at these fortification levels. The limit of quantification for iprodione was $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ and was therefore only evaluated at the highest fortification level ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$), the average recovery value of which was in line with the criteria that set acceptability. Recovery of the internal standards (dichlorvos- d_6 and malathion- d_{10}) was in the 80–110% range, implying method validity. Thus, with only a few exceptions, recovery values were generally satisfactory, which indicates that the QuEChERS extraction and cleanup method applied in this study is efficient and reproducible. This is in accordance with other previous works aimed at assessing the suitability of the QuEChERS method for pesticide residues analysis.¹³

The calibration curves were fitted to a linear function in the $5\text{--}400 \mu\text{g kg}^{-1}$ concentration range. A linear response was confirmed over an eight-point plot (with three replicates per point) based on the squared correlation coefficients (r^2) obtained, ranging from 0.99 to 1, as well as randomly distributed residuals below 20%. The boundaries of the working range over which the method may be used were from 5 to $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ for the majority of the pesticide residues studied. The linear range varied only for the following pesticide residues: azinphos-methyl (from $10 \mu\text{g kg}^{-1}$); and fenitrothion and iprodione (from $50 \mu\text{g kg}^{-1}$) depending on the lower levels demonstrated to be determined by linearity (Table S-2). In the case of fenitrothion, there were no differences in the linear range determined for the three matrices. The wide dynamic range and the high analytical response, however, compromised quantification in some cases as a consequence of ion saturation in the upper part of the concentration range. Azoxystrobin, buprofezin, iprovalicarb, malathion, tebufenozide, and pymetrozine were characterized by their high signal response although saturation was avoided by a 30-fold dilution, and by raising the upper part of the concentration range to $400 \mu\text{g kg}^{-1}$.

The microflow-LC-ESI-QqQ-MS-based method yielded a sensitivity improvement which directly translated into a gain in LOQ values. The method provided LOQ values of $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ with a recovery range between 70 and 120%, and $\text{RSD} \leq 20\%$, for most pesticide residues. The RSD at the LOQ was $<10\%$ for most pesticide residues (RSD of LOQ results are not shown in Table S-2). The LOQ value was 10-fold higher for only three pesticide residues: fenitrothion and iprodione had an LOQ value of $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ in the three commodities tested; thiophanate-methyl had an LOQ value of $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ but only in pepper (Table S-2). The lower LOQ values obtained are well below the upper tolerance (allowable) levels of MRLs established by European legislation. In this study, magnitudes of repeatability and intralaboratory reproducibility were acceptable following this approach. The relative repeatability (RSD_r), expressed as within laboratory, was below 18% although most of the values varied between 1 and 11%. Precision was found to be satisfactory at the two levels studied, 5 and $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Intralaboratory reproducibility was also within an acceptable range, below 19% for the two aforementioned spiked levels. These results are not shown in Table S-2.

Taking into consideration the influence of each matrix on the chromatographic response, less than 14.3% of pesticide residues were affected by both matrix-induced response enhancement and suppression. The magnitude of matrix effects observed were compound dependent. For 85.7% of the pesticide residues, the matrix effect was below 20% (Table S-2), and the method was acceptable for quantifying the evaluated matrices—tomato, pepper, and orange. Figure 2 shows an

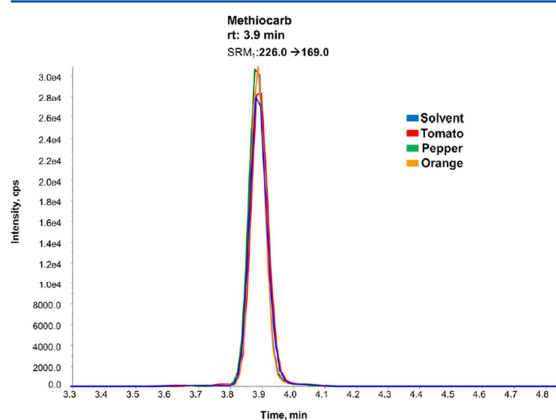


Figure 2. Extracted ion chromatogram (XIC) for the SRM₁:226 → 169 of Methiocarb corresponding to a standard in solvent, spiked tomato, pepper, and orange matrix at a concentration of $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

overlapping of extracted ion chromatograms (XIC) corresponding to methiocarb in solvent, tomato, pepper, and orange. These results suggest that the microflow-LC-ESI-QqQ-MS-based method could offer significant advantages with regard to ion suppression and enhancement effects. The ESI flow rate has been found to influence the degree of ion suppression, evidencing a drastic reduction in matrix effects when the ESI flow rate is reduced to microliter or nanoliter per minute levels.^{28,29} The mechanism by which matrix compounds affect analyte ionization has been discussed in the literature.^{11,30} Some authors suggest a competition between matrix compounds and analytes for the limited charge on the droplet

surface; the increase in the droplet's viscosity and surface tension decreases the solvent evaporation rate and results in less analyte being available to reach the gas phase. It has also been proposed that nonvolatile interferents can decrease the rate of droplet formation by analyte coprecipitation and thus prevent these droplets from reaching the critical radius for gas phase ions to be emitted.^{31,32} Working at a low flow rate, it has been suggested that because of the decrease in the initial charged-droplet size resulting from the lower flow rate, fewer uneven fission events and less solvent evaporation is required for ion release in the gas phase.³³ Because the uneven fission process enhances the surface-activated matrix components to compete with analytes for a limited number of surface charges, less uneven fission will minimize competition and lead to a stronger analyte signal.³² This rationale suggests that matrix effects can be minimized by applying the microflow-LC-MS approach. Some sample-preparation procedures have proved to be effective in reducing matrix effects, but the need for even more productive methods becomes ever more pressing. Based on the results obtained, it seems plausible to employ microflow-LC-MS for highly sensitive analysis, and for inline matrix-effect reduction solutions to reduce processing time and cost in extensive sample preparation.

As mentioned above, 14.3% of pesticide residues were affected by matrix effects even in matrices considered “difficult” such as orange. Carbendazim, cyprodinil, ethirimol, methidathion, and pirimicarb were affected by signal suppression (in the 22% to 57% range). Azinphos-methyl, bromuconazole, fenitrothion, fenthion, and thiophanate-methyl were affected by signal enhancement (up to 15%). The type of coextracts in the examined matrices which remained in the final sample even after cleanup proved to influence the second and third region of the chromatogram—the greater severity being between approximately 2.50 and 5.60 min. Thus, moderately polar coextracts seem to be a major source of matrix effects, rather than hydrophilic compounds, which are not well retained in reversed-phase columns and usually elute in the first few minutes. Hydrophilic compounds in orange extracts (orange is typically recognized as a complex matrix and has a high acid content), which were not removed by the cleanup, interfered with the detection of early eluting pesticide residues. Only carbendazim, ethirimol, and pirimicarb, with retention times between 0.42 and 0.52, were affected by the coelution of compounds such as phenolic acids. The suppression effect observed (from -22% to -29%) under such ionization conditions could be the result of a competition between proton affinities as the solvent evaporates. If the interferent has a higher gas-phase proton affinity than the analyte, this will be protonated first and, therefore, the target analyte's ion intensity will be reduced. The matrix effect was observed for the azinphos-methyl, fenitrothion, and thiophanate-methyl analytes in these types of commodities, with a high water content (tomato and pepper) and a high acid content (orange), leading to signal response enhancement (up to 16%). Acceptably accurate quantitative results were achieved by using matrix-matching, which likely reduces the extent of such effects. Alternatively, because of the sensitivity gain using the microflow-LC-ESI-QqQ-MS-based method, simple dilution of matrix extracts (with a dilution factor of 30) was effective in those cases where the matrix effect was more marked. Under such conditions, matrix effects were found to decrease at a higher rate than that of the analyte response as the sample was diluted. Using this simple dilution approach, the matrix effect

was minimized from a dilution factor of 10 up to 30, finally reaching a plateau; indeed, a dilution factor of 50 did not provide any improvement in our study (Figure S-2). MicroLC and microspray ionization effectively allowed one to dilute samples up to 30-fold, minimizing the potential for matrix effects that would suppress or enhance the analyte's signal of interest.

Analysis of Real Samples. Based upon the validation study, the method's applicability seems adequate for fulfilling the requirements of higher sensitivity and less sample processing time, even in complex matrices. In this study, the samples analyzed included a total of 23 different fruit and vegetable commodities. Nearly all synthetic pesticide residues are prohibited under organic certification standards. By contrast, there is growing concern regarding the trace level presence of pesticide residues and the incidence of pesticide residues in organic foods. Using the microflow-LC-ESI-QqQ-MS method, 25 different pesticide residues were detected in some of these commodities (Table S-3). A total of 76% (38 out of 50) of the samples contained pesticide residues at a quantifiable level (equal to or above the LOQs, mostly at $5 \mu\text{g kg}^{-1}$) for at least one pesticide residue. The most frequently detected pesticide residues, independent of the commodity, were diazinon (50%), azoxystrobin (32%), ethoprophos (26%), difenoconazole (22%), and chlorpyrifos (20%). The results obtained in this study have shown that some organic samples contained pesticide residues which are unauthorized under European organic product regulations.³⁴ With relation to European MRL regulations, in 4% of the samples (two samples of cucumber and cauliflower), the concentration of at least one pesticide residue exceeded the MRL. Iprovalicarb was measured at a concentration of $93 \mu\text{g kg}^{-1}$ in cauliflower (the EU MRL is $10 \mu\text{g kg}^{-1}$). Prothiofos was measured at $128.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ in cucumber even though it is not approved under Regulation (EC) No. 1107/2009.³⁵ It is evidence that, despite the ban on the use of synthetic pesticides in organic farming, pesticide residues can still be found. Under the European organic food regulation framework, it is generally assumed that pesticide residues detected above the LOQ, but below the MRL, denote unauthorized use of a pesticide in organic agricultural practices. The presence of pesticide residues may also be due to cross contamination via water or air, or cultivation on soil previously used for conventional production. In tracking some of the controversial aspects of organic food regulation, it is recognized, however, that the current European legal framework is reviewed rather ambitiously.

CONCLUSIONS

The microflow-LC-ESI-QqQ-MS method can provide better sensitivity than methods based on conventional flow rates using HPLC, which are currently the preferred separation strategy in pesticide residues analysis. In addition to the sensitivity, preconcentration sample procedures are often required (depending on the mass analyzer) when there are low concentration sensitivity issues; however, this may lead to matrix effects. As an alternative, the sensitivity gain offered by microLC and microspray ionization effectively allows sample dilution of up to 30-fold, thus minimizing this potential for matrix effects. Performance and validation data on this microflow-rate method support its robustness and its capability in providing reliable quantification of pesticide residues. The substantial reduction in solvent usage and waste generation

offers additional benefits in cost-saving and reduced environmental impact.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Figures S1 and S2 and Tables S1–S3. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org/>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel.: +34 950 015 034 / Fax:+34 950 015 483. E-mail: amadeo@ual.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge funding support from the European Commission, DG SANCO, of the annual financing decision (2011/889/EU) and according to Article 5 of Commission Implementing Regulation (EU) No 926/2011. A.U.M. acknowledges the research contract from the European Commission, DG SANCO project. B.R. was supported by a scholarship from the CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil (Process 14234-13-0).

REFERENCES

- (1) Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301.
- (2) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* **1989**, *246*, 64–71.
- (3) Emmett, M. R.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 605–613.
- (4) Wilm, M. S.; Mann, M. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1994**, *136*, 167–180.
- (5) Kirby, A. E.; Jebrail, M. J.; Yang, H.; Wheeler, A. R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 3425–3431.
- (6) Rahman, Md. M.; Hiraoka, K.; Chen, L. C. *Analyst* **2014**, *139*, 610–617.
- (7) Catherman, A. D.; Skinner, O. S.; Kelleher, N. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *445*, 683–693.
- (8) Gikaa, H. G.; Theodoridis, G. A.; Plumb, R. S.; Wilson, I. D. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 12–25.
- (9) Novotny, M. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 500–510.
- (10) Desmet, G.; Eelink, S. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 543–556.
- (11) Ferrer, C.; Lozano, A.; Agüera, A.; Girón, A. J.; Fernández-Alba, A. R. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 7634–7639.
- (12) Stahnke, H.; Kittlaus, S.; Kempe, G.; Alder, L. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1474–1482.
- (13) Kmellár, B.; Fodor, P.; Pareja, L.; Ferrer, C.; Martínez-Uroz, M. A.; Valverde, A.; Fernández-Alba, A. R. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1215*, 37–50.
- (14) Fernández-Alba, A. R.; García-Reyes, J. F. *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 973–990.
- (15) Wilm, M. S.; Mann, M. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1–8.
- (16) Page, J. S.; Kelly, R. T.; Tang, K.; Smith, R. D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1582–1590.
- (17) Abian, J.; Oosterkamp, A. J.; Gelpí, E. J. *Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 244–254.
- (18) Shen, Y.; Zhao, R.; Berger, S. J.; Anderson, G. A.; Rodriguez, N.; Smith, R. D. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4235–4249.
- (19) Wood, T. D.; Moy, M. A.; Dolan, A. R.; Bigwarfe, P. M., Jr.; White, T. P.; Smith, D. R.; Higbee, D. J. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2003**, *38*, 187–244.
- (20) Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240–2249.
- (21) Iribarne, J. V.; Thomson, B. A. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287–2294.

- (22) Schubert, B.; Oberacher, H. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 3413–3422.
- (23) Legido-Quigley, C.; Smith, N. W.; Mallet, D. *J. Chromatogr. A* **2002**, *976*, 11–18.
- (24) SANCO/12571/2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Available at http://ec.europa.eu/food/plant/plant_protection_products/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf.
- (25) EURL-FV multiresidue method using QuEChERS followed by GC-QqQ/MS/MS and LC-QqQ/MS/MS for fruits and vegetables. Available at http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/fv/CRLFV_Multiresidue_methods.pdf.
- (26) Mansion, F.; Chiap, P.; Houbart, V.; Crommen, J.; Servais, A. C.; Fillet, M. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 1820–1827.
- (27) Welch, C. J.; Wu, N.; Biba, M.; Hartman, R.; Brkovic, T.; Gong, X.; Helmy, R.; Schafer, W.; Cuff, J.; Pirzada, Z.; Zhou, L. *Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 667–680.
- (28) Andrews, C. L.; Yu, C. P.; Yang, E.; Vouros, P. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1053*, 1–2.
- (29) Andrews, C. L.; Feng, L.; Yang, E.; Yu, C.-P.; Vouros, P. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 43–49.
- (30) Trufelli, H.; Palma, P.; Famiglini, G.; Cappiello, A. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, *30*, 491–509.
- (31) Kebarle, P.; Tang, L. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 972–986.
- (32) Reilly, P. T. A.; Lazar, A. C.; Gieray, R. A.; Whitten, W. B.; Ramsey, J. M. *Aerosol Sci. Technol.* **2000**, *33*, 135–152.
- (33) Juraschek, R.; Dülcks, T.; Karas, M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 300–308.
- (34) Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91. *Official Journal of the European Union* 24.11.2009.
- (35) Regulation (EC) 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the Market. *Official Journal of the European Union* 20.07.2007.

Apêndice F – Verificação da exatidão do método durante o estabelecimento dos fatores de processamento dos agrotóxicos nos doces de frutas caseiros.

Tabela 4 – Fortificação do doce de pêsego caseiro e das frutas para avaliação das recuperações (%) por μ LC-QTRAP-MS/MS. As soluções foram diluídas de 1:30 (v/v) com uma mistura de acetonitrila/água (1:9, v/v) antes da análise.

Matriz	Concentração de fortificação da matriz ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração da solução padrão (mg L^{-1})	Volume de solução padrão (μL)	Massa absoluta adicionada à solução (μg)	Volume de solvente extrator (mL)	Massa de amostra (g)	Concentração inicial dos agrotóxicos ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Volume final após diluição 1:30 com ACN:H ₂ O (μL)	Concentração dos agrotóxicos na solução diluída ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	Concentração dos agrotóxicos na solução diluída ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Doce de pêsego caseiro	0	1	0	0	10	6,7	0	600	0	0
	9	1	60	0,06	10	6,7	6	600	0,2	0,3
Frutas	0	100	0	0	10	10	0	600	0	0
	500	100	50	5	10	10	500	600	17	17

*Concentrações dos P.I.S.: Malationa-d₁₀ e diclorvos-d₆ = 1,7 $\mu\text{g L}^{-1}$; D.I.S.: Linuron-d₆ = 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$; I.I.S.: Dimetoato-d₆ = 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.