



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Estudos de diferentes híbridos de tomates de mesa (*Solanum lycopersicum* L.) por espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PSI-EM): Determinação do perfil químico e quantificação de agrotóxico

Ayrton Martins da Silva Santos

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Goiânia
2021

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Ayrton Martins da Silva Santos

3. Título do trabalho

Estudos de diferentes híbridos de tomates de mesa (*Solanum lycopersicum* L.) por espectrometria de massas com ionização por paper spray (PSI-EM): Determinação do perfil químico e quantificação de agrotóxico

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO*

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Boniek Gontijo Vaz**, Professor do Magistério Superior, em 25/03/2021, às 19:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **AYRTON MARTINS DA SILVA SANTOS**, Discente, em 29/03/2021, às 10:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

SEI



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Estudos de diferentes híbridos de tomates de mesa (*Solanum lycopersicum* L.) por espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PSI-EM): Determinação do perfil químico e quantificação de agrotóxico

Ayrton Martins da Silva Santos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Goiânia
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Santos, Ayrton Martins Da Silva

Estudos de diferentes híbridos de tomates de mesa (*Solanum lycopersicum* L.) por espectrometria de massas com ionização por paper spray (PSI-EM): Determinação do perfil químico e quantificação de agrotóxico [manuscrito] / Ayrton Martins Da Silva Santos. - 2021. LXIX, 69 f.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2021.
Anexos.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. tomate. 2. perfil químico. 3. espectrometria de massas. 4. paper spray. I. Vaz, Boniek Gontijo, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 346 da sessão da Defesa de Mestrado de Ayrton Martins da Silva Santos, que confere o título de Mestre em Química, na área de concentração em Química.

Aos 24 (vinte e quatro) dias do mês de março de 2021 (dois mil e vinte e um), a partir das 14h00m, via videoconferência, realizou-se a sessão pública da Defesa de Mestrado intitulada "Estudos de diferentes híbridos de tomates de mesa (*Solanum lycopersicum* L.) por espectrometria de massas com ionização por paper spray (PSI-EM): Determinação do perfil químico e quantificação de agrotóxico". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz (UFG), com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino (UFG) e Prof. Dr. Lino Carlos Borges (EMATER-GO). Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Mestrado, tendo sido o candidato aprovado pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) 24 (vinte e quatro) dias do mês de março de 2021 (dois mil e vinte e um).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Boniek Gontijo Vaz, Professor do Magistério Superior**, em 24/03/2021, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Gisele Pasqualotto Severino, Professor do Magistério Superior**, em 24/03/2021, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lino Carlos Borges, Usuário Externo**, em 24/03/2021, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1963068 e o código CRC BA9FDB46.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me auxiliar por todos esses anos de estudos, me dando direção e sabedoria. E ao meu único e suficiente Senhor e Salvador, Jesus Cristo. Amo-te.

Agradeço à minha esposa, Glauciane Silva Dias Martins, por estar ao meu lado todos esses anos, minha fiel companheira e auxiliadora idônea, por ser instrumento de Deus na minha vida e me guiando para ir mais longe. Te amo meu amor. Minha vida é sua!

Aos meu pais pela vida e por me educarem nos caminhos certos a serem seguidos, tudo cooperou para eu estar concluindo mais essa fase em minha vida.

Agradeço ao professor Dr. Boniek pela orientação de mestrado, pela excelente estrutura que tem disponível para seus alunos e a todos os colegas do LaCEM. À Dr^a Rosineide (Rosinha) por todo seu auxílio e apoio para concluir todas as etapas.

À professora Dr^a. Abadia dos Reis e à Me. Raquel Cintra, responsáveis pela horta da Escola de Agronomia da UFG, pela parceria, plantio e disponibilidade das amostras de tomates.

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE FIGURAS | 10 |
| LISTA DE QUADROS | 13 |
| LISTA DE TABELAS | 13 |
| RESUMO | 14 |
| ABSTRACT | 15 |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1. Tomate | 16 |
| 1.2. Espectrometria de Massas..... | 17 |
| 1.3. Ionização por <i>Paper Spray</i> | 23 |
| 1.4. Quimiometria | 24 |
| 1.5. Agrotóxicos | 17 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 25 |
| 3. OBJETIVO | 26 |
| 3.1. Objetivos específicos | 26 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 4.1. Reagentes e Padrões | 27 |
| 4.2. Materiais vegetais | 27 |
| 4.3. Preparo da amostra para perfil químico | 29 |
| 4.4. Preparo da amostra para detecção dos Agrotóxicos..... | 29 |
| 4.5. Análise PSI-EM para perfil químico..... | 29 |
| 4.6. Análise PSI(-)-EM-orbitrap para perfil químico | 31 |
| 4.7. Performance analítica | 31 |
| 4.8. Tratamento dos dados | 32 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 32 |
| 5.1. Perfil químico do tomate por PSI-EM | 32 |
| 5.2. Determinação dos Agrotóxicos por PSI-EM | 50 |
| 6. CONCLUSÃO | 59 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |
| 8. Anexos..... | 67 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Fórmula estrutural do inseticida clorpirifós. | 20 |
| Figura 2: Fórmula estrutural do fungicida ciazofamida. | 21 |
| Figura 3: Esquema geral de um sistema de PSI-EM (Paper Spray Ionization Mass Spectrometry) adaptado de Liu <i>et al.</i> (2010). | 23 |
| Figura 4: Foto ilustrativa do sistema homemade de de Paper Spray Ionization (PSI). | 30 |
| Figura 5: Fotos dos tomates dos grupos A) Salada, B) Saladete, C) Cereja, D) Caqui e E) Santa Cruz. | 34 |
| Figura 6: Espectros por PSI(+)-EM dos tomates (A) Cerrado, (B) BS II0012, (C) Sweet Heaven, (D) Grandeur e (E) Débora Max. | 35 |
| Figura 7: Espectros por PSI(-)-EM dos tomates (A) Cerrado, (B) BS II0012, (C) Sweet Heaven, (D) Grandeur e (E) Débora Max. | 36 |
| Figura 8: Estruturas químicas dos compostos: ácido protocatecuico (A), ácido cítrico (B), naringenina (C), rutina (D) e rutina pentose (E). | 37 |
| Figura 9: Gráfico de scores da PCA por PSI(+)-EM das 31 híbridos s de tomates. | 38 |
| Figura 10: Gráfico de scores da PCA dos grupos de tomates Salada, Saladete, Cereja, Caqui e Santa Cruz por PSI(-)-EM sem a presença dos outliers..... | 39 |
| Figura 11: Gráficos de <i>loadings</i> da PC1 (A) e PC2 (B) responsáveis pela separação quimiométrica da PCA. | 40 |
| Figura 12: Gráfico de scores da PCA do novo agrupamento das <i>m/z</i> que mais influenciaram na separação dos grupos de tomates. | 42 |
| Figura 13: Gráficos de <i>loadings</i> da PC2 (A) e PC3 (B) responsáveis pela nova separação quimiométrica da PCA. | 43 |
| Figura 14: Perfil do espectro de EM/EM do fungicida ciazofamida utilizando Helio como gás de colisão e energia de fragmentação de 25 eV. | 51 |
| Figura 15: Perfil do espectro de EM2 do inseticida clorpirifós utilizando Helio como gás de colisão e energia de fragmentação de 27 eV..... | 52 |
| Figura 16: Decaimento do inseticida clorpirifós na casca do tomate BS II0012 (A) e Sweet Heaven (B) por PSI(+)-EM. | 53 |
| Figura 17: Decaimento da intensidade do fungicida ciazofamida na casca do tomate BS II0012 (A) e Sweet Heaven (B) por PSI(+)-EM. | 54 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 18: Curva de calibração, linearidade (R2) e a equação da reta do fungicida ciazofamida na casca dos tomates BS II0012 e Sweet Heaven. | 56 |
| Figura 19: Decaimento da concentração do fungicida ciazofamida na casca do tomate BS II0012 (A) e Sweet Heaven (B) por PSI(+)-EM. | 58 |
| Figura 20: Espectro de fragmentação do íon m/z 151 e estrutura química que corrobora para ácido hidroxifenilacético. | 67 |
| Figura 21: Espectro de fragmentação do íon m/z 153 e estrutura química que corrobora para ácido protocatecuico. | 67 |
| Figura 22: Espectro de fragmentação do íon m/z 179 e estrutura química que corrobora para ácido cafeico. | 68 |
| Figura 23: Espectro de fragmentação do íon m/z 187 e estrutura química que corrobora para ácido hidroxigálico. | 68 |
| Figura 24: Espectro de fragmentação do íon m/z 191 e estrutura química que corrobora para ácido cítrico. | 68 |
| Figura 25: Espectro de fragmentação do íon m/z 197 e estrutura química que corrobora para ácido serínico. | 69 |
| Figura 26: Espectro de fragmentação do íon m/z 215 e estrutura química que corrobora para ácido 2,3-naftalenodicarboxílico. | 69 |
| Figura 27: Espectro de fragmentação do íon m/z 215 e estrutura química que corrobora para hexose dihidratada. | 69 |
| Figura 28: Espectro de fragmentação do íon m/z 241 e estrutura química que corrobora para fosfatidilinositol. | 70 |
| Figura 29: Espectro de fragmentação do íon m/z 255 e estrutura química que corrobora para ácido palmítico. | 70 |
| Figura 30: Espectro de fragmentação do íon m/z 271 e estrutura química que corrobora para naringenina ou narigenina chalcona. | 70 |
| Figura 31: Espectro de fragmentação do íon m/z 277 e estrutura química que corrobora para ácido linolênico. | 71 |
| Figura 32: Espectro de fragmentação do íon m/z 279 e estrutura química que corrobora para ácido linoleico. | 71 |
| Figura 33: Espectro de fragmentação do íon m/z 293 e estrutura química que corrobora para ácido 9-oxo-octadecadienóico. | 71 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 34: Espectro de fragmentação do íon m/z 300 e estrutura química que corrobora para o derivado do dimetil pelargonidina..... | 72 |
| Figura 35: Espectro de fragmentação do íon m/z 383 e estrutura química que corrobora para o derivado do ácido serínico. | 72 |
| Figura 36: Espectro de fragmentação do íon m/z 433 e estrutura química que corrobora para 8-C-glucosil natingenina..... | 72 |
| Figura 37: Espectro de fragmentação do íon m/z 597 e estrutura química que corrobora para ácido yunanéico F..... | 73 |
| Figura 38: Espectro de fragmentação do íon m/z 609 e estrutura química que corrobora para rutina..... | 73 |
| Figura 39: Espectro de fragmentação do íon m/z 695 e estrutura química que corrobora para o glicerol 1,2-dialcanoato 3-fosforo. | 73 |
| Figura 40: Espectro de fragmentação do íon m/z 741 e estrutura química que corrobora para rutina pentosídeo. | 74 |
| Figura 41: Espectro de fragmentação do íon m/z 815 e estrutura química que corrobora para o sulfoquinovosil-diacil-glicerol (SQDG)..... | 74 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1: Classificação toxicológicas dos agrotóxicos, DL ₅₀ por via oral e cor segundo ANVISA (2019)..... | 18 |
| Quadro 2: Tomates cultivados no Setor de Horticultura da Escola de Agronomia-da UFG em 2019. | 28 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Valores de LMR do inseticida clorpirifós e fungicida ciazofamida em tomates determinado pela ANVISA, FAO e EU..... | 19 |
| Tabela 2: Características das bulas dos agrotóxicos..... | 20 |
| Tabela 3: Condições operacionais do Espectrômetro de Massas LTQ-XL. | 30 |
| Tabela 4: Condições operacionais do Espectrômetro de Massas Q-Exactive Orbitrap..... | 31 |
| Tabela 5: <i>Loadings</i> da PC1 e PC2 das <i>m/z</i> responsáveis pela separação quimiométrica dos tomates. | 41 |
| Tabela 6: Lista de metabólitos secundários identificados no extraído de tomate de acordo com formula molecular, massa molecular, fragmentação e referências bibliográficas. | 45 |
| Tabela 7: Fórmula molecular, massa molecular, valor de <i>m/z</i> teórico, <i>m/z</i> medido e fragmento do EM/EM do clorpirifós e ciazofamida. | 51 |
| Tabela 8: Valores de recuperação obtidos do fungicida ciazofamida por PSI(+)-EM na casca dos tomates BS II0012 e Sweet Heaven. | 57 |

RESUMO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças que apresenta o maior crescimento de cultivo nas últimas décadas, com uma safra de 4,5 milhões de toneladas produzidas no Brasil em 2018, sendo o estado de Goiás o maior produtor do país. Normalmente, a determinação do perfil químico e de resíduos de agrotóxicos em tomate é realizada por técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM), que fornecem um alto desempenho analítico, mas requerem várias etapas de preparo de amostras. Este trabalho empregou uma técnica mais simples e rápida, a *paper spray ionization* (PSI-EM). A PSI combinada com a Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Analysis* - PCA) foi empregada para a diferenciação dos híbridos de tomates de mesa em um cenário que objetiva determinar e identificar os constituintes químicos característicos de cada grupo. Ademais, constituiu-se objetivo do trabalho a determinação do inseticida clorpirifós e do fungicida ciazofamida na casca dos híbridos BS II0012 e *Sweet Heaven*. O perfil químico obtido a partir das análises dos grupos de tomates de mesa (Salada, Saladete, Cereja, Caqui e Santa Cruz) foi determinado por PSI(-)-EM, resultando em espectros de massas reprodutíveis entre as análises. As amostras foram agrupadas em função de seus híbridos aplicando-se PCA. Os íons que mais influenciaram na separação dos grupos foram de m/z 191 ($C_6H_8O_7$), 271 ($C_{15}H_{12}O_5$), 609 ($C_{27}H_{30}O_{16}$), 695 ($C_{39}H_{68}O_8P$), 741 ($C_{32}H_{38}O_{20}$) e foram submetidos a experimentos de fragmentação induzida por colisão para fins de identificação. Por fim, utilizando como matriz a casca do tomate BS II0012 e *Sweet Heaven*, desenvolveu-se um método quantitativo para determinação do fungicida ciazofamida por PSI(+)-EM. O método desenvolvido apresentou uma curva de calibração com $R^2 > 0,99$ e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de 10 ng.mL^{-1} e 25 ng.mL^{-1} , respectivamente. Já a recuperação variou de 89% a 108%, dentro do estabelecido pela ANVISA (2017). Os resultados obtidos neste trabalho reforçam o potencial da técnica de PSI-EM como uma técnica analítica rápida e simples para a avaliação e determinação do perfil químico e de resíduos de agrotóxicos em tomates.

Palavras-chaves: tomate, perfil químico, espectrometria de massas, *paper spray*.

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the vegetables that has shown the greatest growth in cultivation in recent decades, with a harvest of 4.5 million tons in Brazil in 2018, with Goiás being the largest producer in the country. Usually, the determination of the chemical profile and pesticide residues in tomatoes is performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), which provide high analytical performance but require several steps of sample preparation. This work employed a simpler and faster technique, the paper spray ionization mass spectrometry (PSI-MS). PSI-MS was combined with Principal Component Analysis (PCA) to differentiate the varieties of table tomatoes in a scenario that aims to determine and identify each variety's chemical constituents. This study also aimed to determine the insecticide chlorpyrifos and the fungicide cyazofamid in the peel of the varieties BS II0012 and Sweet Heaven. The chemical profile obtained from the analysis of the peels of thirty-one varieties of table tomatoes (Flatten, Elongated, Cherry, Beefstake and Santa Cruz) was determined by PSI(-)-MS, resulting in reproducible mass spectra with signals that. The samples were grouped according to the variety using PCA. The principal ions were m/z 191 ($C_6H_8O_7$), 271 ($C_{15}H_{12}O_5$), 609 ($C_{27}H_{30}O_{16}$), 695 ($C_{39}H_{68}O_8P$), and 741 ($C_{32}H_{38}O_{20}$), and were identified using fragmentation experiments. Finally, a quantitative method was developed for the determination of the fungicide cyazofamid by PSI(+)-MS using the peels of the tomatoes BS II0012 and Sweet Heaven as matrices. The method showed a calibration curve with $R^2 > 0.99$ and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 10 ng.mL^{-1} and 25 ng.mL^{-1} , respectively. The recovery ranged from 89% to 108%, within the established by ANVISA (2017). The results obtained in this work reinforce the potential of the PSI-MS technique as a fast and simple analytical technique for the evaluation and determination of the chemical profile and pesticide residue in tomatoes.

Keywords: tomato, chemical profile, mass spectrometry, paper spray.

1. INTRODUÇÃO

1.1. TOMATE

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), anteriormente classificado como *Lycopersicon esculentum* Mill., teve sua origem nas regiões andinas do Peru, Bolívia e Equador, com nome de tomati ou jitomate pelos indígenas mexicanos. O tomate pertence à família Solanaceae, que fazem parte a berinjela, pimenta e pimentão, entre outras hortaliças (EMBRAPA, 1993; ALVARENGA, 2013). É considerado, de forma econômica e social, uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil, ocupando um lugar de destaque na mesa do consumidor (ABCSEM, 2012; BORGUINI, 2006).

A produção mundial de tomate vem crescendo ao longo das últimas décadas. Dados de 2017 da Organização de Agricultura e Alimentos (do inglês: *Food and Agriculture Organization* - FAO), destacam que o Brasil ocupou o nono (9º) lugar no *ranking* mundial da produção de tomate, com China, Índia, Estados Unidos, Turquia, Egito, Itália, Irã e Espanha ocupando os primeiros lugares (CONAB, 2019; FAOSTAT, 2018).

Em 2018, a safra de tomate no Brasil atingiu cerca de 4,5 milhões de toneladas produzidas. As regiões que apresentam maior produção são a Centro-Oeste e Sudeste, com destaque para o estado de Goiás e São Paulo, que produziram 1,29 milhões e 860 mil toneladas, respectivamente, em 2019. Correspondendo à segunda hortaliça mais consumida no país, com um consumo médio de 4,2 quilogramas *per capita* por ano, segundo dados do Instituto Brasileiro de geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2020; NETO, 2019).

Dois tipos de tomates são cultivados no Brasil e no mundo, o tomate industrial para processamento, como polpa, extratos e molhos de tomates; e o de mesa para consumo *in natura*. Ambos apresentam sistemas de plantio e colheitas distintos, com o industrial mais mecanizado e rasteiro e o de mesa mais manual e estaqueado (CAMARGO FILHO, 2001; KROSS *et al.*, 2001). Dentre esses dois tipos, existem diversos híbridos de tomates que são comercializadas, variando em tamanho, cor, sabor, textura e diversas formas. Alvarenga (2013) classificou diferentes híbridos de tomates dentro de cinco grandes grupos: Salada, Saladete, Cereja, Caqui e Santa Cruz.

1.2. AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos recebem diversas nomenclaturas relacionadas com sua utilização, entre elas: defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta, veneno e diversas outras. Esses são alguns dos nomes que são relacionados com a substância química utilizada no controle de pragas e doenças de plantas (PERES *et al.*, 2003). O termo agrotóxicos engloba vários compostos que são empregados contra alvos específicos, como por exemplo, herbicida (contra ervas daninhas), inseticida (insetos), fungicida (fungos), bactericidas (bactérias), larvicidas (larvas) e rodenticidas (roedores) (MATTHEWS, 2016)

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com suas estruturas químicas em dois grupos: inorgânicos e orgânicos. Os inorgânicos são os primeiros a serem utilizados e possuem uma aparência similares aos sais, além de solúveis em água e ambientalmente estáveis, exemplo do arseniato de cálcio, arseniato de cobre, tartarato de antimônio, entre outros. Já os orgânicos são compostos a partir de carbono e hidrogênio, podendo incluir oxigênio, enxofre, fósforo, flúor, cloro e nitrogênio, sendo responsáveis pela maior parte dos agrotóxicos e insolúveis em água (ELDRIDGE, 2008; SARWAR, 2016).

A ANVISA (2019) reclassificou os agrotóxicos no Brasil de acordo com sua toxicidade, seguindo como padrão o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, do inglês: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* – GHS, que segue a regulatória internacional nessa área. Dentro dessa classificação, a categoria 1 corresponde aos produtos extremamente tóxicos (cor vermelha) a categoria 5 corresponde aqueles improváveis de causar dano agudo (cor azul).

No quadro 1 é descrita a classificação toxicológica dos agrotóxicos, referência de dose letal média (DL₅₀) por ingestão via oral necessária para matar 50% de uma população de ratos ou outros animais de teste e cor de identificação reclassificado pela ANVISA em 2019.

Quadro 1: Classificação toxicológicas dos agrotóxicos, DL₅₀ por via oral e cor segundo ANVISA (2019).

| Categoria | Toxicidade | Dose letal média (DL ₅₀) | Cor de classificação |
|-----------|-----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| 1 | Produto Extremamente Tóxico | ≤5 mg/kg | Vermelho |
| 2 | Produto Altamente Tóxico | >5-50 mg/kg | Vermelho |
| 3 | Produto Moderadamente Tóxico | >50-300mg/kg | Amarelo |
| 4 | Produto Pouco Tóxico | >300-2000mg/kg | Azul |
| 5 | Produto Improvável de Causar Dano Agudo | >2000-5000 mg/kg | Azul |
| 6 | Produto Não Classificado | >5000 mg/kg | Verde |

Fonte: adaptado de ANVISA (2019).

No Brasil, em 2016, foram registrados 277 novos agrotóxicos pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): já em 2018 houve um registro de 450 novos produtos químicos, correspondendo a um aumento de 61,5% nos registros. Destes 450 registros (marca comercial), foram constatados a presença de 127 princípios ativos que foram fabricados por 80 empresas diferentes (MAPA, 2019).

Assim, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou em 2001 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com parcerias de alguns estados do Brasil e laboratórios de saúde pública, com objetivo de analisar e promover qualidade aos alimentos em relação ao uso de agrotóxicos e afins e prevenir quadros de intoxicações agudas ou crônicas devido à exposição a essas substâncias.

A partir de estudos realizados, a ANVISA definiu quais os níveis de resíduos de agrotóxicos que podem estar presentes nos alimentos sem que isso cause danos à saúde da população. Assim, estabelece o Limite Máximo de Resíduos (LMR), que é a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim, oficialmente permitida no alimento, em decorrência da aplicação em uma cultura agrícola, expresso em miligramas do agrotóxico por quilo do alimento (mg.kg⁻¹).

A partir de estudos de campo, cada agência internacional de monitoramento de resíduos definiu qual o LMR que melhor assegura sua população contra a exposição de agrotóxicos via ingestão alimentar. Na tabela 1 é possível verificar qual o LMR do inseticida clorpirifós e do fungicida ciazofamida no Brasil,

Estados Unidos e Europa para cultura de tomate. No Brasil o uso do clorpirifós é permitido somente para o tomate industrial, para fins de processamento e proibido para o tomate de mesa.

Tabela 1: Valores de LMR do inseticida clorpirifós e fungicida ciazofamida em tomates determinado pela ANVISA, FAO e EU.

| Agrotóxico | ANVISA (mg.kg ⁻¹) ^a | FAO (mg.kg ⁻¹) ^b | EU (mg.kg ⁻¹) ^c |
|-------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| Clorpirifós | 0,50 | 1,00 | 0,10 |
| Ciazofamida | 0,05 | 0,20 | 0,30 |

^a http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8.

^b <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/>

^c <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>

No estudo publicado por Oliva *et al.*(2003), foram divulgados os primeiros resultados do PARA de 2001-2003, no qual foram analisadas 224 amostras de tomates de mesa. Das amostras analisadas, em 33,5% foram encontrados níveis de resíduos de agrotóxicos acima da LMR e/ou resíduos que não são permitidos na cultura dos tomateiros. Os mais encontrados foram: ditiocarbamatos (41 tomates), metamidofós (30 tomates), clorpirifós (5 tomates), triazofos (4 tomates) e permetrina (3 tomates). Os agrotóxicos acefato, captan, clorotalonil, fenthoato e lambda-cialotrina foram encontrados em menos que 1% das amostras analisadas (OLIVA *et al.*, 2003).

Segundo resultados PARA 2013-2015, foram analisadas 730 amostras de tomates de mesa de diversos estados do Brasil, o inseticida clorpirifós, também chamado de Lorsban, foi detectado em 126 amostras de tomates, com concentração superior a 0,01 mg.kg⁻¹ (correspondente a parte por milhão – ppm), sendo que o mesmo é proibido para a cultura de tomate de mesa, e o fungicida ciazofamida, conhecido comercialmente como Ranman, foi detectado em 8 amostras de tomates, com concentração inferior a 0,01 mg.kg⁻¹ (PARA, 2016).

Os agrotóxicos tem um intervalo de segurança, que após a aplicação deve-se esperar para que os produtos possam ser consumidos sem causar nenhum dano à saúde humana, e uma quantidade máxima de aplicação em tomates. Na tabela 2

estão expostos os dados de acordo com o que está especificado na bula de cada agrotóxico.

Tabela 2: Características das bulas dos agrotóxicos.

| Nome Usual | Nome Comercial | Titular do Registro | Tipo de Agrotóxico | Intervalo de segurança | LMR |
|-------------|----------------|---------------------|--------------------|------------------------|--------------------------|
| Ciazofamida | Ranman | ISK BIOSCIENCES | fungicida | 1 dia | 0,05 mg.kg ⁻¹ |
| Clorpirifós | Lorsban | Dow AgroSciences | inseticida | 21 dias* | 0,5 mg.kg ^{-1*} |

*tomate industrial

O clorpirifós é um agrotóxico do grupo dos organofosforados com fórmula molecular C₉H₁₁Cl₃NO₃PS e nome científico, de acordo com a IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), *O,O*-dietil *O*-3,5,6-tricloropiridin-2-ol fosforotioato e possui a ação inseticida e acaricida, com ampla utilização na agricultura (PINTO, 2017). Na figura 2 é possível observar a fórmula estrutural do composto.

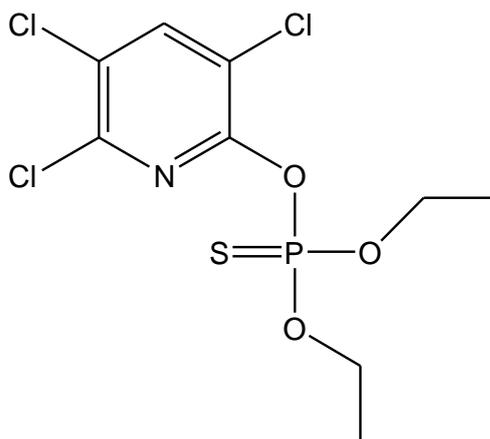


Figura 1: Fórmula estrutural do inseticida clorpirifós.

A ciazofamida pertence a classe dos imadozóis, com substituintes dimetilsulfamila, ciano, cloro e 4-tolil nas posições 1, 2, 4 e com fórmula molecular C₁₃H₁₃ClN₄O₂S e nome científico 4-cloro-2-ciano-N,N-dimetil-5-p-tolilimidazol-1-sulfonamida. Apresenta ação contra fungos resistentes à outras classes químicas. A figura 3 ilustra a fórmula estrutural do composto.

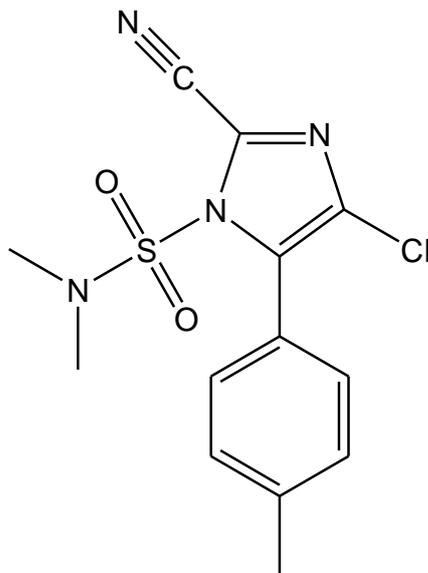


Figura 2: Fórmula estrutural do fungicida ciazofamida.

1.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas (EM) (do inglês, *mass spectrometry* – MS) é uma técnica analítica de grande sensibilidade e aplicabilidade na identificação e quantificação de uma gama de variedades de compostos. Desde dos primeiros estudos de J. J. Thomson para analisar a velocidade de raios catódicos e a razão massa/carga (m/z), a técnica vem sendo desenvolvida e aprimorada para análises de misturas complexas e analitos em níveis de traços. Basicamente, a técnica de EM consiste na geração de íons a partir da fonte de ionização, a separação desses íons pelas diferentes razões m/z e um analisador de massas via campo elétrico ou magnético para realizar a detecção dos íons (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

As técnicas de ionização desempenham papel fundamental na EM. Não existe uma técnica de ionização única para todos tipos de compostos. São escolhidas de acordo com cada tipo de composto, cada técnica tem suas próprias vantagens para diferentes estruturas químicas e grupos funcionais. Então como mesmo espectrômetro de massas, mas variando sua fonte de ionização, é possível realizar análises de diversos tipos de amostras (OUYANG; ZHANG, 2010).

As primeiras fontes de ionização a serem desenvolvidas foram ionização por impacto de electrons (do inglês, *electron ionization* - EI) e ionização química (do inglês, *chemical ionization* - CI). Ambas as técnicas operam em condições de alto vácuo e necessitam que a amostra seja primeiro volatilizadas para depois ionizar.

Limitando as técnicas em molecular voláteis, de baixo peso molecular e termicamente estáveis (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Outras técnicas de ionização a pressão atmosférica foram desenvolvidas, entre elas: ionização por *eletrospray* (do inglês, *electrospray ionization* - ESI), ionização química a pressão atmosférica (do inglês, *atmospheric pressure chemical ionization* - APCI) e fotoionização a pressão atmosférica (do inglês, *atmospheric pressure photoionization* - APPI). Por outro lado, ionização por ESI é uma das mais utilizadas em análises, devido a sua excelente ionização de compostos polares (DOMIN; CODY, 2015; HO *et al.*, 2003). Apesar da ESI ser uma das fontes de ionização mais utilizada, a mesma pode apresentar dificuldades de análises referente ao tratamento da amostra. Como a extração do analito a partir da matriz, preparo de soluções em solventes com pH e teores de sais controlados e, em alguns casos, a necessidade do uso de técnicas de separação anterior a análise por EM (Eberlin, 2007).

Com o desenvolvimento das técnicas de ionização ambiente (do inglês, *ambient mass spectrometry* – AMS) por Cooks e colaboradores (2006), foi possível analisar compostos diretamente no ambiente natural ao EM, utilizando nenhum ou o mínimo preparo de amostra. Algumas das técnicas desenvolvidas são: dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (do inglês, *matrix assisted laser desorption/ionization* - MALDI), ionização de dessorção por eletrospray (do inglês, *desorption electrospray ionization* – DESI) e ionização por *paper spray* (do inglês, *paper spray ionization* – PSI) por entre outras (COOKS, *et al.*, 2006; LIU, *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de novas técnicas de AMS trouxeram simplicidade para as análises por EM, sendo responsáveis pela diminuição do tempo de análise e preparo de amostras. Agora as análises podem ser realizadas diretamente na superfície da amostra e informações relevantes podem ser extraídas em tempo real no espectrômetro de massas. Dentre as técnicas de ionização ambiente, a PSI apresenta um grande potencial, devido a simplicidade e a possibilidade de acoplá-las com qualquer sistema de que opere com uma fonte de ionização atmosférica

1.4. IONIZAÇÃO POR PAPER SPRAY

Dentre as técnicas de AMS, a ionização por paper spray (do inglês, *paper spray ionization* - PSI) foi desenvolvida por Liu *et al.*(2010), sendo uma das mais simples, de baixo custo e capaz de fornecer resultados em análises de curto prazo. Em PSI um papel no formato triangular é utilizado para depositar a amostra no centro do papel e espalhada por efeito de capilaridade, uma alta voltagem (3-5 kV) é aplicada para ionizar os analitos de interesse (figura 1). Com o papel posicionado próximo a entrada do espectrômetro de massas, e aplicado metanol ácido ou básico para ionização no modo positivo ou negativo, onde os íons gerados são protonados ($[M+H]^+$) ou desprotonados ($[M-H]^-$), respectivamente.

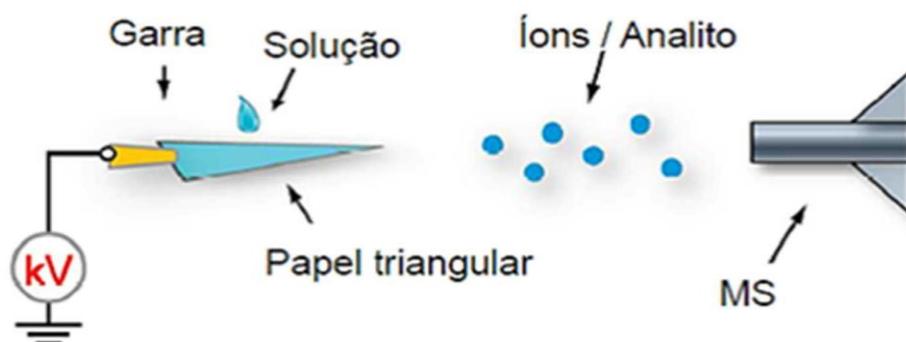


Figura 3: Esquema geral de um sistema de PSI-EM (Paper Spray Ionization Mass Spectrometry) adaptado de Liu *et al.*(2010).

O mecanismo de ionização é semelhante ao de ESI, em que os íons são formados em solução e o campo elétrico na ponta do papel induz à formação de um *spray* com gotículas carregadas que são dessolvatadas e direcionadas ao espectrômetro de massas (LIU *et al.*, 2010).

O desempenho analítico apresentado por PSI-EM foi avaliado em uma ampla gama de aplicações, incluindo quantificação de agrotóxicos em frutas e vegetais (PEREIRA *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2020), estudo de *fingerprint* (do inglês, impressão digital) químico em folhas e frutas (DENG; YANG, 2013; SILVA *et al.*, 2020) e análise de drogas (de CARVALHO *et al.*, 2016; DOMINGOS *et al.*, 2017). Cujo os resultados obtidos foram satisfatórios quando comparado com técnicas tradicionais de análises (CL-EM ou CG-EM) (MICHELY *et al.*, 2017).

Os estudos de Deng e Yang em 2013, destacaram o uso de PSI como sendo o primeiro trabalho para aplicação da técnica para análises de *fingerprint* em matrizes, onde trabalhou com duas marcas do chá de ervas bansha disponíveis no

mercado. A partir das análises por PSI no modo negativo, foi possível obter as melhores informações do perfil químico da amostra e o tratamento quimiométrico aplicado para verificar os íons mais apropriados para os chás adquiridos no comércio.

Já Silva *et al.*(2020) realizou o estudo do perfil químico da farinha da casca da banana prata, suas propriedades físico-química e atividade de agente antioxidante utilizando a técnica de PSI-EM. O que constatou que a farinha tinha alto teor de carboidratos e fibra alimentar, o que correspondia a uma quantidade significativa de compostos fenólicos com atividade antioxidante. E ainda sugeriu a presença de 26 substâncias como ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, flavonóides, açúcares, quinonas e terpenóides, através da fragmentação e referências bibliográficas.

1.5. QUIMIOMETRIA

Com o surgimento de diversas técnicas instrumentais de análises químicas, as complexidades dos dados aumentaram também. Com isso, novas técnicas de processamento de dados foram desenvolvidas, dentre elas a quimiometria, que vem se tornando uma ferramenta muito importante nos diversos ramos da ciência (FERREIRA, 2015).

A quimiometria usa a estatística multivariada no estudo de fenômenos químicos, no que diz respeito a análises de dados. Com o avanço tecnológico, essa ferramenta está cada vez mais difundida, inserida em diversas rotinas laboratoriais e campo de pesquisa. Com isso, a quimiometria faz uma ligação com vários campos da ciência, não se restringindo apenas à química e matemática (FERREIRA, 2015).

Dois métodos são utilizados nos estudos quimiométricos, os métodos de classificação não supervisionado e supervisionado. O método não supervisionado trata-se de um método não paramétrico, onde é possível extrair informações relevantes a partir de conjuntos de dados multivariados e recomendados para encontrar tendências em dados desconhecidos. Já no método supervisionado são aplicados parâmetros para predizer a classificação das informações apresentadas (FERREIRA, 2015).

Dentre a análise exploratória não supervisionada conta a Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Analysis* - PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis* - HCA), que visam apresentar a similaridade ou diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados. Já a análise supervisionada tem-se a Análise Discriminante Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, *Partial Least Squares Discriminant Analysis* - PLS-DA) e de Mínimos Quadrados Parciais Esparsos (do inglês, *Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis* - sPLS-DA) (BOTELHO, 2018; BONA, 2015).

A PCA permite uma redução de dimensionalidade de um grande conjunto de dados para um novo sistema, chamando de componente principal (PC), no que possibilita a visualização dos dados em dimensões inferiores. Pois, as PCs são representações dos novos eixos formados a partir de combinações lineares das variáveis originais, e estão contidas informações mais importantes que descrevem os dados (LIMA, 2018).

Matematicamente, uma matriz de dados X é decomposta no produto de duas outras matrizes, denominadas *scores* (T) e *loadings* (P), somadas a uma matriz resíduos (E), como na equação 1.

$$X = T.P^T + E \quad \text{Equação 1}$$

Os *scores* correspondem a projeção das amostras em um vetor de dados formados pelas PCs, indicando a similaridade entre as amostras e os *loadings* corresponde a importância de cada variável para o conjunto de dados e na determinação de uma PC (MATOS *et al.*, 2003; LIMA, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Como o tomate é uma das hortaliças mais presente na mesa do consumidor final e no comércio local existe diversos tipos de tomates que podem ser adquiridos, faz-se necessário um estudo rápido para caracterizar esses híbridos de tomates de mesa como o foco de verificar os compostos químicos que eventualmente são os mais presentes em cada grupo (Salada, Saladete, Cereja, Caqui e Santa Cruz), empregando técnica quimiométrica para descrever sua distribuição no espaço

amostral. E ainda, verificar o monitoramento de agrotóxicos na matriz para que seu uso seja controlado e não afete o consumidor final. Para isso, utilizou a técnica de PSI-EM como um método rápido de análise para realizar o estudo, pois a mesma necessita de o mínimo preparo de amostra e pouco uso de solvente, corroborando com a química verde.

A partir de levantamento bibliográfico realizado nas plataformas *Web of Science* e *Scopus* com os termos “*paper spray*” “*tomato*” e “*fingerprint*”, a técnica de PSI-EM ainda não foi utilizada para estudar compostos característicos de tomates. Sendo este o primeiro trabalho a realizar o *fingerprint* de híbridos de tomate utilizando a técnica de PSI-EM.

3. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo geral utilizar a técnica de *paper spray ionization* (PSI-EM) combinada com a Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Analysis* - PCA) para diferenciar os híbridos de tomates de mesa, identificar os constituintes químicos característicos dos grupos e determinar resíduos de agrotóxicos na casca de dois híbridos (BS II0012 e Sweet Heaven).

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Utilizar a técnica de PSI-EM para determinar o perfil químico de cinco grupos de tomate de mesa (Salada, Saladete, Cereja, Caqui e Santa Cruz);
2. Realizar a separação química entre os grupos Salada, Saladete, Cereja, Caqui e Santa Cruz por ferramentas quimiométricas;
3. Identificar metabólitos responsáveis pela separação dos híbridos dos tomates;
4. Propor um método de quantitativo por PSI-EM para os agrotóxicos clorpirifós e ciazofamida na casca dos tomates BS II0012 e Sweet Heaven dos grupos saladete e cereja;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES E PADRÕES

Os reagentes analíticos utilizados foram: metanol e acetonitrila, grau HPLC/Spectro, 99,9%; (Tedia, Fairfield, USA). O padrão analítico do clorpirifós e ciazofamida, assim como o ácido fórmico e o hidróxido de amônio foram obtidos pela Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi produzida pelo sistema Milli-Q, Millipore apresentando condutividade de 18,2 MΩ. Os papéis utilizados para o PSI foram Whatman Grade 1 (Whatman, GE Healthcare, USA). O agrotóxico comercial Lorsban 480 BR (clorpirifós 48% m/v, 480 g/L, concentrado emulsificável) foi adquirido da Dow AgroSciences e Ranman (ciazofamida 34% m/v, 400 g/L, suspensão concentrada) adquirido da ISK BIOSCIENCES (São Paulo, Brasil).

4.2. MATERIAIS VEGETAIS

As sementes de cada híbrido foram adquiridas no comércio local de Goiânia-GO e as mudas foram produzidas no viveiro comercial VIVATI (Viveiro Vale do Tietê), localizado em Abadia de Goiás (GO), há 35 km da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (EA/UFG). O experimento foi conduzido no Setor de Horticultura da EA/UFG, na cidade de Goiânia-GO, em região de bioma Cerrado, clima tropical semiúmido, com altitude de 730 m, latitude de 16°35'12" S e longitude de 49°21'14" W.

Os materiais de diferentes híbridos foram subdivididos em cinco grandes grupos de tomate de hábito de crescimento indeterminado: Salada, Saladete, Cereja, Santa Cruz e Caqui (ALVARENGA, 2013).

As mudas de tomate foram transplantadas aos trinta e nove (39) dias após a semeadura. Os tratamentos culturais como irrigação, adubação, tutoramento e desbrota das plantas foram realizados, quando se fizeram necessários, sendo uniformes em todas as parcelas. Já a aplicação de defensivos agrícolas foi realizada de forma manual com auxílio de um pulverizador costal, de acordo com o calendário comercial, quando constatada a incidência de pragas em campo e preventivamente para doenças.

Quadro 2: Tomates cultivados no Setor de Horticultura da Escola de Agronomia-da UFG em 2019.

| Grupo | Código | Híbrido | Empresa |
|--------------|---------------|--------------------------------|----------------|
| Salada | 1 | Cerrado | HM Clause |
| | 2 | Compack | Seminis |
| | 3 | Dominador | Agristar |
| | 4 | Dylla | Syngenta |
| | 5 | Justyne | Takii Seed |
| | 6 | Paronnty | Syngenta |
| | 7 | Santy | Sakata |
| Saladete | 8 | BS II0012 | Blue Seeds |
| | 9 | Giácomo | Rijk Zwaan |
| | 10 | Guará | HM Clause |
| | 11 | Parma | Super Seed |
| | 12 | Ravena | Sakata |
| | 13 | Totalle | Nunhens |
| | 14 | Tyna | Sakata |
| Cereja | 15 | Helena | Feltrin |
| | 16 | Sweet Heaven | Sakata |
| | 17 | Tommel | Yuksel |
| | 18 | Fratellino | Rijk Zwaan |
| | 19 | Laranja | TopSeed |
| | 20 | Vermelho | TopSeed |
| | 21 | Pêra Amarelo | UFG |
| | 22 | Amarelo Redondo | UFG |
| | 23 | Cabaça vermelho | UFG |
| | 24 | Vermelho Redondo Grande (VRG) | UFG |
| | 25 | Bem Pequeno Vermelhinho (BPQ) | UFG |
| Caqui | 26 | Médio Vermelho Redondo (MVR) | UFG |
| | 27 | Médio a Pequeno Vermelho (MPV) | UFG |
| Santa Cruz | 28 | Grandeur | Takii Seed |
| | 29 | Gaúcho | TopSeed |
| Santa Cruz | 30 | Débora Max | Sakata |
| | 31 | Laura | Feltrin |

4.3. PREPARO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO

Três frutos dos 31 híbridos (sem aplicação de agrotóxicos) foram colhidos e descascados manualmente usando uma faca. Parte da casca de cada tomate foi adicionada a um tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL e homogeneizada manualmente usando uma haste de vidro. Em seguida, foram adicionados 6 mL de acetonitrila (H_3CCN) (para extração de compostos polares) e agitado no vórtex (Gehaka) por 3 minutos e centrifugados para separação entre a fase líquida e a sólida. A solução de extração foi armazenada em tubos Eppendorf e refrigerada a 6°C em freezer.

4.4. PREPARO DA AMOSTRA PARA DETECÇÃO DOS AGROTÓXICOS

Três frutos dos híbridos BS II0012 (grupo saladete) e Sweet Heaven (grupo cereja) foram colhidos e suas partes separadas manualmente em casca, polpa e semente, com auxílio de uma faca. Cada parte do tomate foi pesada, adicionada a um tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL e homogeneizada manualmente usando uma haste de vidro. Em seguida, adicionou-se 3 mL de acetonitrila (para extração do pesticida clorpirifós e ciazofamida), o tubo foi agitado no vórtex (Gehaka), banho ultrassônico e centrifugados por 3 minutos para separação entre a fase líquida e sólida. A solução de extração foi armazenada em tubos Eppendorf e refrigerada a 6°C em freezer. Os extratos de cada parte do tomate sem aplicação de agrotóxicos (branco) foram utilizados para avaliação do desempenho analítico.

4.5. ANÁLISE POR PSI-EM PARA CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO

Os papéis foram cortados em forma de triângulo equilátero (lados de 1 cm) e mantido por um clipe de metal conectado à fonte de tensão do espectrômetro de massa. A ponta do papel ficou posicionada aproximadamente 4 mm da entrada do espectrômetro de massa. Separadamente, 15 μ L de cada extrato foram depositados no papel e a fonte de voltagem ligada. Um volume de 15 μ L de metanol acidificado (0,1% de ácido fórmico) ou metanol basificado (0,1% de hidróxido de amônio) foi utilizado como um spray de solvente para os modos de ionização positivo (PSI(+)-EM) e negativo (PSI(-)-EM), respectivamente.



Figura 4: Foto ilustrativa do sistema homemade de de Paper Spray Ionization (PSI).

As amostras foram analisadas no espectrômetro de massas LTQ-XL (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemanha) acoplada fonte de ionização por *paper spray* (PSI-EM). As análises foram realizadas em triplicata para o estudo de perfil químico dos tomates no modo de ionização negativo e positivo, com aquisição *FULL* (50-2000 m/z) e modo positivo para detecção do pesticida com o monitoramento do fragmento mais intenso da perda neutra do pesticida. Os parâmetros experimentais utilizados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Condições operacionais do Espectrômetro de Massas LTQ-XL.

| Parâmetros | Perfil Químico | | Pesticida |
|------------------------|----------------|----------|-----------|
| | Positivo | Negativo | Positivo |
| Modo de ionização | Positivo | Negativo | Positivo |
| Tensão do spray | 3,5 kV | 3,5 kV | 5 kV |
| Tensão do capilar | 38V | -38V | 10V |
| Voltagem Tube Lens | 50V | -217V | 80V |
| Temperatura do capilar | 275°C | 250°C | 275°C |
| Energia de colisão | ----- | ----- | 27 |

4.6. ANÁLISE PSI(-)-EM-ORBITRAP PARA CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO

Os extratos dos tomates foram misturados de acordo com o seu grupo, para serem analisados por PSI-EM no modo negativo no espectrômetro de massas Q-Exactive Orbitrap (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemanha) de alta resolução. As amostras foram injetadas para obter o espectro *FULL* (100-1000 m/z) dos grupos de tomates para obter a massa exata e a fórmula molecular das m/z de interesse.

Tabela 4: Condições operacionais do Espectrômetro de Massas Q-Exactive Orbitrap.

| Parâmetros | Perfil Químico |
|------------------------|----------------|
| Modo de ionização | Negativo |
| Tensão do spray | 3,5 kV |
| Tensão do capilar | -0,3 |
| Voltagem S-Lens | -25V |
| Temperatura do capilar | 275°C |

4.7. PERFORMANCE ANALÍTICA

Para avaliar o desempenho analítico da técnica de PSI, foram construídas curvas de calibração, linearidade (R^2), limite de detecção (do inglês, *limit of detection* - LOD), limite de quantificação (do inglês, *limit of quantification* - LOQ) e recuperações a partir do padrão analítico da ciazofamida que foi diluído na matriz da casca dos híbridos de tomates BS II0012 e Sweet Heaven, para atingir as concentrações de 25, 50, 100, 200, 400 e 800 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ da ciazofamida. A curva de calibração foi construída a partir do cromatograma do íon extraído do fragmento mais intenso da perda neutra do pesticida. Foram adicionados 10 μL da solução da amostra no papel e deixado secar por 1 min. As análises foram realizadas em triplicata.

Os LOD e LOQ foram determinados por meio da diminuição das concentrações do padrão analítico na matriz do tomate e verificado o menor valor que seria detectado pela técnica. O teste de recuperação da curva foi realizado fortificando as amostras com concentrações diferentes (35, 150 e 600 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) da curva de calibração, e obtida pela equação $[(CA-CO)/CN]*100$, onde CA é a concentração analisada, CO é a concentração original e CN é a concentração nominal.

A normativa estabelecida pela ANVISA em resolução RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 foi utilizada para verificar a validação do método proposto. Assim, o PSI foi utilizado para verificar a performance analítica da ciazofamida na casca dos tomates BS II0012 e Sweet heaven.

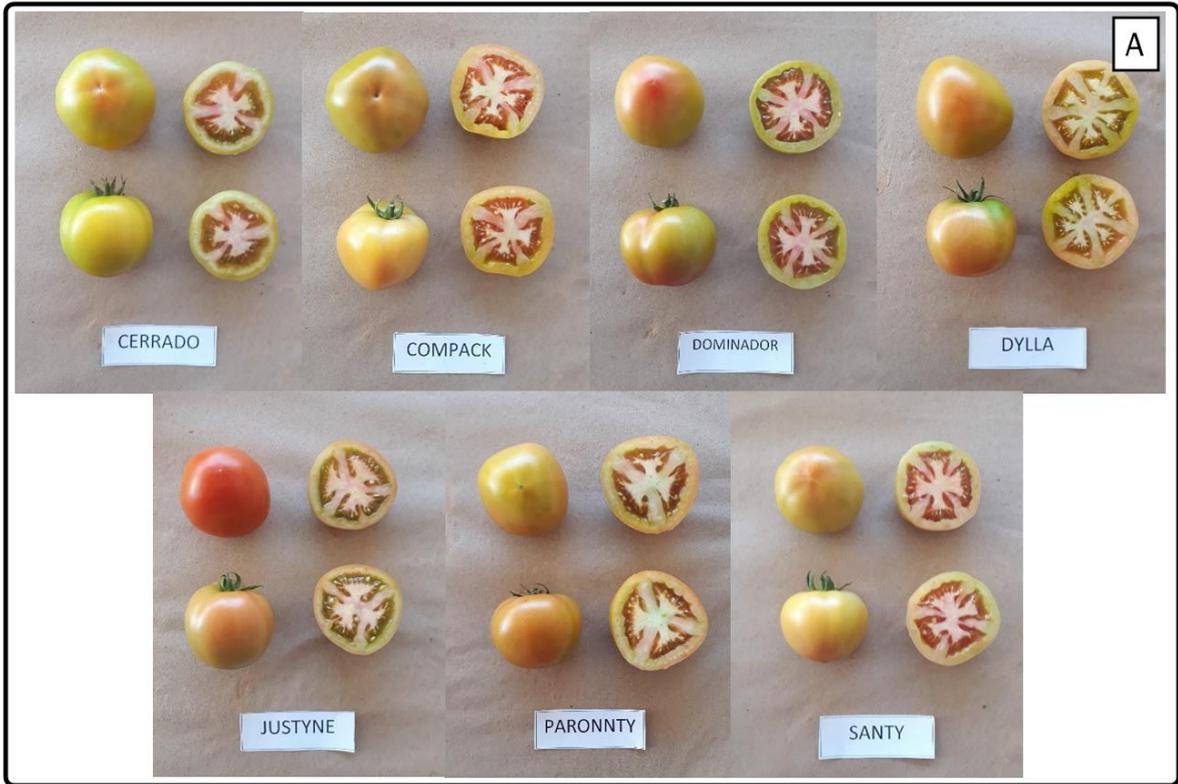
4.8. TRATAMENTO DOS DADOS PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO

Os espectros adquiridos foram organizados no ambiente do *software* MATLAB® R2018a (MathWorks Inc, Natick, MA, EUA) e dispostos em uma matriz de dados, em que as amostras ficam ordenadas em linhas e os valores de massa/carga (m/z) em colunas, sendo variável a intensidade do sinal para cada valor de m/z resultando em uma matriz com 93(amostras)x23400(m/z). Aplicou-se um corte no espectro para uma faixa de trabalho de 100 a 1000 dos valores de m/z . Resultando em uma matriz de 93(amostras) x1994(m/z). Em seguida, aplicou o algoritmo de região de interesse (do inglês, *region of interested - ROI*) para subtração de intensidade de m/z com valores menos que 5%. Assim, para o estudo da Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Analysis - PCA*) realizou a médias entre as triplicatas analisadas e utilizou-se como pré-processamento dos dados a normalização, escalonamento por Pareto e centralização na média.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. PERFIL QUÍMICO DO TOMATE POR PSI-EM

Cada grupo de tomate apresenta similaridades físicas, por exemplo, os grupos dos tomates salada, saladete e santa cruz apresentam tamanhos similares entre si, com uma variação do formato dos tomates do grupo saladete, sendo mais alongados nas suas extremidades. Já o grupo cereja é característico de tomates de pequenos tamanhos, híbridos de cores e formatos. Os tomates de maior tamanho são do grupo caqui. Então, analisando os frutos de tomates fisicamente e visualmente é possível classificá-los de acordo com os grupos propostos por Alvarenga (2013). A figura 5 ilustra as híbridos analisadas.



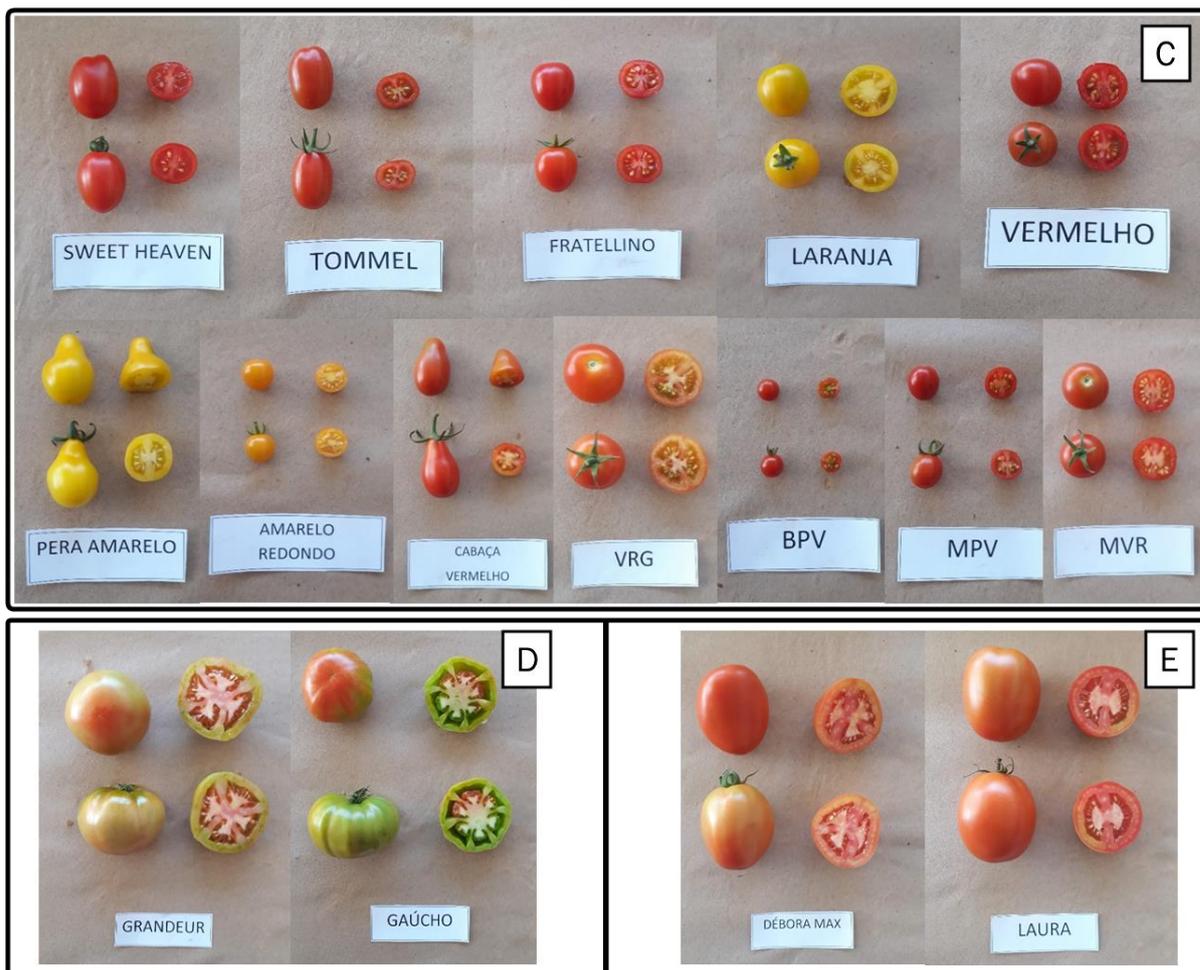


Figura 5: Fotos dos tomates dos grupos A) Salada, B) Saladete, C) Cereja, D) Caqui e E) Santa Cruz.

Na figura 6 são ilustrados os espectros realizados pelas análises de PSI(+)-EM, onde cada espectro é representativo dos tomates de cada grupo analisado: salada, saladete, cereja, caqui e santa cruz, correspondendo aos dos híbridos Cerrado, BS II0012, Sweet Heaven, Grandeur e Débora Max, respectivamente.

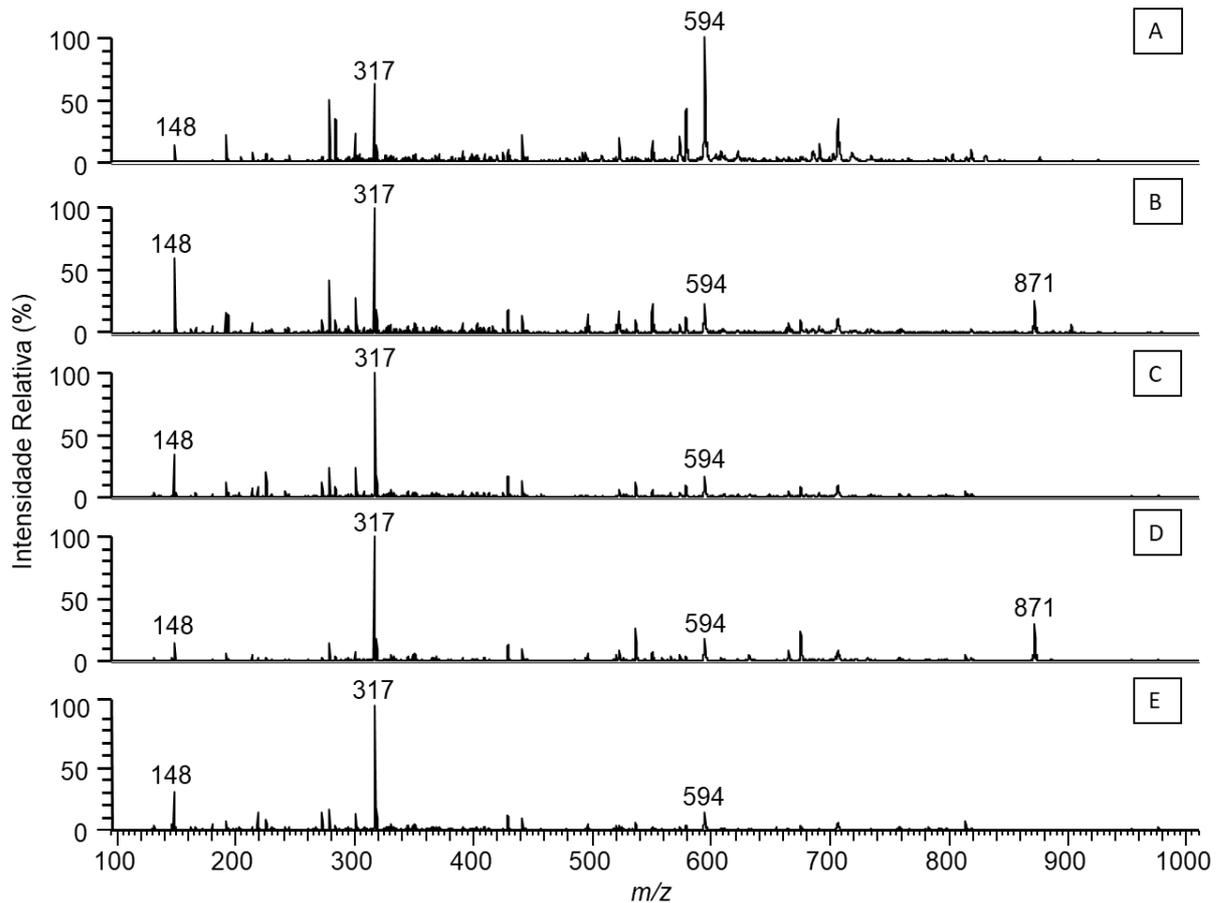


Figura 6: Espectros por PSI(+)-EM dos tomates (A) Cerrado, (B) BS II0012, (C) Sweet Heaven, (D) Grandeur e (E) Débora Max.

Os íons de m/z 148, 317 e 594 estão presentes em todos os espectros das amostras de tomates (figura 6-A, B, C, D e E), com variação nas intensidades relativas dos íons. O íon de m/z 871 foi detectado com intensidade em torno de 50% apenas nos espectros dos tomates BS II0012 e Grandeur (figura 6-B e D). Observe que por uma simples análise visual dos espectros de PSI(+)-EM não é possível discriminar os tomates em função de seus híbridos.

Na figura 7 são ilustrados os espectros das análises realizadas por PSI(-)-EM dos tomates dos grupos analisados, salada, saladete, cereja, caqui e santa cruz, correspondendo aos híbridos Cerrado, BS II0012, Sweet Heaven, Grandeur e Débora Max, respectivamente. Em modo negativo são detectados os constituintes ácidos, como por exemplo os compostos fenólicos. Note que todos os íons mais intensos destacados estão presentes em todos os espectros dos tomates (figura 7-A, B, C, D e E), com variação nas intensidades relativas desses íons. Os íons de

m/z 271 e 609 estão presentes em todos os espectros dos tomates (figura 7-A, B, C, D e E), com variação nas intensidades relativas dos íons, e os íons de m/z 153 e 191 apareceu mais intenso apenas nos espectros dos tomates BS II0012, Sweet Heaven, Grandeur e Débora Max (figura 7-B, C, D e E).

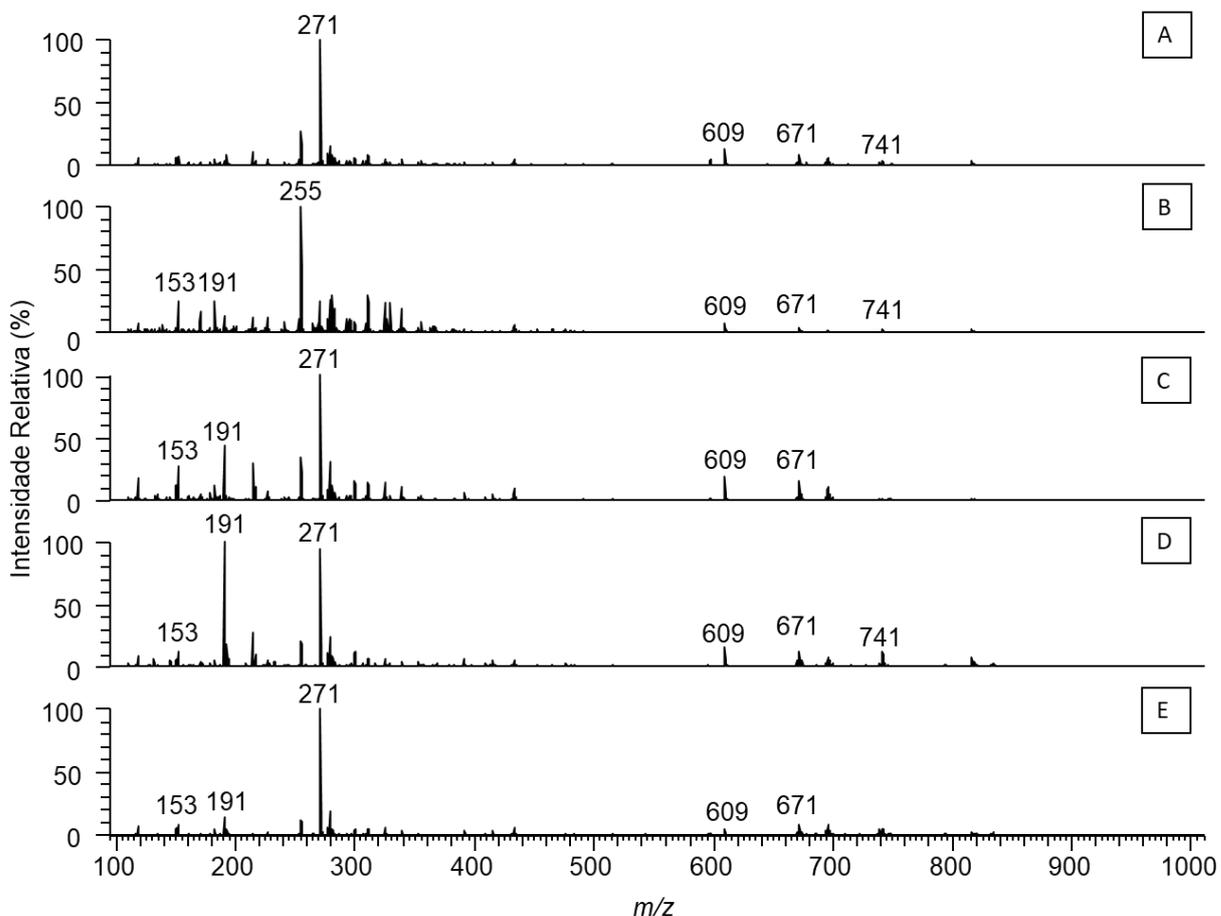


Figura 7: Espectros por PSI(-)-EM dos tomates (A) Cerrado, (B) BS II0012, (C) Sweet Heaven, (D) Grandeur e (E) Débora Max.

A partir dos espectros por PSI(-)-EM foi possível detectar diversos íons que são característicos do perfil químico de tomate. Cita-se, por exemplo, os íons de m/z 153, 191, 271, 609, 741, que de acordo com o perfil de fragmentação e a literatura, corroboram para ser o ácido protocatecuíco, ácido cítrico, naringenina, rutina e rutina pentose, respectivamente (MOCO *et al.*, 2006; AGIUS *et al.*, 2018). Na figura 8 são ilustradas as estruturas químicas desses compostos.

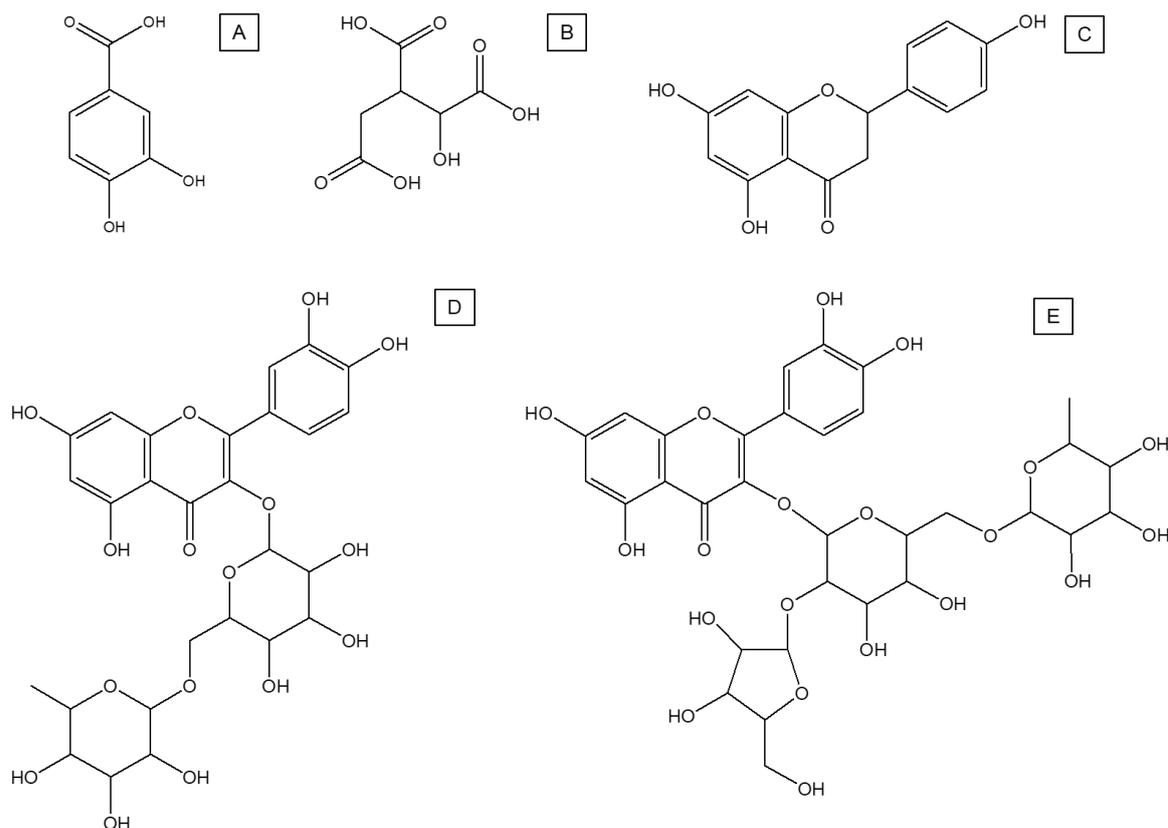


Figura 8: Estruturas químicas dos compostos: ácido protocatecuico (A), ácido cítrico (B), naringenina (C), rutina (D) e rutina pentose (E).

Mesmo que em PSI(-)EM algumas diferenças entre os espectros sejam perceptíveis, há uma grande similaridade entre os espectros dos grupos de tomates. Desta maneira, faz-se necessário um estudo mais completo para distinguir os grupos de tomates analisados por PSI(±)-EM. Assim, foi utilizada a Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Analysis* - PCA) para diferenciar os grupos quimicamente e identificar as variáveis, íons, características de cada família de tomates.

5.2. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS - PCA

Na figura 9 é ilustrado o gráfico de *scores* da PCA por PSI(+)-EM, Nesse modo de ionização, os grupos de tomates não apresentaram separação quimiométrica, mesmo variando-se os pré-processamentos de dados disponíveis no ambiente do MATLAB® R2018a. Note que as amostras do mesmo grupo de tomates estão misturadas com seus diferentes híbridos.

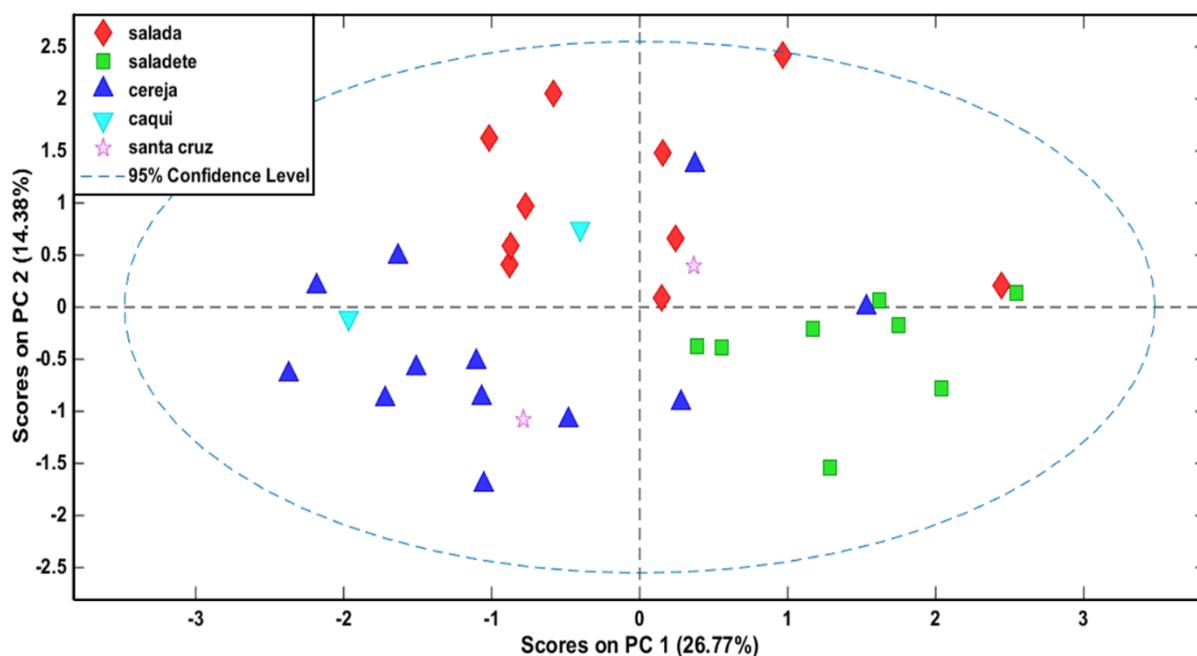


Figura 9: Gráfico de scores da PCA por PSI(+)-EM das 31 híbridoss de tomates.

Análises de tomates pelo modo de ionização positivo prioriza ionizar compostos contendo nitrogênio, como aminoácidos fenilalanina e alguns alcalóides (MOCO *et al.*, 2006) entre outros. Esses compostos não apresentaram uma contribuição significativa para a separação química dos grupos de tomates.

Na figura 10 é ilustrado o gráfico de scores da PCA por PSI(-)-EM da distribuição dos híbridos dos tomates, em que possível compreender quais são as m/z mais características de cada grupo de tomate e quais são as variáveis responsáveis pela separação quimiométrica. A PCA descreveu 47,97% (PC1xPC2) dos dados para explicar a distribuição dos tomates nos cinco grupos.

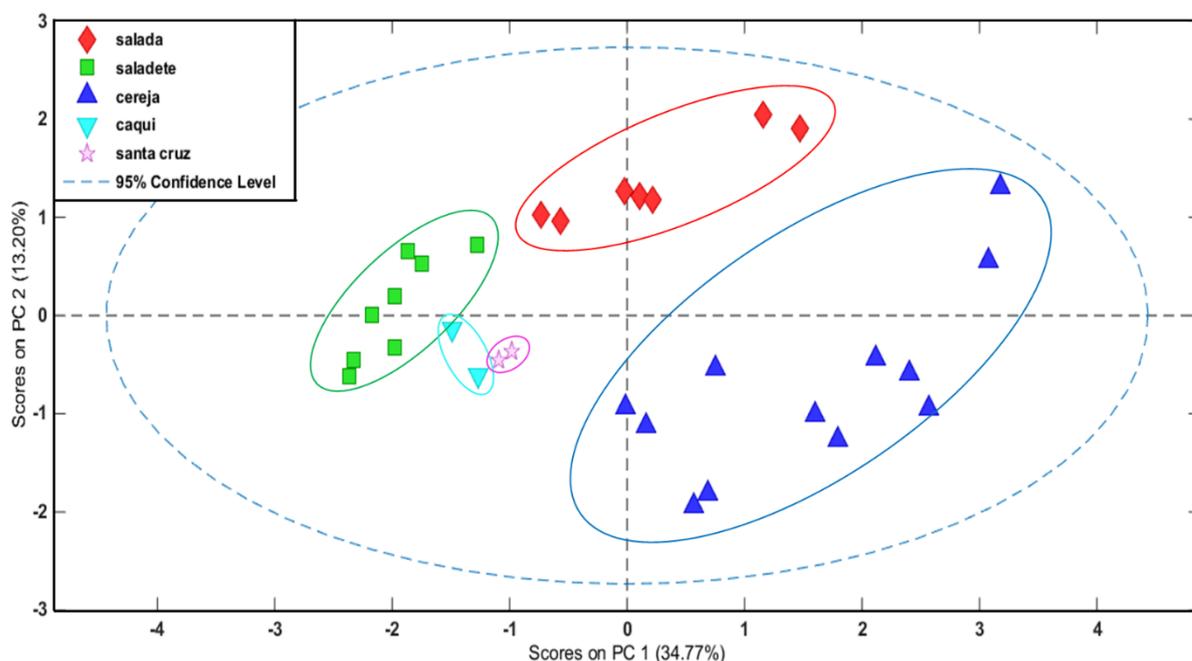


Figura 10: Gráfico de scores da PCA dos grupos de tomates Salada, Saladete, Cereja, Caqui e Santa Cruz por PSI(-)-EM sem a presença dos outliers.

A separação quimiométrica apresentada no gráfico de *scores* da PCA (figura 10), corrobora para a diferenciação dos cinco grupos de tomates de mesa analisados (Salada, Saladete, Cereja, Caqui e Santa Cruz). Para determinar quais são as *m/z* que contribuem para a separação apresentada, os gráficos de *loadings* faz uma correlação entre a distribuição dos tomates nos gráficos de *scores* da PCA com as *m/z*. Foi possível destacar quais *m/z* estão mais presentes em cada grupo de tomates, de acordo com a representação no gráfico de *scores* da PCA. Então, a figura 11A-B ilustra os gráficos de *loadings* da PC1 e PC2, respectivamente.

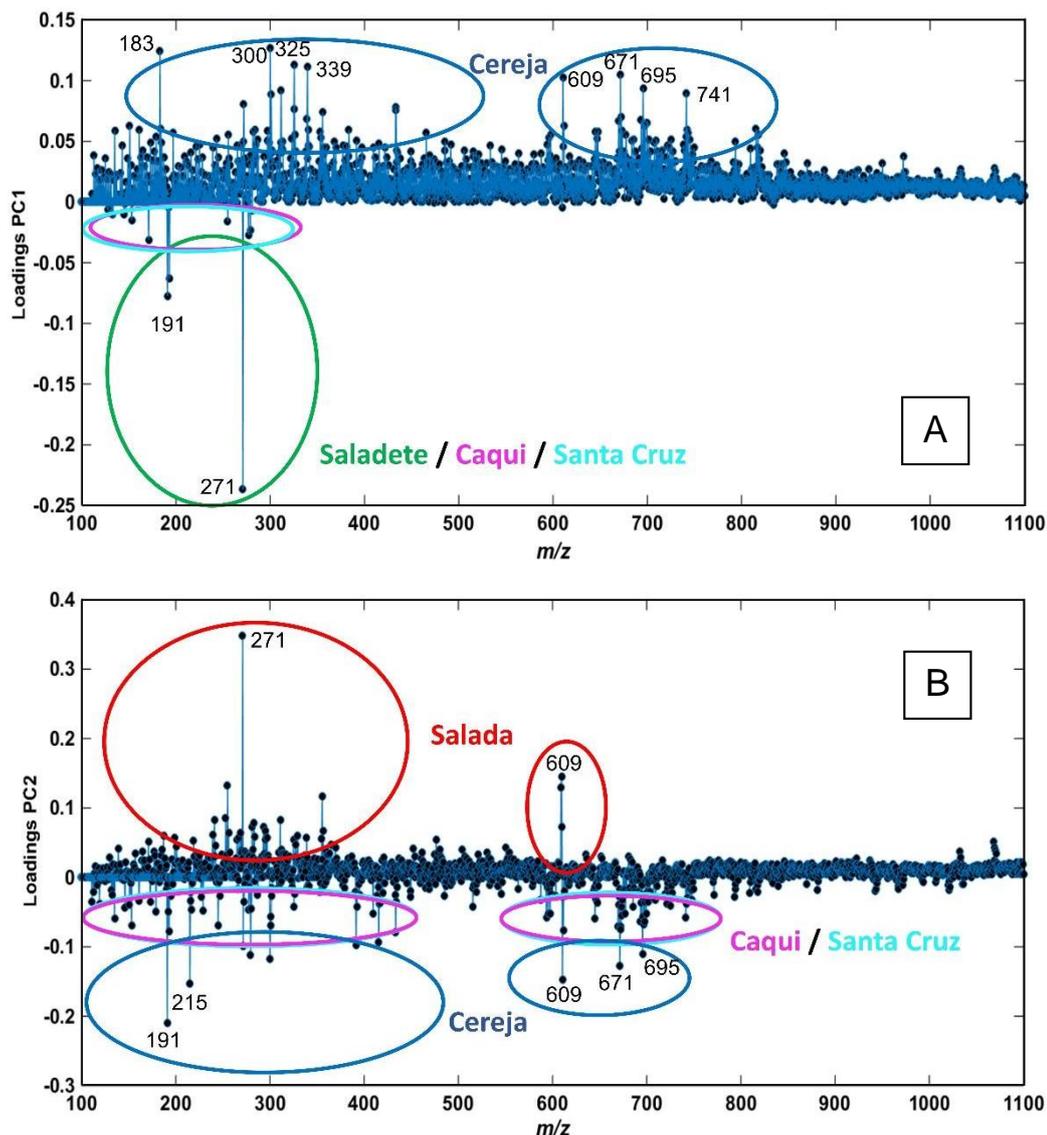


Figura 11: Gráficos de *loadings* da PC1 (A) e PC2 (B) responsáveis pela separação quimiométrica da PCA.

O gráfico de *scores* da PCA é composto por duas componentes principais (do inglês, *Principal Components* – PC) que representa a distribuição das amostras ao longo dos eixos. Os gráficos de *loadings* estão relacionados com as PCs, pois caracterizam quais são as m/z que estão contribuindo para a distribuição das amostras na PC. Assim, ambas PCs e *loadings* apresentam valores positivos e negativos.

Com isso, segundo os gráficos de *loadings* da PC1 e PC2, o íons mais intensos de *m/z* 271 que contribuiu para os grupos salada e saladete. O íon de *m/z* 609 para os grupos salada e cereja. Os íons de *m/z* 671, 695 e 741 são mais marcante no grupo cereja e não foram identificados e nenhum outro grupo, tornando esse grupo diferente quimicamente. E o íon de *m/z* 191 está mais presente nos grupos saladete e cereja.

Na tabela 5 são ilustradas as *m/z* que estão com valores maiores e menores que 0,05 nos gráficos de *loadings*, que tem o maior peso/coeficiente de separação dos grupos de tomates analisados por PSI(-)-EM no gráfico de *scores* da PCA (figura 10). Assim, foram selecionadas 79 *m/z* que mais contribuíram como marcadores químicos para a separação dos grupos de tomates trabalhados.

Tabela 5: *Loadings* da PC1 e PC2 das *m/z* responsáveis pela separação quimiométrica dos tomates.

| PC1 (<i>m/z</i>) | | | | PC2 (<i>m/z</i>) | | | |
|-------------------------|-----|-----|-------------------------|-------------------------|-----|-------------------------|-----|
| <i>Loading</i> Positivo | | | <i>Loading</i> Negativo | <i>Loading</i> Positivo | | <i>Loading</i> Negativo | |
| 133 | 312 | 678 | 128 | 171 | 325 | 135 | 596 |
| 151 | 326 | 695 | 130 | 187 | 329 | 153 | 598 |
| 161 | 340 | 700 | 132 | 199 | 339 | 191 | 609 |
| 179 | 356 | 726 | 133 | 219 | 356 | 193 | 645 |
| 183 | 384 | 741 | 145 | 239 | 357 | 215 | 671 |
| 184 | 433 | 815 | 153 | 241 | 477 | 245 | 678 |
| 197 | 466 | | 171 | 255 | 609 | 217 | 695 |
| 243 | 596 | | 191 | 271 | | 280 | 698 |
| 271 | 598 | | 193 | 283 | | 300 | 741 |
| 282 | 611 | | 255 | 293 | | 392 | |
| 284 | 645 | | 271 | 295 | | 416 | |
| 287 | 671 | | 277 | 297 | | 434 | |
| 300 | 674 | | 279 | 311 | | 594 | |

Para confirmar que essas *m/z* realmente são as que mais influenciam na separação dos grupos, as mesmas foram selecionadas para uma nova análise de PCA. Na figura 12 é ilustrado o novo gráfico de *scores* da PCA gerado a partir dessas variáveis.

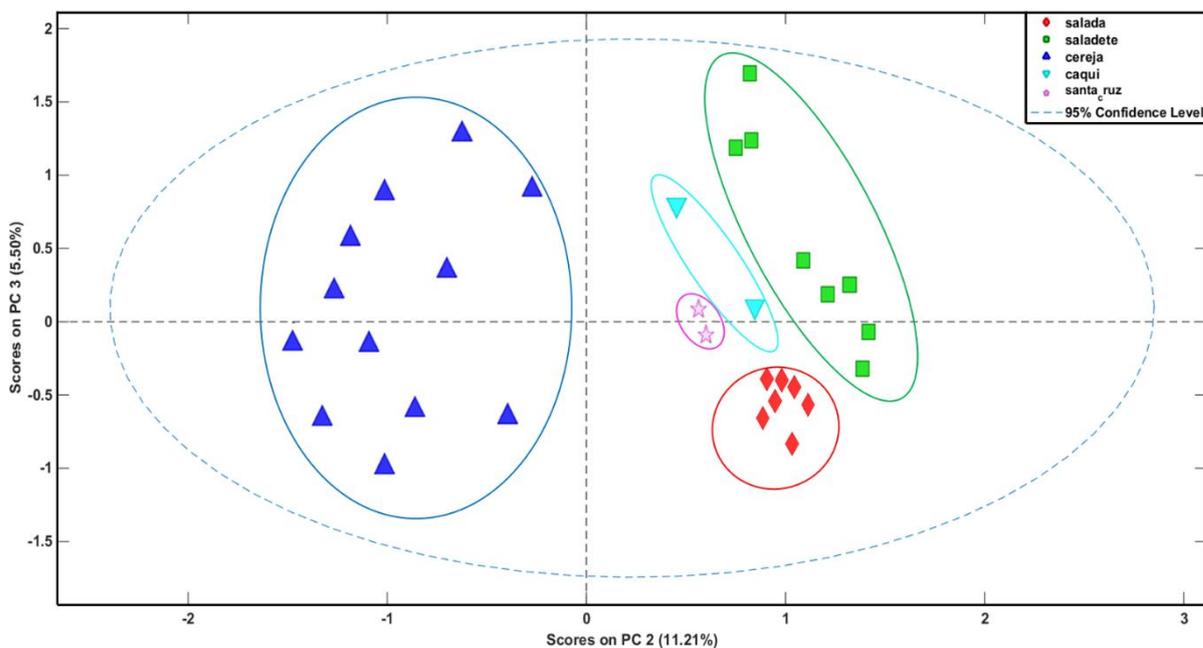


Figura 12: Gráfico de scores da PCA do novo agrupamento das m/z que mais influenciaram na separação dos grupos de tomates.

Note que o agrupamento dos cinco grupos de tomates de mesa trabalhados se mantém utilizando 16,71% dos dados da PC2 e PC3 para explicar a distribuição das amostras. Com isso, pode-se destacar que essas m/z realmente são as que mais contribuem para a diferenciação dos grupos, sendo considerados potenciais marcadores químicos. Assim, os gráficos de *loadings* da PC2 e PC3 ilustrados na figura 13A-B, respectivamente, destacam a distribuição das m/z ao longo das componentes principais.

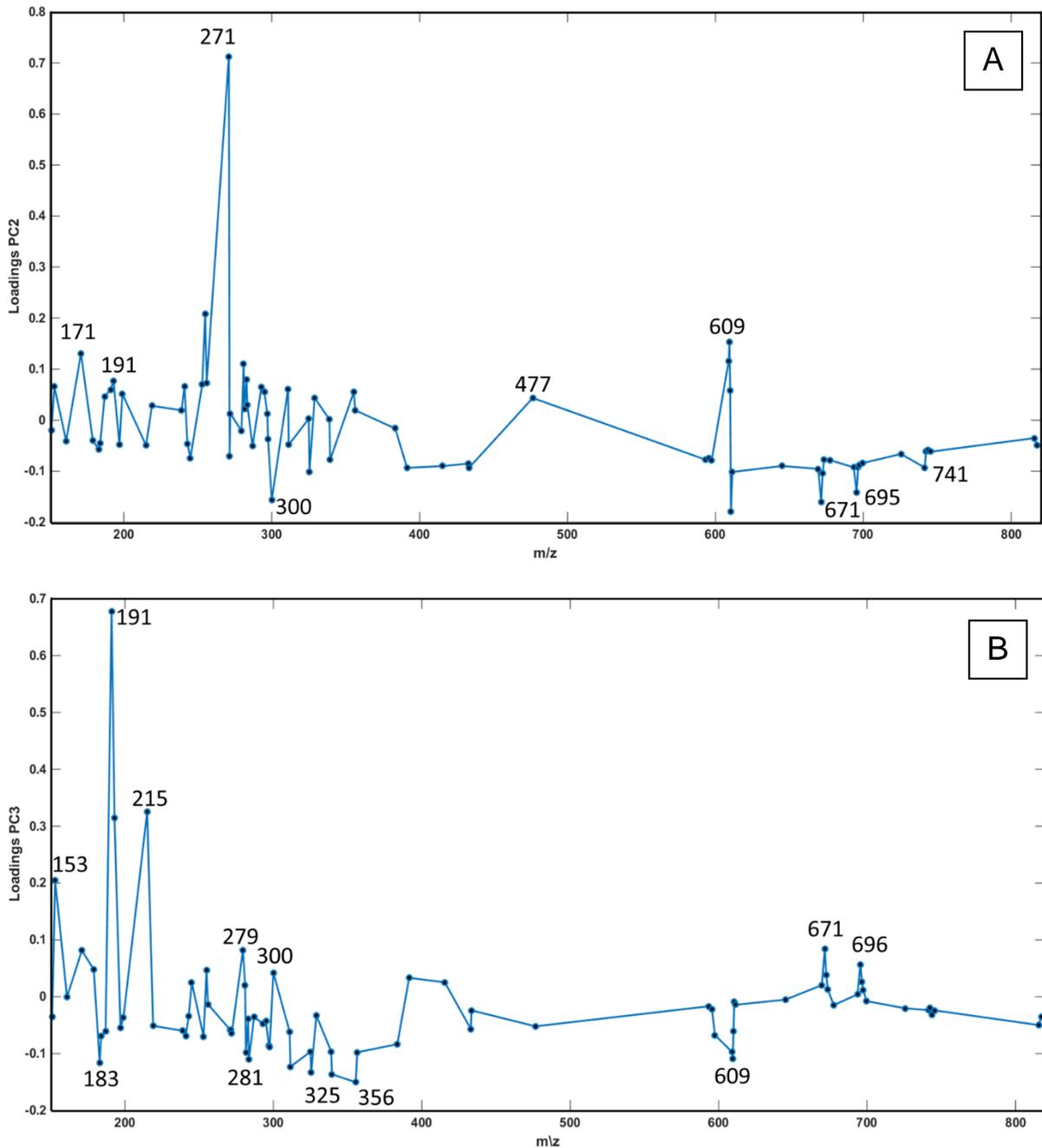


Figura 13: Gráficos de *loadings* da PC2 (A) e PC3 (B) responsáveis pela nova separação quimiométrica da PCA.

Dentre essas *m/z* destacadas, podem corresponder a compostos ácidos, açúcares e flavonoides, sendo alguns dos metabólitos secundários dos tomates (AGIUS *et al.*, 2018; SLIMESTAD; VERHEUL, 2009). Então são compostos que mais contribuíram para na separação dos grupos de tomates analisados. Assim, faz-se necessário verificar em análises por espectrometria de massas de alta

resolução o perfil de fragmentação dos íons para comparar com a literatura, propondo um composto que corresponde com o perfil apresentado pelas análises.

As análises de fragmentação foram realizada por PSI(-)-EM-Orbitrap. Dentre as análises, vinte e oito (28) compostos que mais contribuíram para a separação química entre os grupos salada, saladete e cereja foram identificados por fragmentação (EM²) e referências bibliográficas (tabela 6).

Tabela 6: Lista de metabólitos secundários identificados no extraído de tomate de acordo com formula molecular, massa molecular, fragmentação e referências bibliográficas.

| Grupo | m/z [M-H] ⁻ | m/z medido [M-H] ⁻ | Fórmula molecular | Resoluçã o | Erro (ppm) | DBE | Energia de colisão | EM/EM | Proposta de Composto | Massa molecular (g.mol ⁻¹) | Referências |
|--------|-----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------|---------------|------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Salada | 187 | 187,0976 | C ₉ H ₁₅ O ₄ | 157.599 | 0,04 | 2,5 | 37 | 125 169 | Ácido Hidroxigálico | 188,22 | Fathoni et al., 2017 Ambigaipalan et al., 2016 Fuchs et al., 2020 |
| | 241 | 241,0356 | C ₆ H ₁₀ O ₈ P | 126.587 | 0,84 | 4,5 | 30 | 223 213 197 | Fosfatidilinositol | 242,12 | Pi et al., 2016 |
| | 255 | 255,2331 | C ₁₆ H ₃₁ O ₂ | 139.355 | 0,53 | 1,5 | 30 | 237 227 211 | Ácido Palmítico | 256,42 | Liu et al., 2011 Wang et al., 2017 Harvey, 2005 |
| | 271 | 271,0612 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ | 128.776 | 0,19 | 10,5 | 30 | 151 | Naringenina | 272,25 | XU et al., 2009 Moco <i>et al.</i> , 2006 Perlatti et al., 2016 Anton et. al., 2017 Romero et al., 2010 |
| | | | | | | | | | Naringenina chalcona | | XU et al., 2009; Moco <i>et al.</i> , 2006; Bino et al., 2005; Romero et al., 2010 |
| | 293 | 293,2123 | C ₁₈ H ₂₉ O ₃ | 127.234 | 0,24 | 4,5 | 30 | 275 249 185 96,83 | Ácido 9-oxo- octadecadienóico | 294,4 | Levison et al., 2013 Ağalar et al., 2018 |
| | 609 | 609,1458 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ | 88.242 | -0,44 | 13,5 | 15 | 301 273 257 179 151 | Rutina (Quercetina 3-rutinósido) | 61 0,5 | Moco <i>et al.</i> , 2006 Bino et al., 2005 Perlatti et al., 2016 Romero, et al., 2010; Anton et. al., 2017; |

Continuação: Tabela 6.

| | | | | | | | | | | | |
|----------|-----|----------|------------------------------------------------|---------|-------|-----|----|----------------------------------------|------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | 191 | 191,0198 | C ₆ H ₇ O ₇ | 144.812 | 0,59 | 3 | 20 | 173 111 | Ácido Cítrico | 192,12 | Farag et al., 2020; Romero, et al., 2010; Silva et al., 2020 |
| | 215 | 215,0329 | C ₁₂ H ₇ O ₄ | 143.871 | -9,63 | 9,5 | 28 | 197 187 179 171 153 143 | Ácido 2,3- naftalenodicarboxíli co | 216,19 | Naik et al., 2019 Said et al., 2017 |
| Saladete | 271 | 271,0612 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ | 133.665 | 0,16 | 10 | 30 | 151 107 | Naringenina | 272,25 | XU et al., 2009 Moco <i>et al.</i> , 2006 Perlatti et al., 2016 Anton et. al., 2017 Romero et al., 2010 |
| | 277 | 277,2173 | C ₁₈ H ₂₉ O ₂ | 126.955 | -0,15 | 4,5 | 27 | 259 233 | Ácido Linolênico | 278,44 | XU et al., 2009; Moco <i>et al.</i> , 2006; Bino et al., 2005; Romero et al., 2010 |
| | 279 | 279,2329 | C ₁₈ H ₃₁ O ₂ | 128.790 | -0,12 | 3,5 | 27 | 261 243 235 97 | Ácido Linoleico | 280,45 | Serafim et al., 2019 |
| | 151 | 151,0401 | C ₈ H ₇ O ₃ | 173.216 | 0,01 | 5,5 | 28 | 107 65 | Ácido Hidroxifenilacético | 152,1 | Zabela et al., 2020 Liu et al., 2017 Saura-Calixto et al., 2010 |
| | 153 | 153,0193 | C ₇ H ₅ O ₄ | 173.800 | 0,11 | 5,5 | 36 | 109 97 79 | Ácido Protocatecuico | 154,12 | Rogozinska; Biesaga, 2020 Hassan; Švajdlenka, 2017 |
| | 179 | 179,035 | C ₉ H ₇ O ₄ | 158.529 | 0,38 | 6,5 | 30 | 135 107 | Ácido cafeico | 180,16 | López; Yahia, 2013 Orqueda et al., 2017 |

Continuação: Tabela 6

| | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|----------|-------------------------------------------------|---------|-------|------|----|----------------------------------------|--------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | 191 | 191,0199 | C ₆ H ₇ O ₇ | 153.999 | 0,96 | 3,5 | 20 | 173 111 | Ácido Cítrico | 192,12 | Farag et al., 2020 Romero, et al., 2010 Silva et al., 2020 |
| | 197 | 197,0456 | C ₉ H ₉ O ₅ | 159.143 | 0,27 | 5,5 | 34 | 182 169 153 133 125 | Ácido Seringico | 198,14 | Zheng et al., 2020 Zhang et al., 2007 Sun et al., 2007 |
| | 215 | 215,0329 | C ₁₂ H ₇ O ₄ | 147.992 | -9,49 | 9,5 | 21 | 179 89 | Hexose dihidratada | 216,19 | Silva et al., 2019 |
| | 279 | 279,2329 | C ₁₈ H ₃₁ O ₂ | 128.421 | -0,04 | 3,5 | 25 | 261 243 | Ácido Linoleico | 280,45 | Serafim et al., 2019 |
| | 300 | 300,1019 | C ₁₇ H ₁₆ O ₅ | 115.569 | 5,12 | 10 | 20 | 271 255 | Derivado do Dimetil Pelargonidina | 301,32 | Said et al., 2017 |
| Cereja | 383 | 383,1196 | C ₂₂ H ₃₉ O ₅ | 110.382 | 0,26 | 3,5 | 22 | 365 337 221 197 | Derivado do Ácido Serínico | 384,56 | Zheng et al., 2020 Zhang et al., 2007 |
| | 433 | 433,1141 | C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ | 102.094 | 0,06 | 11,5 | 15 | 313 271 153 | 8-C-glucosil naringenina | 434,4 | Wu et al., 2020 Carlsom et al., 2019 |
| | 597 | 597,1202 | C ₂₉ H ₂₅ O ₁₄ | 83.751 | -7,93 | 17,5 | 17 | 579 553 477 387 357 325 | Ácido Yunanéico F | 598,5 | Barros et al., 2013 Chen <i>et at.</i> , 2011 |
| | 609 | 609,1458 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ | 88.242 | -0,44 | 13,5 | 15 | 301 179 151 | Rutina (Quercetina 3-rutinósido) | 610,5 | Moco <i>et al.</i> , 2006 Bino et al., 2005 Perlatti et al., 2016 Romero, et al., 2010; Anton et. al., 2017; |

Continuação: Tabela 6

| | | | | | | | | | | |
|-----|----------|----------------------|--------|-------|------|----|-------------------|--------------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 695 | 695,4656 | $C_{39}H_{68}O_8P$ | 93.269 | -0,21 | 6,5 | 18 | 416 279 | Glicerol 1,2- dialcanoato 3- fosforo | 696,47 | Raheem et al., 2019 |
| 725 | 725,2355 | $C_{26}H_{45}O_{23}$ | 76.384 | -0,24 | 4,5 | 20 | 593 576 285 | Kaempferol 3-O-(2- pentosil, 6-O- ramnosil)- hexosídeo | 726,63 | Roriz et al., (2014) |
| 741 | 741,1885 | $C_{32}H_{37}O_{20}$ | 84.008 | 0,14 | 14,5 | 18 | 609 300 | Rutina pentosídeo (Quercetina 3-O- pentosil- rutinósídeo) | 741,5 | Ferreres et al., 2010 Moco et al., 2006 Roldan et al., 2014 Romero, et al., 2010 Anton et. al., 2017; |
| 815 | 815,4982 | $C_{39}H_{75}O_{17}$ | 78.837 | -3,36 | 2,5 | 20 | 559 537 225 | Sulfoquinovosil- diacil-glicerol (SQDG) | 817,02 | Montero, 2011 |

Em anexo são apresentadas as figuras que ilustram os espectros de fragmentação dos compostos que foram identificados no presente trabalho (tabela 6). Suas respectivas estruturas químicas e proposta de mecanismo de fragmentos foram demonstrados nos compostos que foram possíveis.

Dentre as massas identificadas, a de maior importância para a separação observada na análise de PCA (Figura 10), é o íon desprotonado $[M-H]^-$ de m/z 191 ($C_6H_7O_7$) (Figura 24). A dissociação induzida por colisão (CID) deste íon levou a formação de um fragmento de m/z 111 (intensidade 100%) $[M-CO_2-2H_2O]^-$, referente a uma perda neutra de CO_2 e duas moléculas de água (H_2O). O fragmento m/z 111 é um íon típico e característico de ácido, correspondendo a um padrão de fragmentação típico do ácido cítrico (FARAG *et al.*, 2020; ROMERO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2020).

O íon desprotonado $[M-H]^-$ de m/z 271 ($C_{15}H_{11}O_5$) (Figura 30) foi um dos mais intensos presentes nos espectros das amostras de tomates. A dissociação induzida por colisão (CID) deste íon levou a formação do fragmento de m/z 151 (100%), referente a perda neutra de C_8H_7O $[M-C_8H_7O]$, fruto de uma fragmentação do tipo reação de retro Diels-Alder. Assim, pelo perfil do espectro de EM/EM pode-se atribuir ao íon m/z 271, a perda neutra e fragmentação, o perfil é típico da naringenina e/ou naringenina chalcona, onde ambos são isômeros estruturais (XU *et al.*, 2009; ROMERO *et al.*, 2010; MOCO *et al.*, 2006; CAMILO; GRUBER, 1999).

Já o íon desprotonado $[M-H]^-$ de m/z 609 ($C_{27}H_{29}O_{16}$) (Figura 38) foi um dos mais presentes nas amostras de tomates, com uma baixa intensidade. A dissociação induzida por colisão (CID) deste íon levou a formação do seguinte fragmento de m/z 301 (intensidade 100%) $[M-C_{15}H_9O_7]$ referente a perda neutra de uma glicosíde ($C_{12}H_{21}O_9$). Assim, a fragmentação corresponde a rutina, um flavonoide, utilizado como antioxidante na prevenção ou tratamento da insuficiência venosa ou linfática e na fragilidade capilar (XU *et al.*, 2009; ĆIRIĆ *et al.*, 2012; MOCO *et al.*, 2006).

O íon desprotonado $[M-H]^-$ m/z 695 ($C_{39}H_{68}O_8P$) (Figura 39) quando submetido a dissociação induzida por colisão (CID) formou os seguintes fragmentos de m/z 415 (intensidade 90%) $[M-C_{18}H_{31}O_2]$ e m/z 279 (intensidade 94%) $[M-C_{21}H_{37}O_6P]$. Este perfil de fragmentação é típico da glicerol 1,2-dialcanoato 3-fosfato (RAHEEM *et al.*, 2019).

Dentre as massas, o íon desprotonado $[M-H]^-$ de m/z 741 ($C_{32}H_{37}O_{20}$) (Figura 40), quando submetido a dissociação induzida por colisão (CID) apresentou os fragmentos da m/z 609 (intensidade 100%) $[M-C_5H_9O_4]$ e de m/z 300 (intensidade

81%) [M-C₁₇H₂₉O₁₃], correspondendo a perda neutra de uma pentose, deoxihexose e hexose), respectivamente. Os fragmentos da *m/z* 741 apresentam um padrão de fragmentação típico da rutina pentose (FERRERES *et al.*, 2010; MOCO *et al.*, 2006; ROLDAN *et al.*, 2014; ROMERO *et al.*, 2010; ANTON *et al.*, 2017).

As discussões destas fragmentações foram dos compostos que mais contribuíram para a separação de seus respectivos grupos. Esse estudo de análise do perfil químico de tomate realizado por análises de PSI-EM, foi o primeiro a ser realizado, com nenhum outro registro encontrado, que se torna um estudo inédito com a matriz.

5.3. DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS POR PSI-EM

A grande maioria de trabalhos relacionados com detecção e quantificação de agrotóxicos usa técnicas de análises tradicionais, como LC-EM e GC-EM (WANG *et al.*, 2017; HADIAN *et al.*, 2019; KAILANI *et al.*, 2019). No entanto, a técnica de PSI-EM configura-se como uma técnica analítica emergente para este propósito. Há na literatura um vasto número de publicações retratando o potencial da ferramenta para o *screening* de resíduos de agroquímicos em diversas matrizes. Pereira *et al.*(2016) e Moura *et al.*(2020) empregaram o PSI-EM como uma técnica rápida de *screening* de resíduos de agroquímicos em alimentos. A vantagem do PSI-EM são rapidez na execução das análises e um preparo mínimo de amostras (MAHER *et al.*, 2016; EVARD *et al.*, 2015).

Os agrotóxicos clorpirifós e ciazofamida foram submetidos à análise por PSI(+)-EM na matriz do tomate BS II0012 e Sweet Heaven, os quais são os mais comercializados atualmente. Em todas as análises, ocorreu o monitoramento do íon mais intenso da fragmentação dos agrotóxicos. Na tabela 7 são descritas a fórmula molecular, massa molecular, valor de *m/z* teórico, *m/z* medido e fragmentos do EM² do clorpirifós e ciazofamida.

Tabela 7: Fórmula molecular, massa molecular, valor de m/z teórico, m/z medido e fragmento do EM/EM do clorpirifós e ciazofamida.

| Pesticida | Fórmula | Massa Molecular | m/z teórico $[M+H]^+$ | m/z medido $[M+H]^+$ | Fragmentos |
|-------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|------------------------|-------------------|
| Ciazofamida | $C_{13}H_{13}ClN_4O_2S$ | 325 | 324 | 325 | 261 216 108 |
| Clorpirifós | $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ | 350 | 349 | 350 | 322 294 198 |

Na figura 14 é ilustrado o espectro de EM/EM obtido por PSI(+)-EM da ciazofamida na matriz de tomate na concentração de 1.000 ng.mL^{-1} , sendo possível observar as perdas neutras de 64 Da e 153 Da.

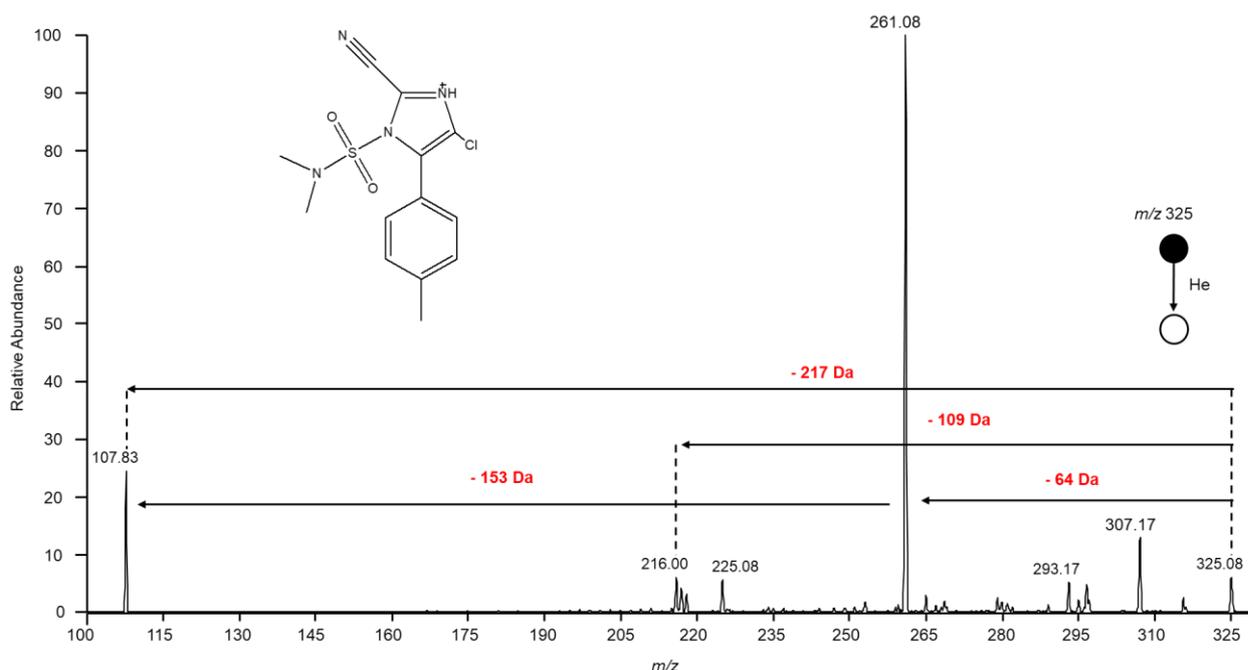


Figura 14: Perfil do espectro de EM/EM do fungicida ciazofamida utilizando Helio como gás de colisão e energia de fragmentação de 25 eV.

Já na figura 15 é ilustrado o espectro de EM/EM obtido por PSI(+)-EM do clorpirifós, na matriz de tomate na concentração de 1.000 ng.mL^{-1} sendo possível observar as perdas neutras de 28 Da e 96 Da, correspondendo aos grupos etil das extremidades e tiofosfarado, respectivamente.

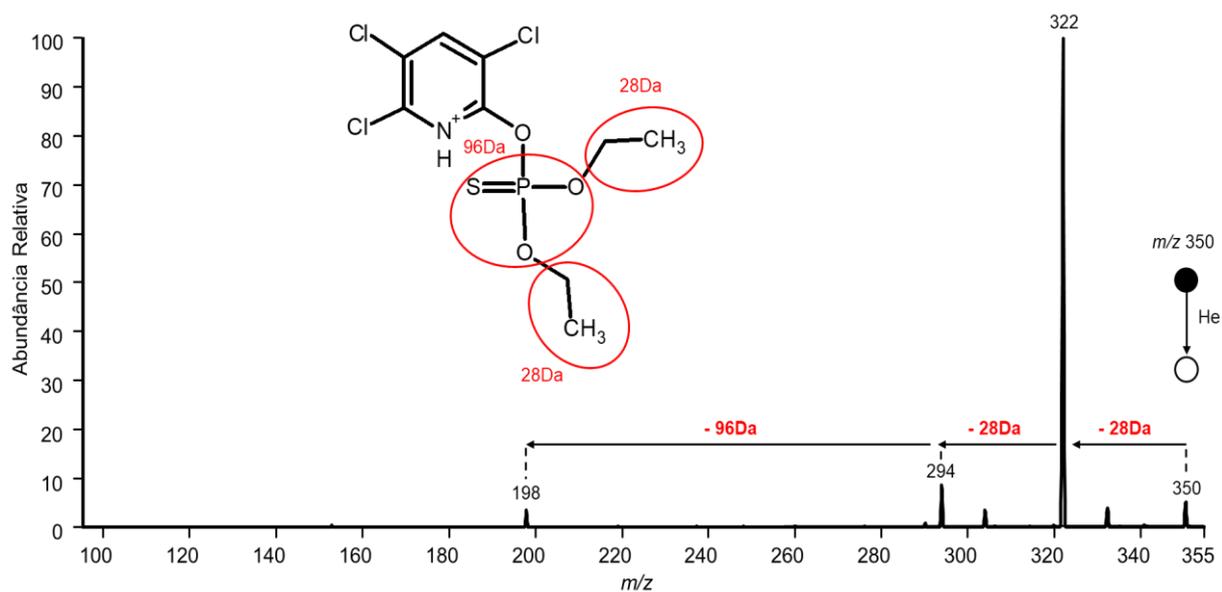


Figura 15: Perfil do espectro de EM2 do inseticida clorpirifós utilizando Helio como gás de colisão e energia de fragmentação de 27 eV.

Nas análises quantitativas por EM é comum utilizar moléculas deuteradas como padrão interno, pois o composto deuterado é ionizado de maneira semelhante ao analito de interesse. O que pode evitar erros na quantificação, que podem ocorrer devido à supressão iônica causada pelo efeito matriz (ESPY *et al.*, 2014; MICHEL *et al.*, 2015). Apesar de ser mais adequado para estudos quantitativos, os padrões deuterados possuem preços elevados. No entanto, abordagem que utilizam padrões alternativos são mais baratas e demonstraram resultados satisfatórios (MOURA *et al.*, 2020; MENDES *et al.*, 2017).

Métodos alternativos também são desenvolvidos para realizar análises quantitativas, como alternativa à utilização de moléculas não deuteradas, como por exemplo, o monitoramento de reação selecionada (do inglês, *Single Reaction Monitoring* – SRM), que seleciona uma reação de fragmentação e monitora a intensidade do íon mais intenso (GANDARA, 2011; MANES *et al.*, 2015).

Análises da amostra real dos tomates com os agrotóxicos e das etapas de detecção e quantificação foram determinadas monitorando o íon mais intenso do produto da fragmentação de acordo com as concentrações dos agrotóxicos no extrato de tomate. Para a ciazofamida monitorou o íon de m/z 261 e para o clorpirifós o íon de m/z 322.

No primeiro momento, foram analisadas as amostras reais submetidas à aplicação dos agrotóxicos, construindo uma curva de decaimento a partir da intensidade do íon monitorado de cada agrotóxico. Na figura 16 é ilustrado o gráfico

de decaimento da intensidade do íon monitorado do clorpirifós no decorrer dos dias após a aplicação.

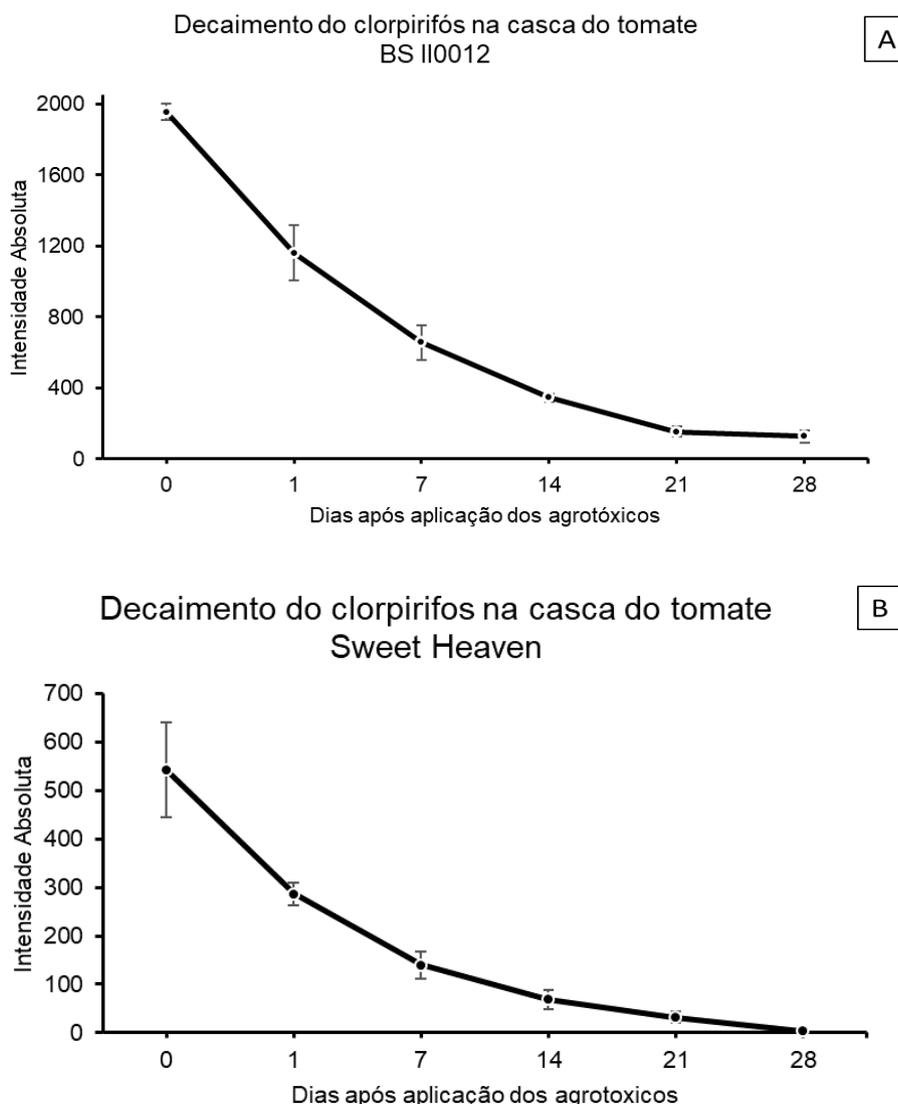


Figura 16: Decaimento do inseticida clorpirifós na casca do tomate BS II0012 (A) e Sweet Heaven (B) por PSI(+)-EM.

É possível observar que o íon monitorado do clorpirifós (m/z 322) tem um decaimento uniforme no decorrer dos dias, indicando que a concentração do mesmo diminui. Os valores apresentados pela intensidade da amostra real após o intervalo de segurança foram acima do esperado pela comparação com padrão analítico de 500 ng.mL^{-1} na matriz do tomate. Não sendo possível concluir a validação do inseticida clorpirifós, pelo fato dos valores estarem fora da faixa de trabalho. Como não houve tempo hábil para refazer todo o experimento de campo para novas análises, optou-se por apresentar apenas a curva de decaimento do inseticida.

Já as amostras reais que foram submetidas à aplicação do fungicida ciazofamida, foram analisadas por PSI(+)-EM para monitorar o íon mais intenso pela fragmentação e construir uma curva apresentando seu decaimento. Na figura 17 é ilustrado o decaimento do fungicida ciazofamida no decorrer dos dias após a aplicação.

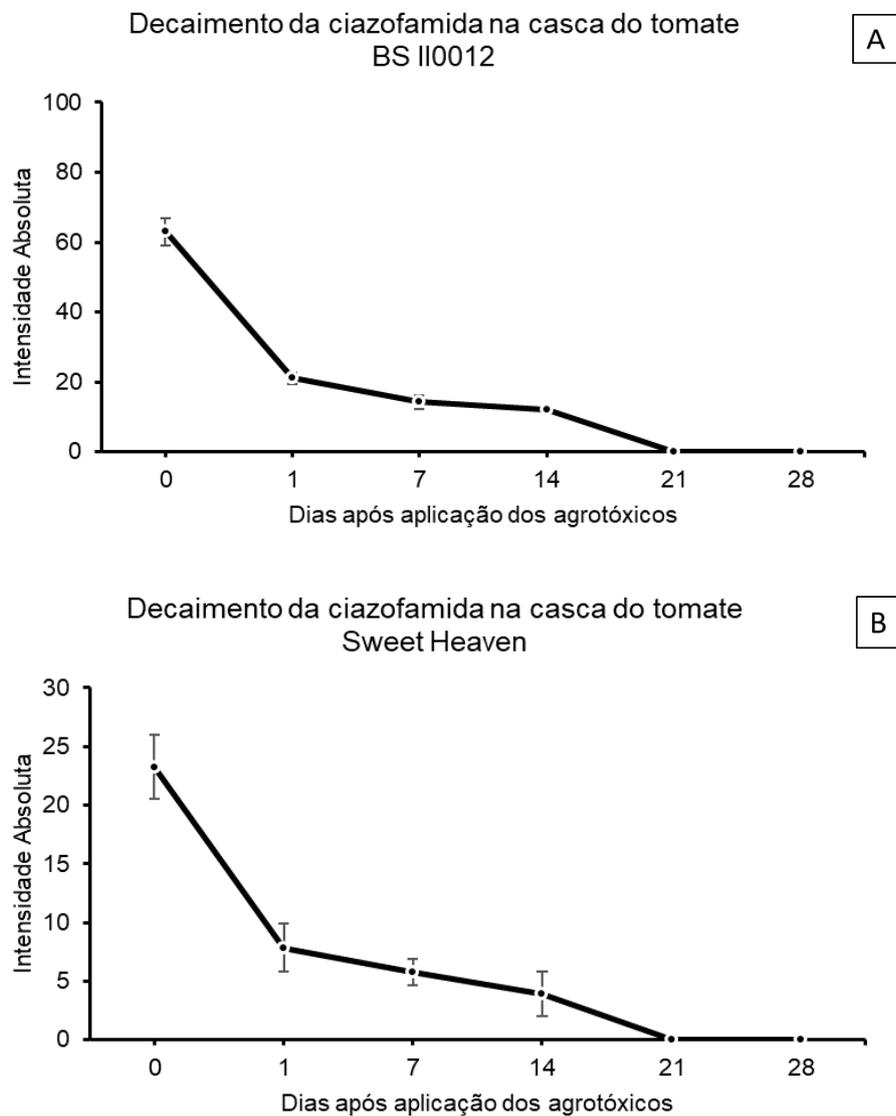


Figura 17: Decaimento da intensidade do fungicida ciazofamida na casca do tomate BS II0012 (A) e Sweet Heaven (B) por PSI(+)-EM.

O decaimento da intensidade do íon monitorado da ciazofamida corrobora com a informação da bula sobre o intervalo de segurança, que é o dia máximo para que a concentração do agrotóxico na cultura aplicada esteja abaixo do LMR, que é de 1 dia após a aplicação. Indicando que a concentração do agrotóxico está diminuindo ao longo dos dias. O que se faz necessário saber qual é a concentração real das

amostras. Para isso, realizou o estudo quantitativo da ciazofamida na matriz dos tomates BS II0012 e Sweet Heaven, para determinar qual a concentração ao longo dos dias após a aplicação.

Para determinar o LOD e LOQ da ciazofamida por PSI(+)-EM na matriz dos tomates, realizou a diminuição da diluição do agrotóxico na matriz até atingir a concentração mínima de detecção e quantificação, respectivamente. A partir das análises realizadas, o LOD ficou definido como 10 ng.mL⁻¹ e o LOQ de 25 ng.mL⁻¹. Os valores de LOD e LOQ estão abaixo do LMR estabelecido pela ANVISA para o fungicida ciazofamida em tomate, que é de 50 ng.mL⁻¹. Os resultados obtidos foram satisfatórios quando comparados com técnicas tradicionais de análises.

Moura *et al.*(2020) empregou a técnica de PSI-EM para analisar a presença do fungicida ciazofamida em frutos de tomates, com LOD de 10 ng.mL⁻¹ e LOQ de 30 ng.mL⁻¹, sendo basicamente os mesmos valores obtidos. Em trabalhos que empregaram técnicas tradicionais de análises (CL e CG) para determinar a concentração desse pesticida em tomates, obtiveram valores de limites de quantificação próximos ao apresentado. Corroborando para o uso de PSI-EM para análises rápidas de agrotóxicos em alimentos (YANG *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2018; TANDON, SINGH, 2012).

Assim, para construir a curva de calibração do fungicida ciazofamida na casca dos tomates, foram utilizado o cromatograma do íon extraído na faixa de *m/z* de 260,5 a 261,5 das análises por PSI(+)-EM. A curva de calibração foi construída nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 400 e 800 ng.mL⁻¹. Na figura 18 é ilustrada a curva de calibração, linearidade (R^2) e a equação da reta da ciazofamida obtidas por análises de PSI(+)-EM nos tomates BS II0012 e Sweet Heaven.

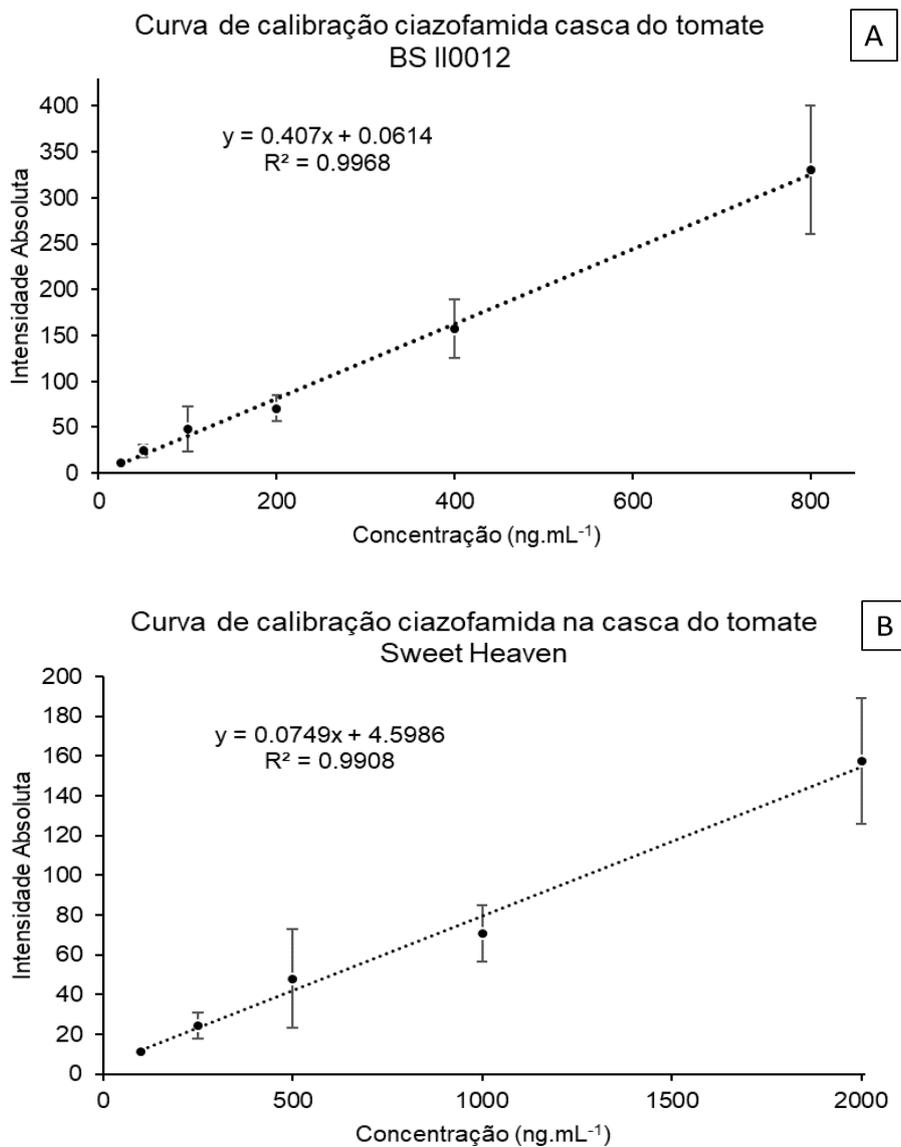


Figura 18: Curva de calibração, linearidade (R²) e a equação da reta do fungicida ciazofamida na casca dos tomates BS II0012 e Sweet Heaven.

O desempenho analítico da curva é considerado satisfatório, pois a linearidade (R²) da curva é acima de 0,99, como trabalhos que já utilizaram a técnica de PSI para desempenho analítico de agrotóxicos em alimentos (MOURA *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2016; REEBER *et al.*, 2015). Os testes de recuperação das concentrações foram construídos a partir de pontos fora da curva de calibração (35, 150, 600 ng.mL⁻¹), cujo resultados podem ser observado na tabela 8 para os tomates BS II0012 e Sweet Heaven e que corresponde a faixa de trabalho estabelecida pela ANVISA (2017) que é de 80% a 120%. Trabalho realizado por Figueiredo *et al.*(2010) e Wang *et al.*(2013) trabalharam com técnicas analíticas tradicionais (LC-EM e GC-EM) e obtiveram uma recuperação entre 96,4% a 116,9% e 82,1% a 105,2%, respectivamente.

Tabela 8: Valores de recuperação obtidos do fungicida ciazofamida por PSI(+)-EM na casca dos tomates BS II0012 e Sweet Heaven.

| | | Concentração nominal (ng.mL ⁻¹) | 35 | 150 | 600 |
|--------------|----------------|-----------------------------------------------|--------------|----------------|----------------|
| BS II0012 | Intradia (n=3) | Concentração analisada (ng.mL ⁻¹) | 31,38 ± 4,65 | 175,12 ± 7,60 | 619,83 ± 54,95 |
| | | Precisão (%) | 14,82 | 4,34 | 8,87 |
| | | Recuperação (%) | 89,66 | 116,74 | 103,31 |
| | Interdia (n=3) | Concentração analisada (ng.mL ⁻¹) | 33,02 ± 1,52 | 155,46 ± 6,20 | 596,63 ± 33,43 |
| | | Precisão (%) | 4,60 | 3,99 | 5,60 |
| | | Recuperação (%) | 94,34 | 103,64 | 99,44 |
| Sweet Heaven | Intradia (n=3) | Concentração analisada (ng.mL ⁻¹) | 33,81 ± 0,77 | 163,98 ± 2,13 | 563,21 ± 45,36 |
| | | Precisão (%) | 2,29 | 1,30 | 8,05 |
| | | Recuperação (%) | 96,59 | 109,32 | 93,87 |
| | Interdia (n=3) | Concentração analisada (ng.mL ⁻¹) | 35,28 ± 1,16 | 150,17 ± 13,40 | 597,27 ± 35,79 |
| | | Precisão (%) | 3,30 | 8,92 | 5,99 |
| | | Recuperação (%) | 100,81 | 100,11 | 99,54 |

Como esperado, a concentração do fungicida ciazofamida na casca dos tomates no dia da aplicação estava em 150 ng.mL⁻¹ para o BS II0012 e 60 ng.mL⁻¹ para o Sweet Heaven, o que se justifica, pois os tomates foram colhidos e realizadas as extrações do agrotóxico no mesmo dia. O fato da concentração do tomate BS II0012 ser bem maior que o Sweet Heaven, pode se dar pelo fato do tamanhos dos tomates, onde o BS II0012 é aproximadamente 12 vezes maior que o Sweet Heaven. Com isso, aumentando a superfície para o contato do tomate com o agrotóxico e tendo uma maior absorção do mesmo. A firmeza dos frutos também pode estar relacionada com essa concentração elevada de agrotóxico na casca do BS II0012 em relação ao Sweet Heaven. Na figura 19 é ilustrada a concentração da ciazofamida nos tomates ao longo dos dias após a aplicação.

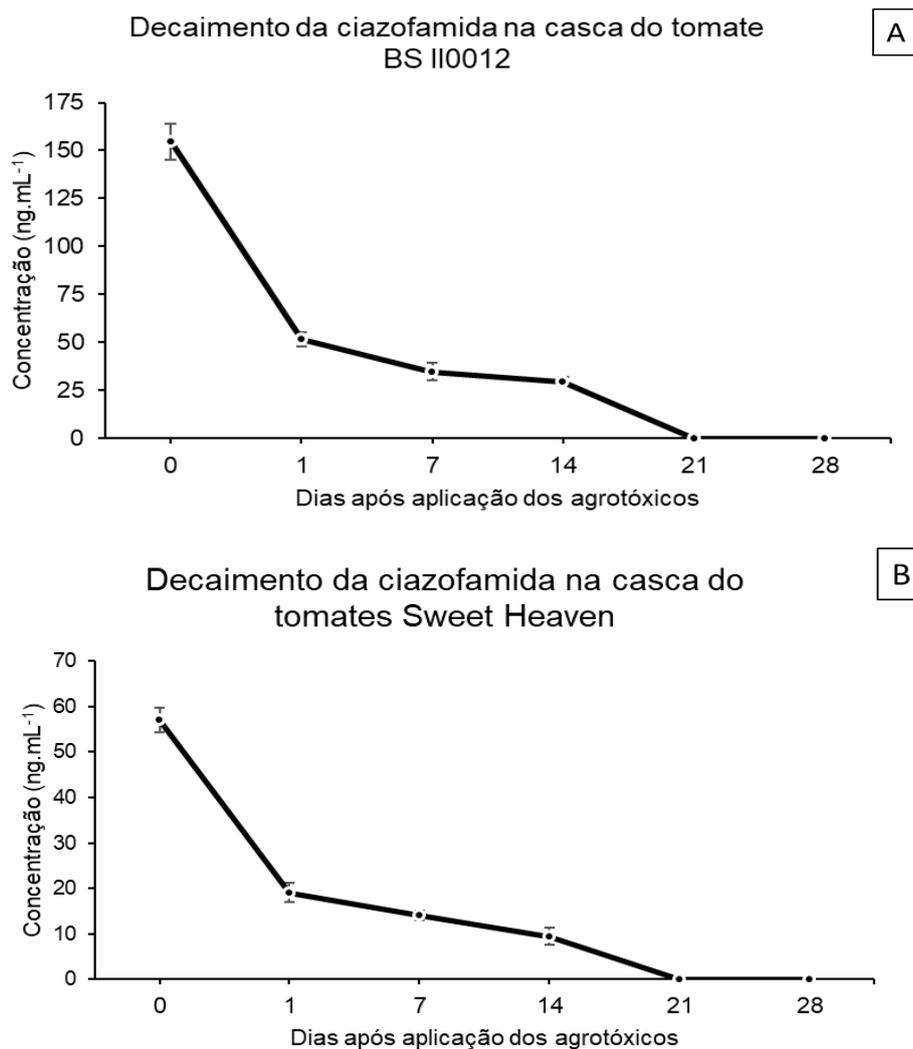


Figura 19: Decaimento da concentração do fungicida ciazofamida na casca do tomate BS II0012 (A) e Sweet Heaven (B) por PSI(+)-EM.

No entanto, logo após o primeiro dia da aplicação do agrotóxico, sua concentração em ambos os tomates caiu, para 50 ng.mL⁻¹ no BS II0012 e 20 ng.mL⁻¹ no Sweet Heaven, valores que já se enquadram dentro do LMR para o fungicida na cultura de tomate, que é de 50 ng.mL⁻¹ para 1 dia após a aplicação. Outros fatores que podem influenciar na diminuição da concentração do agrotóxico são a lavagem das chuvas, irrigação, fotólise, degradação microbiana e volatilização (STOYTCHIEVA, 2011).

6. CONCLUSÃO

Este trabalho utilizou a técnica de PSI-EM para analisar o perfil químico de tinta e um (31) híbridos de tomates de mesa e realizar a determinação dos agrotóxicos ciazofamida e clorpirifós na casca dos híbridos BS II0012 e Sweet Heaven.

O perfil químico foi determinado utilizando a técnica de PSI-EM. Onde a PCA das análises realizadas por PSI(-)-EM apresentaram uma boa separação entre os grupos de tomates de mesa analisados. A partir dos gráficos de *loadings*, conclui-se que os 79 íons são os que mais contribuíram para a separação quimiométrica apresentada. Destas *m/z*, a partir do perfil de fragmentação (EM^2) e referências bibliográficas, corroboram para os seguintes compostos: ácido cítrico, narigenina e/ou narigenina chalcona, rutina, glicerol 1,2-dialcanoato 3-fosforo e a rutina pentosídeo como os mais responsáveis pela separação quimiométrica. Já no modo de ionização positivo, não foi possível distinguir quimicamente os híbridos de tomates avaliadas.

Importante salientar que esse foi o primeiro trabalho a analisar metabólitos secundários de tomates com a técnica de PSI-EM, onde a técnica se mostrou eficaz para análises rápidas e diferenciação entre os frutos de tomates.

O método de quantificação do fungicida ciazofamida desenvolvido por PSI(+)-EM nos tomates BS II0012 e Sweet Heaven, dos grupo salada e cereja, respectivamente, apresentou curva de calibração linear ($R^2 > 0,99$) e LOD e LOQ em baixas concentrações (10 ng.mL^{-1} e 25 ng.mL^{-1} , respectivamente), sendo esses valores abaixo do LMR proposto pela ANVISA, que é de 50 ng.mL^{-1} . E apresentou valores de recuperação da curva de calibração dentro do estabelecido pela ANVISA (80% a 120%).

A técnica de PSI-EM demonstrou ser um método rápido e eficiente para análises de agrotóxicos em tomates, sendo compatível com resultados de trabalhos que utilizou técnicas de CG-EM ou CL-EM. Permitindo assim que a PSI-EM possa ser utilizada em outras matrizes para quantificação ou detecção rápida de agrotóxicos, substituindo as técnicas tradicionais de análises que apresentam alto custo e elaborado preparo de amostra.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCSEM. Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas. 2012. Disponível em: <<http://www.abcsem.com.br/dados-do-setor>>. Acesso em: 03 de ago. 2020.

AGIUS, C.; VON TUCHER, S.; POPPENBERGER, B.; ROZHO, W. Quantification of sugars and organic acid in tomato fruits. *MethodsX*, v. 5, p. 537-550, 2018.

ALBERICI, R. M.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G. B.; ROMÃO, W.; LALLI, P. M.; BENASSI, M.; CUNHA, I. B. S.; EBERLIN, M. N. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 398, p. 265-294, 2010.

ALVARENGA, M. A. R. TOMATE: Produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia. Editora UFLA. p. 400, Lavras, 2013.

ANTON, D.; BERNDER, I.; KAART, T.; ROASTO, M.; HEINONEN, M.; LUIK, A.; PÜSSA, T. Changes in Polyphenols Contents and Antioxidant Capacities of Organically and Conventionally Cultivated Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Fruits during Ripening. *International Journal of Analytical Chemistry*, p. 1-10, 2017.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. *Diário Oficial da União*, p. 87, 2017.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. *Diário Oficial da União*, p. 78, 2019.

BINO, R. J.; VOS, C. H. R.; LIEBERMAN, M.; HALL, R. D.; BOVY, A.; JONKER, H. H.; TIKUNOV, Y.; LOMMEN, A.; MOCO, S.; LEVIN, I. The light-hyperresponsive high pigment-2^{dg} mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. *New Phytologist*, v. 166, p. 427-438, 2005.

BLASCO, C.; VAZQUEZ-ROIG, P.; ONGHENA, M.; MASIA, A.; PICÓ, Y. Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry: comparison of different extraction procedures. *Journal Chromatogr. A*, v. 1218, p. 4892-4901, 2011.

BONA, E. Análise Quimiométrica Aplicada a Dados de Espectrometria de Massas em Amostras de Soro de Pacientes Chagásicos Crônicos. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Curitiba-PR, 2015.

BORGUINI, R. G. Avaliação do potencial antioxidante e algumas características do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. 2006, 178 p. Tese. Universidade de São Paulo. Doutorado em Saúde Pública – Faculdade de Saúde Pública. São Paulo-SP. 2006.

BOTELHO, K. H. M. Espectrometria de Massas com Ionização por Paper Spray e Métodos Quimiométricos Aplicados à Identificação de Adulterações em Açúcar e Óleo

de Coco. Dissertação. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química, Belo Horizonte-BH, 2018.

CAMARGO FILHO, W. P. Perspectivas dos mercados de tomate para indústria e mesa. *Informações Econômicas*, v. 31, n. 5, p. 51-54, 2001.

CAMILO, F. F.; GRUBER, J. Reações de diels-alder entre compostos carbonílicos α,β -insaturados e ciclopentadieno. *Química Nova*, v. 22, n. 3, 1999.

CANUTO, G. A. B.; DA COSTA, J. L.; DA CRUZ, P. L. R.; DE SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F.M. Metabolômica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Química Nova*, v. 41, p. 75-91, 2018.

ĆIRIĆ, A.; PROSEN, H.; STANKIV, M. J.; ĐURĐEVIĆ, P. Evaluation of matrix effect in determination of some bioflavonoids in food samples by LC–EM/EM method. *Talanta*, v. 99, p. 780-790, 2012.

Companhia Nacional de Abastecimento. Tomate: Análise dos Indicadores da Produção e Comercialização no Mercado Mundial, Brasileiro e Catarinense. *Compêndio de Estudos CONAB*, v. 21, 2019.

COOKS, R. G.; OUYANG, Z.; TAKATS, Z.; WISEMAN, J. M. Ambient Mass Spectrometry. *Science*, v. 311, p. 1566-1570, 2006.

DE CARVALHO, T. C.; TOSATO, F.; SOUZA, L. M.; SANTOS, H.; MERLO, B. B.; ORTIZ, R. S.; RODRIGUES, R. R. T.; FILGUEIRAS, P. R.; FRANÇA, H. S.; AUGUSTI, R.; ROMÃO, W.; VAZ, B. G. Thin Layer Chromatography coupled to Paper Spray Ionization Mass Spectrometry for Cocaine and its Adulterants Analysis. *Forensic Science international*, v. 262, p. 56-65, 2016.

DENG, J.; YANG, Y. Chemical fingerprint analysis for quality assessment and control of Bansha herbal tea using paper spray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 785, n. 27, p. 82-91, 2013.

DIESSE. A Produção Mundial e Brasileira de Tomate. Relatório, 2010.

DOMIN, M.; CODY, R. Ambient Ionization Mass Spectrometry. [s.l.] The Royal Society of Chemistry, 2015.

DOMINGOS, E.; DE CARVALHO, T. C.; PEREIRA, I.; VASCONCELOS, G. A.; THOMPSON, C. J.; AUGUSTI, R.; RODRIGUES, R. R. T.; TOSE, L. V.; SANTOS, H.; ARAUJO, J. R.; VAZ, B. G.; ROMÃO, W. Paper Spray Ionization Mass Spectrometry Applied to Forensic Chemistry - Drugs of Abuse, Inks and Questioned Documents. *Analytical Methods*, v. 9, p. 4400-4409, 2017.

EBERLIN, M. N. Electrospray ionization Mass Spectrometry: a major tool to investigate reaction mechanisms in both solution and the gas phase. *European Journal of Mass Spectrometry*, v. 13, p. 19-28, 2007.

ELDRIDGE, B. F. Pesticide application and safety training for applicators of public health pesticides. California Department of Public Health, Sacramento, p. 122, 2008.

ESPY, R. D.; TEUNISSEN, S. F.; MANICKE, N. E.; REN, Y.; OUYANG, Z.; ASTEN, A. V.; COOKS, R. G. Paper spray and extraction spray mass spectrometry for the direct and simultaneous quantification of eight drugs of abuse in whole blood. *Analytical Chemistry*, v. 86, p. 7712-7718, 2014.

EVARD, H.; KRUIVE, A.; LÖHMUS, R.; LEITO, I. Paper spray ionization mass spectrometry: Study of a method for fast-screening analysis of pesticides in fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 41, p. 221-225, 2015.

FAOSTAT. Roma: FAO, 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acessado em: 28 out. 2020.

FARAG, M. A.; SALLAM, I. E.; FEKRY, M. I.; ZAGHLOUL, S. S.; EL-DINE, R. S. Metabolite profiling of three *Opuntia ficus-indica* fruit cultivars using UPLC-QTOF-EM in relation to their antioxidant potential. *Food Bioscience*, v. 36, n. 100673, 2020.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações. Editora Unicamp. Campinas-SP, 2015.

FERRERES, F.; TAVEIRA, M.; PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Seeds: New Flavonols and Cytotoxic Effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 5, p. 2854-2861, 2010.

FIGUEIREDO, E. C.; SANVIDO, G. B.; ARRUDA, M. A. Z.; EBERLIN, M. N. Molecularly imprinted polymers as analyte sequesters and selective surfaces for easy ambient sonic spray ionization. *Analyst*, v. 135, p. 726-730, 2010.

GANDARA, M. S. Desenvolvimento e Validação de método Analítico Utilizando LC-EM/EM para Determinação de Macrolídeos em Carne de Tilápia no Nilo (*Oreochromis niloticus*). Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas – SP. 2011.

HO, C. S.; LAM, C. W. K.; CHAN, M. H. M.; CHEUNG, R. C. K.; LAW, L. K.; LIT, L. C. W.; NG, K. F.; SUEN, M. W. M.; TAI, H. L. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Mini-Review*, v. 24, 2003.

HOFFMANN, E. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Third Edition, 3 ed, 2007.

IBGE. Estatística mensal da Produção Agrícola Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Relatório, 2020. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>> Acessa: 20 de abril 2020.

KROSS, R.K.; CAVALCANTI, M. E. R. M.; BRAGA, E. M. Influência da epiderme do tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) na transferência de massa durante o tratamento osmótico. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (SLACA), 4. Campinas:UNICAMP, 2001.

LIMA, L. A. S. Novas metodologias espectroscópicas e eletroquímica aplicando classificação multivariada em sistemas biológicos. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Química, Natal-RN, 2018.

LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N. E.; LIN, J.-M.; COOKS, R. G.; OUYANG, O. Z. Development, characterization, and application of paper spray ionization. *Analytical Chemistry*, v. 82, p. 2463-2471, 2010.

MAHER, S.; JJUNJU, F. P. M.; DAMON, D. E.; GORTON, H.; MAHER, Y. S.; SYED, S. U.; HEEREN, R. M. A.; YOUNG, I. S.; TAYLOR, S.; BADU-TAWIAH, A. K. Direct Analysis and Quantification of Metaldehyde in Water using Reactive Paper Spray Mass Spectrometry. *Scientific Reports*, v. 6, n. 35643, 2016.

MÄKILÄ, L.; LAAKSSONEN, O.; ALANNE, A.; KORTESNIEMI, M.; KALLIO, H.; YANG, B. Stability of Hydroxycinnamic Acid Derivatives, Flavonol Glycosides, and Anthocyanins in Black Currant Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, n. 22, p. 4584-4598, 2016.

MANES, N. P.; MANN, J. M.; NITA-LAZAR, A. Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry for Absolute Protein Quantification. *Journal of Visualized Experiments*, v. 102, p. 1-15, 2015.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Registro de Agrotóxicos e Afins. Relatório, 2019. Disponível em: < <https://dados.contraosagrototoxicos.org/dataset/registro-de-agrototoxicos-e-afins>>. Acessado em: 04 de agosto 2020.

MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. *Revista Analítica*, v. 06, p. 38–50, 2003.

MATTHEWS, G. A. *Pesticides: health, safety and the environment*. 2.ed. New Jersey, John Wiley & Sons, p.296, 2016.

MENDES, T. P. P.; PEREIRA, I.; FERREIRA, M. R.; CHAVES, A. R.; VAZ, B. G. Molecularly imprinted polymer-coated paper as a substrate for highly sensitive analysis using paper spray mass spectrometry: quantification of metabolites in urine. *Analytical Methods*, v. 9, p. 6117-6123, 2017.

MICHEL, D.; GAUNT, M. C.; ARNASON, T.; EL-ANEED, A. Development and validation of fast and simple flow injection analysis–tandem mass spectrometry (FIA–EM/EM) for the determination of metformin in dog serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 107, p. 229-235, 2015.

MICHELY, J. A.; MEYER, M. R.; MAURER, H. H. Paper spray ionization coupled to high resolution tandem mass spectrometry for comprehensive urine drug testing in comparison to liquid chromatography-coupled techniques after urine precipitation or dried urine spot workup. *Analytical Chemistry*, v. 89, p. 11779-11786, 2017.

MOCO, S.; BINO, R. J.; VORST, O.; VERHOEVEN, H. A.; GROOT, J.; BEEK, T. A. V.; VERVOOT, J.; RIC de VOS, C. H. A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolome Database for Tomato. *Plant Physiology*, v. 141, p. 1205–1218, 2006.

MOURA, A. C. M.; LAGO, I. N.; CARDOSO, C. F.; NASCIMENTO, A. R.; PEREIRA, I.; VAZ, B. G. Rapid monitoring of pesticides in tomatoes (*Solanum lycopersicum*)

during pre-harvest intervals by paper spray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 310, n. 24, p. 1-6, 2020.

NETO, R. D. S. O mercado de tomate em goiás: estudo sobre o comportamento da cadeia e a evolução da atividade produtiva no setor in natura. Dissertação. Universidade Federal de Goiás. Programa de Pós-Graduação de Agronegócio. Goiânia-GO, 2019.

OLIVA, R.; GEMAL, A. L.; NÓBREGA, A. W.; ARAÚJO, A. C. P. Pesticide monitoring program me of the Ministry of Health of Brazil. *Food Additives & Contaminants*, v. 20, n. 8, p. 758–763, 2003.

OUYANG, Z. & ZHANG, X. Ambient mass spectrometry. *Analyst*, v. 135, p. 659-660. 2010.

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. Brasília – DF, p. 246, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>. Acessado em: 05 de agosto 2020.

PEREIRA, I.; RODRIGUES, M. F.; CHAVES, A. R.; VAZ, B. G. Molecularly imprinted polymer (MIP) membrane assisted direct spray ionization mass spectrometry for agrochemicals screening in foodstuffs. *Talanta*, v. 178, p. 507-514, 2018.

PEREIRA, I.; RODRIGUES, S. R. M.; de CARVALHO, T. C.; CARVALHO, V. V.; LOBÓN G. S.; BASSANE, J. F. P.; DOMINGOS, E.; ROMÃO, W.; AUGUSTO, R.; VAZ, B. G. Rapid screening of agrochemicals by paper spray ionization and leaf spray mass spectrometry: which technique is more appropriate? *Analytical Methods*, v. 8, p. 6023-6029, 2016.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Org.). *É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 384, 2003.

PERLATTI, B.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ARDILA, F. A.; CARNEIRO, R. L.; SOUZA, B. H. S.; COSTA, E. N.; EDUARDO, W. I.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; FORIM, M. R. Application of a Quantitative HPLC-ESI-EM/EM Method for Flavonoids in Different Vegetables Matrices. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, n. 3, p. 475-483, 2016.

PINTO, G. D. A. Capacidade de degradação do agrotóxico clorpirifós por bactérias lácticas. Dissertação. Uiversidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em alimentos e nutrição. Rio de Janeiro – RJ, 2017.

RAHEEM, D.; TAWFIKE, A. F.; ABDELMOHSEN, U. R.; EBRADA-EBEL, R.; FITZSIMMANS-THOSS, V. Application of metabolomics and molecular networking in investigating the chemical profile and antitrypanosomal activity of British bluebells (*Hyacinthoides non-scripta*). *Scientific Reports*, v. 9, n. 2547, 2019.

REEBER, S. L.; GADI, S.; HUANG, S.; GLISH, G. Direct analysis of herbicides by paper spray ionization mass spectrometry. *Analytical Methods*, v. 7, p. 9808-9816, 2015.

ROLDAN, M. V. G.; ENGEL, B.; VOS, R. C. H.; VEREIJKEN, P.; ASTOLA, L.; GROENENBOOM, M.; VAN DE GEEST, H.; BOVY, A.; JAAP, M.; VAN EAUWIJK, F.; HALL, R. D. Metabolomics reveals organ-specific metabolic rearrangements during early tomato seedling development. *Metabolomics*, v. 10, p. 958-974, 2014.

ROMERO, M. G.; CARRETERO, A. S.; GUTIÉRREZ, A. F. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*, v. 71, p. 1848-1864, 2010.

SARWAR, M. Inorganic insecticides used in landscape settings and insect pests. *Chem. Res. J.*, v. 1, p. 50-57, 2016.

SILVA, V. D. M.; ARQUELAU, P. B. F.; SILVA, M. R. S.; AUGUSTI, R.; MELO, J. O. F.; FANTE, C. A. Use of paper spray-mass spectrometry to determine the chemical profile of ripe banana peel flour and evaluation of its physicochemical and antioxidant properties. *Química Nova*, v. 43, n. 5, p. 1-7, 2020.

SLIMESTAD, R.; VERHEUL, M. Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 89, p. 1255-1270, 2009.

STOYTICHEVA, M. Pesticides – Formulations, effects, fate. Rijeka: InTech, 1^o ed, 2011.

TANDON, S.; SINGH, N. Method Development for Determination of cyazofamid in Soil and Water by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 35, p. 924-936, 2012.

TOSATO, F.; SOUZA, L. M.; MERLO, B. B.; ORTIZ, R. S.; FILGUEIRAS, P. R.; FRANÇA, H. S. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. A cultura do tomateiro (para mesa). Serviço de produção de informação – SPI, Brasília, 1993.

WANG, X.; QIAO, X.; MA, Y.; ZHAO, T.; XU, Z. Simultaneous determination of nine trace organophosphorous pesticide residues in fruit samples using molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 3821-3827, 2013.

WU, S.; YU, W.; SUN, C.; ZHENG, K.; ZHANG, H.; HUANG, M.; HU, D.; ZHANG, K. Simultaneous determination of residues of metalaxyl, cyazofamid and a cyazofamid metabolite in tobacco leaves and soil by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, v. 32, e. 4161, 2018.

XU, F.; LIU, Y.; ZHANG, Z.; YANG, C.; TIAN, Y. Quasi-EMⁿ identification of flavanone 7-glycoside isomers in Da Chengqi Tang by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Medicine*, v. 4, n. 15, p. 1-10, 2009.

YANG, Q.; LIU, N.; ZHANG, S.; WANG, W.; ZOU, Y.; GU, Z. The dissipation of cyazofamid and its main metabolite CCIM during tomato growth and tomato paste making process. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36, p. 1327-1336, 2019.

8. ANEXOS

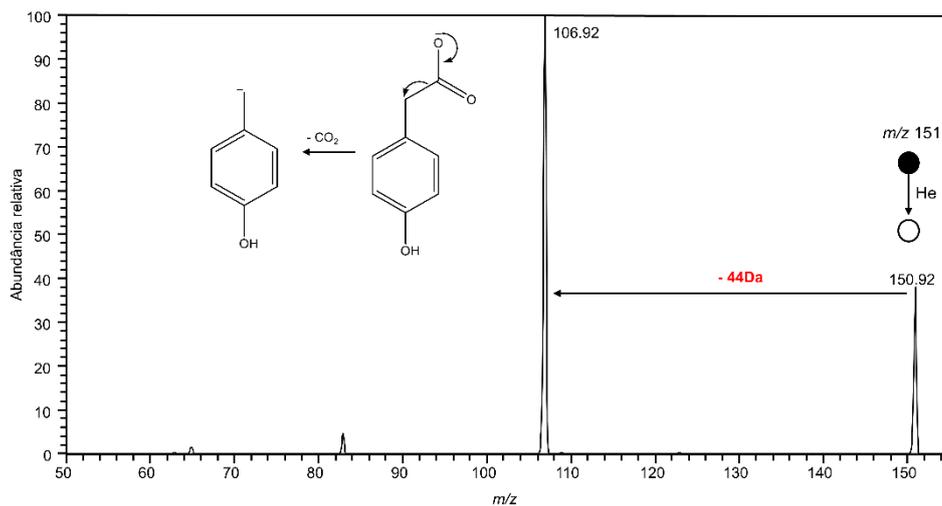


Figura 20: Espectro de fragmentação do íon m/z 151 e estrutura química que corrobora para ácido hidroxifenilacético.

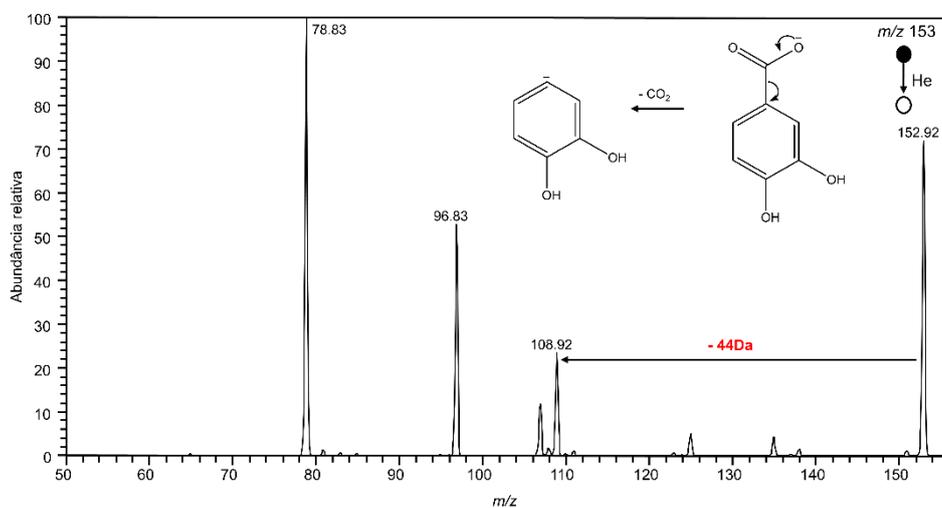


Figura 21: Espectro de fragmentação do íon m/z 153 e estrutura química que corrobora para ácido protocatecuico.

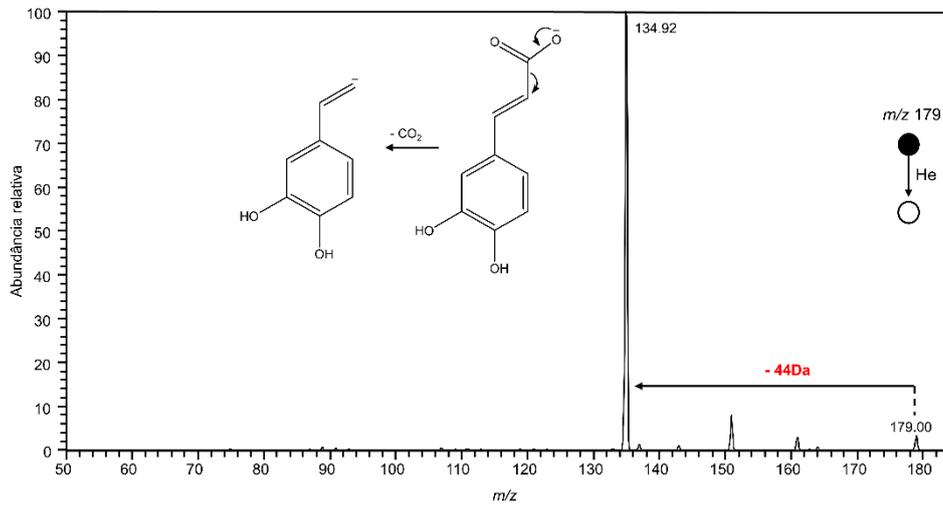


Figura 22: Espectro de fragmentação do íon m/z 179 e estrutura química que corrobora para ácido cafeico.

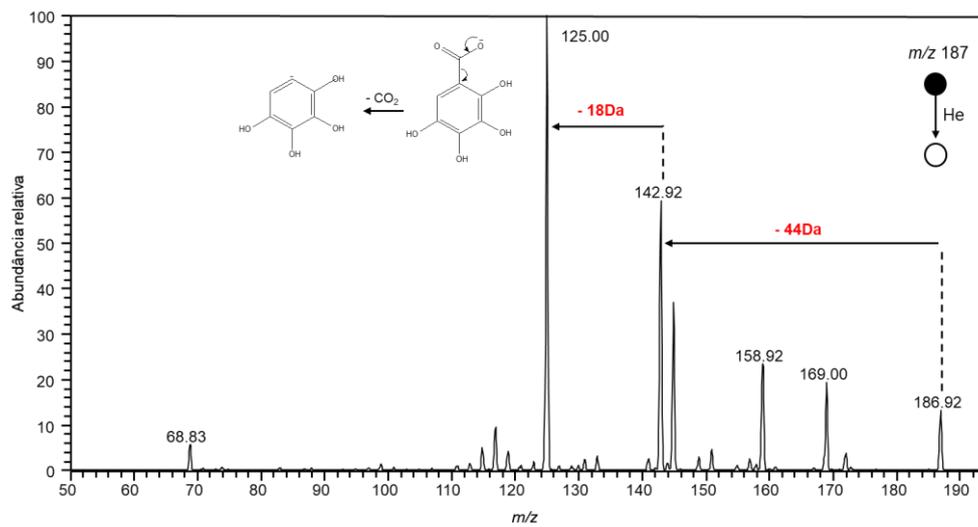


Figura 23: Espectro de fragmentação do íon m/z 187 e estrutura química que corrobora para ácido hidroxigálico.

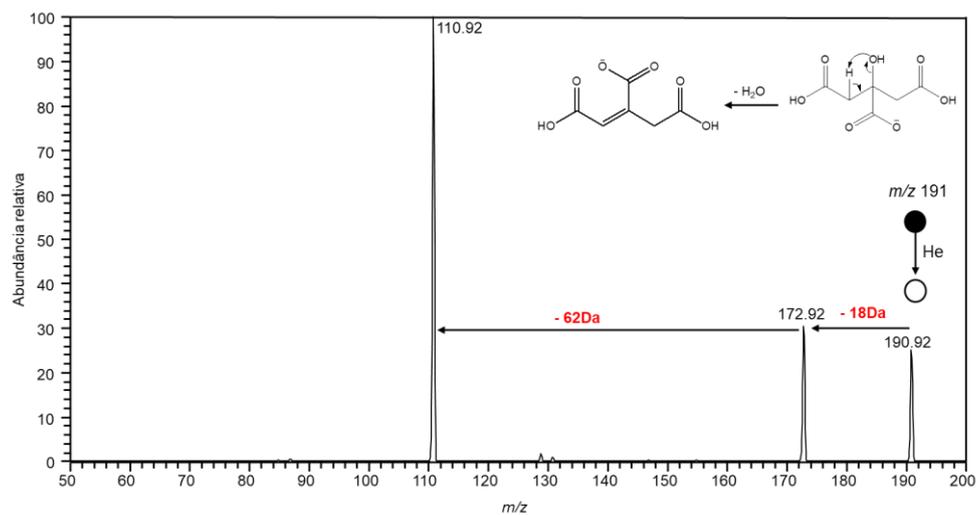


Figura 24: Espectro de fragmentação do íon m/z 191 e estrutura química que corrobora para ácido cítrico.

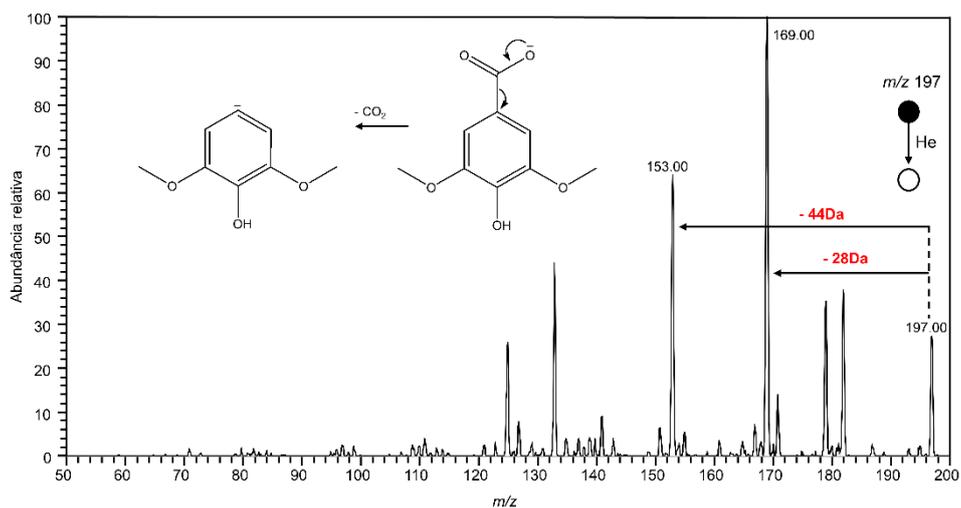


Figura 25: Espectro de fragmentação do íon m/z 197 e estrutura química que corrobora para ácido serínico.

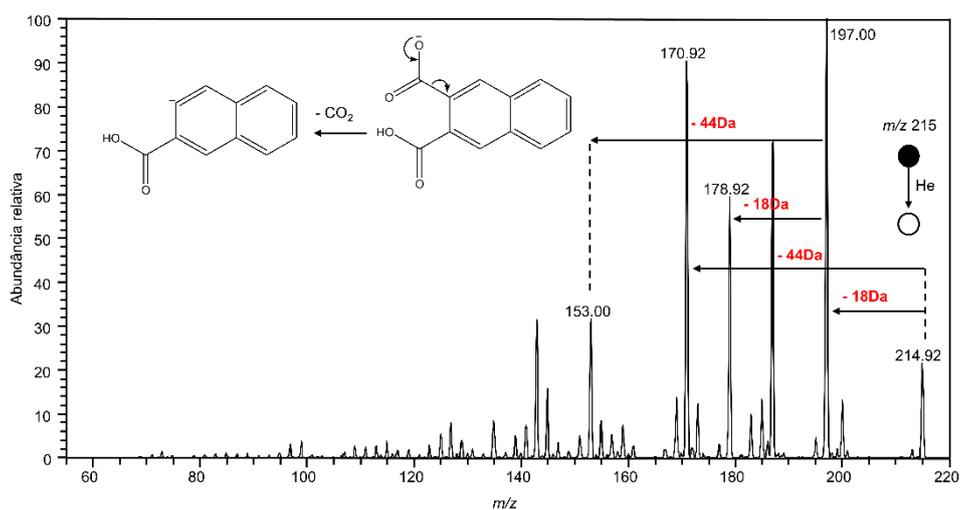


Figura 26: Espectro de fragmentação do íon m/z 215 e estrutura química que corrobora para ácido 2,3-naftalenodicarboxílico.

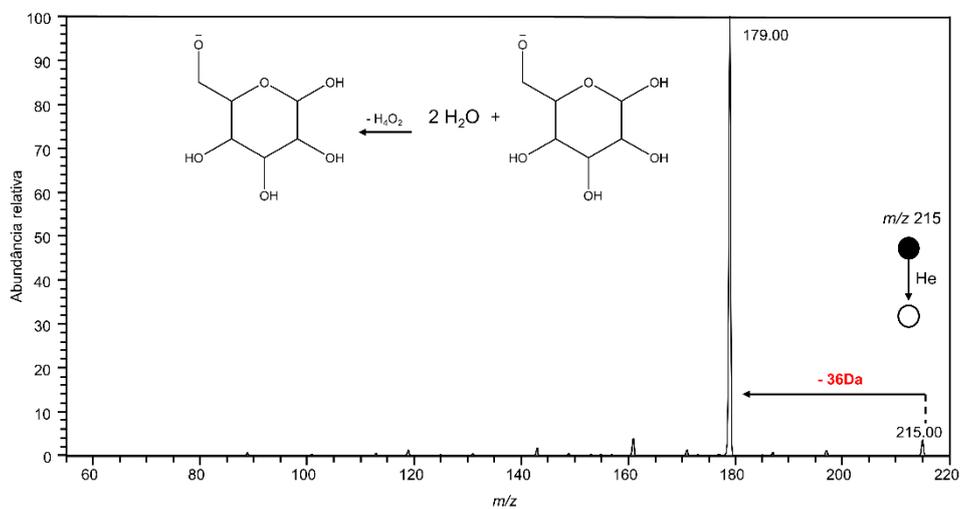


Figura 27: Espectro de fragmentação do íon m/z 215 e estrutura química que corrobora para hexose dihidratada.

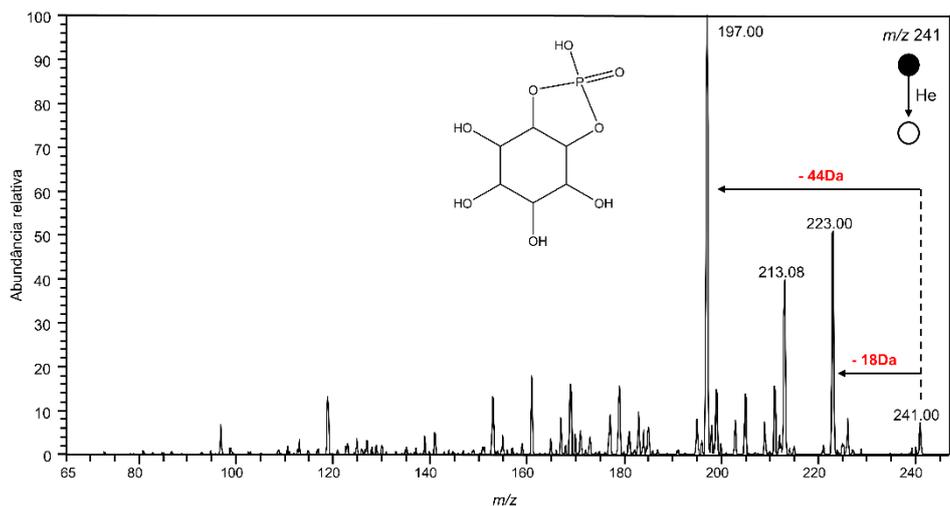


Figura 28: Espectro de fragmentação do íon m/z 241 e estrutura química que corrobora para fosfatidilinositol.

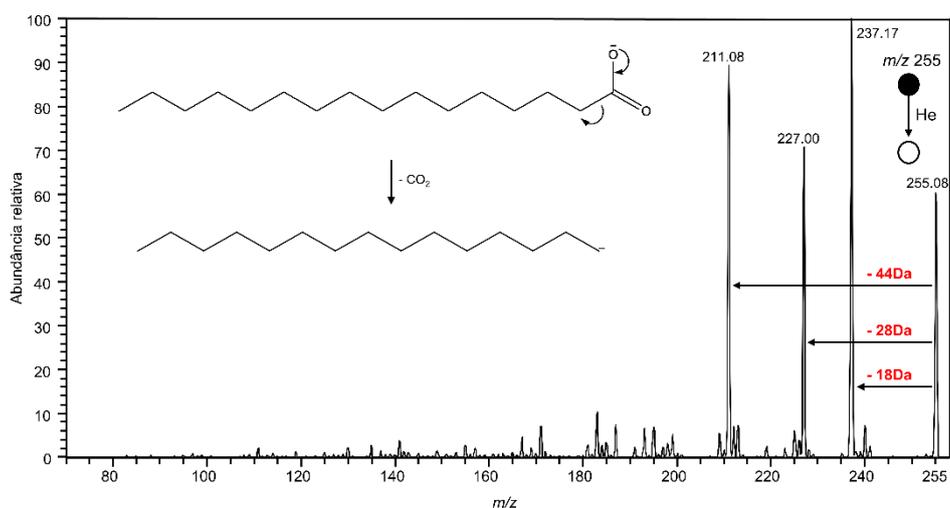


Figura 29: Espectro de fragmentação do íon m/z 255 e estrutura química que corrobora para ácido palmítico.

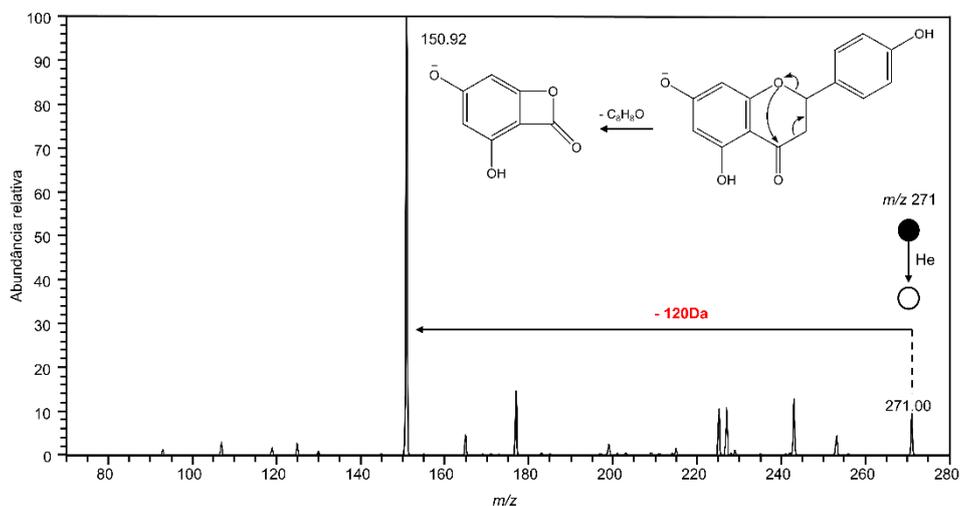


Figura 30: Espectro de fragmentação do íon m/z 271 e estrutura química que corrobora para naringenina ou naringenina chalcona.

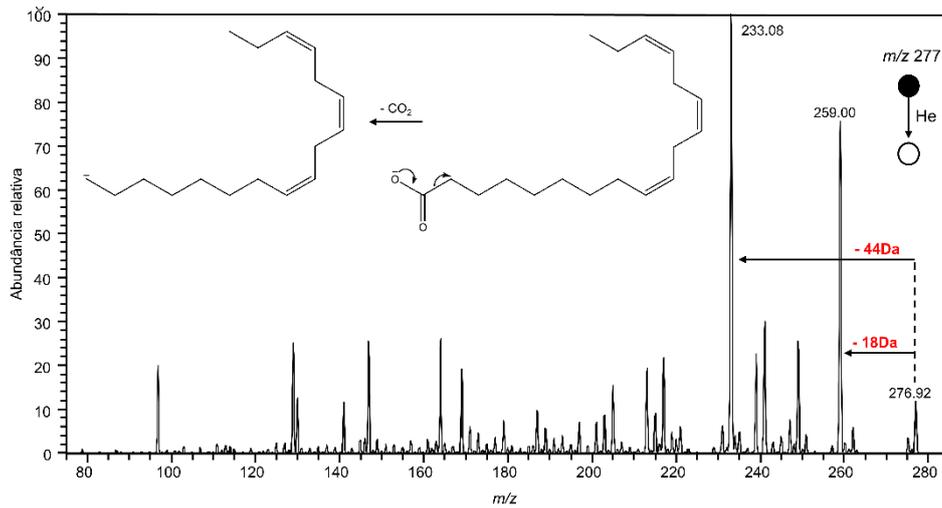


Figura 31: Espectro de fragmentação do íon m/z 277 e estrutura química que corrobora para ácido linolênico.

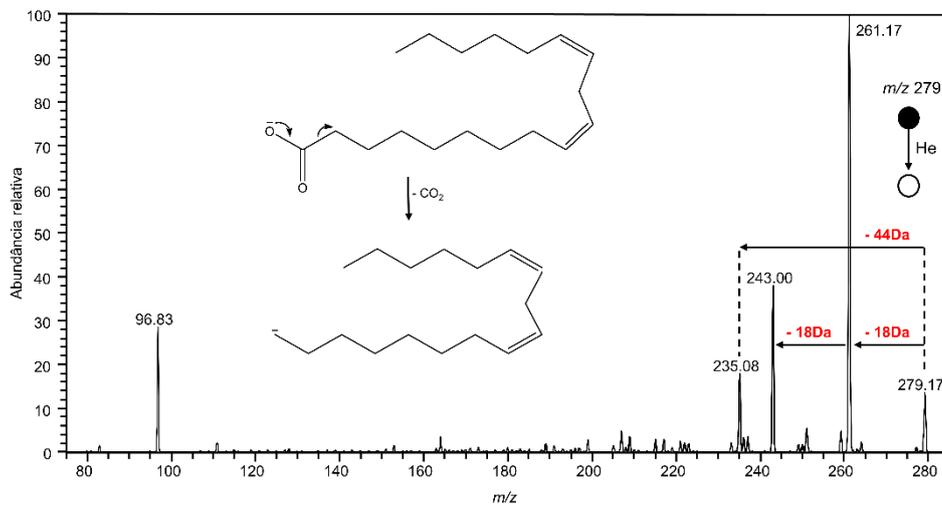


Figura 32: Espectro de fragmentação do íon m/z 279 e estrutura química que corrobora para ácido linoleico.

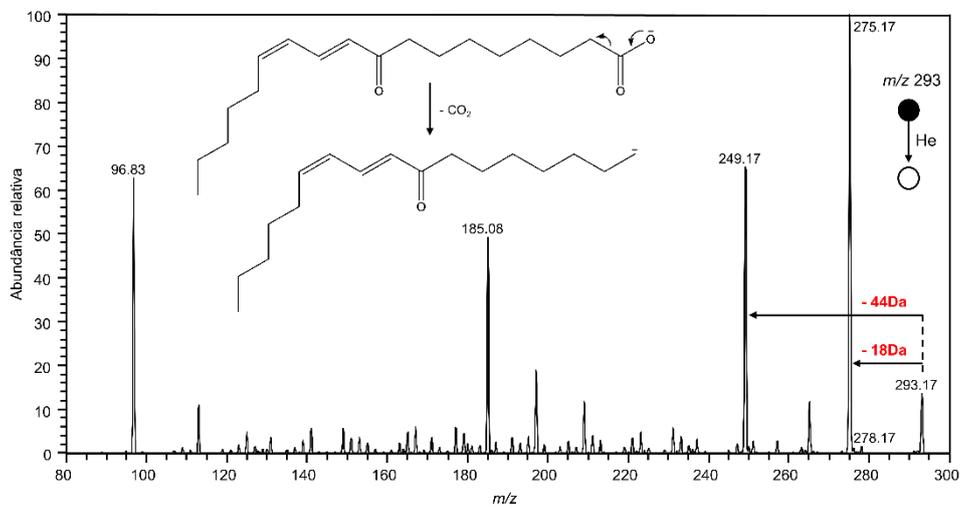


Figura 33: Espectro de fragmentação do íon m/z 293 e estrutura química que corrobora para ácido 9-oxo-octadecadienóico.

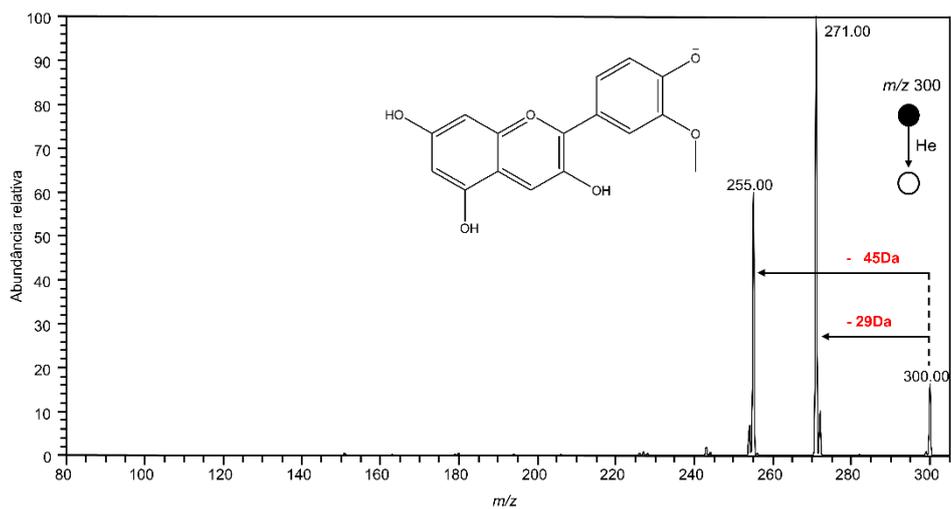


Figura 34: Espectro de fragmentação do íon m/z 300 e estrutura química que corrobora para o derivado do dimetil pelargonidina.

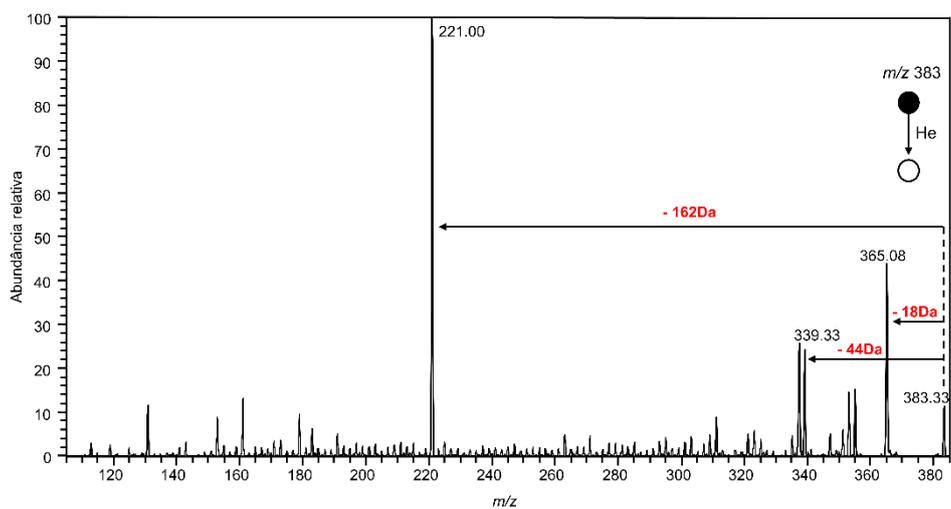


Figura 35: Espectro de fragmentação do íon m/z 383 e estrutura química que corrobora para o derivado do ácido serínico.

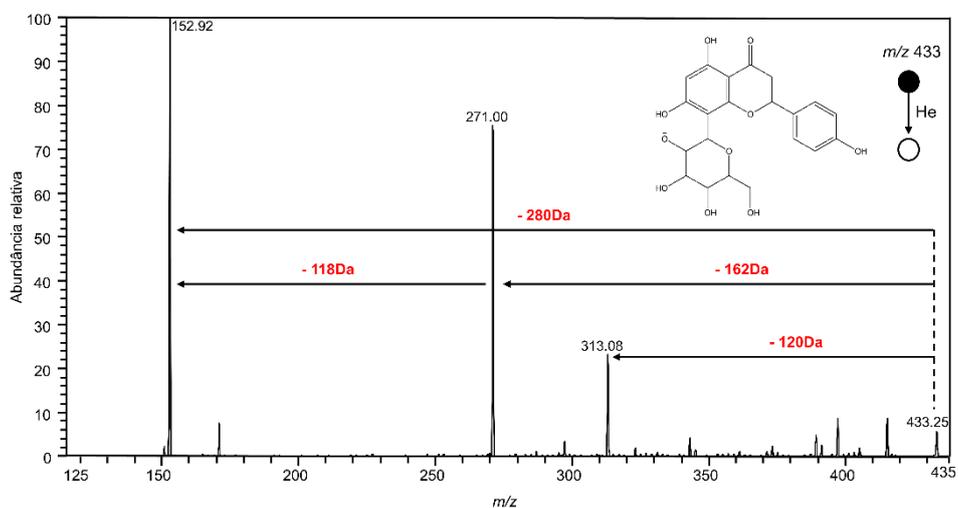


Figura 36: Espectro de fragmentação do íon m/z 433 e estrutura química que corrobora para 8-C-glucosil natingenina.

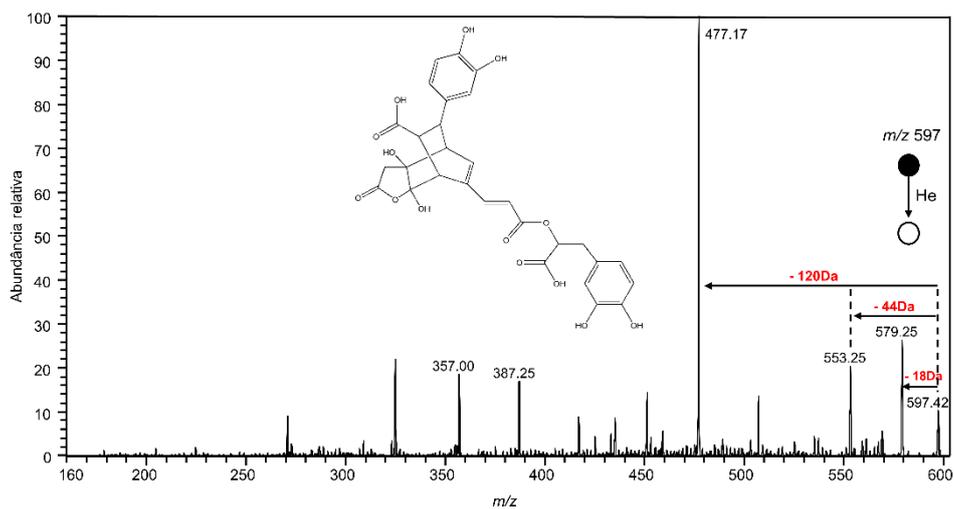


Figura 37: Espectro de fragmentação do íon m/z 597 e estrutura química que corrobora para ácido yunanéico F.

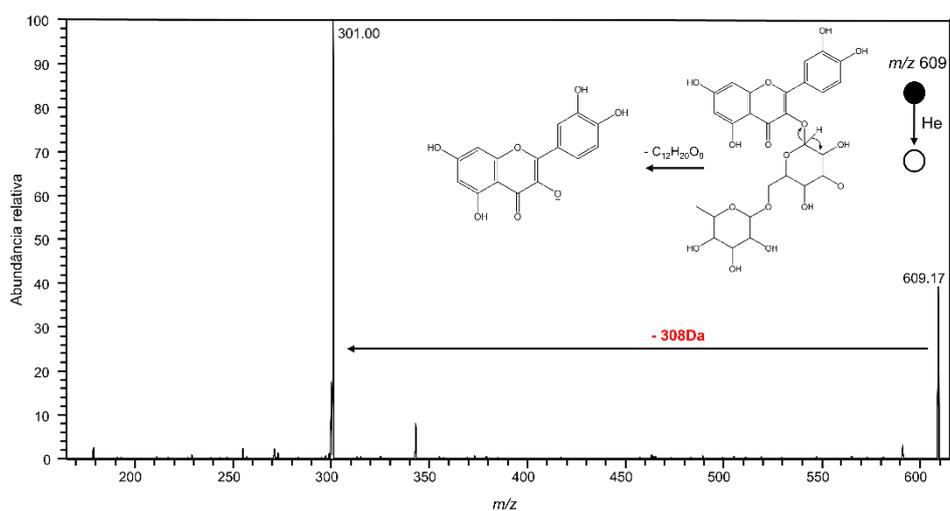


Figura 38: Espectro de fragmentação do íon m/z 609 e estrutura química que corrobora para rutina.

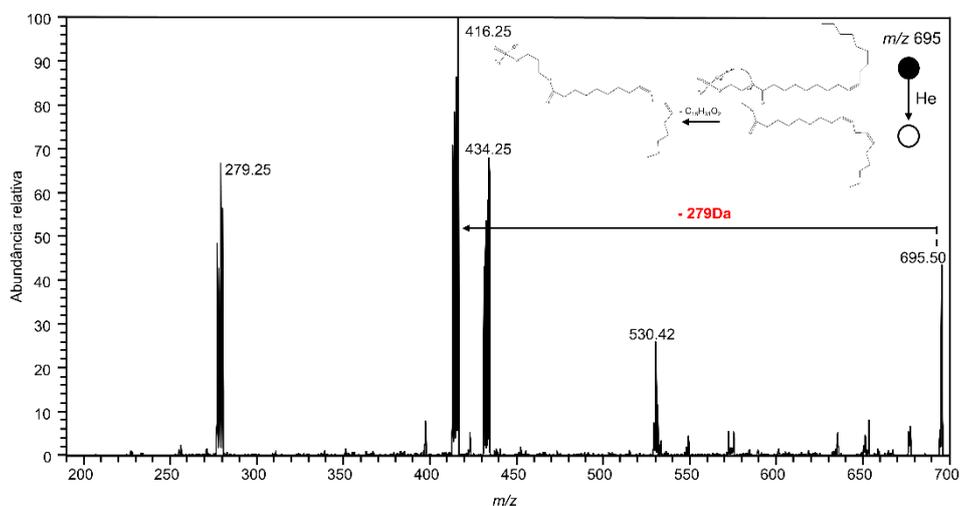


Figura 39: Espectro de fragmentação do íon m/z 695 e estrutura química que corrobora para o glicerol 1,2-dialcanoato 3-fosforo.

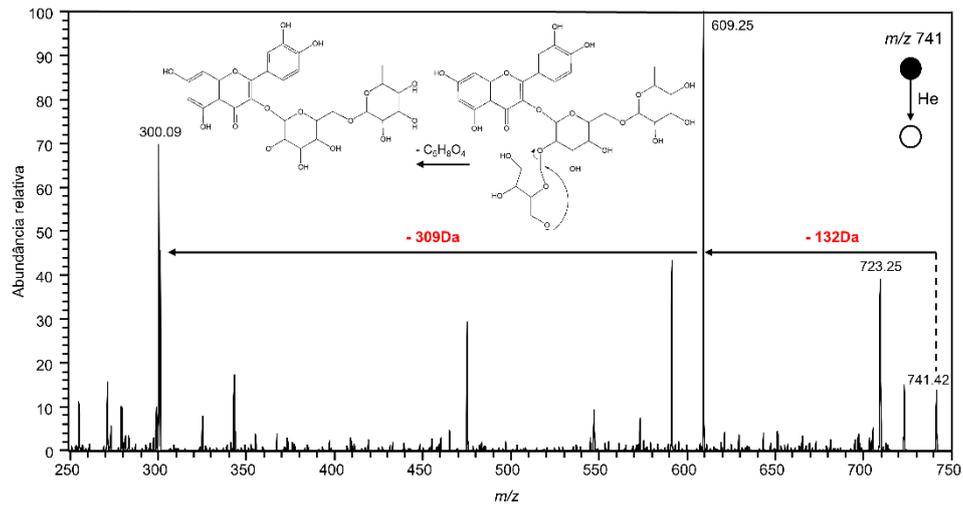


Figura 40: Espectro de fragmentação do íon m/z 741 e estrutura química que corrobora para rutina pentosídeo.

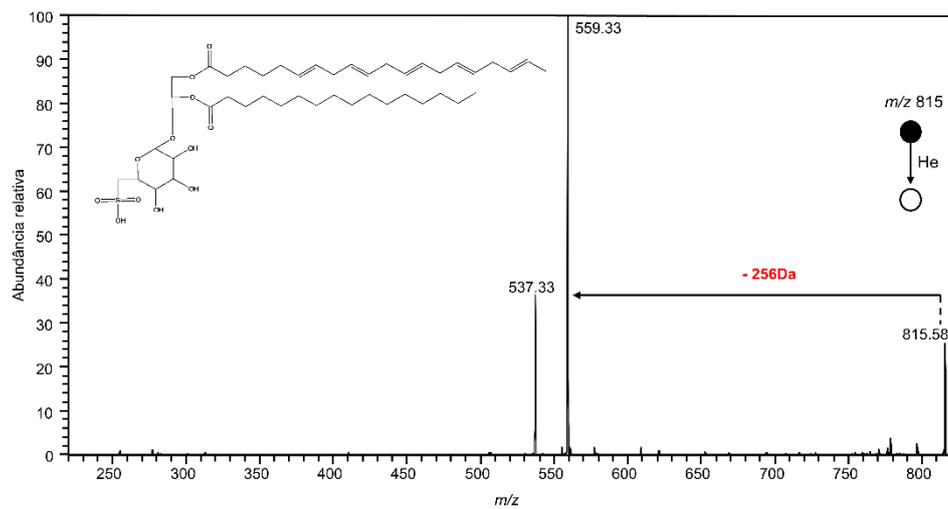


Figura 41: Espectro de fragmentação do íon m/z 815 e estrutura química que corrobora para o sulfoquinovosil-diacil-glicerol (SQDG).