

Validação de metodologia QuEChERS-acetato para a análise de multirresíduo de agrotóxicos em amostras de soja e de extrato solúvel de soja utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

Validation of acetate QuEChERS methodology for pesticides multiresidue analysis in soybean samples and soybean-soluble extract by means of high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

RIALA6/1588

Adherlene Vieira GOUVÊA^{1*}, Maria Helena Wohlers Morelli CARDOSO¹, Lucia Helena Pinto BASTOS¹, Cristiane BARATA SILVA¹, Nina Daddario ORTIZ², Armi Wanderley da NÓBREGA¹, Silvana do Couto JACOB¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Alimentos e Contaminantes, Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Av. Brasil, 4365 – Mangueiros, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 21040-900. E-mail: adherlene.gouvea@incqs.fiocruz.br, adherlene@gmail.com.

²Unidade Proteômica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química (IQ), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Recebido: 15.03.2013 - Aceito para publicação: 12.03.2014

RESUMO

Com o aumento da utilização da soja e seus derivados na alimentação humana torna-se importante a avaliação da possibilidade de contaminação desses produtos por resíduos de agrotóxicos. Neste contexto, este estudo efetuou a validação da metodologia QuEChERS-acetato, para análise de 144 resíduos de agrotóxicos em soja e no extrato solúvel de soja por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. Os parâmetros avaliados foram: seletividade (efeito matriz nos dois tipos de amostras), linearidade (faixa de trabalho, significância da regressão e homogeneidade dos resíduos da regressão), exatidão (recuperação), precisão (repetitividade) e limite de detecção e de quantificação. As curvas analíticas apresentaram $R^2 \geq 0,95$ e $r \geq 0,98$ na faixa de trabalho (0,002 a 0,200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A exatidão e precisão em dois níveis de fortificação das duas matrizes apresentaram valores de 70 a 120 % de recuperação e $\text{CV}(\%) \leq 20$ %, respectivamente. O limite de detecção e de quantificação apresentou resultados satisfatórios. A metodologia validada possibilitou a determinação de 122 substâncias na matriz soja e 124 na matriz de extrato solúvel de soja.

Palavras-chave. soja, agrotóxicos, estudos de validação, cromatografia líquida, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The possibility of occurring the soy and soy derivatives samples contamination with pesticide residues has become significant due to the increased use of these products in human nourishment. In this context, the present study aimed at validating the acetate QuEChERS multiresidue methodology for analyzing 144 pesticide residues in soybean samples and soybean soluble extract using high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The parameters evaluated were: selectivity (matrix effect in the two sample types), linearity (working range, regression significance, homogeneity of the regression residues), accuracy (recovery), precision (repeatability) and limits of detection and quantification. The analytical curves presented $R^2 \geq 0.95$ and $r \geq 0.98$ in the working range (0.002 to 0.200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The accuracy and precision evaluated at two levels of fortification of two matrices presented values of recovery in the 70-120 % range and $\text{CV}(\%) \leq 20$ %, respectively. The limits of detection and quantification showed satisfactory results. The validated methodology allowed to perform the determination of 122 substances in the matrix soybean and 124 in the soluble extract of soybean.

Keywords. soybeans, pesticides, validation studies, chromatography, liquid, mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado dos agrotóxicos em desrespeito às indicações agronômicas acarreta a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, em quantidades superiores àquelas estabelecidas na legislação, podendo expor a população a possíveis agravos à saúde.

Quando são utilizados agrotóxicos de uso não autorizado, a exposição da população que consome esses alimentos contaminados é de maior gravidade, visto que não existem estudos toxicológicos que possibilitem estabelecer, em âmbito nacional, limites seguros de resíduos que não causem danos aos consumidores desses alimentos.

A soja é a cultura agrícola que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49 % da área plantada em grãos do país. O cultivo é feito especialmente nas regiões centro-oeste e sul do país¹. Dados da safra de 2010/2011 indicam que o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, atrás apenas dos Estados Unidos^{2,3}.

Há evidências de que nos últimos anos a inclusão de produtos à base de soja vem intensificando-se na alimentação humana, pois o grão é um dos alimentos mais completos em relação às proteínas⁴. A indicação de uso de alimentos à base de soja também inclui pessoas com histórico familiar de osteoporose e câncer de próstata⁵.

Para a cultura da soja, atualmente, são permitidos no Brasil cerca de cento e cinquenta e cinco agrotóxicos, treze produtos biológicos, quatro ferormônios sintéticos, quatro reguladores de crescimento e cinco compostos inorgânicos. Dentre os agrotóxicos permitidos, vinte e nove são da classificação toxicológica I, trinta e um da classificação toxicológica II, sessenta e nove da classificação toxicológica III e vinte e seis da classificação toxicológica IV⁶.

O avanço da tecnologia impacta no aumento da produção e do consumo de soja e seus derivados, sendo necessário o desenvolvimento de métodos para controle destes produtos visando verificar o cumprimento da legislação a fim de prever o aparecimento de danos à saúde.

As análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos são muito dispendiosas principalmente no que se refere à utilização de materiais de referência para a quantificação e identificação dessas substâncias devido ao elevado número de agrotóxicos que devem ser investigados. Outro fator determinante para o elevado custo dessa análise é a necessidade de utilização de equipamentos sofisticados para atender aos limites requeridos e treinamento de técnicos especializados⁷.

Dificuldades existem no que se refere à quantidade de substâncias permitidas para o uso e controle de pragas na produção de alimentos, a diversidade das características físico-químicas dessas substâncias e o uso indevido de agrotóxicos não permitidos na legislação vigente.

Porém, são os resultados dessas análises o referencial para se avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos que chegam à mesa do consumidor e, também, serve como subsídio técnico-científico para as ações de vigilância no sentido de prevenir agravos à saúde da população devido à exposição a estas substâncias químicas.

Neste desafio os métodos de análise adequados são denominados multirresiduais que englobam a quantificação destes agrotóxicos em uma mesma corrida cromatográfica.

Pizzutti et al⁸ realizou seu estudo com cento e sessenta e nove agrotóxicos em grãos de soja utilizando o método multirresíduo Luke modificado o qual consiste em uma extração com acetona, éter de petróleo e diclorometano. Uma desvantagem do método é a utilização de grande quantidade de solvente.

O método multirresíduo denominado QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”) desenvolvido em 2003 por Anastassiades et al⁹ tem como vantagens o fato de ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Diversas modificações foram realizadas ao longo do tempo nesse método, com o objetivo de aumentar a aplicação para diversas matrizes, com altos percentuais de recuperação (>85 %) para substâncias de diferentes polaridades e volatilidades além da redução da quantidade de solventes orgânicos utilizados¹⁰.

Pizzutti et al¹¹ também realizou um estudo comparativo desses cento e sessenta e nove agrotóxicos analisados com o método multirresíduo Luke modificado⁸ e com uma diferente versão do método QuEChERS-acetato utilizando acetoneitrila acidificada, sulfato de magnésio anidro e acetato de sódio anidro, sem a etapa de “clean up”. Ambos os métodos demonstraram ser adequados para a utilização na matriz grãos de soja respeitando os critérios internacionais de qualidade. Os resultados encontrados mostraram um melhor desempenho do método QuEChERS-acetato nos critérios de exatidão e precisão em relação ao método Luke modificado.

No entanto, a etapa de “clean-up” é essencial para resultados satisfatórios, aumentando a eficiência do método em relação ao número de substâncias com

resultados adequados para os critérios de exatidão e precisão, promovendo robustez e confiabilidade. Outro fator determinante na utilização dessa etapa consiste na manutenção das condições de uso do equipamento, pois componentes não voláteis da matriz podem ficar aderidos no conjunto injetor-insersor e também na coluna cromatográfica alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções necessárias¹⁰.

O desenvolvimento e aprimoramento do QuEChERS para diferentes matrizes foi um marco na análise de resíduos de agrotóxicos pois agregou rapidez, facilidade de execução, economia, precisão e exatidão.

Informações de identificação, quantificação e confirmação da presença dos resíduos dessas substâncias são importantes para avaliação do risco real pelo qual a população consumidora está exposta. O avanço da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequencial subsidia esta necessidade elencando-se como a principal técnica utilizada para a análise de resíduos de agrotóxicos com o maior número de substâncias monitoradas.

Para a utilização de métodos não oficiais, ou seja, que não possuem uma comprovação de atendimento a requisitos para uma aplicação específica, é necessária a submissão do método a um processo de validação. Este processo é a comprovação, através de evidência objetiva, que os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido são atendidos¹².

A validação de métodos tem por objetivo confirmá-los como adequados para o uso pretendido. Este procedimento se aplica a métodos não normalizados, criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos ampliações e modificações de métodos normalizados¹³.

Os estudos de validação devem ser representativos e adequados para as substâncias de interesse, nos níveis delimitados pela legislação vigente, além de apresentar parâmetros aceitáveis de desempenho analítico que sejam capazes de garantir a confiabilidade dos resultados.

A seletividade, uma das etapas da validação, é a avaliação da presença de interferentes das substâncias de interesse na matriz da amostra a ser utilizada na validação. Os experimentos de avaliação de seletividade incluem ensaios com amostras com e sem o analito pesquisado¹³. Esta etapa do processo deve ser assegurada para não comprometer os outros parâmetros da validação a serem avaliados.

A construção de curvas analíticas é uma prática comum em laboratório, sendo este passo de extrema importância para a obtenção de resultados precisos e com boa exatidão¹⁴. De acordo com o trabalho a ser desenvolvido, uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado deve ser definida, sendo denominada faixa de trabalho. Essa faixa deve cobrir os níveis de concentração para os quais o ensaio será aplicado. Nas análises de multirresíduos, como no caso dos agrotóxicos, o valor da faixa de trabalho deve abranger o menor e o maior LMR permitido para o grupo de substâncias estudadas.

Para a quantificação do analito na amostra é necessário que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise¹⁵. Levando-se em consideração que a maioria dos métodos analíticos utiliza relações lineares para quantificação analítica, o exame de uma função de calibração para a linearidade é uma figura de desempenho importante na validação de um método analítico¹⁶. A faixa de trabalho, com uma resposta linear é denominada faixa linear.

Bazilio et al¹⁴ apresentam uma planilha eletrônica, intitulada “Planilha para Avaliação de Premissas” para cálculo e avaliação da linearidade de curvas analíticas. Os parâmetros de regressão podem ser estimados com o auxílio desta planilha. Outros resultados apresentados são a avaliação da homogeneidade dos resíduos da regressão, r , R^2 e a significância da regressão.

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, podendo haver acréscimo ou redução do sinal, sendo que a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Se o efeito matriz for significativo, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas¹³.

O processo de preparação dos padrões de calibração pode ser simplificado se os mesmos forem preparados com soluções simples do analito. Porém, é necessário que seja avaliada uma possível incompatibilidade da matriz analisada antes da sua utilização no preparo dos padrões¹⁷.

O efeito matriz pode variar de ocorrência e intensidade, porém algumas técnicas apresentam uma maior magnitude do efeito. Desta forma, se a técnica utilizada não é inerte ao efeito matriz é necessária a avaliação no processo de validação para a garantia de um

resultado fidedigno¹⁸.

Souza¹⁹ descreve um procedimento analítico para avaliação do efeito matriz, na qual uma curva analítica preparada, em solvente, é comparada através do teste *t* com uma curva preparada na presença da matriz da amostra. Quando as curvas analíticas preparadas não diferem estatisticamente entre si considera-se que o efeito matriz não é significativo.

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada e o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada. Um dos métodos de determinação destes limites é o método da relação sinal/ruído (S/R). O LD é a concentração que produziu um sinal 3 vezes maior do que o ruído da linha de base; e o LQ é a concentração que produziu um sinal 10 vezes maior do que o ruído da linha de base²⁰. Os limites de detecção e quantificação adequados para a análise multirresíduos de agrotóxicos têm valores inferiores aos LMR das substâncias estudadas.

Os estudos dos limites de detecção e quantificação feitos através da adição da solução de interesse na amostra branco avaliada no estudo de seletividade antes do processo de extração são denominados fortificação da amostra.

Outro parâmetro avaliado no processo de validação é a exatidão que é o grau de concordância existente entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro, sendo avaliada numericamente através da tendência. Esta é uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos podendo ser expressa como a recuperação analítica. Um dos processos utilizados para avaliação da tendência é a realização de ensaios de recuperação e os valores aceitáveis de recuperação estabelecidos pelo SANCO¹⁸ são 70-120 %.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em determinadas condições¹⁵, pode ser expressa de três formas: precisão intermediária, reprodutibilidade e repetitividade sendo que esta última é avaliada pelo coeficiente de variação (CV(%)) e/ou estimativa do desvio padrão relativo (DPR(%)).

Os ensaios de recuperação para avaliação da exatidão e precisão também são feitos através da fortificação de amostras em diferentes níveis de concentrações e replicatas de análise.

As condições de repetitividade podem ser

caracterizadas com: um mesmo procedimento de medição, um mesmo observador, um mesmo instrumento usado sob mesmas condições, um mesmo local e repetições no menor espaço de tempo possível¹³. Os valores aceitáveis de DPR(%) ou CV(%) definidos pelo SANCO¹⁸ são ≤ 20 %.

Em vista do aumento da utilização da soja e seus derivados na alimentação humana com ênfase em populações específicas como crianças, doentes, homens, mulheres e idosos, torna-se importante a avaliação destes alimentos quanto à contaminação de resíduos de agrotóxicos. Esta importância se refere à garantia do direito do consumidor às informações confiáveis a cerca dos alimentos comercializados.

Nesse contexto, o desenvolvimento desse estudo teve por finalidade validar o método QuEChERS-acetato^{9,21} para a análise de cento e quarenta e quatro resíduos de agrotóxicos em soja e no extrato solúvel de soja utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial - CLAE-EM/EM (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry - HPLC-MS/MS). O trabalho permitiu fornecer subsídios para avaliação da situação atual do consumo desses alimentos, disponíveis no mercado nacional em relação à presença destes resíduos.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes, solventes e soluções

Os reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento do trabalho foram o acetato de etila grau resíduo, o acetato de sódio grau para análise, a acetona grau resíduo e o ácido acético glacial grau cromatografia líquida, fornecidos pela TEDIA (EUA), a acetonitrila grau cromatografia líquida, o formato de amônio grau para análise e o sulfato de magnésio anidro grau para análise, fornecidos pela Sigma-Aldrich (EUA), a água tipo I, o detergente Extran[®] alcalino grau para análise, fornecido pela Merck (EUA), o metanol grau espectrometria de massas, fornecido pela J. T. Baker (EUA), o sorvente amina primária- secundária ("primary secondary amine" - PSA) grau para análise, fornecida pela Varian (EUA).

As soluções estoques dos agrotóxicos foram preparadas a partir dos padrões de agrotóxicos adquiridos do Dr. Ehrenstofer (Alemanha), com certificado de análise e grau de pureza superior a 95 %, diluídos em

acetato de etila e metanol dependendo da solubilidade de cada substância. As soluções estoque foram preparadas na concentração nominal de 100 µg.mL⁻¹, de acordo com a pureza definida no seu certificado e a aplicação pretendida. A partir dessas soluções foi preparada uma mistura na concentração nominal de 1 µg.mL⁻¹. Com essa mistura foram preparadas todas as soluções de trabalho nas seguintes concentrações nominais: 0,002; 0,004; 0,008; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1 e 0,2 µg.mL⁻¹.

Equipamentos e condições operacionais

Foi utilizado o cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Waters, EUA) modelo ACQUITY UPLC™ equipado com um sistema binário de bombas, injetor automático, degaseificador e forno para a coluna. A coluna utilizada para a separação cromatográfica foi de fase reversa Alltima™ C₁₈ com 5 µm de tamanho de partícula, 3,2 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento (Grace, EUA). A pré-coluna utilizada foi o cartucho SecurityGuard C₁₈ com 4 mm de diâmetro interno e 3 mm de comprimento (Phenomenex, EUA). O detector acoplado foi o detector de massas sequencial (Waters, EUA) modelo Quattro Premier XE™ equipado com uma fonte de ionização ElectroSpray Ionization

(ESI) (Z-Spray™) operando no modo positivo e estação de trabalho MassLynx™ Versão 4.1.

As condições operacionais utilizadas no cromatógrafo líquido foram o volume de injeção de 5 µL, a vazão da fase móvel constante de 0,3 mL.min⁻¹, a temperatura do forno da coluna constante de 40 °C, a temperatura do amostrador constante de 8 °C e o tempo total de corrida de 38 min. Na eluição por gradiente, as fases móveis utilizadas no estudo foram a fase denominada A: formato de amônio 5 x 10⁻³ mol.L⁻¹ com 10 % de metanol e a fase denominada B: metanol.

As condições operacionais utilizadas no espectrômetro de massas sequencial foram a voltagem do capilar de 0,98 kV, a temperatura da fonte ESI⁺ em 120 °C, a temperatura do gás de dessolvatação (N₂) de 400 °C, o fluxo do gás do cone (N₂) de 50 L.h⁻¹, o fluxo do gás de dessolvatação (N₂) de 800 L.h⁻¹ e a pressão do gás de colisão (Argônio) de 3,5 x 10⁻³ mbar.

Na Tabela 1 estão relacionadas as transições selecionadas para a quantificação e confirmação de cada substância selecionada para o estudo de acordo com as referências consultadas²²⁻³⁹. A letra “s” ao lado do nome das substâncias indica o uso permitido para a cultura da soja.

Outros equipamentos utilizados para a realização

Tabela 1. Condições analíticas para detecção e quantificação das substâncias selecionadas para o estudo

Nº	Substância	Transição Quantificação MRM		Transição Confirmação MRM		Espécie do Íon Precursor	Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão Quant. (eV)	Energia de Colisão Confirm. (eV)	Tr (min)	
1	3-Hidroxi-Carbofurano	237,9	>	162,8	237,9	>	180,8	[M + H] ⁺	18	15	10	8,40
2	Abamectina (s)	890,5	>	567,1	890,5	>	305,0	[M + NH ₄] ⁺	20	20	15	19,26
3	Acefato (s)	183,9	>	142,8	183,9	>	94,6	[M + H] ⁺	20	25	10	4,21
4	Acetamiprido (s)	223,1	>	125,9	223,1	>	90,0	[M + H] ⁺	35	35	22	8,66
5	Aldicarbe	190,5	>	115,6	190,5	>	88,7	[M + H] ⁺	12	14	5	10,56
6	Aldicarbe Sulfona	223,1	>	76,0	223,1	>	86,0	[M + H] ⁺	25	10	14	5,18
7	Aldicarbe Sulfóxido	207,0	>	88,9	207,0	>	131,9	[M + H] ⁺	20	14	10	4,69
8	Ametrina	228,1	>	186,0	228,1	>	96,0	[M + H] ⁺	30	25	20	14,99
9	Azaconazole	300,1	>	158,9	300,1	>	230,9	[M + H] ⁺	30	25	16	13,93
10	Azametifós	325,0	>	111,9	325,0	>	138,9	[M + H] ⁺	25	35	24	11,32
11	Azinfós-Etílico	345,5	>	131,8	345,5	>	159,8	[M + H] ⁺	15	18	10	15,80
12	Azinfós-Metilico	318,0	>	131,9	318,0	>	104,2	[M + H] ⁺	15	24	16	14,25
13	Azoxistrobina (s)	404,1	>	372,0	404,1	>	328,9	[M + H] ⁺	15	30	16	14,11
14	Benalaxil	325,9	>	147,9	325,9	>	293,9	[M + H] ⁺	20	20	20	16,56
15	Boscalida	343,0	>	307,0	343,0	>	271,2	[M + H] ⁺	30	30	20	14,69
16	Bromuconazol (s)	376,0	>	70,1	376,0	>	158,9	[M + H] ⁺	35	25	35	15,47

Continua

Cont. Tabela 1

Nº	Substância	Transição Quantificação MRM		Transição Confirmação MRM		Espécie do Íon Precursor	Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão Quant. (eV)	Energia de Colisão Confirm. (eV)	Tr (min)	
17	Bupirimate	316,8	>	107,6	316,8	>	271,7	[M + H] ⁺	35	25	20	16,18
18	Bupropenzina (s)	306,1	>	201,0	306,1	>	115,9	[M + H] ⁺	20	16	12	17,95
19	Butocarboxim Sulfóxido	207,0	>	88,0	207,0	>	75,0	[M + H] ⁺	20	10	10	4,42
20	Cadusafós	271,4	>	159,0	271,4	>	215,0	[M + H] ⁺	25	15	10	17,27
21	Carbaril	219,0	>	144,9	219,0	>	126,9	[M + NH4] ⁺	10	35	16	12,45
22	Carbendazim (s)	192,0	>	159,9	192,0	>	132,0	[M + H] ⁺	25	30	16	10,23
23	Carbofurano	222,1	>	122,9	222,1	>	164,9	[M + H] ⁺	25	25	12	11,82
24	Carbossulfano (s)	381,0	>	160,0	381,0	>	118,0	[M + H] ⁺	30	20	15	20,22
25	Ciazofamida	324,6	>	107,6	324,6	>	260,7	[M + H] ⁺	20	15	10	15,71
26	Cimoxanil	199,0	>	127,9	199,0	>	110,9	[M + H] ⁺	20	18	10	9,51
27	Ciproconazol (s)	292,1	>	70,1	292,1	>	124,9	[M + H] ⁺	25	18	30	15,29
28	Ciprodinil	226,1	>	92,9	226,1	>	107,9	[M + H] ⁺	45	35	25	17,08
29	Ciromazina	166,8	>	60,0	166,8	>	124,8	[M + H] ⁺	30	18	18	5,14
30	Clofentezina	303,0	>	137,9	303,0	>	101,9	[M + H] ⁺	20	35	14	17,27
31	Clorbromuron	294,5	>	205,6	294,5	>	181,6	[M + H] ⁺	25	20	20	15,18
32	Clorfenvinfós	359,0	>	98,8	359,0	>	126,9	[M + H] ⁺	25	24	22	16,56
33	Clorpirifós (s)	349,5	>	197,7	349,5	>	96,7	[M + H] ⁺	20	30	21	18,52
34	Clotianidina (s)	250,0	>	168,9	250,0	>	131,8	[M + H] ⁺	20	14	14	7,96
35	Coumafós	363,0	>	307,0	363,0	>	289,0	[M + H] ⁺	26	16	24	16,66
36	Cresoxim-Metílico (s)	313,7	>	266,7	313,7	>	115,7	[M + H] ⁺	15	15	5	16,37
37	Demeton-S-Metílico	230,7	>	88,9	230,7	>	61,1	[M + H] ⁺	12	30	10	12,11
38	Desmedifam	318,2	>	181,9	318,2	>	135,9	[M + NH4] ⁺	20	30	14	13,61
39	Diazinona	305,1	>	169,0	305,1	>	96,9	[M + H] ⁺	25	35	22	16,75
40	Diclorvós	220,9	>	126,9	220,9	>	108,8	[M + H] ⁺	25	18	18	11,85
41	Difenoconazol (s)	406,1	>	250,9	406,1	>	187,8	[M + H] ⁺	35	40	25	17,16
42	Dimetoato	230,0	>	198,8	230,0	>	124,8	[M + H] ⁺	20	22	10	8,78
43	Dimetomorfe	388,1	>	300,9	388,1	>	165,0	[M + H] ⁺	35	30	20	14,93
44	Diniconazol	326,1	>	70,1	326,1	>	158,9	[M + H] ⁺	35	25	30	17,19
45	Dissulfotom	274,7	>	61,0	274,7	>	88,8	[M + H] ⁺	12	35	10	17,27
46	Diurum (s)	233,0	>	72,0	233,0	>	159,9	[M + H] ⁺	25	18	25	13,92
47	Dodemorfe	282,3	>	115,9	282,3	>	97,9	[M + H] ⁺	40	29	21	24,60
48	Epoconazol (s)	330,1	>	120,9	330,1	>	122,9	[M + H] ⁺	35	25	20	15,80
49	Espinosade A (s)	732,6	>	142,0	732,6	>	98,1	[M + H] ⁺	50	59	31	22,60
	Espinosade D (s)	746,5	>	142,0	746,5	>	98,1	[M + H] ⁺	45	55	31	23,78
50	Etiofencarbe-Sulfona	275,1	>	106,9	275,1	>	201,0	[M + NH4] ⁺	15	22	10	7,17
51	Etiofencarbe-Sulfóxido	242,1	>	106,9	242,1	>	184,9	[M + H] ⁺	15	25	10	7,35
52	Etiona	384,6	>	198,7	384,6	>	142,7	[M + H] ⁺	20	25	10	18,01
53	Etiprole	414,1	>	350,9	414,1	>	396,9	[M + NH4] [±]	15	25	9	14,38
54	Etirimol	210,1	>	97,9	210,1	>	140,0	[M + H] ⁺	40	25	22	13,87

Continua

Cont. Tabela 1

Nº	Substância	Transição Quantificação MRM		Transição Confirmação MRM		Espécie do Íon Precursor		Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão Quant. (eV)	Energia de Colisão Confirm. (eV)	Tr (min)
55	Etoprofós	243,0	>	131,0	243,0	>	97,0	[M + H] ⁺	25	30	20	15,88
56	Etrinfós	293,0	>	265,0	293,0	>	125,0	[M + H] ⁺	35	25	15	16,75
57	Famoxadona	391,7	>	330,8	391,7	>	237,7	[M + NH ₄] ⁺	15	18	10	16,28
58	Fenamidona	312,1	>	92,0	312,1	>	236,1	[M + H] ⁺	25	25	14	14,57
59	Fenamifós	304,1	>	216,9	304,1	>	201,9	[M + H] ⁺	30	35	24	15,91
60	Fenarimol (s)	330,6	>	267,6	330,6	>	80,8	[M + H] ⁺	30	25	25	15,63
61	Fenazaquina	307,2	>	57,2	307,2	>	161,0	[M + H] ⁺	30	25	19	20,87
62	Fenbuconazole	336,8	>	69,8	336,8	>	124,7	[M + H] ⁺	30	20	25	15,71
63	Fenhexamide	301,9	>	96,8	301,9	>	55,0	[M + H] ⁺	35	40	25	15,47
64	Fenoxicarbe	302,1	>	88,0	302,1	>	115,9	[M + H] ⁺	20	18	12	15,99
65	Fenpiroximato	422,3	>	366,1	422,3	>	134,9	[M + H] ⁺	30	17	31	19,17
66	Fenpropimorfe	304,2	>	147,0	304,2	>	130,0	[M + H] ⁺	45	25	31	21,71
67	Fentiona	279,0	>	168,9	279,0	>	104,9	[M + H] ⁺	25	25	18	16,54
68	Fentiona Sulfóxido	294,7	>	108,9	294,7	>	279,7	[M + H] ⁺	30	30	15	12,11
69	Fluazifope-P-Butílico (s)	384,0	>	282,0	384,0	>	328,0	[M + H] ⁺	25	25	20	17,51
70	Flufenacete	364,1	>	193,9	364,1	>	151,9	[M + H] ⁺	20	18	10	15,47
71	Fluquinconazol (s)	375,7	>	348,8	375,7	>	107,9	[M + H] ⁺	35	40	20	15,55
72	Flusilazole	316,1	>	247,0	316,1	>	165,0	[M + H] ⁺	35	25	18	15,91
73	Flutriafol (s)	302,1	>	70,1	302,1	>	122,9	[M + H] ⁺	25	16	30	13,10
74	Fosalona	368,0	>	182,0	368,0	>	111,0	[M + H] ⁺	25	45	15	16,84
75	Fosmete	317,9	>	159,9	317,9	>	132,9	[M + H] ⁺	20	40	20	14,25
76	Fostiazato	284,1	>	103,9	284,1	>	227,8	[M + H] ⁺	20	22	10	12,79
77	Furatiocarbe	383,2	>	194,9	383,2	>	252,0	[M + H] ⁺	25	18	12	17,69
78	Hexitiazoxi	352,8	>	227,8	352,8	>	167,8	[M + H] ⁺	20	25	15	18,43
79	Imazalil	297,1	>	69,1	297,1	>	158,9	[M + H] ⁺	35	18	24	16,75
80	Imidacloprido (s)	256,1	>	174,9	256,1	>	209,0	[M + H] ⁺	25	20	12	7,65
81	Indoxacarbe	528,1	>	202,9	528,1	>	217,9	[M + H] ⁺	30	40	25	16,75
82	Iprovalicarbe	321,2	>	118,9	321,2	>	203,0	[M + H] ⁺	20	18	10	15,38
83	Isoprotilolane	291,1	>	188,8	291,1	>	230,9	[M + H] ⁺	20	22	12	15,08
84	Isoxaflutol	359,5	>	250,6	359,5	>	220,0	[M + H] ⁺	20	35	15	13,34
85	Isoxationa	313,7	>	104,7	313,7	>	285,5	[M + H] ⁺	20	15	10	16,83
86	Linuron (s)	249,0	>	159,9	249,0	>	181,9	[M + H] ⁺	20	20	16	14,87
87	Malationa	331,0	>	126,9	331,0	>	98,9	[M + H] ⁺	20	25	12	14,93
88	Mefenacete	299,1	>	147,9	299,1	>	119,9	[M + H] ⁺	20	25	16	15,38
89	Mefosfolan	270,0	>	139,8	270,0	>	195,9	[M + H] ⁺	35	25	14	11,41
90	Mepronil	270,1	>	118,9	270,1	>	91,0	[M + H] ⁺	30	40	25	15,08
91	Metalaxil	280,1	>	220,0	280,1	>	192,0	[M + H] ⁺	25	18	12	13,44
92	Metamidofós (s)	141,9	>	93,9	141,9	>	124,8	[M + H] ⁺	30	12	14	3,94
93	Metconazol (s)	320,1	>	70,1	320,1	>	124,8	[M + H] ⁺	35	18	40	16,83

Continua

Cont. Tabela 1

Nº	Substância	Transição Quantificação MRM		Transição Confirmação MRM		Espécie do Íon Precursor		Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão Quant. (eV)	Energia de Colisão Confirm. (eV)	Tr (min)
94	Metidationa	303,0	>	84,9	303,0	>	144,8	[M + H] ⁺	20	22	12	14,05
95	Metiocarbe	226,1	>	121,0	226,1	>	168,9	[M + H] ⁺	20	20	10	14,82
96	Metiocarbe Sulfona	275,1	>	121,9	275,1	>	200,9	[M + NH ₄] ⁺	15	24	14	8,84
97	Metiocarbe Sulfoxido	242,1	>	184,9	242,1	>	121,9	[M + H] ⁺	25	30	14	7,91
98	Metobromuron	258,5	>	147,7	258,5	>	169,6	[M + H] ⁺	20	15	20	13,44
99	Metomil (s)	162,9	>	105,9	162,9	>	88,0	[M + H] ⁺	15	10	10	6,25
100	Metoxifenoazida (s)	368,8	>	148,7	368,8	>	312,8	[M + H] ⁺	15	15	10	14,93
101	Mevinfós	225,0	>	193,0	225,0	>	127,0	[M + H] ⁺	20	15	10	8,42
102	Miclobutanil (s)	289,1	>	70,1	289,1	>	124,9	[M + H] ⁺	30	18	30	15,08
103	Monocrotofos	224,0	>	126,8	224,0	>	97,9	[M + H] ⁺	20	14	16	6,52
104	Ometoato	214,0	>	124,8	214,0	>	182,8	[M + H] ⁺	25	22	10	4,52
105	Oxadixil	279,1	>	219,0	279,1	>	132,3	[M + H] ⁺	20	25	12	10,51
106	Oxamil-Oxima	162,9	>	72,0	162,9	>	89,9	[M + H] ⁺	20	12	16	4,62
107	Paclobutrazol	294,1	>	70,0	294,1	>	124,9	[M + H] ⁺	30	18	35	14,92
108	Pencicuirom	329,1	>	124,9	329,1	>	218,0	[M + H] ⁺	30	30	16	17,01
109	Picoxistrobina (s)	368,1	>	144,9	368,1	>	204,9	[M + H] ⁺	15	25	10	15,88
110	Pimetrozina	218,1	>	104,9	218,1	>	78,3	[M + H] ⁺	30	35	18	6,07
111	Butóxido de Piperonila	356,3	>	176,9	356,3	>	119,0	[M + NH ₄] ⁺	20	37	11	18,20
112	Piraclostrobina (s)	388,1	>	163,0	388,1	>	193,9	[M + H] ⁺	25	25	12	16,75
113	Pirazofós	374,0	>	222,0	374,0	>	194,0	[M + H] ⁺	40	35	20	17,08
114	Piridabem	365,2	>	147,0	365,2	>	309,0	[M + H] ⁺	25	27	13	19,59
115	Piridafentiona	341,1	>	188,9	341,1	>	92,0	[M + H] ⁺	35	40	25	15,18
116	Pirifenoxi	295,1	>	92,9	295,1	>	66,1	[M + H] ⁺	35	40	22	16,07
117	Pirimetanil	200,1	>	106,9	200,1	>	82,0	[M + H] ⁺	45	25	25	15,38
118	Pirimicarbe	239,1	>	72,0	239,1	>	182,0	[M + H] ⁺	30	20	16	13,20
119	Pirimifós-Etílico	333,5	>	197,7	333,5	>	305,5	[M + H] ⁺	35	25	18	18,11
120	Pirimifós-Metílico	306,1	>	107,9	306,1	>	67,1	[M + H] ⁺	30	40	30	17,08
121	Piriproxifem (s)	322,2	>	95,9	322,2	>	184,9	[M + H] ⁺	25	15	23	18,38
122	Procloraz	376,0	>	308,0	376,0	>	266,0	[M + H] ⁺	20	15	15	17,01
123	Profenofós (s)	374,8	>	304,6	374,8	>	346,7	[M + H] ⁺	25	20	15	17,82
124	Propargito	368,3	>	231,1	368,3	>	175,0	[M + NH ₄] ⁺	20	15	11	18,43
125	Propiconazol (s)	342,1	>	158,9	342,1	>	69,1	[M + H] ⁺	35	20	30	16,66
126	Propizamida	255,6	>	189,6	255,6	>	172,6	[M + H] ⁺	25	25	15	15,29
127	Propoxur	210,1	>	110,9	210,1	>	92,9	[M + H] ⁺	15	25	12	11,73
128	Quinalfós	298,8	>	162,8	298,8	>	146,8	[M + H] ⁺	25	20	25	16,56
129	Tebuconazol (s)	307,8	>	124,7	307,8	>	69,9	[M + H] ⁺	30	20	35	16,37
130	Tebuconazole (s)	352,8	>	132,9	352,8	>	296,8	[M + H] ⁺	10	20	10	15,88
131	Tebuconazole (s)	334,2	>	116,9	334,2	>	144,9	[M + H] ⁺	45	35	25	17,88
132	Terbufós	289,0	>	103,0	289,0	>	57,0	[M + H] ⁺	10	10	10	18,01
133	Tetraconazol (s)	372,0	>	158,9	372,0	>	70,1	[M + H] ⁺	35	22	35	15,38

Continua

Cont. Tabela 1

Nº	Substância	Transição Quantificação MRM		Transição Confirmação MRM		Espécie do Íon Precursor	Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão Quant. (eV)	Energia de Colisão Confirm. (eV)	Tr (min)	
134	Tiabendazol (s)	202,0	>	174,9	202,0	>	130,9	[M + H] ⁺	45	30	25	12,15
135	Tiacloprido (s)		>	125,8	253,0	>	90,0	[M + H] ⁺	35	40	20	9,57
136	Tiametoxam (s)	292,1	>	210,9	292,1	>	180,9	[M + H] ⁺	20	22	12	6,43
137	Tiodicarbe (s)	355,0	>	87,9	355,0	>	107,9	[M + H] ⁺	20	16	16	12,59
138	Tiofanox-Sulfona	268,1	>	76,0	268,1	>	57,2	[M + NH ₄] ⁺	10	12	10	8,02
139	Triazofós (s)	314,1	>	161,9	314,1	>	118,9	[M + H] ⁺	25	35	18	15,29
140	Triclorfom	256,9	>	108,8	256,9	>	126,8	[M + H] ⁺	25	20	18	8,73
141	Trifloxistrobina (s)	409,2	>	185,9	409,2	>	145,0	[M + H] ⁺	25	40	14	17,01
142	Triflumizol	346,1	>	278,0	346,1	>	73,1	[M + H] ⁺	15	18	10	17,43
143	Vamidotiona	287,7	>	145,8	287,7	>	117,5	[M + H] ⁺	20	25	12	8,20
144	Zoxamida	336,0	>	186,9	336,0	>	158,9	[M + H] ⁺	30	40	25	16,75

do trabalho foram: balanças analíticas modelos XP205 e AG245 (precisão de 5 casas decimais) fabricante Mettler Toledo (EUA), agitador modelo MS3 Digital e processador de sólidos modelo M20 fabricante IKA (EUA), banho ultrassom modelo 2510RMTM fabricante Branson Ultrasonics (EUA), centrífuga modelo T16 fabricante Beckman, liquidificador industrial modelo 36BL55 fabricante Ametek (EUA) e unidade de evaporação com fluxo de nitrogênio modelo Reacti Therm III Reacti Vap III fabricante Thermo Fisher Cientific (EUA).

Os gases utilizados para o estudo foram o nitrogênio e o argônio com pureza maior que 99,995 % e 99,999 %, respectivamente.

Método de extração QuEChERS-acetato

O método multirresíduo QuEChERS-acetato foi utilizado para a validação nas matrizes soja e extrato solúvel de soja adquiridas em mercado local^{19,21}.

Para a matriz soja foi feita a extração de 2 g de amostra com 3 mL de água adicionados à 15 mL de uma solução de acetonitrila com 1 % de ácido acético glacial. Após agitação foi adicionado 6 g de sulfato de magnésio anidro e 1,5 g de acetato de sódio e novamente agitado seguido de uma centrifugação (3000 RPM, 5 min, 20 °C). Em uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi adicionado 100 mg de sulfato de magnésio anidro e 50 mg de PSA sendo promovidas uma nova agitação e centrifugação (3000 RPM, 5 min, 20 °C). Após este procedimento 1 mL do sobrenadante foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio e o resíduo foi reconstituído com metanol. Esta solução foi filtrada em filtro para

solventes orgânicos com tamanho de partícula 0,22 µm e injetado no cromatógrafo líquido com detector por massas sequencial.

Para a matriz extrato solúvel de soja o processo se inicia com a extração de 15 g de amostra direto com a solução de acetonitrila com 1 % de ácido acético. O restante do procedimento segue a mesma sequência anteriormente descrita.

Validação do método QuEChERS-acetato

Os parâmetros avaliados no processo de validação do método foram: seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade), limite de detecção e de quantificação.

A seletividade foi verificada analisando-se uma amostra de soja e outra de extrato solúvel de soja. Ambas foram avaliadas quanto à presença de interferentes das substâncias selecionadas para o estudo. Foram preparadas soluções em metanol nas concentrações nominais anteriormente descritas para determinação da faixa de trabalho das curvas analíticas. Foram evaporados 1 mL do extrato branco da soja e do extrato solúvel de soja e adicionados aos resíduos da evaporação os pontos das curvas analíticas sendo assim feita a avaliação das curvas analíticas nas duas matrizes. Para determinação da faixa de trabalho linear das curvas analíticas, foram considerados valores adequados de $R^2 \geq 0,95$ e $r \geq 0,98$, regressão linear significativa ($p < 0,001$) e homogeneidade dos resíduos ($\alpha = 0,05$). O efeito matriz foi calculado considerando-se as curvas preparadas em metanol e nas matrizes soja e extrato solúvel de soja. Foi utilizada

a planilha desenvolvida por Bazilio et al¹⁴ para todos os cálculos de linearidade das curvas analíticas.

Para a avaliação da exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade) foram utilizados ensaios de fortificação com as amostras avaliadas anteriormente no parâmetro seletividade. A amostra de soja foi fortificada em dois níveis nas concentrações nominais de 0,01 e 0,2 mg.kg⁻¹ com quatro replicatas de cada nível. Para a amostra de extrato solúvel de soja também foram fortificados dois níveis, porém com concentrações nominais de 0,01 e 0,03 mg.kg⁻¹ em quatro replicatas de cada nível. Foram pesadas oito amostras de soja com duas gramas. Essas amostras foram separadas em dois grupos de quatro amostras. No primeiro grupo foram adicionados a cada uma das quatro amostras uma solução de fortificação de concentração nominal de 0,02 µg.mL⁻¹ correspondendo ao 1º nível de fortificação com quatro replicatas na concentração nominal final de 0,01 mg.kg⁻¹. Para obtenção desse nível de fortificação a alíquota de evaporação foi de 2 mL. No segundo grupo de amostras foram adicionados a cada uma das quatro amostras uma solução de fortificação de 0,2 µg.mL⁻¹ correspondendo ao 2º nível de fortificação com quatro replicatas na concentração nominal final de 0,2 mg.kg⁻¹. Para obtenção desse nível de fortificação o volume de acetonitrila adicionado foi de 10 mL. Para o extrato solúvel de soja foram pesadas também oito amostras de soja com quinze gramas. Essas amostras foram separadas em dois grupos de quatro amostras. No primeiro grupo foram adicionados a cada uma das quatro amostras uma solução de fortificação de concentração nominal de 0,02 µg.mL⁻¹ correspondendo ao 1º nível de fortificação com quatro replicatas na concentração nominal final de 0,01 mg.kg⁻¹. No segundo grupo de amostras foram adicionados a cada uma das quatro amostras uma solução de fortificação de 0,2 µg.mL⁻¹ correspondendo ao 2º nível de fortificação com quatro replicatas na concentração nominal final de 0,03 mg.kg⁻¹. Os critérios de aceitação para esses parâmetros de desempenho, definidos pelo SANCO¹⁸ são limites de 70 a 120 % de recuperação e valores aceitáveis de DPR(%) ou CV(%) ≤ 20 %. O limite de quantificação foi definido como sendo a menor concentração adicionada na matriz que obteve resultado satisfatório para os parâmetros de linearidade, exatidão, precisão e uma relação S/R maior que 10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação das curvas analíticas

Das cento e quarenta e quatro substâncias estudadas, quatro delas (benalaxil, dodemorfe, espinosade e quinalfós) apresentaram resultados insatisfatórios de acordo com a avaliação dos critérios estabelecidos nas condições analíticas do trabalho. O mesmo comportamento das substâncias nas curvas preparadas em solvente e nas preparadas na matriz soja foi observado. Para a curva preparada na matriz extrato solúvel de soja três substâncias (dissulfotom, fentiona e pirifenoxi) apresentaram resultados insatisfatórios além das quatro já observadas no estudo da matriz soja.

As substâncias com resultados satisfatórios para todos os critérios estabelecidos representaram 97 % (140) da totalidade para a soja e 95 % (137) para o extrato solúvel de soja.

As curvas analíticas estudadas demonstraram ser adequadas para o estudo de acordo com os critérios estabelecidos. Além da quantificação com curvas o documento do SANCO¹⁸ também permite a quantificação através de um cálculo pontual, ou seja, com apenas um ponto da curva, os critérios estabelecidos pelo documento são: o ponto pode ter uma concentração com uma variação permitida de ± 20 % em relação à concentração da substância na amostra se o LMR é excedido, quando o LMR não é excedido essa variação pode ser de até ± 50 %.

Além disso, a quantificação pontual pode fornecer resultados mais fidedignos do que a quantificação com a curva analítica se a resposta do detector é variável com o tempo¹⁸.

Quanto ao efeito matriz, foi observado que em trinta e cinco (24 %) das substâncias possuíam tal interferência para a matriz soja e cinco (3 %) para a matriz extrato solúvel de soja.

Avaliação da exatidão, precisão e definição do limite de detecção e quantificação

Na matriz soja, das cento e quarenta e quatro substâncias estudadas, dezenove agrotóxicos (abamectina, carbossulfano, ciproconazol, ciromazina, clorfenvinfós, clorpirifós, diclorvós, dissulfotom, diurom, espinosade, fenazaquina, fentiona, fosmete, isoxaflutol, linuron, metamidofós, metomil, pirifenoxi e tiobencarbe) representando 13 % do total das substâncias selecionadas para o estudo obtiveram resultados insatisfatórios de acordo com os critérios estabelecidos para os ensaios

de exatidão e de precisão, dentre eles o ciproconazol e o espinosade que são permitidos para o uso na cultura. Para o extrato solúvel de soja quinze substâncias (abamectina, diclorvós, diuron, epoxiconazol, espinosade, etirimol, famoxadona, fenpiroximato, fentiona, fosmete, imazalil, isoprothiolana, isoxaflutol, pirimifós-etílico e terbufós) representando 10 % do total das substâncias selecionadas para o estudo tiveram o mesmo comportamento sendo que quatro delas (abamectina, diuron, epoxiconazol e espinosade) são permitidas para o uso na cultura da soja. Do total das cento e quarenta e quatro substâncias estudadas, setenta e cinco substâncias (52 % do total)

tiveram resultados satisfatórios para ambas as matrizes estudadas. Cinco (3,5 % do total) apenas para a matriz soja e quarenta e quatro (31 % do total) apenas para a matriz extrato solúvel de soja. Para a matriz soja oitenta substâncias (55 % do total) tiveram resultados satisfatórios enquanto que para a matriz extrato solúvel de soja o total foi de cento e dezenove substâncias (83 % do total). Estes resultados estão descritos nas Tabelas 2 e 3. A letra “s” ao lado do nome das substâncias indica o uso permitido para a cultura da soja.

Para as substâncias presentes nas Tabelas 4 e 5 a avaliação de exatidão e de precisão foi realizada

Tabela 2. Resultados da avaliação da exatidão, precisão e limite de detecção e quantificação para a matriz soja

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão - Repetitividade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Aldicarbe	90	89	17	4	0,010
Aldicarbe Sulfona	80	89	12	4	0,010
Aldicarbe Sulfóxido	79	87	3	4	0,010
Ametrina	90	83	9	3	0,010
Azaconazole	88	83	3	7	0,010
Azinfós-Metílico	79	92	8	9	0,010
Azoxistrobina (s)	90	95	1	6	0,010
Boscalida	77	83	12	12	0,010
Buprofenzina (s)	80	88	4	8	0,010
Butocarboxim Sulfóxido	83	89	3	4	0,010
Cadusafós	88	94	15	3	0,010
Carbaril	87	95	5	3	0,010
Carbendazim (s)	76	89	5	4	0,010
Carbofurano	84	89	1	3	0,010
Ciazofamida	86	102	14	5	0,011
Cimoxanil	78	82	8	7	0,010
Ciprodinil	101	90	1	1	0,010
Clotianidina (s)	83	108	2	5	0,010
Diazinona	118	92	5	2	0,014
Dimetomorfe	103	81	3	4	0,010
Diniconazol	89	79	3	9	0,012
Etiofencarbe-Sulfona	78	94	9	5	0,010
Etiofencarbe-Sulfóxido	77	90	3	4	0,008
Etiona	82	82	4	10	0,010
Etiprole	77	85	8	7	0,010
Fenamidona	77	94	5	4	0,010
Fenhexamide	86	70	8	8	0,010
Fenpiroximato	70	70	3	12	0,010

Cont. Tabela 2

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão - Repetitividade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Fenpropimorfe	81	83	1	5	0,010
Fentiona Sulfóxido	83	89	6	5	0,010
Flufenacete	85	90	1	7	0,010
Fluquinconazol (s)	75	89	10	10	0,010
Flusilazole	89	87	5	3	0,011
Flutriafol (s)	73	92	5	4	0,010
Fosalona	106	100	3	8	0,010
Fostiazato	83	93	3	3	0,010
Furatiocarbe	110	86	5	6	0,010
Hexitiazoxi	86	70	5	7	0,010
Imazalil	76	70	16	9	0,010
Imidacloprido (s)	86	93	6	3	0,010
Iprovalicarbe	88	113	7	9	0,010
Isoprothiolane	80	97	10	7	0,010
Isoxationa	91	88	5	8	0,010
Malationa	106	92	4	8	0,010
Mefenacete	90	96	2	7	0,010
Mefosfolan	89	93	3	4	0,011
Mepronil	118	95	3	4	0,010
Metalaxil	86	102	1	4	0,010
Metconazol (s)	83	90	6	4	0,010
Metiocarbe	78	87	5	5	0,010
Metobromuron	82	95	8	3	0,010
Ometoato	78	84	4	3	0,010
Oxadixil	95	100	2	1	0,010
Oxamil-Oxima	71	90	5	5	0,010
Pencicuirom	84	97	2	4	0,010
Butóxido de Piperonila	82	73	3	9	0,010
Piraclostrobina (s)	119	95	4	5	0,010
Pirazofós	110	76	4	2	0,010
Piridabem	83	75	1	7	0,010
Piridafentiona	107	90	1	2	0,010
Pirimetanil	89	91	13	4	0,005
Pirimicarbe	87	96	3	3	0,010
Pirimifós-Etílico	85	81	10	10	0,010
Pirimifós-Metílico	99	98	2	6	0,010
Piriproxifem (s)	73	76	4	12	0,010
Procloraz	90	86	3	9	0,010
Profenofós (s)	77	71	5	6	0,010
Propargito	80	83	5	8	0,009
Propiconazol (s)	97	88	3	7	0,010

Continua

Cont. Tabela 2

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão - Repetitividade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Propoxur	88	85	3	9	0,011
Tebufenpirade	74	75	4	13	0,010
Terbufós	87	93	4	13	0,010
Tetraconazol (s)	86	91	5	8	0,005
Tiabendazol (s)	74	75	9	5	0,010
Tiacloprido (s)	93	94	7	7	0,010
Tiofanox-Sulfona	81	98	3	4	0,010
Triazofós (s)	114	90	3	6	0,010
Trifloxistrobina (s)	107	92	2	4	0,010
Triflumizol	93	88	2	9	0,011
Vamidotiona	81	94	6	3	0,020

Tabela 3. Resultados da avaliação da exatidão, precisão e limite de detecção e quantificação para a matriz extrato solúvel de soja

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão Repetitividade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
3-Hidroxi-Carbofurano	96	85	3	6	0,012
Acefato (s)	90	78	2	8	0,014
Acetamiprido (s)	99	119	2	7	0,013
Aldicarbe	102	88	2	10	0,013
Aldicarbe Sulfona	99	82	1	5	0,013
Aldicarbe Sulfóxido	96	84	3	8	0,013
Ametrina	92	92	10	7	0,013
Azaconazole	97	101	2	12	0,013
Azametifós	94	86	1	6	0,013
Azinfós-Etílico	114	96	5	13	0,013
Azinfós-Metílico	102	88	3	8	0,013
Azoxistrobina (s)	102	91	1	6	0,013
Boscalida	94	84	5	11	0,013
Bromuconazol (s)	97	87	6	15	0,013
Bupirimate	111	101	4	10	0,013
Buprofenzina (s)	94	82	2	5	0,013
Butocarboxim Sulfóxido	91	80	4	7	0,013
Cadusafós	88	78	4	8	0,013
Carbaril	101	91	2	4	0,013
Carbendazim (s)	95	81	2	6	0,013
Carbofurano	100	88	2	6	0,013
Ciazofamida	95	108	4	5	0,014
Cimoxanil	101	89	7	7	0,013
Ciproconazol (s)	112	93	6	12	0,013

Continua

Cont. Tabela 3

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão Repetibilidade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Ciprodinil	86	84	6	4	0,013
Ciromazina	79	70	2	6	0,014
Clofentezina	100	88	18	16	0,013
Clorbromuron	103	84	7	12	0,013
Clorpirifós (s)	88	76	9	12	0,013
Clotianidina (s)	100	93	4	5	0,013
Coumafós	84	84	5	11	0,013
Demeton-S-Metilico	91	83	3	5	0,012
Desmedifam	100	96	2	6	0,013
Diazinona	89	75	2	8	0,018
Difenoconazol (s)	102	84	2	3	0,013
Dimetoato	92	112	1	7	0,013
Dimetomorfe	104	81	4	8	0,013
Diniconazol	96	83	8	4	0,015
Etiofencarbe-Sulfona	102	87	2	7	0,013
Etiofencarbe-Sulfoxido	96	84	2	9	0,010
Etiona	99	81	2	4	0,013
Etiprole	105	82	6	5	0,013
Etoprofós	92	88	10	11	0,013
Etrinifós	75	80	4	7	0,012
Fenamidona	100	93	2	7	0,013
Fenamifós	102	89	2	5	0,013
Fenazaquina	91	92	4	7	0,013
Fenbuconazole	109	116	2	8	0,013
Fenhexamide	106	80	6	7	0,013
Fenoxicarbe	102	91	6	6	0,013
Fenpropimorfe	97	86	3	6	0,013
Fentiona Sulfoxido	104	98	1	3	0,013
Fluazifope-P-Butílico (s)	98	92	2	5	0,013
Flufenacete	89	90	3	8	0,013
Fluquinconazol (s)	95	71	15	9	0,013
Flusilazole	116	94	7	8	0,014
Flutriafol (s)	99	93	2	6	0,013
Fosalona	103	99	4	7	0,013
Fostiazato	100	89	3	5	0,013
Furatiocarbe	97	84	4	5	0,013
Hexitiazoxi	96	81	8	4	0,013
Imidacloprido (s)	95	95	3	10	0,013
Indoxacarbe	112	88	9	11	0,013
Iprovalicarbe	103	91	2	5	0,013

Continua

Cont. Tabela 3

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão Repetibilidade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Isoxationa	92	80	10	4	0,014
Linuron (s)	100	92	11	13	0,013
Malationa	102	99	4	6	0,013
Mefenacete	99	90	3	10	0,013
Mefosfolan	100	85	2	6	0,014
Mepronil	108	96	7	3	0,014
Metalaxil	103	90	2	8	0,013
Metamidofós (s)	70	70	3	5	0,015
Metconazol (s)	103	78	3	2	0,013
Metidationa	102	93	2	10	0,013
Metiocarbe	103	89	2	5	0,013
Metiocarbe Sulfona	95	93	2	6	0,010
Metiocarbe Sulfóxido	97	82	3	7	0,013
Metobromuron	106	100	2	5	0,013
Metomil (s)	100	87	2	7	0,013
Metoxifenoazida (s)	104	97	2	6	0,013
Mevinfós	81	82	6	7	0,013
Miclobutanil (s)	88	109	3	6	0,013
Monocrotofos	96	87	4	8	0,013
Ometoato	95	81	2	7	0,013
Oxadixil	99	86	2	6	0,013
Oxamil-Oxima	95	90	2	8	0,013
Paclobutrazol	108	85	1	7	0,015
Pencicrom	97	87	2	4	0,013
Pimetrozina	89	82	1	6	0,014
Butóxido de Piperonila	98	82	2	2	0,014
Piraclostrobina (s)	101	81	2	5	0,013
Pirazofós	94	94	4	2	0,013
Piridabem	90	82	6	5	0,013
Piridafentona	80	94	11	3	0,013
Pirimetanil	97	84	1	1	0,006
Pirimicarbe	97	92	3	6	0,013
Pirimifós-Metilico	108	81	3	5	0,013
Piriproxifem (s)	94	76	2	3	0,013
Procloraz	107	82	11	8	0,013
Profenofós (s)	97	78	5	5	0,013
Propargito	96	81	2	10	0,012
Propiconazol (s)	95	91	4	4	0,013
Propizamida	114	87	9	12	0,013
Propoxur	98	91	3	8	0,014

Continua

Cont. Tabela 3

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão Repetibilidade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Tebuconazol (s)	93	97	13	9	0,013
Tebufenozide (s)	104	94	8	5	0,013
Tebufenpirade	99	76	3	5	0,014
Tetraconazol (s)	96	94	2	2	0,006
Tiabendazol (s)	99	90	1	5	0,013
Tiacloprido (s)	100	89	2	7	0,013
Tiametoxam (s)	102	93	3	8	0,007
Tiodicarbe (s)	99	92	1	8	0,013
Tiofanox-Sulfona	101	83	2	7	0,013
Triazofós (s)	88	94	3	10	0,013
Triclorfom	95	115	3	8	0,014
Trifloxistrobina (s)	95	90	8	7	0,013
Triflumizol	86	93	4	2	0,014
Vamidotiona	97	87	2	7	0,026
Zoxamida	112	84	7	7	0,012

utilizando os valores encontrados no apenas no 2º nível de fortificação destas substâncias. A letra “s” ao lado do nome das substâncias indica o uso permitido para a cultura da soja. Três substâncias (2,1 % do total) apresentaram resultados satisfatórios no 2º nível de

fortificação para as duas matrizes estudadas. Para a matriz soja apenas trinta e nove substâncias (27 % do total) apresentaram esse comportamento e duas (1,4 % do total) apenas para a matriz extrato solúvel de soja.

Tabela 4. Resultados da avaliação da exatidão, precisão e limite de detecção e quantificação avaliados no 2º nível de fortificação para a matriz soja

Substância	Exatidão - Recuperação (%)	Precisão - Repetibilidade CV (%)	Limite de Quantificação
	2º Nível	2º Nível	mg.kg ⁻¹
3-Hidroxi-Carbofurano	90	6	0,182
Acefato (s)	77	3	0,199
Acetamiprido (s)	92	7	0,188
Azametifós	87	3	0,184
Azinfós-Etílico	94	15	0,189
Bromuconazol (s)	83	1	0,190
Bupirimate	93	2	0,187
Clofentezina	90	18	0,187
Clorbromuron	103	11	0,187
Coumafós	91	8	0,188
Cresoxim-Metilico (s)	88	10	0,187
Demeton-S-Metilico	87	4	0,180
Desmedifam	92	3	0,187
Difenoconazol (s)	85	5	0,190

Continua

Cont. Tabela 4

Substância	Exatidão – Recuperação (%)	Precisão – Repetitividade CV (%)	Limite de Quantificação
	2º Nível	2º Nível	mg.kg ⁻¹
Dimetoato	98	3	0,187
Epoxiconazol (s)	85	2	0,190
Etirimol	78	11	0,189
Etoprofós	83	8	0,190
Etrinfós	82	9	0,178
Famoxadona	88	2	0,187
Fenamifós	99	5	0,188
Fenarimol (s)	83	11	0,188
Fenbuconazole	97	8	0,188
Fenoxicarbe	90	3	0,190
Fluazifope-P-Butílico (s)	90	4	0,187
Indoxacarbe	99	14	0,187
Metidationa	97	7	0,190
Metiocarbe Sulfona	86	4	0,140
Metiocarbe Sulfóxido	93	3	0,189
Metoxifenzida (s)	90	3	0,187
Mevinfós	90	9	0,192
Miclobutanil (s)	104	4	0,189
Monocrotofos	92	4	0,191
Paclobutrazol	89	3	0,215
Picoxistrobina (s)	93	8	0,204
Pimetrozina	76	4	0,202
Propizamida	91	11	0,191
Tebuconazol (s)	85	6	0,194
Tebufenozide (s)	99	12	0,187
Tiametoxam (s)	96	5	0,104
Triclorfom	89	6	0,203
Zoxamida	95	5	0,182

Tabela 5. Resultados da avaliação da exatidão, precisão e limite de detecção e quantificação avaliados no 2º nível de fortificação para a matriz extrato solúvel de soja

Substância	Exatidão – Recuperação (%)	Precisão – Repetitividade CV (%)	Limite de Quantificação
	2º Nível	2º Nível	mg.kg ⁻¹
Carbossulfano (s)	89	4	0,182
Clorfenvinfós	82	14	0,027
Cresoxim-Metílico (s)	77	8	0,026
Fenarimol (s)	81	18	0,026
Picoxistrobina (s)	90	7	0,028

Os resultados das recuperações obtidas encontraram-se dentro dos limites de 70 a 120 % definidos pelo SANCO¹⁸. E a precisão medida sob condições de repetitividade avaliada pelo coeficiente de variação (CV(%)) e/ou estimativa do desvio padrão relativo (DPR(%)) também encontraram-se dentro do limite de 20 %¹⁸. O limite de quantificação foi adequado para as substâncias estudadas, pois seus valores definidos estão abaixo dos LMR destas substâncias permitidas para a cultura da soja e dentro do limite de sensibilidade do equipamento.

O método estudado, para cento e quarenta e quatro substâncias, foi considerado adequado, contemplando todos os critérios estabelecidos (estudo de linearidade, avaliação da precisão e exatidão) para cento e vinte e duas substâncias (85 % do total) estudadas na matriz soja e cento e vinte e quatro (86 % do total) na matriz extrato solúvel de soja.

Dentro dos critérios estabelecidos a validação do método QuEChERS-acetato foi adequada, visto que contemplou mais de 80 % das substâncias selecionadas para o estudo. Em relação aos parâmetros de exatidão e precisão, a presença da matriz soja prejudicou a avaliação de um maior número de substâncias que na matriz extrato solúvel de soja. Também no parâmetro efeito matriz este foi observado em um maior número de substâncias na matriz soja em relação à matriz extrato solúvel de soja. Para as substâncias com resultados insatisfatórios nos parâmetros estudados modificações deverão ser feitas para adequação do método à análise destas substâncias.

O processo de validação da análise multirresíduo de agrotóxicos na matriz soja e extrato solúvel de soja é uma ferramenta a ser utilizada para atender aos limites definidos na legislação nacional e podendo ser aplicável a um maior número possível de substâncias em laboratórios que visam o monitoramento desses tipos de produtos alimentícios. Este processo proporciona subsídios aos órgãos regulatórios para verificar o uso dessas substâncias na prática agrícola e definir ações para controle e prevenção de possíveis danos à saúde da população consumidora dos alimentos produzidos.

CONCLUSÃO

No presente contexto, o desenvolvimento e otimização dos parâmetros da técnica analítica selecionada para o presente estudo demonstraram ser adequados para o método proposto dentro dos padrões

internacionais de qualidade. Os requisitos mínimos de validação analítica foram alcançados nas duas matrizes avaliadas. A aplicação do método QuEChERS-acetato nas matrizes soja e extrato solúvel de soja representam um avanço das análises multirresiduais aplicado no laboratório para cerca de cento e vinte e duas substâncias validadas na matriz soja e cento e vinte e quatro na matriz extrato solúvel de soja.

O presente trabalho possibilitou a validação deste método para aplicação nas matrizes soja e extrato solúvel de soja com a associação da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial permitindo o aumento do número de substâncias monitoradas em apenas uma análise.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Soja. Disponível em: [<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>].
2. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Soja - EMBRAPA SOJA. Dados Econômicos da Soja. Disponível em: [http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17].
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201205_7.shtm].
4. Berno LI, Guimarães-Lopes TG, Canniatti-Brazaca SG. Avaliação da composição centesimal, digestibilidade e atividade inibitória de tripsina em produtos derivados de soja (glycine max). *Alim Nutr*.2007;18(3):277-82.
5. Anderson JW, Smith BM, Washnock CS. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am J Clin Nutr*.1999;70(supl):464S-74S.
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Monografias Autorizadas. Disponível em: [<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>].
7. Sobreira AEG, Adissi PJ. Agrotóxicos: falsas premissas e debates. *Ciênc Saúde Coletiva*.2003;8(4):985-90.
8. Pizzutti IR, De KoK A, Zanella R, Adaime MB, Hiemstra M, Wickert C 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. *J Chromatogr A*.2007;1142:123-36.
9. Anastassiades M., Lehotay SL, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and Easy ultiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int*.2003;86(2): 412-31.
10. Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, Zanella R. QUECHERS - Um método moderno de preparo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim Nova*.2009;32(6):1620-34.

11. Pizzutti IR, De KoK A, Hiemstra M, Wickert C, Prestes OD. Method validation and comparison of acetonitrile extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*.2009;1216:4539-52.
12. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO (Rio de Janeiro – Brasil). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos: DOQ-CGCRE-008, rev. 01. Rio de Janeiro, 2003.
13. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO (Rio de Janeiro – Brasil). Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008, rev. 04. Rio de Janeiro, 2011.
14. Bazilio FS, Bonfim MVJ, Almeida RJ, Abrantes SMP. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. *Analytica*.2012;59:60-7.
15. Ribani M, Bottoli, CBG, Collins CH, Jardim ICSF. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*.2004;27(5):771-80.
16. Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal Chim Acta*.2005;552(1-2):25-35.
17. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for a single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*.2002;74:835-55.
18. Dg-Sanco. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document No. SANCO/12495/2011 Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf].
19. Souza SVC. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
20. Cardoso MHW, Gouvêa AV, Nóbrega AW, Abrantes SMP. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. *Ciênc Tecnol Aliment*.2010;30(supl.1):63-72.
21. Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scient Chromatogr*.2011;3(1):51-64.
22. Hiemstra M, De Kok A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*.2007;1154:3-25.
23. Pizzutti IR, Vreuls RJJ, De Kok A, Roehrs R, Martel S, Friggi CA et al. Design of a compressed air modulator to be used in comprehensive multidimensional gas chromatography and its application in the determination of pesticide residues in grapes. *J Chromatogr A*.2009;1216:3305-11.
24. Kovalczuk T, Lacina O, Jech M, Poustka J, Hajslova J. Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Food Addit Contam*.2008;25(4):444-57.
25. Banerjee K, Oulkar DP, Dasgupta S, Patil SB, Patil SH, Savant R et al. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*.2007;1173:98-109.
26. Leandro CC, Hancock P, Fussell RJ, Keely BJ. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A*.2006;1103:94-101.
27. Pareja L, Cesio V, Heinzen H, Fernandez-Alba AR. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. *Talanta*.2011;83(5):1613-22.
28. Mastovska K, Dorweiler KJ, Lehotay SJ, Wegscheid JS, Szpylka KA. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChers method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *J Agric Food Chem*.2010;58(10):5959-72.
29. Romero-Gonzalez R, Frenich AG, Vidal JM. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultraperformance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*.2008;76:211-25.
30. Mol HGJ, Plaza-Bolanos P, Zomer P, Rijk TC, Stolker AAM, Mulder PPJ. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrices. *Anal Chem*.2008;80:9450-9.
31. Durden DA. Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *J Chromatogr B*.2007;850:134-46.
32. Agilent Technologies (Santa Clara - EUA). Multiresidue Analysis of 301 Pesticides in Food Samples by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry: 5989-8614EN. Santa Clara, 2008.
33. Pang G, Cao Y, Zhang J, Fan C, Liu Y, Li X et al. Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*.2006;1125(1):1-3
34. Waters (Milford – EUA). A rapid method for the screening and confirmation of over 400 pesticide residues in food: 720002628EN. Milford, 2012.
35. Fillâtre Y, Rondeau D, Jadas-Hécart A, Communal PY. Advantages of the scheduled selected reaction monitoring algorithm in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry multi-residue analysis of 242 pesticides: a comparative approach with classical selected reaction monitoring mode. *Rapid Commun Mass Spectrom*.2010;24:2453-61.
36. Sack C, Smoker M, Chamkasem N, Thompson R, Satterfield G, Masse C et al. Collaborative Validation of the QuEChERS Procedure for the Determination of Pesticides in Food by LC-MS/MS. *J Agric Food Chem*.2011;59:6383-411.
37. Alder L. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS. *Mass Spectrom Rev*.2006;25:838-65.
38. Agilent Technologies (Santa Clara - EUA). Multiresidue Analysis of 301 Pesticides in Food Samples by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry: 5991-1183EN. Santa Clara, 2012.
39. Chen G, Cao P, Liu R. A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. *Food Chem*.2011;125:1406-11.