

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

**Espectrometria de massas ambiente:
novas abordagens para análise de
pesticidas em alimentos**

Igor Pereira da Silva

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Goiânia
2018

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES 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 nº 9610/98, 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.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:


Nome completo do autor: Igor Pereira da Silva

Título do trabalho: Espectrometria de massas ambiente: novas abordagens para análise de pesticidas em alimentos

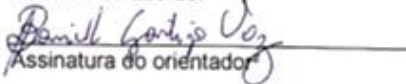
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do autor²

Ciente e de acordo:


Assinatura do orientador

Data: 21/01/2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados 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.

² A assinatura deve ser escaneada.

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

**Espectrometria de massas ambiente:
novas abordagens para análise de
pesticidas em alimentos**

Igor Pereira da Silva

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Federal
de Goiás para obtenção do título
de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

Goiânia
2018

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

Pereira da Silva, Igor

Espectrometria de massas ambiente: novas abordagens para análise de pesticidas em alimentos [manuscrito] / Igor Pereira da Silva. - 2018.

113 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2018. Bibliografia.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Espectrometria de massas ambiente. 2. Paper spray ionization. 3. Leaf spray. 4. Infrared laser ablation sample transfer. 5. Pesticidas. I. Gontijo Vaz, Boniek , orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)

Ata da defesa de Tese de Doutorado de Igor Pereira da Silva, aluno regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aos dias 04 (quatro) de dezembro do ano de 2018 (dois mil e dezoito), com início às 14:00 horas no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes docentes: Boniek Gontijo Vaz (UFG), Rodinei Augusti (UFMG), Luciano Morais Lião (UFG), Lucilla Kato (UFG) e Abadia dos Reis Nascimento (UFG), sob a presidência do primeiro, para julgar a tese de IGOR PEREIRA DA SILVA intitulada: "Espectrometria de massas ambiente: novas abordagens para análise de pesticidas em alimentos". O presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra ao candidato para que o mesmo fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, o candidato foi arguido pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado num intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz: Aprovado
Prof. Dr. Rodinei Augusti: APROVADO
Prof. Dr. Luciano Morais Lião: APROVADO
Profa. Dra. Lucilla Kato: APROVADO
Profa. Dra. Abadia dos Reis Nascimento: APROVADO

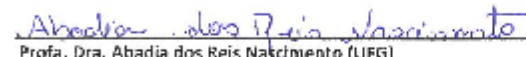
A seguir, na presença do público e do candidato, o presidente da Banca Examinadora declarou que Igor Pereira da Silva, candidato ao título de Doutor em Química, foi Aprovado (; Reprovado (). Este resultado deverá ser homologado pela Coordenação de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente cumprimentou o candidato e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Themerson Blenner Cavalcanti Souza, fizrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 04 de dezembro de 2018.


Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz (UFG)


Prof. Dr. Rodinei Augusti (UFMG)


Prof. Dr. Luciano Morais Lião (UFG)


Profa. Dra. Lucilla Kato (UFG)


Profa. Dra. Abadia dos Reis Nascimento (UFG)

Aos meus pais, por provocarem em mim a
paixão pela leitura desde a tenra idade.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Boniek Gontijo Vaz, que me ensinou e fez crescer, e muito, no aprendizado científico durante os últimos 4 anos.

Ao Dr. Kermit Murray e todo o seu grupo pelo agradável acolhimento em seu laboratório, e também pelo ensino e grande contribuição no trabalho.

À Prof.^a Andréa Rodrigues Chaves e a todos os integrantes do LaCEM, pela amizade e pequenas e grandes contribuições.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida e pelo financiamento da pesquisa.

Aos meus pais, Milton e Zuleide, por toda a confiança e apoio financeiro e emocional, e a toda minha família pelo companheirismo.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que me ajudaram direta e indiretamente para o término deste trabalho.

Sumário

Lista de Figuras.....	IX
Lista de Tabelas.....	XI
Lista de Abreviaturas.....	XII
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XVI
Capítulo I: Introdução geral.....	18
1.1 - Pesticidas.....	19
1.1.1 - Toxicidade.....	25
1.1.2 - Riscos de Contaminação.....	27
1.2 - Espectrometria de Massas.....	28
1.2.1 - Espectrometria de Massas Ambiente.....	30
1.2.1.1 - <i>Paper Spray Ionization</i>	32
1.2.1.2 - <i>Leaf Spray</i>	36
1.2.1.3 - <i>Infrared Laser Ablation Sample Transfer</i>	38
1.3 - Objetivos.....	41
1.3.1 - Objetivo Geral.....	41
1.3.2 - Objetivos Específicos.....	41
Capítulo II: Análise de pesticidas por PSI e LS-MS: uma comparação analítica.....	42
2.1 - Introdução.....	43
2.2 - Metodologia.....	44
2.2.1 - Materiais, Padrões Analíticos e Solventes.....	44
2.2.2 - PSI e LS-MS.....	45
2.2.3 - Performance Analítica.....	46
2.2.4 - Parâmetros Instrumentais.....	46
2.3 - Resultados e Discussões.....	47
2.4 - Conclusão.....	53
Capítulo III: MIP <i>membrane spray ionization</i> : combinando <i>molecularly imprinted polymer</i> (MIP) e <i>paper spray ionization</i> para análise de herbicidas em frutas.....	55

3.1 - Introdução.....	56
3.2 - Metodologia.....	58
3.2.1 - Materiais, Padrões Analíticos e Solventes.....	58
3.2.2 - Síntese da Membrana MIP.....	59
3.2.3 - Preparo de Amostras.....	59
3.2.4 - MIP <i>Membrane Spray Ionization</i>	59
3.2.5 - Performance Analítica.....	61
3.3 - Resultados e Discussões.....	61
3.4 - Conclusão.....	71
Capítulo IV: Análise da penetração de fungicida em maçãs por MALDI <i>imaging e infrared laser ablation sample transfer</i>	72
4.1 - Introdução.....	73
4.2 - Metodologia.....	75
4.2.1 - Materiais, Padrões Analíticos e Solventes.....	75
4.2.2 - Preparo de Amostras.....	75
4.2.3 - MALDI <i>Imaging</i>	75
4.2.4 - IR-LAST.....	76
4.2.5 - ESI-MS.....	78
4.3 - Resultados e Discussões.....	78
4.4 - Conclusão.....	84
Conclusão geral.....	86
Referências Bibliográficas.....	89
Curriculum vitae.....	110

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição de amostras de origem vegetal de acordo com a presença ou ausência de pesticidas e o tipo de irregularidade.....	28
Figura 2: A “árvore de ionização” da MS demonstrando as técnicas base (marrom) a partir das quais algumas técnicas de AMS (verde) e suas variantes (vermelho) foram desenvolvidas.....	31
Figura 3: Esquema geral da técnica <i>paper spray ionization</i> (PSI).....	33
Figura 4: Esquema geral da técnica <i>leaf spray</i> (LS).....	36
Figura 5: Esquema geral da técnica <i>infrared laser ablation sample transfer</i> (IR-LAST) com análise offline por MS.....	39
Figura 6: Esquema geral da técnica (a) PSI e (b) LS.....	45
Figura 7: Espectros de massas obtidos por (a) PSI(+) e (b) LS(+) com 10 ppb de atrazina em rúcula, manjeriço, repolho, alface e couve.....	48
Figura 8: Espectros de (a) PSI(+) e (b) LS(+)-MS/MS obtidos com 100 ppb de atrazina, diuron e metomil na amostra de manjeriço.....	49
Figura 9: Proposta de mecanismo de fragmentação para (a) atrazina, (b) diuron e (c) metomil.....	50
Figura 10: Espectros de massas obtidos por (a) PSI(+) e (b) LS(+) com atrazina (10-1000 ppb, m/z 216,1011) utilizando o padrão interno diuron (500 ppb, m/z 233,0242).....	51
Figura 11: Esquema ilustrativo de uma síntese por MIP: (a) estágio inicial de polimerização ao redor do template (analito ou moléculas da mesma classe); (b) template retido no polímero; (c) remoção do template e formação de uma cavidade seletiva.....	57
Figura 12: Membrana de celulose utilizada para a síntese do MIP.....	58
Figura 13: Esquema geral da técnica MIP <i>membrane spray ionization</i>	60
Figura 14: Imagem obtida por MEV (×3000) de (a) membrana de celulose, (b) NIP e (c) membrana MIP.....	62
Figura 15: Gráfico de barras de intensidades de íons obtidas a partir de espectros de massas no modo positivo da atrazina, metomil e diuron em extrato de uva (1000 ppb) utilizando a membrana MIP monuron e NIP. As barras de erros mostram o desvio padrão das análises em triplicata.....	63

Figura 16: Gráfico de barras de intensidades de íons obtidas a partir de espectros de massas no modo negativo do glifosato e 2,4-D em extrato de uva (1000 ppb) utilizando a membrana MIP 2,4,5-T e NIP. As barras de erros mostram o desvio padrão das análises em triplicata.....	64
Figura 17: Espectros de MS/MS obtidos com (a) diuron utilizando MIP-MSI(+) e (b) com 2,4-D utilizando MIP-MSI(-) em extrato de uva (1000 ppb).....	65
Figura 18: LODs, LOQs e curvas de calibração (10-1000 ppb) utilizando MIP-MSI-MS com: (a) diuron em extratos de maçã, banana e uva; (b) 2,4-D em extratos de maçã, banana e uva. As barras de erros mostram o desvio padrão das análises em triplicata.....	66
Figura 19: Esquema geral da técnica IR-LAST.....	77
Figura 20: Espectro de massas obtido por MALDI-MS após a aplicação de 1 µL de uma solução de 1000 ppm de imazalil (m/z 297 $[M+H]^+$) em uma fatia de maçã. Os íons oriundos da matriz CHCA estão marcados por asteriscos vermelhos.....	79
Figura 21: Análise da penetração do imazalil (m/z 297 $[M+H]^+$) em maçãs por MALDI imaging nos dias 0, 1, 4 e 7: (a) imagem ótica das fatias de maçã; (b) imagens obtidas por MALDI <i>imaging</i> ; (c) mesclagem das imagens.....	80
Figura 22: Regiões da maçã (1 mm de altura; 1 mm de largura; 0,2 mm de espessura) irradiadas por laser a partir da casca (0 mm) até a região interna (7 mm).....	81
Figura 23: Espectro de massas por ESI(+) de uma solução de imazalil (m/z 297,0565 $[M+H]^+$): (a) não exposta à luz UV; (b) exposta à luz UV (254 nm) mostrando a presença do íon m/z 261,0804 $[C_{14}H_{13}ClN_2O]+H^+$, um produto da perda de HCl do molécula do imazalil.....	84

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação dos pesticidas de acordo com suas estruturas químicas.....	20
Tabela 2: Classes toxicológicas dos pesticidas baseados na DL ₅₀ por via oral.....	26
Tabela 3: Fórmulas e massas moleculares dos pesticidas atrazina, diuron e metomil e seus respectivos valores de <i>m/z</i> medidos e teóricos e erros de massa.....	47
Tabela 4: Performance analítica de PSI(+) e LS(+)-MS através da detecção dos pesticidas atrazina, diuron e metomil em amostras de hortaliças.....	53
Tabela 5: Valores de precisão e exatidão obtidos através da análise de diuron e 2,4-D em extrato de frutas por MIP-MSI-MS.....	68
Tabela 6: Valores de recuperação obtidos pela análise de diuron e 2,4-D em extrato de frutas por MIP-MSI-MS.....	70
Tabela 7: Eficiência de transferência da técnica IR-LAST na análise de imazalil em maçãs.....	82
Tabela 8: Concentração de imazalil a partir da casca (0 mm) até a região interna (7 mm) em maçãs.....	82

Lista de Abreviaturas

ACN	Acetonitrila
ALQ	Abaixo do limite de quantificação
AMS	Espectrometria de massas ambiente
APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization
APPI	Atmospheric pressure photoionization
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
CI	Chemical ionization
CRM	Charge residue model
DAPPI	Desorption atmospheric pressure photo ionization
DART	Direct analysis in real time
DESI	Desorption electrospray ionization
DeSSI	Desorption sonic spray ionization
DL ₅₀	Dose letal média
EASI	Easy ambient sonic-spray ionization
EI	Electron ionization
ESI	Electrospray ionization
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IEM	Ion evaporation model
IR LADESI	Infrared laser-assisted desorption electrospray ionization
IR-LAST	Infrared laser ablation sample transfer
IV	Infravermelho
LAESI	Laser ablation electrospray ionization
LAPSI	Laser assisted paper spray ionization
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LS	Leaf spray
LS(+)	Leaf spray no modo positivo
LS-MS	Espectrometria de massas por leaf spray
m/z	Razão massa/carga

MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIP	Molecularly imprinted polymer
MIP-MSI	MIP membrane spray ionization
MIP-MSI-MS	Espectrometria de massas por MIP membrane spray
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
NIP	Non-imprinted polymer
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
PSCI	Paper spray chemical ionization
PSI	Paper spray ionization
PSI(+)	Paper spray ionization no modo positive
PSI-MS	Espectrometria de massas por paper spray ionization
SPE	Solid phase extraction
TFA	Ácido trifluoroacético
UV	Ultravioleta

Resumo

Os pesticidas são compostos utilizados em frutas e hortaliças com o objetivo de evitar danos causados por uma variedade de pestes. Geralmente, as técnicas empregadas na análise de pesticidas são a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Ambas as técnicas apresentam elevados desempenhos analíticos, mas requerem laboriosas etapas de preparo de amostra antes da análise instrumental. A espectrometria de massas ambiente (AMS) é um grupo de técnicas que requer o mínimo ou nenhum preparo de amostra e emerge como alternativa para análise de pesticidas em alimentos. Este trabalho apresenta três capítulos que utilizam técnicas de AMS para análise de pesticidas em frutas ou hortaliças. Na primeira abordagem, as técnicas de AMS *paper spray ionization* (PSI) e *leaf spray* (LS) foram comparadas através de suas performances analíticas pelas análises dos pesticidas atrazina, diuron e metomil em alface, couve, manjeriço, repolho e rúcula. Ambas as técnicas apresentaram desempenhos analíticos semelhantes. As curvas de calibração foram obtidas com $R^2 > 0,99$ e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) na faixa de ppb. A segunda abordagem teve o objetivo de acoplar o *molecularly imprinted polymer* (MIP) com a PSI-MS para obter um método com maior seletividade. O MIP *membrane spray ionization* foi empregado nas análises dos pesticidas diuron e ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) em extratos de maçãs, bananas e uvas. O método demonstrou maiores intensidades de sinal do diuron e 2,4-D em comparação com aqueles obtidos pelo *non-imprinted polymer* (NIP). As curvas de calibração exibiram linearidades com $R^2 > 0,99$ para os pesticidas em todos os extratos de frutas, e os LODs foram encontrados abaixo de 0,60 ppb e os LOQs abaixo de 2 ppb. Os valores de precisão e exatidão foram inferiores a 20% e os de recuperação variaram entre 92,5% e 116,9%. No capítulo posterior, *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI) *imaging* foi combinada com a técnica ambiente *infrared laser ablation sample transfer* (IR-LAST) para verificar a penetração do fungicida imazalil em maçãs. MALDI *imaging* foi utilizada para obter informações da localização espacial do

composto, enquanto que IR-LAST com análise offline por *electrospray ionization* (ESI) foi utilizada para quantificação. O fungicida foi detectado na parte interna da maçã um dia após a sua aplicação na casca. A concentração de imazalil na casca da maçã foi reduzida ao longo dos dias. Sete dias após a aplicação do fungicida, 0,015 ppm foram encontrados no sexto milímetro da região interna da maçã. A taxa de penetração do imazalil foi de aproximadamente 1 mm por dia.

Palavras-chave: Espectrometria de massas ambiente; Paper spray ionization; Leaf spray; Infrared laser ablation sample transfer; Pesticidas.

Abstract

Pesticides are compounds used on fruits and vegetables to avoid damage by pests. Usually, pesticide residue determination in fruits and vegetables has been performed by using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). Both techniques demonstrate excellent analytical performance but require laborious steps of sample preparation prior to instrumental analysis. Ambient mass spectrometry (AMS) is a group of techniques that requires minimal or no sample preparation and emerges as an alternative for analysis of pesticides in food. This work shows three chapters using AMS techniques for analysis of pesticides in fruits or vegetables. In the first approach, paper spray ionization (PSI) and leaf spray (LS) were compared by analyzing the pesticides atrazine, diuron and methomyl in lettuce, kale, basil, cabbage and arugula. Both techniques showed similar analytical performances. The calibration curves were obtained with $R^2 > 0.99$ and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were found in ppb range. In the second approach, a molecularly imprinted polymer (MIP) was coupled to PSI-MS to obtain a selective method. MIP membrane spray ionization was employed for the analysis of diuron and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in apple, banana and grape extracts. This method demonstrated higher signal intensities for diuron and 2,4-D in comparison to the non-imprinted polymer (NIP). The calibration curves were obtained with $R^2 > 0.99$ for the pesticides in all fruit extracts, and the LODs were found below 0.60 ppb and LOQs below 2 ppb. The accuracy and precision values were lower than 20% and the values of recovery ranged from 92.5% to 116.9%. In the next chapter, matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) imaging was combined with infrared laser ablation sample transfer (IR-LAST) ambient technique to verify the penetration of the fungicide imazalil in apples. MALDI imaging was used to obtain information on the spatial location of the compound, whereas IR-LAST with electrospray ionization (ESI) was used for quantification. The fungicide was detected in the inner part of the apple one day after its application. The concentration of imazalil in the apple skin was reduced over the days. Seven days after application of the fungicide,

a concentration of 0.015 ppm was found six millimeters inside the apple. The penetration rate of imazalil was approximately 1 mm per day.

Keywords: Ambient mass spectrometry; Paper spray ionization; Leaf spray; Infrared laser ablation sample transfer; Pesticides.

Capítulo I: Introdução geral

1.1 - Pesticidas

Os pesticidas, também chamados de praguicidas, defensivos agrícolas, agrotóxicos ou agroquímicos, são substâncias tóxicas que são utilizadas para prevenir a ação de organismos vivos indesejados na agricultura (STOYTCHIEVA, 2011a). O termo pesticida engloba vários compostos que são empregados contra alvos específicos, por exemplo, herbicidas (contra ervas daninhas), inseticidas (insetos), fungicidas (fungos), bactericidas (bactérias), larvicidas (larvas) e rodenticidas (roedores) (RAȚĂ; SALA; SAMFIRA, 2012; MATTHEWS, 2016). No Brasil, os pesticidas foram definidos através da Lei Federal nº 7.802, de 11 de Julho de 1989, da seguinte maneira:

Agrotóxicos e afins: (a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; (b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Os pesticidas podem ser classificados de acordo com suas estruturas químicas em dois principais grupos: inorgânicos e orgânicos. Os inorgânicos foram os primeiros pesticidas químicos a serem utilizados e possuem uma aparência cristalina semelhante aos sais, além de serem ambientalmente estáveis e altamente solúveis em água (ELDRIDGE, 2008). Exemplos de pesticidas inorgânicos incluem arseniato de cálcio, arseniato de cobre, tartarato de antimônio e potássio, entre outros (SARWAR, 2016). Já os pesticidas orgânicos são compostos contendo carbono e hidrogênio, podendo incluir oxigênio, enxofre, fósforo, flúor, cloro e nitrogênio. Eles constituem a maior parte dos pesticidas modernos, além de serem menos solúveis em água em relação aos inorgânicos (ELDRIDGE, 2008). Adicionalmente, os pesticidas orgânicos podem ser subdivididos em dois grupos: naturais e sintéticos (KIM; KABIR; JAHAN, 2017). Os naturais são isolados de fontes naturais (plantas

ou microrganismos), como os inseticidas abamectina e piretro (GERWICK; SPARKS, 2014; SENTHIL-NATHAN, 2018). Já os sintéticos são obtidos artificialmente por síntese química. Na Tabela 1 estão descritos os grupos e as estruturas químicas de alguns pesticidas sintéticos.

Tabela 1: Classificação dos pesticidas de acordo com suas estruturas químicas (continua).

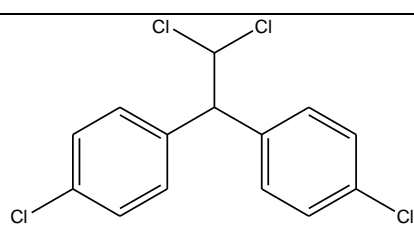
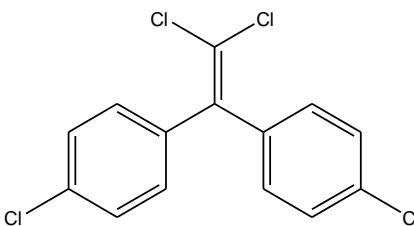
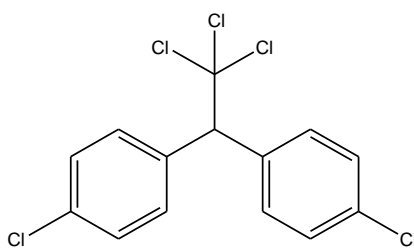
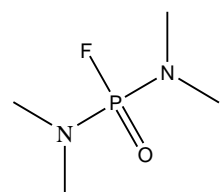
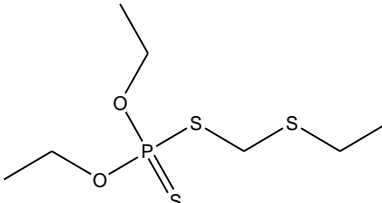
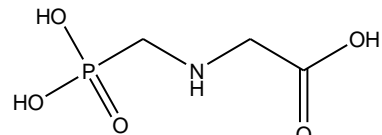
Grupo	Pesticida	Estrutura
Organoclorado	Diclorodifenildicloroetano (DDD)	
	Diclorodifenildicloroetileno (DDE)	
	Diclorodifeniltricloroetano (DDT)	
Organofosforado	Dimefox	
	Forato	
	Glifosato	

Tabela 1: Classificação dos pesticidas de acordo com suas estruturas químicas (continuação).

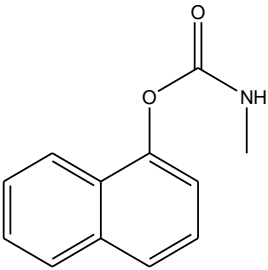
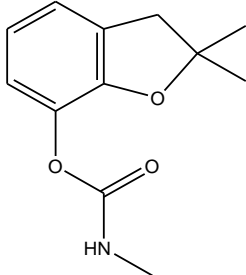
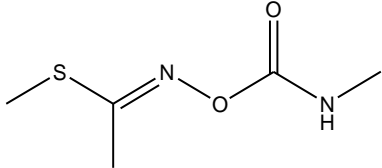
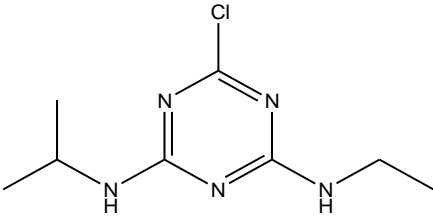
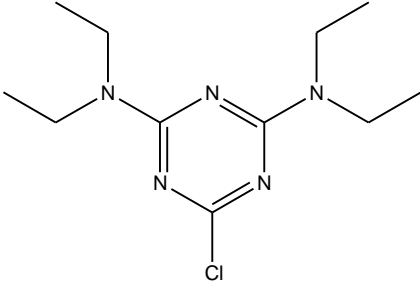
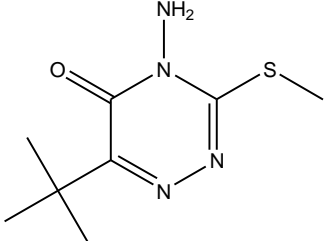
Grupo	Pesticida	Estrutura
Carbamato	Carbaril	
	Carbofurano	
	Metomil	
Triazina	Atrazina	
	Clorazina	
	Metribuzina	

Tabela 1: Classificação dos pesticidas de acordo com suas estruturas químicas (continuação).

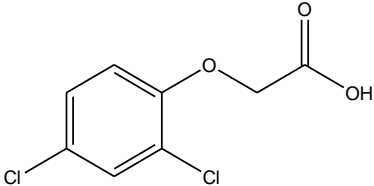
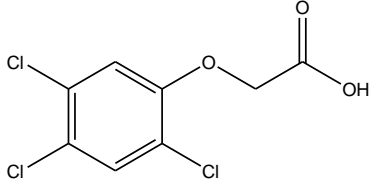
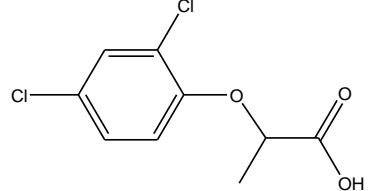
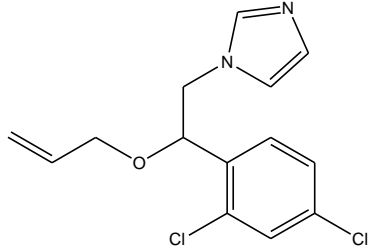
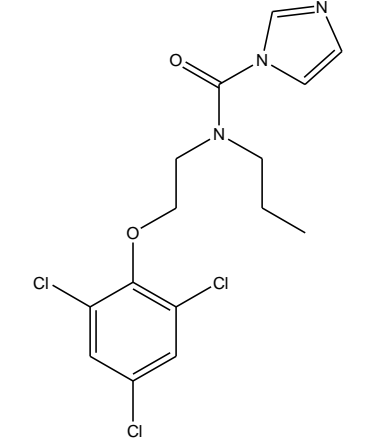
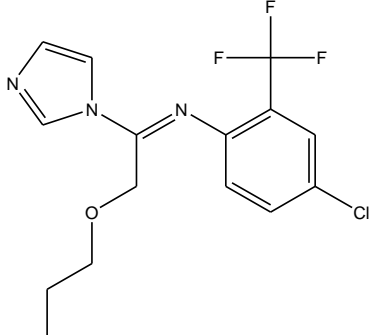
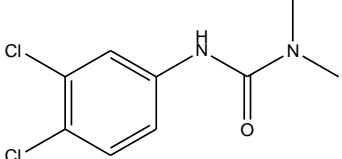
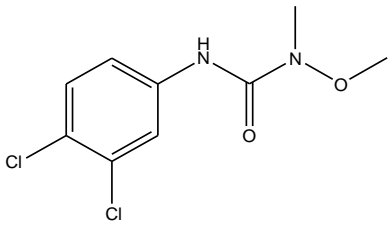
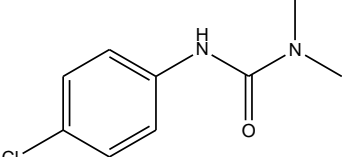
Grupo	Pesticida	Estrutura
Fenoxiácido	ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)	
	ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T)	
	Dicloroprop	
Imidazol	Imazalil	
	Procloraz	
	Triflumizol	

Tabela 1: Classificação dos pesticidas de acordo com suas estruturas químicas (conclusão).

Grupo	Pesticida	Estrutura
Feniluréia	Diuron	
	Linuron	
	Monuron	

FONTE: adaptado de Jayaraj, Megha e Sreedev (2016).

Os pesticidas organoclorados, também conhecidos como hidrocarbonetos clorados, são moléculas que possuem pelo menos um anel na estrutura e múltiplos átomos de cloro (SPARLING, 2016). São compostos de baixa polaridade e que possuem baixa solubilidade aquosa. São amplamente utilizados como inseticidas e podem ser tóxicos para animais e humanos, além de possuírem elevada persistência no ambiente, ou seja, possuem uma meia-vida na água ou no solo que pode variar entre aproximadamente 60 dias a 10-15 anos (JAYARAJ; MEGHA; SREEDEV, 2016). Alguns exemplos de pesticidas organoclorados incluem DDD, DDE, DDT, aldrina, dieldrina, metoxicloro, heptacloro, dicofol, pentaclorofenol, quintozena e toxafeno (RANI; SHANKER; JASSAL, 2017).

Os organofosforados são pesticidas que contém pelo menos uma ligação P-C (fósforo-carbono) e são sintetizados de derivados do fósforo P₄, como tricloreto de fósforo (PCl₃), hidreto de fósforo (PH₃) ou hipofosfito de sódio (NaPO₂H₂) (WEFERLING; ZHANG; CHIANG, 2016). São ésteres do ácido fosfórico e seus derivados, possuindo uma estrutura geral contendo um átomo de fósforo central com uma ligação fosfórica (P=O) ou tiofosfórica (P=S) (STOYTCHIEVA, 2011b). Eles agem em organismos vivos através da inativação da enzima acetilcolinesterase, uma enzima essencial para a

manutenção dos impulsos nervosos em humanos e animais (SURATMAN; EDWARDS; BABINA, 2015). Estes pesticidas podem ser degradados sob exposição à luz, ar e solo, embora pequenas quantidades possam ser detectadas em alimentos e água (JAYARAJ; MEGHA; SREEDEV, 2016). Alguns exemplos de pesticidas organofosforados são dimefox, forato, glifosato, clorpirifós, disulfoton, diazinon, fenitrotiona, malation, metidation e fosmete (MUÑOZ-QUEZADA et al., 2013).

Os carbamatos são ésteres derivados do ácido carbâmico. Assim como os organofosforados, os carbamatos são inibidores da atividade da acetilcolinesterase, além de não serem persistentes no meio ambiente e se degradarem facilmente, o que os permitem estar entre os pesticidas mais utilizados (DHOUIB et al., 2016). Entre os carbamatos estão incluídos carbaril, carbofurano, metomil, aldicarbe, ethienocarb, fenobucarb e oxamil (MARRAZZA, 2014).

As triazinas são compostos heterocíclicos contendo nitrogênio. Possuem um anel aromático planar com seis membros, mas com três carbonos substituídos por nitrogênios. As posições dos nitrogênios no anel distinguem três isômeros, referidos como 1,2,3-triazina, 1,2,4-triazina e 1,3,5-triazina (LEBARON; FARLAND; BURNSIDE, 2011). São compostos amplamente utilizados como herbicidas com o objetivo de controlar o crescimento de ervas daninhas herbáceas através da inibição do transporte de elétrons fotossintéticos das plantas (GUPTA, 2017). Alguns exemplos de pesticidas do grupo triazina incluem atrazina, ametrina, clorazina, metribuzina, terbutrina, propazina, prometrina, prometron e simazina (YANG et al., 2018).

Os herbicidas fenoxiácidos são análogos sintéticos dos hormônios de crescimento das plantas. São amplamente utilizados na produção agrícola para controlar as ervas daninhas de folhas largas, tornando os níveis hormonais da erva superiores ao nível normal de crescimento (PENG et al., 2018). Os fenoxiácidos incluem os compostos 2,4-D, 2,4,5-T, dicloroprop, fenoprop, mecoprop, ácido 2,4-diclorofenoxibutírico (2,4-DB) e ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA), em que todos possuem uma estrutura molecular similar contendo um anel aromático com uma cadeia lateral de ácido carboxílico (JAYAKODY; HARRIS; COGGON, 2015).

Todos os pesticidas imidazóis compartilham uma estrutura molecular contendo um anel planar de cinco membros com dois carbonos substituídos por nitrogênios (MANOCHA et al., 2016). É a classe de pesticida mais utilizada como fungicida devido à sua capacidade de se ligar à enzima lanosterol 14-alfa demethylase (CYP51) e, desse modo, prevenir a síntese do ergosterol, um componente essencial da membrana celular fúngica (THIND, 2012). Exemplos de pesticidas imidazóis são imazalil, procloraz, triflumizol, tioconazol, econazol, miconazol, cetoconazol e clotrimazol (CHEN; YING, 2015; CHEN et al., 2018).

Os pesticidas do grupo químico feniluréia, juntamente com os fenoxiácidos e as triazinas, formam um dos mais importantes grupos de herbicidas agrícolas. A estrutura geral de um herbicida feniluréia é $\text{fenil-NH-C(O)-NR}_2$. O grupo fenil é frequentemente substituído com átomos de cloro ou bromo, mas também pode ocorrer a substituição com grupos metóxi, metila, trifluorometila ou propila (KRIEGER, 2010). São herbicidas sistêmicos que entram nas plantas pelas raízes e folhas e inibem o processo de fotossíntese através da inibição da transferência de elétrons no fotossistema (HUSSAIN et al., 2015). Dentre os herbicidas do grupo feniluréia estão o diuron, linuron, monuron, clortoluron, dimefuron, fenuron, fluometuron, isoproturon, isouron, metobromuron, metoxuron, monolinuron, neburon e siduron (OLIVEIRA JR; CONSTANTIN; INOUE, 2011).

1.1.1 - Toxicidade

Uma vez que os pesticidas são utilizados contra organismos vivos, estes compostos podem ser tóxicos para seres humanos. A toxicidade dos pesticidas é expressa em valores referentes à dose letal média (DL_{50}), ou seja, uma concentração (miligramas do composto ativo por quilogramas de peso vivo) necessária para matar 50% de uma população de ratos ou outro animal de teste. Desse modo, a DL_{50} é utilizada como um parâmetro para avaliar os riscos que determinado pesticida pode causar à saúde humana (ANVISA, 2018a). Na Tabela 2 estão descritas as classes dos pesticidas de acordo com suas toxicidades e DL_{50} .

Tabela 2: Classes toxicológicas dos pesticidas baseados na DL₅₀ por via oral.

Classe	Toxicidade
I	Extremamente tóxico (DL ₅₀ ≤ 5 mg/kg)
II	Altamente tóxico (DL ₅₀ > 5-50 mg/kg)
III	Moderadamente tóxico (DL ₅₀ > 50-300 mg/kg)
IV	Pouco tóxico (DL ₅₀ > 300-2000 mg/kg)
V	Improvável de causar dano agudo (DL ₅₀ > 2000-5000 mg/kg)
VI	Não classificado (DL ₅₀ > 5000 mg/kg)

FONTE: adaptado de Anvisa (2018a).

O risco para a saúde devido à exposição aos pesticidas depende não apenas da toxicidade dos ingredientes ativos, mas também do nível de exposição. Além disso, certas pessoas, como crianças, mulheres grávidas ou populações idosas, podem ser mais sensíveis aos efeitos destes compostos do que outras (KIM; KABIR; JAHAN, 2017). Diversos estudos sugerem que os pesticidas estão relacionados a várias doenças, incluindo câncer, diabetes, doença de Parkinson, distúrbios cognitivos, entre outros. Os resultados de um estudo com 57310 aplicadores de pesticidas nos Estados Unidos indicaram associações de dois herbicidas imidazolinonas (imazetapir e imazaquin) com câncer de bexiga (KOUTROS et al., 2016). Daniels et al. (2018) relataram uma maior taxa (2 a 3 vezes maior) de diabetes mellitus em imigrantes sul-asiáticos em relação aos europeus. Os autores correlacionaram o alto índice de diabetes a uma maior exposição a pesticidas organoclorados, como o diclorodifenildicloroetileno (DDE), diclorodifeniltricloroetano (DDT), hexacloroetano e bifenilpoliclorado 118, ocasionados pelo uso indevido destes compostos no ambiente asiático. Ratner et al. (2014) demonstraram que a exposição crônica a metais e a pesticidas está associada ao desenvolvimento da doença de Parkinson em idades mais jovens em relação a pacientes sem histórico familiar da doença. Os autores também relataram que a duração da exposição era o fator importante que controlava a magnitude de tal efeito. Lee et al. (2016) analisaram as concentrações dos pesticidas DDE, trans-nonacloro e hexaclorobenzeno no plasma sanguíneo de 989 indivíduos com idade de 70 anos na Suécia. Os indivíduos que continham maiores níveis dos pesticidas tinham três vezes maiores riscos de possuírem problemas

cognitivos. Além disso, diversos artigos de revisão têm sido publicados nesta década demonstrando os efeitos dos pesticidas na saúde humana (GILDEN; HUFFLING; SATTLER, 2010; MNIF et al., 2011; NICOLOPOULOU-STAMATI et al., 2016; CIMINO et al., 2017; LI; JENNINGS, 2017; PRUDENTE et al., 2018).

1.1.2 - Riscos de Contaminação

Os pesticidas são considerados alguns dos principais contaminantes ambientais (RICHARDSON; KIMURA, 2016). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) tem realizado monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). No período de 2013 a 2015, foram analisadas 12051 amostras de 25 alimentos de origem vegetal (cereais, frutas, hortaliças, raízes, entre outros) representativos da dieta da população brasileira. As amostras foram coletadas em estabelecimentos varejistas localizados nas capitais do país. Foram pesquisados até 232 pesticidas diferentes nas amostras monitoradas (ANVISA, 2016). A Figura 1 demonstra a distribuição de pesticidas encontrados em todas as amostras monitoradas. Em 5062 amostras (40,0%) não foram encontrados resíduos de pesticidas, enquanto que em 4618 (38,3%) foram detectados resíduos em concentrações iguais ou abaixo do limite máximo de resíduo (LMR). Desse modo, 9680 amostras (80,3%) foram consideradas satisfatórias. Porém, 2371 amostras (19,7%) continham pesticidas em concentrações acima do LMR ou não eram autorizados para as culturas.

Como demonstrado nas páginas anteriores, há riscos de toxicidade e contaminação que podem ser ocasionados pelo mal uso dos pesticidas na agricultura. Os pesticidas podem se aderir aos alimentos em concentrações acima do permitido. Desse modo, é de suma importância a utilização de técnicas analíticas para detecção e quantificação destes compostos em alimentos. Dentre as diversas técnicas analíticas, uma será abordada neste trabalho: a espectrometria de massas.

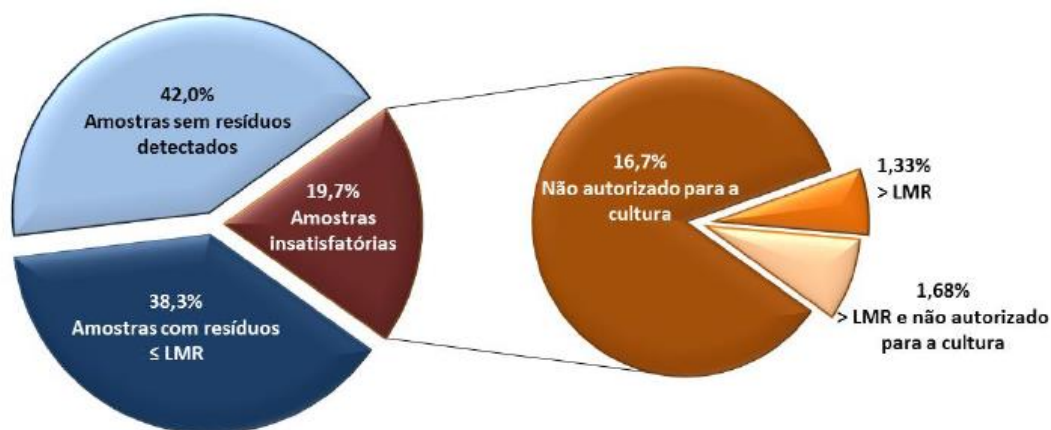


Figura 1: Distribuição de amostras de origem vegetal de acordo com a presença ou ausência de pesticidas e o tipo de irregularidade.
 FONTE: Anvisa (2016).

1.2 - Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (MS) (do inglês, *mass spectrometry* - MS) é uma técnica analítica que possui aplicabilidade na identificação e quantificação de uma ampla variedade de compostos (WATSON; SPARKMAN, 2007). Desde os primeiros estudos de J. J. Thomson com medidas de massa dos elétrons, a MS vem sendo desenvolvida e aprimorada para possibilitar a análise de misturas complexas e analitos em níveis de traços (HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Basicamente, a análise por MS consiste na geração ou transferência de íons em uma fonte de ionização e na separação dos íons de acordo com suas diferentes razões massa/carga (m/z) em um analisador de massas via campo elétrico ou magnético, seguido pela detecção dos íons (GROSS, 2017).

A técnica de ionização desempenha um papel muito importante na MS. Não existe uma técnica de ionização universal que possa ionizar todos os compostos em diferentes matrizes. É necessária uma técnica de ionização adequada para compostos específicos, pois cada técnica tem sua própria vantagem para estruturas químicas e grupos funcionais orgânicos específicos. Desse modo, o progresso das análises por MS está estritamente ligado aos avanços das técnicas de ionização, uma vez que elas possibilitam a análise de compostos de diferentes massas e estruturas moleculares presentes em amostras complexas (ALBERICI et al., 2010).

As técnicas *electron ionization* (EI) e *chemical ionization* (CI) foram as primeiras a serem utilizadas nas análises por MS. Tais técnicas operam sob condições de alto vácuo e exigem que a amostra seja primeiro volatilizada e depois ionizada (OUYANG; ZHANG, 2010). Portanto, as duas técnicas são limitadas a moléculas voláteis, de baixa massa molecular e termicamente estáveis. A necessidade de analisar compostos não voláteis, termicamente lábeis e macromoléculas foi um impulso para que pesquisadores desenvolvessem técnicas de ionização/dessorção, como *matrix assisted laser desorption/ionization* (MALDI) (KARAS et al., 1987) e *electrospray ionization* (ESI) (YAMASHITA; FENN, 1984).

MALDI é uma técnica de ionização em que o analito é primeiro co-cristalizado com um composto orgânico denominado matriz e que atua como doador ou receptor de prótons. Após a radiação de um laser ultravioleta (UV) nesta mistura analito-matriz, a matriz é evaporada e transporta o analito juntamente com ela. Este processo permitiu a análise de biomoléculas (DNA, proteínas, peptídeos e açúcares) e grandes moléculas orgânicas (polímeros, dendrímeros e outras macromoléculas) que não eram possíveis de serem analisadas pelas técnicas de ionização convencionais (GROSS, 2017). No entanto, as etapas de preparo de amostra para misturar e co-cristalizar o analito com a matriz podem consumir um tempo elevado. Em alguns casos, a matriz pode ser um interferente na análise, uma vez que os íons oriundos da matriz podem suprimir o íon do analito. Além disso, MALDI não é uma técnica adequada para análises quantitativas devido à baixa reprodutibilidade ocasionada pela morfologia não homogênea das amostras causadas pela cristalização da matriz (PORTA et al., 2015; WANG et al., 2016).

ESI é uma técnica de ionização baseada na transferência de íons previamente formados em solução para a fase gasosa assistida por um campo elétrico. Os íons em solução podem ser obtidos pela adição de um ácido (ex: ácido fórmico) ou uma base (hidróxido de amônio). Estes íons são ejetados da solução em forma de um *spray* eletrolítico, e são dessolvatados e direcionados ao espectrômetro de massas (CHO et al., 2015). Através da ESI, a análise por MS se tornou mais simples, onde a necessidade de alto vácuo para ionização foi retirada, e moléculas maiores e menos voláteis puderam

ser analisadas a partir de misturas complexas, aumentando a faixa de aplicações da MS. Porém, mesmo com estes avanços, a técnica ESI pode apresentar dificuldades na análise devido ao tratamento da amostra, como a extração do analito a partir de sua matriz, o preparo de soluções em solventes ultrapuros com pH e teores de sais controlados e, em alguns casos, a necessidade do uso de técnicas de separação anterior a análise por MS (ALBERICI et al., 2010). O preparo de amostras pode inserir interferentes químicos na análise e perdas de informações espaciais do analito na matriz (KADAM; MISRA; ZAIMA, 2016).

Todos os problemas relacionados às técnicas de ionização mencionados acima foram estímulos para a criação de um enorme grupo de técnicas: a espectrometria de massas ambiente.

1.2.1 - Espectrometria de Massas Ambiente

A espectrometria de massas ambiente (*ambient mass spectrometry* - AMS) é uma família de técnicas que permite a análise de compostos diretamente de seus ambientes naturais utilizando o mínimo ou nenhum preparo de amostras (COOKS et al., 2006). Tais técnicas operam sob os seguintes princípios: os íons são gerados sob pressão atmosférica e temperatura ambiente antes de entrarem no espectrômetro de massas; as amostras requerem o mínimo ou nenhum pré-tratamento; as moléculas podem ser diretamente dessorvidas/ionizadas da superfície da amostra, tornando possível a análise em tempo real (HSU; DORRESTEIN, 2015).

O desenvolvimento da *desorption electrospray ionization* (DESI) em 2004 pelo grupo do Dr. Graham Cooks foi um marco na história da AMS. Na DESI, um *spray* de gotículas carregadas (*electrospray*) é pneumáticamente direcionado à superfície da amostra para dessorver e ionizar os analitos. Após a dessorção/ionização, os íons são direcionados à entrada do espectrômetro de massas para posterior detecção. Desse modo, a análise é realizada diretamente da superfície da amostra, não sendo necessário um extenso pré-tratamento de amostra antes da análise por MS (TAKÁTS et al., 2004).

naturais (BOUSLIMANI et al., 2014), controle de qualidade de alimentos (WANG; WANG; CAI, 2013), e química forense (CORREA et al., 2016).

Dentre as diversas técnicas de AMS, três serão utilizadas e detalhadas no presente trabalho: *paper spray ionization*, *leaf spray* e *infrared laser ablation sample transfer*.

1.2.1.1 - Paper Spray Ionization

A técnica *paper spray ionization* (PSI), ilustrada na Figura 3, foi desenvolvida pelos grupos do Dr. Graham Cooks e Dr. Zheng Ouyang (Purdue University, Indiana, EUA) em 2010. A PSI consiste na aplicação de uma alta voltagem (ex., 3-5 kV) em um papel triangular contendo a amostra, que pode ser uma amostra não tratada (ex., sangue, bebidas) ou um extrato. A amostra é depositada no centro do papel e se espalha por efeito de capilaridade. O papel é posicionado próximo à entrada do espectrômetro de massas que também é submetida à uma voltagem com o objetivo de gerar um campo elétrico. Então, um solvente contendo ácido ou base (solvente de *spray*) é aplicado sobre o papel e o campo elétrico induz à formação de um *spray* eletrolítico na ponta do papel. O mecanismo de ionização é semelhante ao de ESI: os íons são formados em solução e o forte 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). A formação dos íons a partir das gotas ocorre devido à repulsão de íons de mesma carga. Este processo pode ocorrer por dois diferentes modelos, o modelo de evaporação de íons (*ion evaporation model* – IEM), em que os íons são ejetados das gotas, ou modelo de carga residual (*charge residue model* – CRM), onde são formadas gotas contendo apenas um íon. Os íons gerados são moléculas protonadas ($[M+H]^+$), desprotonadas ($[M-H]^-$) e/ou cationizadas ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) (WILM, 2011).

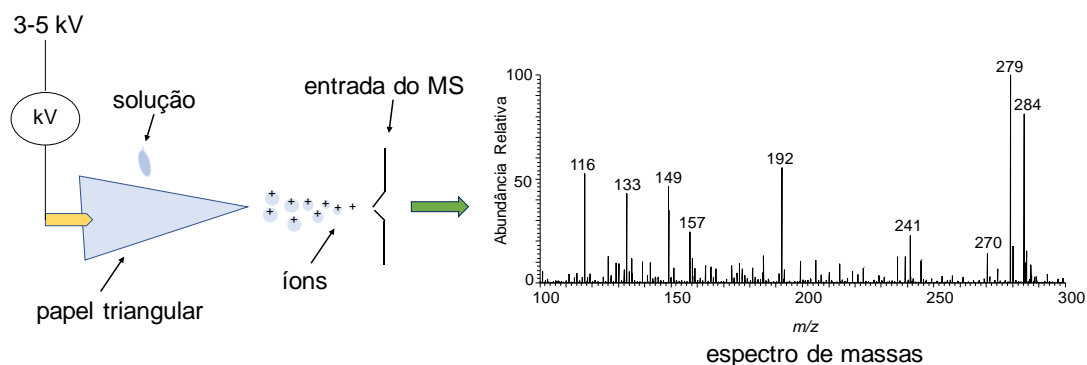


Figura 3: Esquema geral da técnica *paper spray ionization* (PSI).
FONTE: adaptado de Alberici et al. (2010).

Em menos de uma década, a PSI se tornou muito útil e seu desempenho tem sido demonstrado para vários analitos e matrizes. Recentemente, Michely, Meyer e Maurer (2017) utilizaram a PSI-MS para analisar três testes de proficiência de análise toxicológica sistemática e 103 amostras de urinas humanas. Os resultados da PSI-MS foram comparados com os obtidos por cromatografia líquida acoplada à MS (LC-MS). Nas amostras autênticas, 73% de todos os 777 fármacos foram detectáveis com PSI-MS, embora as análises por LC-MS tenham detectado mais fármacos, particularmente em amostras contendo baixas concentrações de analito. Além disso, McKenna et al. (2018) também realizaram uma triagem toxicológica de drogas em sangue utilizando PSI-MS. Os autores relataram o desenvolvimento de um método de triagem semiquantitativo para 137 medicamentos e metabólitos de drogas. A abordagem por PSI-MS foi testada em 30 amostras de sangue post-mortem, e uma comparação com LC-MS e outros testes de confirmação apresentaram resultados semelhantes. Ademais, vários relatos nos últimos 2 anos vem mostrando o uso de PSI-MS para análise clínica de metabólitos e drogas em biofluidos (BILLS; MANICKE, 2016; DAMON et al., 2016; YANNELL et al., 2017; KENNEDY et al., 2018; CHIANG; ZHANG; OUYANG, 2018).

A PSI-MS é uma técnica útil para a ciência e tecnologia de alimentos. Evard et al. (2015) utilizaram a PSI-MS para analisar os pesticidas tiabendazol, aldicarbe, imazalil, metomil e metiocarbe em laranjas, toranjas, limões, tangerinas, tomates, maçãs, pêras, morangos, uvas e pimentas doces. A PSI-

MS foi capaz de fornecer limites de detecção (LODs) abaixo dos valores de LMR estabelecidos para os pesticidas analisados. Yu et al. (2018) analisaram o ácido benzóico e a vitamina C em refrigerantes (ex., Coca-Cola, Pepsi), suco de laranja, vinagre de maçã e água de coco por PSI-MS. Foram obtidos LODs e limites de quantificação (LOQs) de 0,1 e 0,3 µg/mL para o ácido benzóico e 0,3 e 1 µg/mL para a vitamina C, respectivamente. A recuperação variou de 91,1 a 106,7% para o ácido benzóico e de 92,6 a 108,2% para a vitamina C. A comparação com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) não mostrou diferença substancial na quantificação do ácido benzóico e vitamina C nas bebidas. Do mesmo modo, Cody, Tamura e Downard (2018) usaram a PSI-MS para detectar e quantificar antocianinas em extratos de sabugo e caule de sabugueiro, bem como em três formulações nutracêuticas comercialmente disponíveis. Os compostos cianidina-3-sambubiosídeo, cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3,5-diglucosídeo, cianidina-3-sambubiosídeo-5-glicosídeo e aglicona cianidina foram rapidamente detectados. Nas formulações nutracêuticas, a concentração de antocianinas variou de 1050 a 5430 mg/100 g, enquanto nos caules e frutos a concentração variou de 500 a 2370 mg/100 g. Além disso, a PSI-MS tem sido aplicada na rápida discriminação de cervejas (PEREIRA et al., 2016) e óleos essenciais de bergamota (TAVERNA et al., 2016), quantificação de corantes em bebidas ilegais (GUO et al., 2017), identificação de whiskies escoceses falsificados (TEODORO et al., 2017) e análise de bisfenol A e seus análogos em produtos de embalagens de alimentos (CHEN et al., 2017).

A química forense tem sido um alvo para aplicações da PSI-MS devido às características de rapidez e simplicidade desta técnica. Carvalho et al. (2016) utilizaram a PSI-MS para verificar drogas diretamente da superfície de selos triangulares, uma vez que algumas drogas são vendidas na forma de selo. Os autores detectaram seis drogas projetadas, tais como dietilamida do ácido lisérgico (LSD), 2,5-dimetoxi-4-cloroanfetamina (DOC), 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina (DOB), 25C-NBOMe, 25B-NBOMe, e 25I-NBOMe. Domingos et al. (2017) também analisaram selos contendo 25I-NBOMe, bem como extratos e folhas de canabinóides e determinaram a autenticidade de fitoterápicos por PSI-MS. Além disso, Tsai, Tipple e Yost (2017) avaliaram

vários sistemas de solventes com diferentes tensões superficiais e aditivos para verificar seus efeitos na ionização de amostras de explosivos na análise por PSI-MS. LODs tão baixos quanto 0,06 ng para o tetranitrato de pentaeritritol (PETN) foram observados utilizando isopropanol com nitrato de amônio (0,4 mM) como solvente de *spray*. Amador et al. (2017) descreveram o uso da PSI-MS para análise direta de tintas de canetas de diferentes marcas de esferográficas, como Bic, Paper Mate, Faber Castell, Pentel, Compactor e Pilot. Os autores diferenciaram as canetas esferográficas de acordo com seus perfís químicos característicos através da análise de PSI-MS combinada com análise multivariada de mínimos quadrados parciais (PLS). Ademais, trabalhos recentes relataram o uso da PSI-MS para análise de cocaína e seus adulterantes (CARVALHO et al., 2016), determinação de benzodiazepínicos (PAULA et al., 2018) e cafeína (TAVERNA et al., 2016) em bebidas, discriminação entre perfumes autênticos e falsificados (TEODORO et al., 2017), detecção de falsificação por assinatura com canetas apagáveis (JURISCH; AUGUSTI, 2016) e detecção e quantificação de simuladores de agentes de guerra química (DHUMMAKUPT et al., 2017).

Outras aplicações da PSI-MS em diferentes campos da ciência têm sido publicadas recentemente. Em microbiologia, as discriminações entre espécies de *Candida* (HAMID et al., 2015) e entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (WEI et al., 2016) foram adequadamente obtidas. O mesmo ocorre no monitoramento de reações, como o monitoramento em tempo real de um sistema em equilíbrio químico dinâmico (PAULA et al., 2016) e a degradação fotocatalítica do azul de metileno na superfície do papel (RESENDE et al., 2017). Compostos apolares (ex., hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), que normalmente não são ionizáveis com técnicas de ionização derivadas de ESI, podem ser analisadas por *laser assisted paper spray ionization* (LAPSI) (BASURI et al., 2018) ou por *paper spray chemical ionization* (PSCI) (KIM et al., 2017), onde em LAPSI é aplicado um laser no papel juntamente com uma alta voltagem para produzir uma fotoionização similar à análise por APPI-MS, enquanto que em PSCI é utilizada uma descarga corona no papel para simular uma análise de APCI-MS. Além disso, alguns pesquisadores têm demonstrado interesse no potencial uso da PSI-

MS em proteômica (HAN et al., 2015), petroleômica (KIM et al., 2018) e análise de inorgânicos (CODY; DANE, 2014).

1.2.1.2 - Leaf Spray

A partir da PSI, outra técnica semelhante foi desenvolvida, a *leaf spray* (LS). A LS também foi desenvolvida pelos grupos do Dr. Graham Cooks e Dr. Zheng Ouyang e foi reportada pela primeira vez em 2011. A diferença entre PSI e LS é que a última utiliza a própria amostra como suporte para formação de íons em fase gasosa. Uma fruta ou hortaliça é cortada em formato triangular, semelhante à PSI, e uma alta voltagem (3-5 kV) é aplicada ao tecido vegetal umedecido com um solvente ácido ou básico (Figura 4). Solventes com diferentes polaridades podem ser utilizados com o intuito de extrair e analisar compostos variados presentes no mesmo vegetal. Amostras com alta quantidade de água (ex., tomate, pimenta, pepino, cebola) não necessitam da adição de solvente. Entretanto, espectros com sinais mais intensos e melhor relação sinal/ruído podem ser obtidos quando o solvente é adicionado. A vantagem da LS em relação à PSI é que, em análises de frutas e vegetais, a PSI requer o preparo de um extrato para aplicar no papel, enquanto que a LS requer apenas o corte da amostra em formato triangular. Desse modo, o conteúdo químico do vegetal pode ser verificado de forma rápida sem a necessidade de qualquer preparo de amostra. Os íons gerados podem ser protonados, desprotonados e/ou cationizados (LIU et al., 2011).

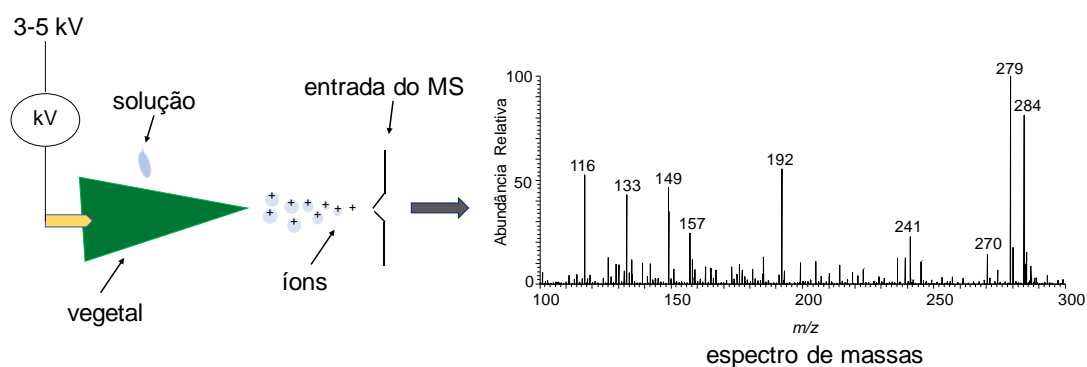


Figura 4: Esquema geral da técnica *leaf spray* (LS).

FONTE: adaptado de Liu et al. (2011).

A LS-MS já foi empregada na análise direta de pesticidas. Pulliam et al. (2015) analisaram o herbicida 2,4-D em folhas de grama utilizando um espectrômetro de massas portátil. Os autores aplicaram o herbicida na grama e verificaram se a quantidade do composto diminuía com o passar dos dias. Durante cinco dias de análises, a intensidade do íon fragmento característico do 2,4-D (m/z 219 \rightarrow m/z 175) diminuiu, demonstrando uma possível perda (ex., difusão, evaporação, degradação) do composto. Os mesmos autores também analisaram o fungicida clorotalonil em folhas de árvore carvalho. Do mesmo modo, após cinco dias, foi possível verificar a diminuição da quantidade do fungicida nas folhas. Em outra abordagem, Malaj et al. (2012) identificaram vários pesticidas (acetamiprid, difenilamina, imazalil, linuron, tiabendazole) diretamente da casca e polpa de uma variedade de frutas e vegetais (maçã, pêra, limão, laranja, cenoura, pepino, berinjela, batata). Os alimentos foram cortados em formato triangular e diretamente analisados por LS-MS. Também foi possível quantificar os pesticidas em frutas e vegetais orgânicos por LS-MS/MS utilizando curvas de calibração construídas com a adição de padrões internos. Foram encontrados valores de LOD abaixo dos LMRs estabelecidos para os pesticidas. Os resultados também demonstraram curvas de calibração com $R^2 > 0,99$ e valores de precisão abaixo de 15%.

A LS-MS é uma técnica amplamente utilizada para análise de metabólitos secundários de plantas. Freund et al. (2018) utilizaram LS-MS para detectar metabólitos de folhas de *Glycyrrhiza lepidota*. Foram detectados os seguintes compostos: prunetina, glabranina, glepidotina A, glepidotina B, glepidotina D, licocumarona e isolicoflavonol. Os autores compararam as análises diretas por LS-MS com uma extração das folhas para posterior análise por LC-MS. As técnicas LS e LC-MS demonstraram diferenças no perfil químico, provavelmente devido à primeira extrair principalmente os compostos da superfície da folha. Snyder et al. (2015) utilizaram LS-MS para detecção de glicosídeos fenólicos em folhas de *Populus deltoides* e *Populus grandidentata*. Adicionando brometo de sódio ou cloreto de potássio ao solvente de *spray*, houve um aumento na sensibilidade e seletividade na análise por LS(+)-MS, onde os íons dominantes no espectro eram sodiados ou potássidos. Do mesmo modo, Liu et al. (2016) analisaram glicosídeos

fenilpropanóides em espécies de *Callicarpa* L., tais como *Callicarpae kwangtungensis Folium*, *Callicarpae macrophyllae Folium*, *Callicarpa nudiflora Folium*, *Callicarpae formosanae Folium* e *Callicarpa longissima Folium*. Os espectros de massas das amostras de *Callicarpa* L. foram analisados por análise de componentes principais (PCA) ou análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), e os resultados demonstraram que LS-MS acoplado à análise multivariada pode diferenciar as cinco espécies de plantas.

Outras aplicações da LS-MS têm sido reportadas, por exemplo, identificação de alergênicos em espécies de *Toxicodendron* (TADJIMUKHAMEDOV et al., 2012), análise de alterações moleculares em *Ocimum tenuiflorum* induzidas pelo envelhecimento (SARKAR; SRIMANY; PRADEEP, 2012), discriminação de *Illicium verum* e *Illicium anisatum* através da detecção de neurotoxinas (SCHRAGE et al., 2013), detecção de alcalóides polihidroxiados em amoras (ZHANG et al., 2013), análise direta de grão de café (GARRETT; REZENDE; IFA, 2013) e diferenciação de fitoquímicos (MULLER; COOKS, 2014) e de folhas tóxicas e não tóxicas de *Jatropha curcas* (PEREIRA et al., 2017).

1.2.1.3 - Infrared Laser Ablation Sample Transfer

A *infrared laser ablation sample transfer* (IR-LAST) é uma técnica de amostragem ambiente utilizada em MS. Nesta técnica, um laser infravermelho (IV) médio (comprimento de onda de 3 μm) pulsado é utilizado para remover materiais de uma superfície de interesse. Depois de removido, o material pode ser submetido a técnicas de separação (ex., HPLC) ou ser diretamente analisado por MS (PARK; MURRAY, 2011). Diferente de MALDI em que o laser é absorvido por uma matriz, em IR-LAST o laser IV médio pode ser absorvido por moléculas de água ou outros compostos que contenham grupos de absorções vibracionais OH ou NH, não sendo necessária a adição de uma matriz externa (RUSSO et al., 2013).

O uso de um laser IV para dessorver ou remover materiais para serem ionizados por ESI foi relatado pela primeira vez em 2007, e foi referido por

diferentes nomes, incluindo *laser ablation electrospray ionization* (LAESI) (NEMES; VERTES, 2007) e *infrared laser-assisted desorption electrospray ionization* (IR LADESI) (REZEMOM; DONG; MURRAY, 2008). Todavia, estes métodos operam em modo online, isto é, o analito é irradiado pelo laser e é desorvido e ionizado dentro de uma fonte de ESI. O processo de desorção e ionização pode ser desacoplado se o material irradiado for primeiramente capturado em um solvente, processado (agitação, centrifugação, extração, etc.) e subsequentemente ionizado, ou seja, operado em modo offline. A análise em modo offline pode ser vantajosa para análises quantitativas em relação ao modo online. Quando a amostra é capturada, o analito pode ser extraído e ressuspenso em um volume adequado de solvente que pode resultar em uma solução de analito mais concentrada para análise quantitativa por MS (DONNARUMMA; MURRAY, 2016).

A IR-LAST pode ser categorizada como uma técnica de análise em modo offline, como demonstra a Figura 5. A amostra é depositada em uma lâmina de microscopia de vidro e o laser é aplicado no modo de transmissão no lado inverso da lâmina. Após a aplicação do laser, o material irradiado se desprende da amostra e é capturado em um tubo de microcentrífuga contendo solvente. Após procedimentos de extração, centrifugação, adição adequada de volume de solvente, etc., a amostra pode ser analisada por ESI-MS ou outro método de ionização (WANG et al., 2018).

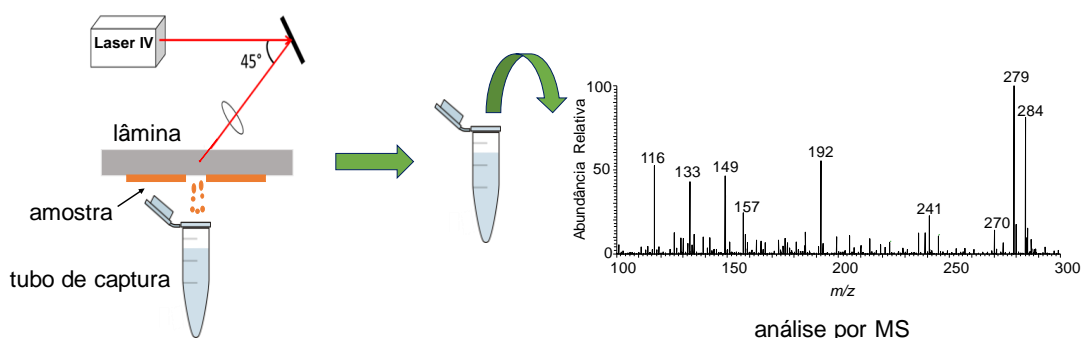


Figura 5: Esquema geral da técnica *infrared laser ablation sample transfer* (IR-LAST) com análise offline por MS.

FONTE: adaptado de Wang et al. (2018).

A IR-LAST já foi utilizada para capturar material de impressões digitais depositadas em diferentes superfícies, como vidros, plásticos e alumínio. Um laser IV médio (3 μm) foi aplicado nas superfícies e diferentes analitos foram capturados e analisados por MS. Utilizando MALDI-MS foi possível detectar cafeína em quantidades abaixo de 1 ng em todos os materiais. MALDI também foi empregada na análise de lubrificantes de preservativos e detecção de peptídeos antibacterianos em um creme antisséptico. Diferentes explosivos, como 1,3-dinitrobenzeno, 2,4-dinitrotolueno, 1,3,5-trinitrobenzeno, 2,4,6-trinitrotolueno e 2-amino-4,6-dinitrotolueno de impressões digitais em plásticos foram detectados por cromatografia gasosa acoplada à MS (GC-MS) (DONNARUMMA et al., 2017).

A IR-LAST tem sido empregada na análise de peptídeos, proteínas e enzimas. Donnarumma e Murray (2016) utilizaram IR-LAST com MS para verificar o perfil proteico de cérebro de ratos. Um laser IV foi utilizado para transferir partes do tecido de cerebelo e mesencéfalo com 50 μm de espessura montadas em uma lâmina de microscopia para um tubo de microcentrífuga contendo solvente. O material capturado foi analisado por LC-MS. Park e Murray (2013) usaram IR-LAST juntamente com eletroforese capilar acoplada à MS. O sistema foi testado utilizando misturas de padrões de peptídeos e proteínas que foram irradiados por um laser IV médio, capturados e analisados via eletroforese capilar-MS. A quantidade de material transferido por IR-LAST para o sistema de eletroforese capilar foi de 15 fmol para bradicinina, 20 fmol para neurotensina, 40 fmol para angiotensina II e 10 fmol para encefalina. Já Wang et al. (2018) empregaram IR-LAST na extração de enzimas a partir de amostras de 50 μm de espessura de córtex e cerebelo de ratos. Os experimentos foram realizados com a enzima tripsina, que foi submetida a um laser IV (3 μm), capturada e usada para digerir a albumina do soro bovino (BSA). A BSA digerida foi analisada por MALDI-MS e os íons dos peptídeos trípticos foram comparados com um padrão analítico da tripsina. Em outra abordagem, Pettit et al. (2018) removeram partes de tecido cerebral (50 μm de espessura) de ratos por IR-LAST para verificar o perfil proteico. As amostras foram analisadas utilizando *ion mobility*-MS.

1.3 - Objetivos

1.3.1 - Objetivo Geral

Comparar, desenvolver e aplicar técnicas de espectrometria de massas ambiente, como *paper spray ionization* (PSI), *leaf spray* (LS) e *infrared laser ablation sample transfer* (IR-LAST) na análise de pesticidas em frutas e hortaliças folhosas.

1.3.2 - Objetivos Específicos

- Comparar as performances analíticas das técnicas PSI e LS-MS através da detecção, quantificação, determinação de linearidade, LOD e LOQ dos pesticidas atrazina, diuron e metomil em rúcula, manjeriço, repolho, alface e couve;
- Sintetizar um *molecularly imprinted polymer* (MIP) sobre a superfície de uma membrana de celulose e utilizá-la como substrato em análise por PSI-MS;
- Verificar a seletividade e a performance analítica do MIP *membrane spray ionization* através da análise dos herbicidas diuron e 2,4-D em maçãs, bananas e uvas,
- Verificar a dinâmica de penetração e quantificar o fungicida imazalil em maçãs utilizando IR-LAST com análise offline por *electrospray ionization*.

Capítulo II:
Análise de pesticidas por PSI e LS-MS:
uma comparação analítica

2.1 - Introdução

Os herbicidas são compostos amplamente utilizados na agricultura para controlar o desenvolvimento de plantas daninhas (MATTHEWS, 2016). Dois importantes herbicidas utilizados no Brasil são a atrazina e o diuron. A atrazina é um herbicida do grupo químico das triazinas (YANG et al., 2018) e é utilizada em diferentes culturas, como abacaxi, cana-de-açúcar, mandioca, milho e sorgo (ANVISA, 2016; MAPA, 2018). De acordo com a Anvisa (2018b), ela faz parte da classe III (moderadamente tóxico) dentro da classificação toxicológica. A atrazina tem sido relatada na literatura como uma potencial causadora de câncer de próstata (HU et al., 2016), câncer no fígado (TIAN et al., 2018), agente de toxicidade mitocondrial em células hepáticas (SAGARKAR et al., 2016), de alteração no sistema reprodutivo (SONG et al., 2014) e de abortos espontâneos e problemas de desenvolvimento fetal (GOODMAN et al., 2014). Já o diuron é um herbicida do grupo das feniluréias (HUSSAIN et al., 2015) e tem sido utilizado em culturas de abacaxi, algodão, cana-de-açúcar, café, banana, laranja, mandioca, milho, trigo e uva (ANVISA, 2016; MAPA, 2018). Este composto também faz parte da classe III, de acordo com a classificação toxicológica (ANVISA, 2018b). O diuron tem sido relatado como um potencial agente de toxicidade ao sistema reprodutivo (BEHRENS et al., 2016) e à placenta humana (HUOVINEN et al., 2015), além de indutor do estresse oxidativo (FELÍCIO et al., 2018).

Outros compostos vastamente utilizados na agricultura são os inseticidas. Esta classe de pesticida é utilizada na agricultura para combater insetos (MATTHEWS, 2016). O metomil é um inseticida do grupo dos carbamatos (DHOUIB et al., 2016) e tem sido aplicado em algodão, batata, brócolis, couve, mandioca, milho, repolho, tomate, trigo e soja (ANVISA, 2016; MAPA, 2018). De acordo com a Anvisa (2018b), este composto faz parte da classe I (extremamente tóxico) na classificação toxicológica. O metomil tem sido associado à toxicidade renal e aumento do estresse oxidativo (ASHOUR et al., 2017), toxicidade à acetilcolinesterase (WHITACRE, 2013), além de induzir ao polimorfismo da enzima glutationa-S-transferase, o que pode acarretar em risco de câncer (EL-BENDARY, 2014).

Tradicionalmente, as análises de herbicidas e inseticidas em alimentos têm sido realizadas por meio de técnicas analíticas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (SHARMA et al., 2010; GRIMALT; DEHOUCK, 2016; UCLÉS et al., 2017) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) (STACHNIUK; FORNAL, 2016; MASIÁ et al., 2016). Ambas as técnicas demonstram elevados desempenhos analíticos, porém, requerem etapas laboriosas de preparo de amostra antes da análise instrumental.

Com o advento das técnicas de ionização ambiente, como a *paper spray ionization* (PSI) e a *leaf spray* (LS), foram introduzidos meios mais simples de gerar íons em MS. Estas técnicas aparecem como alternativas simplificadas e úteis para a detecção e quantificação de analitos diretamente de seus ambientes naturais ou quando colocados em superfícies auxiliares (ALBERICI et al., 2010).

Apesar da enorme aplicabilidade da PSI e LS-MS, como já demonstrado no Capítulo I, não há uma descrição detalhada na literatura comparando as performances analíticas destas duas técnicas para determinação de pesticidas em hortaliças. Neste trabalho, PSI e LS-MS são comparadas através de parâmetros analíticos como linearidade (R^2) e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) obtidos a partir da construção de curvas de calibração com os herbicidas atrazina e diuron e o inseticida metomil. As matrizes utilizadas são as hortaliças rúcula, manjericão, repolho, alface e couve.

2.2 - Metodologia

2.2.1 - Materiais, Padrões Analíticos e Solventes

O metanol grau HPLC foi adquirido da J. T. Baker (New Jersey, EUA). O papel Whatman #1 (poros de 11 μm) foi adquirido da Whatman International Ltd. (Maidstone, Inglaterra), e foi tratado com adição de microcanais parafinados com o intuito de direcionar a solução da amostra para a ponta do papel, evitando que a amostra se espalhe sobre a superfície do mesmo, como

descrito por Colletes et al. (2016). A parafina (140^o/145^oF) foi adquirida da Petrobrás (Rio de Janeiro, Brasil). Os padrões analíticos dos pesticidas (atrazina, diuron e metomil) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As amostras de rúcula, manjeriço, repolho, alface e couve foram adquiridas em um supermercado local (Goiânia, Brasil).

2.2.2 - PSI e LS-MS

Para as análises por PSI, as hortaliças foram submetidas à extração por metanol. Uma folha de cada vegetal foi cortada em pequenos pedaços e depositados em um tubo de centrifuga de polipropileno. Um volume de 3 mL de metanol foi adicionado e a extração ocorreu por 3 min sob agitação. O extrato resultante foi aplicado em um papel triângulo equilátero com 1 cm de lado (CARVALHO, et al., 2016). Nas análises por LS, a hortaliça foi cortada em formato triangular (equilátero, 1 cm de lado) e utilizada para análise por MS. A distância entre a ponta do papel ou hortaliça e a entrada do espectrômetro de massas foi de aproximadamente 4 mm (WANG et al., 2010). Foram utilizados 15 µL (ESPY et al., 2014) de metanol ácido (0,1% de ácido fórmico) como solvente de *spray*. A Figura 6 ilustra um esquema geral das técnicas PSI e LS demonstrando o papel e a hortaliça tendo suas bases fixadas por um clipe metálico por meio do qual é aplicada uma alta voltagem.

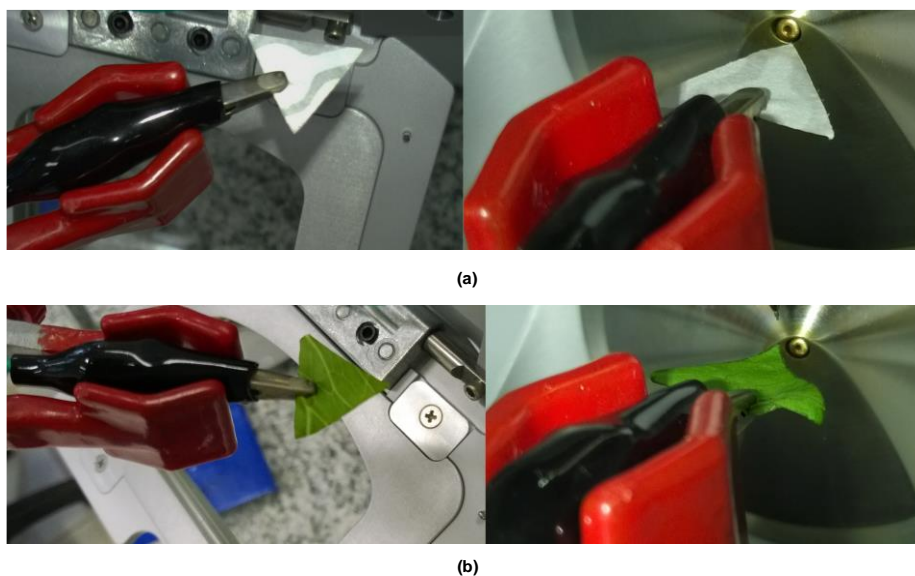


Figura 6: Esquema geral da técnica (a) PSI e (b) LS.

2.2.3 - Performance Analítica

Para avaliar e comparar o desempenho analítico das técnicas PSI e LS, foram construídas curvas de calibração com os padrões analíticos da atrazina, diuron e metomil. Para a PSI, alíquotas de soluções estoques dos pesticidas foram diluídas nos extratos metanólicos, e alíquotas destes extratos foram diluídas na mesma matriz para atingir as concentrações de 10, 100, 300, 500, 700 e 1000 ppb. O mesmo processo foi aplicado na LS, porém, utilizando solvente metanol em vez de extratos. As curvas de calibração foram construídas pela medida das razões entre as intensidades absolutas dos íons de interesse e a intensidade absoluta de um padrão interno. A atrazina (500 ppb) foi utilizada como padrão interno para análises com diuron e metomil, e o diuron (500 ppb) foi utilizado nas análises com atrazina. Foram adicionados 15 µL das soluções da amostra no papel ou hortaliça e deixado secar por 3 min. Em seguida, o padrão interno foi adicionado (15 µL) e deixado secar. As análises foram realizadas em triplicata. Os LODs e LOQs foram calculados através das equações $3sB/m$ e $10sB/m$, respectivamente, onde sB é o desvio padrão de 10 análises do branco e m é o coeficiente angular da curva de calibração (VU et al., 2018). Por fim, PSI e LS-MS foram utilizadas para verificar a presença de atrazina, diuron e metomil em hortaliças coletadas em um supermercado.

2.2.4 - Parâmetros Instrumentais

Os espectros de massas foram obtidos utilizando um espectrômetro de massas *Thermo Scientific Q Exactive hybrid Quadrupole-Orbitrap*. As análises foram realizadas no modo de ionização positivo e utilizando o modo de aquisição *selected ion monitoring* (SIM), com uma resolução de 140000. Os outros parâmetros experimentais foram: voltagem do *spray*: 3,5 kV; temperatura capilar: 275 °C; S-lens RF level: 50%; energia de colisão: 35 eV.

2.3 - Resultados e Discussões

Os pesticidas atrazina, diuron e metomil foram submetidos à análise por PSI(+) e LS(+)-MS. Em todos os casos, os compostos foram detectados como moléculas protonadas $[M+H]^+$, com erros de massa abaixo de 1 ppm. A Tabela 3 descreve as fórmulas moleculares, massas moleculares, valores de m/z medidos e teóricos e os erros de massa obtidos para os três pesticidas.

Tabela 3: Fórmulas e massas moleculares dos pesticidas atrazina, diuron e metomil e seus respectivos valores de m/z medidos e teóricos e erros de massa.

Pesticida	Fórmula	Massa molecular	$m/z_{medido} [M+H]^+$	$m/z_{teórico} [M+H]^+$	Erro (ppm)
Atrazina	$C_8H_{14}N_5Cl$	215,0938	216,1011	216,1010	0,42
Diuron	$C_9H_{10}ON_2Cl_2$	232,0170	233,0242	233,0243	-0,54
Metomil	$C_5H_{10}O_2N_2S$	162,0463	163,0535	163,0536	-0,40

Atrazina, diuron e metomil podem ser detectados por PSI(+) e LS(+) em baixas concentrações, na faixa de partes por bilhão (ppb). A Figura 7 demonstra os espectros de massas obtidos por PSI(+) (Figura 7a) e LS(+)-MS (Figura 7b) com a atrazina em 10 ppb em rúcula, manjericão, repolho, alface e couve. Nesta concentração, foi possível detectar os íons protonados dos três compostos em todas as hortaliças com intensidades em torno ou acima de 10^6 , utilizando ambas as técnicas.

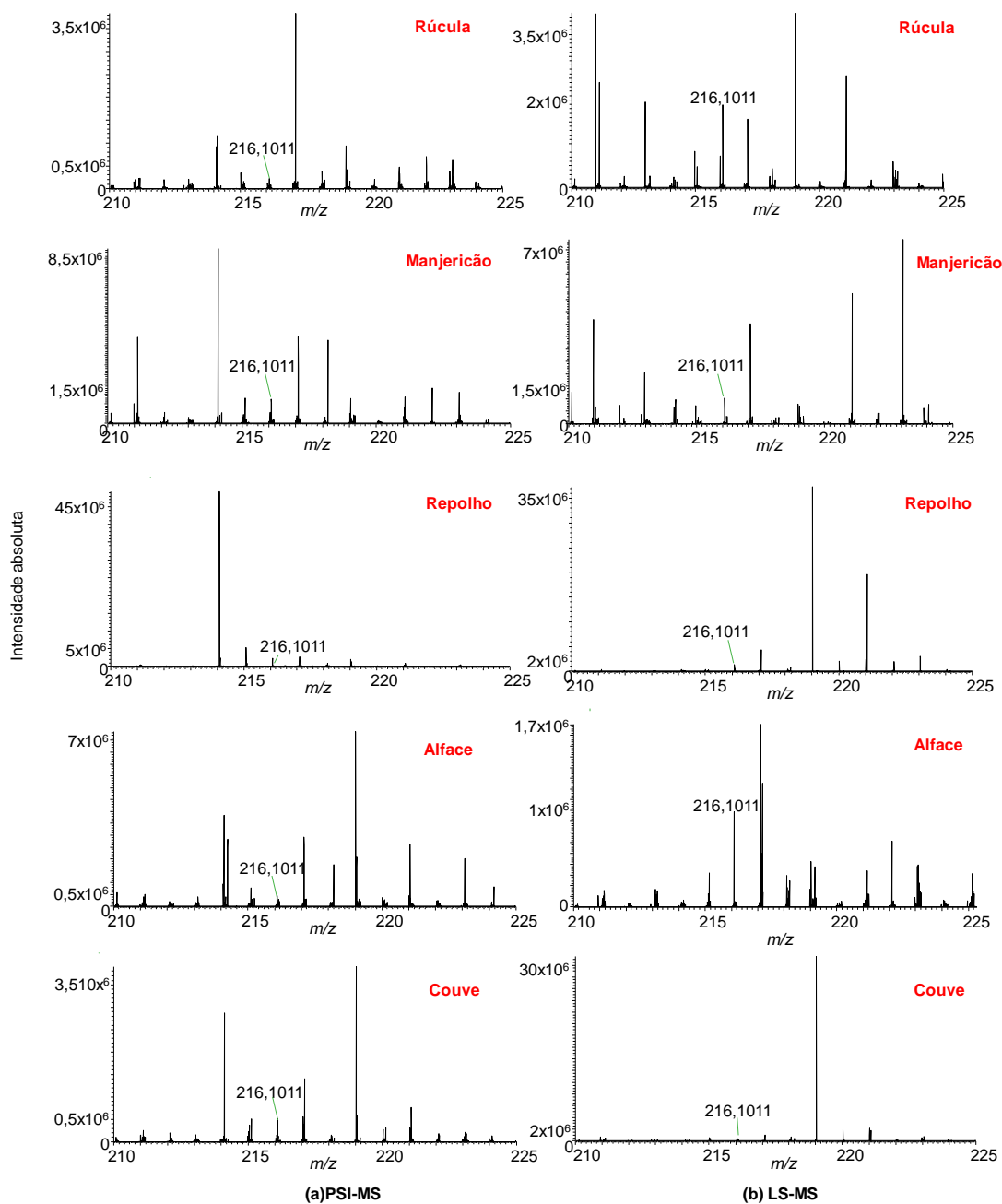


Figura 7: Espectros de massas obtidos por (a) PSI(+) e (b) LS(+) com 10 ppb de atrazina em rúcula, manjerição, repolho, alface e couve.

A Figura 8 ilustra os espectros de MS/MS obtidos por PSI(+) (Figura 8a) e LS(+) (Figura 8b) da atrazina, diuron e metomil na amostra de manjerição em uma concentração de 100 ppb. Comparando as duas técnicas de ionização para cada composto, os espectros de MS/MS não demonstraram diferenças significativas. Isto demonstra que é possível identificar e confirmar

a estrutura de pesticidas em baixas concentrações em vegetais por ambas as técnicas.

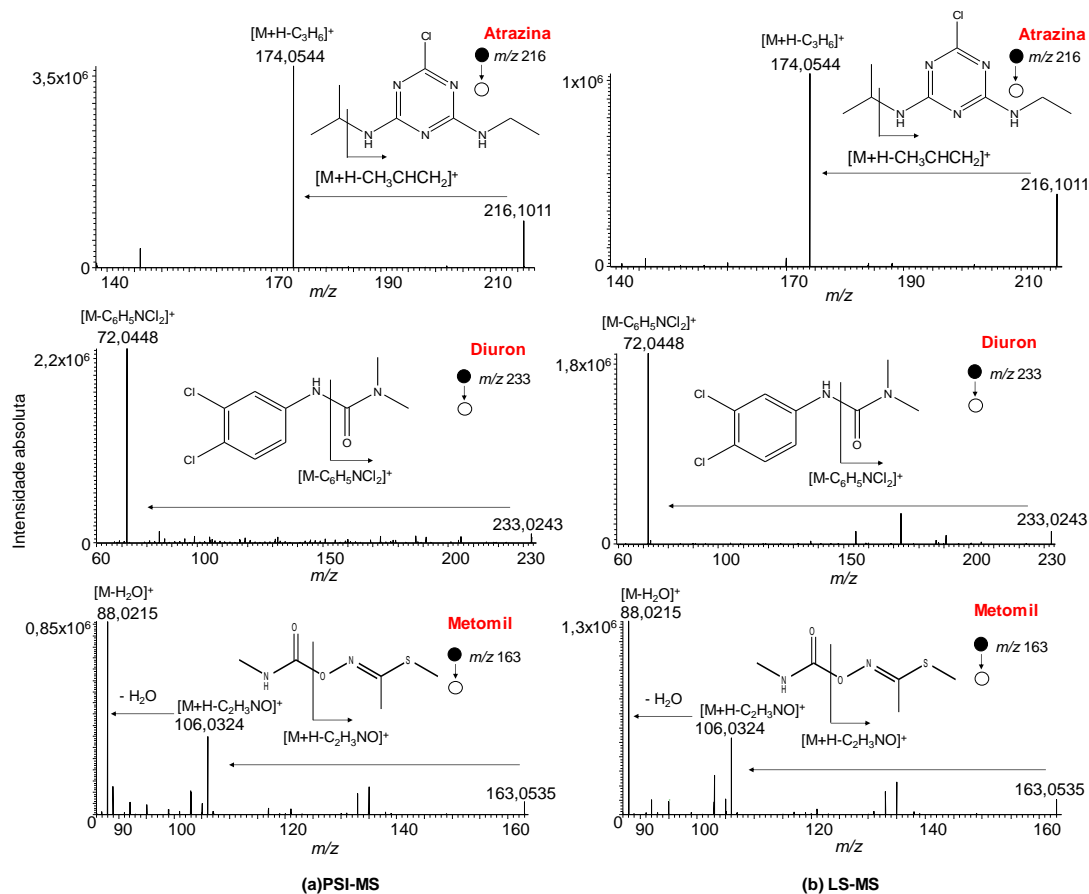


Figura 8: Espectros de (a) PSI(+) e (b) LS(+)-MS/MS obtidos com 100 ppb de atrazina, diuron e metomil na amostra de manjeriço.

Os espectros de MS/MS da atrazina apresentaram um fragmento intenso com valor de m/z 174,0544 $[M+H]^+$, devido à perda de propileno da cadeia isopropilamina (DONG; LIANG; SUN, 2016), como demonstrado na Figura 9a. Nos espectros de MS/MS do diuron, um íon intenso com m/z 72,0448 $[M]^+$ foi detectado devido à perda da dicloroanilina (NIESSEN, 2010), exemplificado na Figura 9b. Já os espectros de MS/MS do metomil apresentaram um fragmento com m/z 106,0324 $[M+H]^+$ oriundo da perda de isocianato de metila (Figura 9c), e outro fragmento mais intenso com m/z 88,0215 $[M]^+$ devido à perda de H_2O do íon m/z 106 (CHIU; LANGENHOVE, 1989).

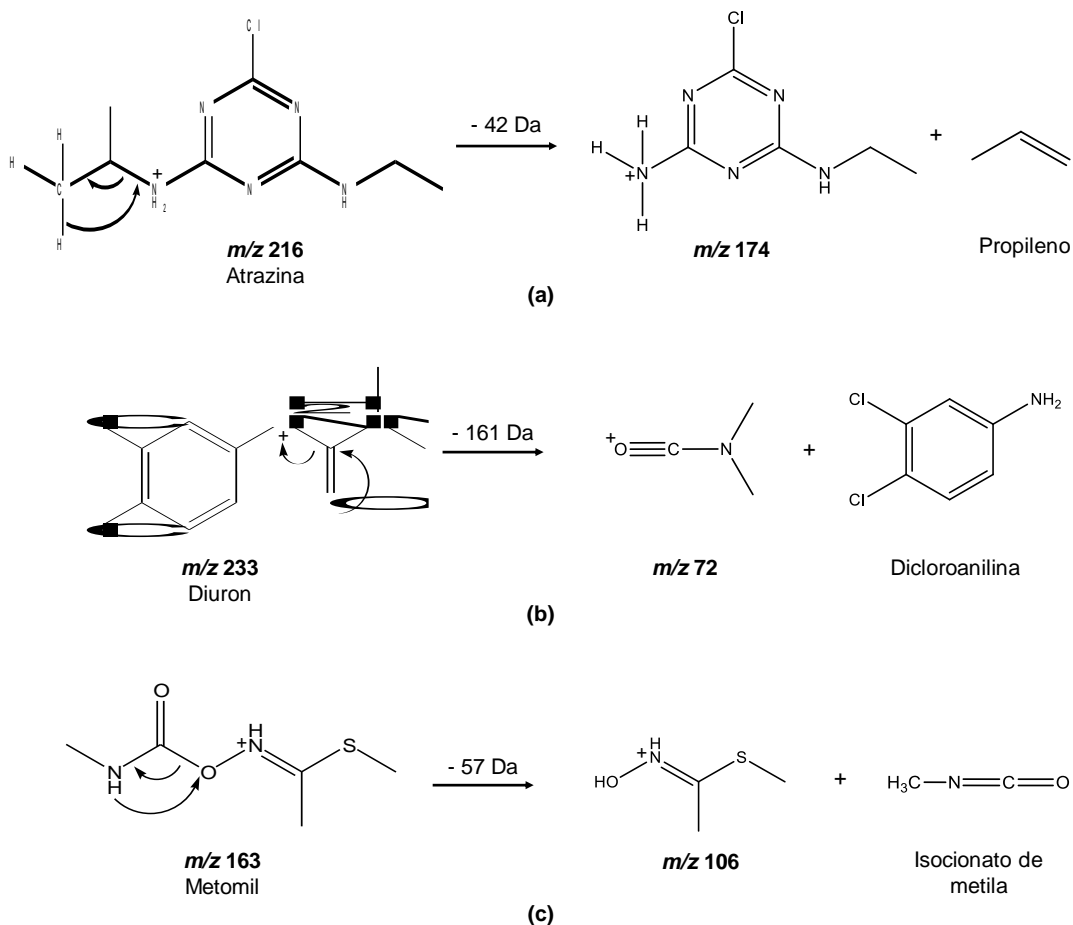


Figura 9: Proposta de mecanismo de fragmentação para (a) atrazina, (b) diuron e (c) metomil.

Geralmente, em análises quantitativas por MS é comum a utilização de moléculas deuteradas como padrões internos, pois o composto deuterado será ionizado de maneira semelhante ao analito de interesse. Este processo pode evitar erros na quantificação que podem ocorrer devido à supressão iônica causada pelos componentes da matriz (STOKVIS; ROSING; BEIJNEN, 2005; YANG et al., 2012; TAVERNA et al., 2013; ESPY et al., 2014; ZRNČIĆ et al., 2014; MICHEL et al., 2015). PSI e LS são técnicas com características de simplicidade. O uso de padrões deuterados, que possuem preços elevados e nem sempre estão disponíveis, pode tornar estas técnicas mais complexas e exigentes. Desse modo, é de suma importância a investigação de métodos alternativos para realizar análises quantitativas por ambas as técnicas. Uma alternativa é utilizar moléculas não deuteradas, mas que se ionizam de forma semelhante ao analito de interesse. Neste trabalho, a atrazina foi utilizada

como padrão interno nas análises com diuron e metomil, e o diuron foi utilizado nas análises com atrazina.

As curvas de calibração foram construídas utilizando a razão entre a intensidade do íon do analito e do padrão interno. A Figura 10 ilustra um exemplo, onde a Figura 10a demonstra os espectros de PSI(+) e a Figura 10b os espectros de LS(+) da atrazina (10 a 1000 ppb) utilizando diuron (500 ppb) como padrão interno na amostra de alface. Com o aumento da concentração da atrazina, há um aumento do valor da intensidade absoluta deste composto em relação ao padrão interno.

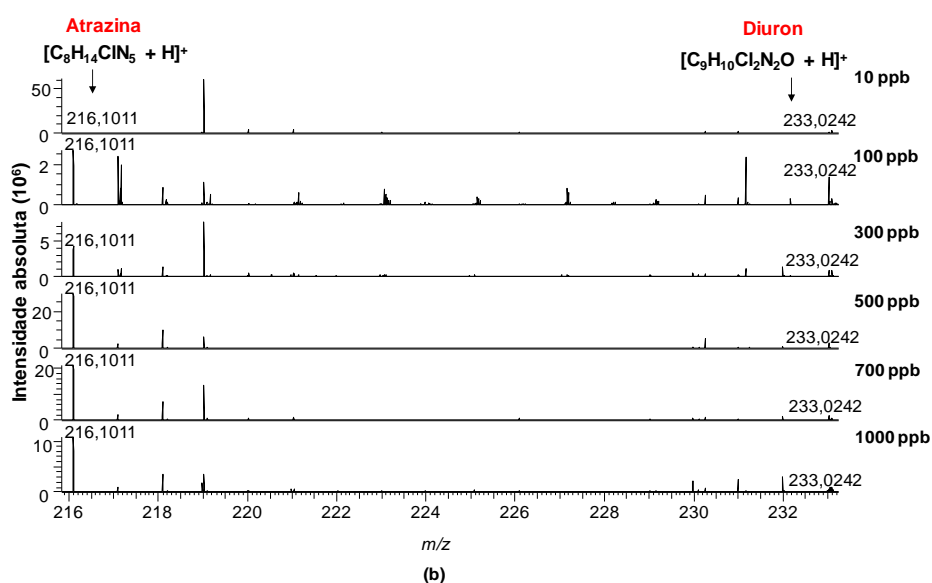
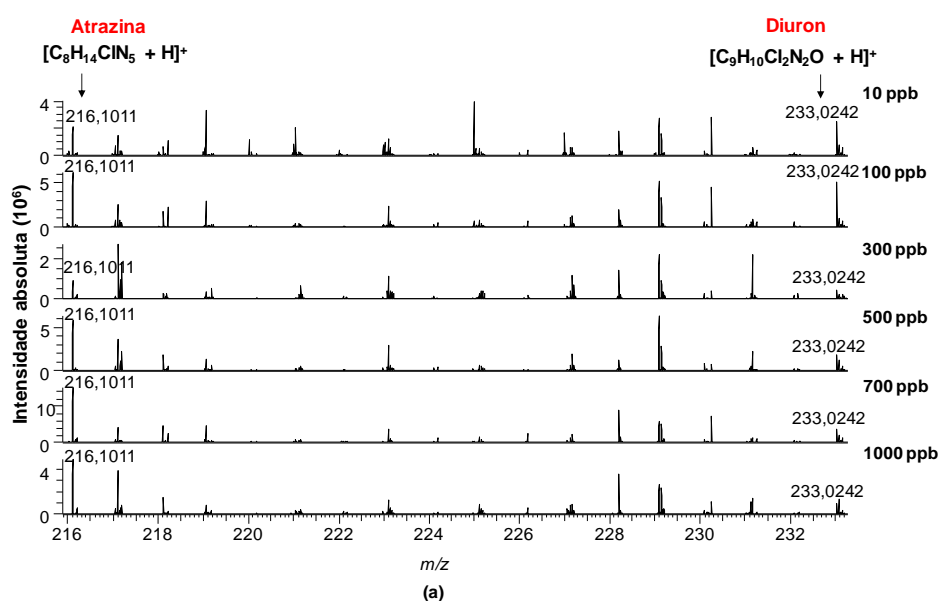


Figura 10: Espectros de massas obtidos por (a) PSI(+) e (b) LS(+) com atrazina (10-1000 ppb, m/z 216,1011) utilizando o padrão interno diuron (500 ppb, m/z 233,0242).

A partir das curvas de calibração de cada pesticida em todas as amostras de hortaliças, foram determinadas as linearidades (R^2), equações da reta e valores de LOD e LOQ para as técnicas PSI e LS-MS (Tabela 4). Ambas as técnicas apresentaram linearidades adequadas quando aplicadas aos três pesticidas, com R^2 acima de 0,99. A técnica LS-MS apresentou os menores valores de LOD e LOQ utilizando couve como amostra: com a atrazina, LS apresentou um LOD de 0,35 e um LOQ de 1,18 ppb; com o diuron, LS mostrou um LOD de 0,82 e um LOQ de 2,74 ppb; já para o metomil, o LOD foi de 0,03 e o LOQ 0,11 ppb. No entanto, a PSI-MS também apresentou valores baixos de LOD e LOQ: para atrazina e diuron, o LOD foi de 2,49 e o LOQ foi de 8,31 ppb utilizando repolho como amostra; para o metomil, o LOD foi de 1,23 e o LOQ 4,12 ppb na amostra de alface. Portanto, ambas as técnicas aparentam ser adequadas para uma rápida triagem de pesticidas em vegetais, pois os resultados de LOD estão abaixo dos níveis regulatórios de limite máximo de resíduos (LMR) estabelecidos para os compostos estudados em vegetais. De acordo com a Anvisa, o LMR do metomil para couve e repolho são de 3000 ppb. Mesmo que a atrazina e o diuron não sejam registrados para o uso em rúcula, manjeriço, repolho, alface e couve, os LMRs destes herbicidas variam de 20 a 250 ppb para diferentes culturas como mandioca, milho, trigo, abacaxi, banana, laranja e uva.

Por fim, PSI e LS-MS foram empregados para verificar a presença dos pesticidas atrazina, diuron e metomil em folhas de rúcula, manjeriço, repolho, alface e couve adquiridas em um supermercado local. No entanto, nenhuma hortaliça ($n=20$ para cada amostra) continha teores detectáveis dos pesticidas.

A LS-MS já foi utilizada para análise de pesticidas em frutas e hortaliças (LIU et al., 2011). Do mesmo modo, PSI-MS tem sido relatada como uma técnica viável para análise de atrazina e metomil. Reeber et al. (2015) detectaram atrazina em 10 ppb em amostras de água, além de obterem uma curva de calibração com $R^2=0,9948$. O inseticida metomil foi detectado por PSI-MS em cascas de tomates, laranjas e uvas e apresentou um LOD abaixo

dos LMRs declarados pela legislação de pesticidas da União Europeia (EVARD et al., 2015).

Tabela 4: Performance analítica de PSI(+) e LS(+)-MS através da detecção dos pesticidas atrazina, diuron e metomil em amostras de hortaliças.

Compostos	Amostras	Métodos	Equação da reta	(R ²)	LOD ^a	LOQ ^a	
Atrazina	Rúcula	PSI	y = 0,0022x - 0,0002	0,9926	7,44	24,79	
		LS	y = 0,0058x + 0,1843	0,9926	1,07	3,57	
	Manjeriço	PSI	y = 0,0018x + 0,1033	0,9943	9,09	30,30	
		LS	y = 0,0015x + 0,1059	0,9911	10,91	36,36	
	Repolho	PSI	y = 0,0038x + 0,1554	0,9918	2,49	8,31	
		LS	y = 0,001x + 0,2997	0,9937	36,00	120,00	
	Alface	PSI	y = 0,0023x - 0,0861	0,9906	6,81	22,68	
		LS	y = 0,0156x + 0,5319	0,9904	4,94	16,46	
	Couve	PSI	y = 0,0022x + 0,1221	0,9936	7,44	24,79	
		LS	y = 0,0101x - 0,3008	0,9946	0,35	1,18	
	Diuron	Rúcula	PSI	y = 0,0024x + 0,2593	0,9901	6,25	20,83
			LS	y = 0,0022x - 0,0932	0,9927	7,44	24,79
Manjeriço		PSI	y = 0,0028x - 0,1469	0,9904	4,59	15,31	
		LS	y = 0,0027x + 0,2047	0,9937	4,94	16,46	
Repolho		PSI	y = 0,0038x - 0,0859	0,9946	2,49	8,31	
		LS	y = 0,0032x + 0,008	0,9916	3,52	11,72	
Alface		PSI	y = 0,0031x - 0,1563	0,9938	3,75	12,49	
		LS	y = 0,0015x + 0,0496	0,9937	16,00	53,33	
Couve		PSI	y = 0,0041x - 0,0645	0,9903	2,14	7,14	
		LS	y = 0,0107x + 0,1094	0,9935	0,82	2,74	
Metomil		Rúcula	PSI	y = 0,0013x + 0,2439	0,9910	21,30	71,01
			LS	y = 0,0014x + 0,1777	0,9923	18,37	61,22
	Manjeriço	PSI	y = 0,0012x - 0,026	0,9910	25,00	83,33	
		LS	y = 0,0014x + 0,3565	0,9963	15,31	51,20	
	Repolho	PSI	y = 0,0053x - 0,1424	0,9923	1,28	4,27	
		LS	y = 0,0021x - 0,0169	0,9912	8,16	27,21	
	Alface	PSI	y = 0,0054x - 0,0472	0,9908	1,23	4,12	
		LS	y = 0,0058x + 0,2555	0,9967	3,05	10,15	
	Couve	PSI	y = 0,0033x + 0,1099	0,9925	3,31	11,02	
		LS	y = 0,0337x + 1,9327	0,9906	0,03	0,11	

^a ppb.

2.4 - Conclusão

Este estudo comparou as técnicas *paper spray ionization* e *leaf spray* através da detecção de pesticidas em hortaliças, bem como pela construção de curvas de calibração e determinação de LODs e LOQs. PSI e LS-MS se apresentaram como técnicas capazes de detectar os pesticidas atrazina, diuron e metomil em baixas concentrações (ppb) em amostras de rúcula, manjeriço, repolho, alface e couve. Curvas de calibração com linearidades

adequadas ($R^2 > 0,99$) e baixos valores de LOQ e LOD (0,03 a 120 ppb) foram obtidos nas análises por ambas as técnicas. Além disso, um desempenho analítico satisfatório foi alcançado utilizando apenas moléculas não deuteradas como padrões internos. A LS-MS aparenta ser mais vantajosa em relação à PSI-MS devido a análise ser realizada diretamente do tecido vegetal, sem a necessidade de se preparar um extrato do vegetal. Todavia, o extrato preparado para a PSI pode ser realizado utilizando uma folha inteira do vegetal de uma só vez, o que permite verificar a presença dos pesticidas em todo o tecido vegetal em apenas uma análise. Isto não ocorre na LS devido à necessidade de cortar a folha em pequenos triângulos e analisar cada um separadamente. De todo modo, PSI e LS-MS se apresentam como metodologias viáveis para análise de pesticidas em vegetais.

Capítulo III:
MIP membrane spray ionization:
combinando *molecularly imprinted*
polymer (MIP)* e *paper spray ionization
para análise de herbicidas em frutas

3.1 - Introdução

Como demonstrado no capítulo anterior, a técnica *paper spray ionization* (PSI) pode ser empregada na análise de pesticidas utilizados nas lavouras do Brasil, como atrazina, metomil e diuron. Um outro pesticida muito utilizado na agricultura brasileira e que pode ser estudado por PSI é o ácido diclorofenóxiacético (2,4-D), um herbicida do grupo dos fenoxiácidos (JAYAKODY; HARRIS; COGGON, 2015). O 2,4-D tem sido aplicado em culturas de arroz, cana-de-açúcar, café, mandioca, milho, soja, e trigo (ANVISA, 2016; MAPA, 2018). De acordo com a Anvisa (2018b), este composto faz parte da classe I (extremamente tóxico) dentro da classificação toxicológica. O 2,4-D tem sido correlacionado como potencial causador de câncer de estômago e próstata (GOODMAN; LOFTUS; ZU, 2015), indutor do linfoma não-Hodgkin (SMITH et al., 2017) e apoptose testicular (ZHANG et al., 2017).

Apesar da eficácia e enorme aplicabilidade da PSI, esta técnica pode apresentar algumas limitações, por exemplo, supressão iônica e baixa sensibilidade em níveis de traço, especialmente em análises de amostras complexas (ex., frutas e vegetais). Tentativas de resolver tais problemas na espectrometria de massas (MS) tem feito pesquisadores desenvolver novos métodos que combinam todas as características da MS com as características de purificação de amostra, extração ou enriquecimento do analito fornecidos por métodos como *solid-phase extraction* (SPE) (ZHANG; MANICKE, 2015), *solid-phase microextraction* (SPME) (GÓMEZ-RÍOS et al., 2016), *single-drop microextraction* (SDME) (SUN et al., 2011), *liquid phase microextraction* (LPME) (THUNIG et al., 2012), *polymer monolith microextraction* (PMME) (WANG et al., 2015) e *slug-flow microextraction* (SFME) (REN et al., 2014). Tais técnicas representam uma tendência para a MS, onde dispositivos de preparo de amostras são diretamente acoplados à instrumentação da MS.

Em alguns desses métodos de preparo de amostras, como SPE e SPME, materiais seletivos podem ser usados como adsorventes, incluindo os *molecularly imprinted polymers* (MIPs) (WACKERLIG; SCHIRHAGL, 2016; CHAVES; QUEIROZ, 2013; LAN et al., 2014). Os MIPs são materiais que

forneem uma superfície quimicamente seletiva (Figura 11). Estes polímeros inteligentes mimetizam enzimas pois possuem sítios de reconhecimento molecular específicos para um analito alvo em detrimento de outros compostos e, portanto, são capazes de acomodar e reter moléculas específicas ou classes de moléculas (MARTÍN-ESTEBAN, 2013).

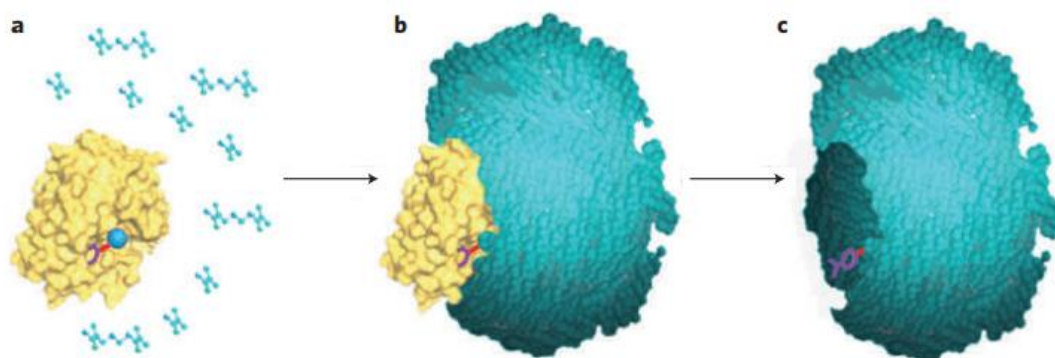


Figura 11: Esquema ilustrativo de uma síntese por MIP: (a) estágio inicial de polimerização ao redor do template (analito ou moléculas da mesma classe); (b) template retido no polímero; (c) remoção do template e formação de uma cavidade seletiva.

FONTE: Sellergren, 2010.

Os MIPs já foram utilizados com o objetivo de aumentar a seletividade de análises com técnicas de espectrometria de massas ambiente (AMS). Figueiredo et al. (2010) relataram o uso do MIP para a extração de cinco fenotiazinas (clorpromazina, perfenazina, triflupromazina, tioridazina e proclorperazina) de amostras de urina e analisaram os compostos por *easy ambient sonic-spray ionization* (EASI). Os autores relataram um aumento na seletividade da análise, com os íons das fenotiazinas mais intensos em relação a um controle, e encontraram limites de quantificação (LOQs) de 1 $\mu\text{mol/L}$. Biesen et al. (2010) utilizaram os MIPs para a extração do herbicida 2,4-D a partir de amostras de água e analisaram o composto por *desorption electrospray ionization* (DESI). Também foi reportado um aumento na seletividade da análise, além de serem obtidos limites de detecção (LODs) abaixo de 5 ppb.

Uma outra estratégia seria acoplar a tecnologia MIP à PSI-MS. Neste trabalho, é apresentada a técnica MIP *membrane spray ionization* (MIP-MSI), um novo método baseado em MIPs e PSI-MS. Os MIPs foram produzidos

diretamente sobre uma membrana de celulose que foi cortada em formato triangular e utilizada como substrato em análises por PSI-MS. Os pesticidas monuron e 2,4,5-triclorofenoxiacético ácido (2,4,5-T) foram utilizados como templates na síntese do MIP para análises dos herbicidas diuron e 2,4-D, respectivamente. Maçãs, bananas e uvas foram utilizadas como matrizes.

3.2 - Metodologia

3.2.1 - Materiais, Padrões Analíticos e Solventes

O metanol grau HPLC foi adquirido da J. T. Baker (Phillipsburg, EUA) e a acetona grau analítico da Scharlab S. L. (Sentmenat, Espanha). Para a síntese do MIP, padrões analíticos do monuron e 2,4,5-T foram utilizados como templates na análise do diuron e 2,4-D, respectivamente, e o ácido metacrílico foi utilizado como monômero funcional, o etileno glicol dimetacrilato como agente de entrecruzamento (todos comprados da Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e a benzofenona como fotoiniciadora (adquirida da Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, Brasil). As membranas de celulose (Figura 12) com poros de 0,45 μm , diâmetro de 47 mm e espessura de 160 μm foram adquiridas da Agilent (Santa Clara, EUA). As frutas (maçãs, bananas e uvas) foram coletadas em um supermercado local (Goiânia, Brasil).

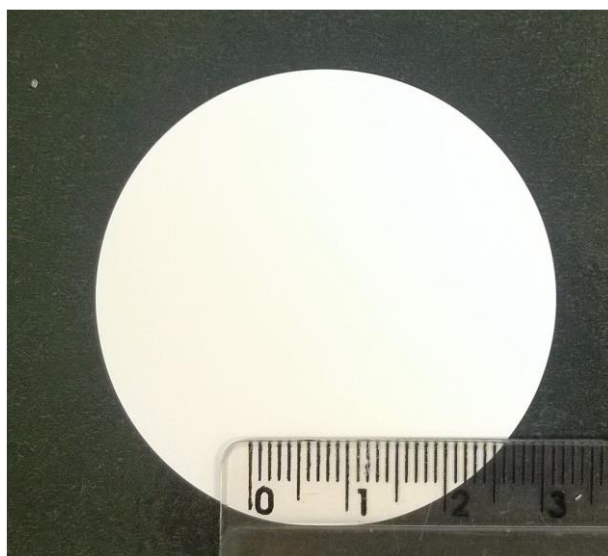


Figura 12: Membrana de celulose utilizada para a síntese do MIP.

3.2.2 - Síntese da Membrana MIP

A síntese da membrana MIP foi baseada em Sergeyeva et al. (2001), com pequenas modificações. A membrana de celulose foi lavada com metanol em um aparelho de Soxhlet por 4 h e secada sob temperatura ambiente. Posteriormente, foi cortada em vários triângulos equiláteros (aproximadamente 1 cm de lado) que foram embebidos em uma solução de 150 mmol/L de benzofenona em acetona por 5 min, e colocados para secar sob temperatura ambiente. As membranas triangulares foram transferidas para placas de Petri contendo uma solução de metanol com 10 mmol/L de monuron ou 2,4,5-T, 50 mmol/L de ácido metacrílico e 150 mmol/L de etileno glicol dimetacrilato. Estas membranas em solução foram expostas à irradiação ultravioleta (UV) por 20 min. Por fim, o template e os resíduos da síntese foram extraídos da membrana com metanol por extração com soxhlet. Um *non-imprinted polymer* (NIP) foi sintetizado de forma semelhante ao MIP, mas sem a adição do template. Os MIPs e NIPs foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.2.3 - Preparo de Amostras

Cada maçã, banana (sem casca) e uva foi homogeneizada e aproximadamente 15 g de cada foram depositadas em um tubo de centrifuga de polipropileno. Foi adicionado metanol (proporção 1:1 p/v) e a extração ocorreu por 3 min sob agitação. Estas misturas foram filtradas a vácuo e os extratos foram utilizados para análise por MS. Uma análise prévia dos extratos foi realizada para garantir que eles não continham os herbicidas diuron e 2,4-D, e então eles foram utilizados como brancos e matrizes nos testes analíticos.

3.2.4 - MIP *Membrane Spray Ionization*

A membrana MIP foi mergulhada em um béquer contendo 2 mL de extrato de fruta com pesticida sob agitação por 5 min para que o MIP extraia o analito. Foi então removida e secada sob temperatura ambiente. Em

seguida, a membrana MIP foi lavada com água deionizada por 1 min com o intuito de remover os componentes do extrato na matriz polimérica. Após secagem sob temperatura ambiente, a membrana foi fixada por um clipe metálico (Figura 13) e posicionada a aproximadamente 4 mm da entrada do espectrômetro de massas. Um volume de 15 μL de metanol ácido (0,1% de ácido fórmico) foi utilizado como solvente de *spray* para análises no modo positivo e metanol básico (0,1% de hidróxido de amônio) para análises no modo negativo. Para avaliar a eficiência qualitativa e seletiva das membranas MIP, a intensidade do íon diuron obtido pela membrana MIP monuron e do íon 2,4-D obtido pela membrana MIP 2,4,5-T foram comparadas com as intensidades destes íons obtidos pelo NIP. Além disso, atrazina e metomil foram utilizados como analitos na extração pela membrana MIP monuron, e o glifosato foi empregado como analito na extração pela membrana MIP 2,4,5-T. As intensidades destes íons também foram comparadas com aquelas obtidas pelo NIP. Os espectros de massas foram obtidos utilizando um espectrômetro de massas *Thermo Scientific Q Exactive hybrid Quadrupole-Orbitrap*. Para as análises quantitativas, foram monitoradas as intensidades dos íons produtos obtidos por MS/MS. Outros parâmetros experimentais utilizados foram os seguintes: voltagem do *spray*: 3,5 kV; temperatura do capilar: 275 °C; S-lens RF level: 50%; resolução: 70000; energia de colisão: 45 eV.

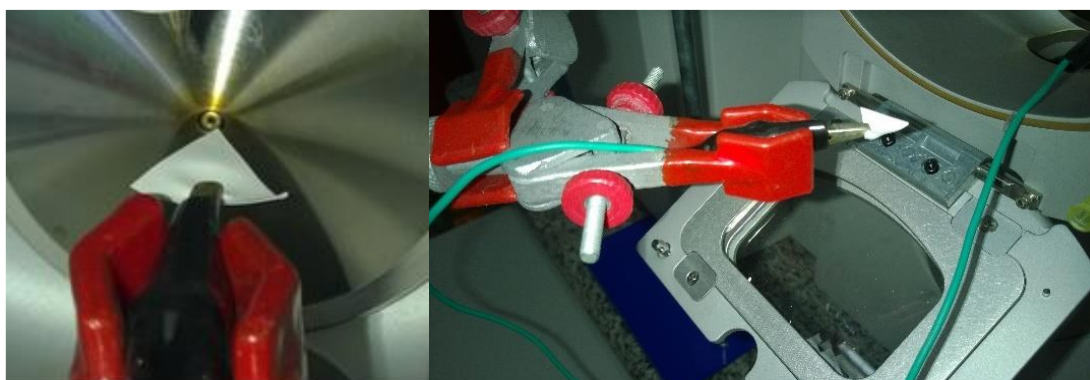


Figura 13: Esquema geral da técnica MIP *membrane spray ionization*.

3.2.5 - Performance Analítica

Para determinar a performance analítica do MIP-MSI-MS, foram avaliadas curvas de calibração, LOD, LOQ, exatidão, precisão, recuperação e análises em amostras reais. Para construir as curvas de calibração, alíquotas de soluções estoques do diuron e 2,4-D foram diluídas nos extratos de fruta, e alíquotas destes extratos foram diluídas na mesma matriz para atingir as concentrações de 10, 100, 300, 500, 700 e 1000 ppb. As curvas foram produzidas a partir das intensidades dos íons do produto da fragmentação do diuron e 2,4-D (MS/MS) e as análises foram realizadas em triplicata. O LOD foi determinado através da equação $S_{\text{blank}} + 3 \times \sigma_{\text{blank}}$, e o LOQ foi calculado por $S_{\text{blank}} + 10 \times \sigma_{\text{blank}}$, onde S_{blank} é a média do sinal do branco, e σ_{blank} é o desvio padrão de 10 replicatas do branco (HOLSTEIN et al., 2015; DAMON et al., 2016). Os testes de exatidão e precisão foram realizados intra-dia (n = 5) e inter-dia (n = 3) utilizando concentrações de 15, 400 e 800 ppb. A exatidão foi obtida pela fórmula $E = [(AC - NC)/NC] \times 100$, onde E é o erro relativo, expresso em unidades percentuais, AC é a concentração analisada e NC é a concentração nominal. A precisão foi calculada pela seguinte equação: $CV = (SD/AC) \times 100$, em que CV é o coeficiente de variação, expresso em unidades percentuais, e SD é o desvio padrão. O teste de recuperação foi realizado fortificando as amostras com as mesmas concentrações da exatidão e precisão, e foi obtida pela equação $[(AC - OC)/NC] \times 100$, onde OC é a concentração original. Por fim, o MIP-MSI-MS foi utilizado para a determinação dos herbicidas diuron e 2,4-D em maçãs, bananas e uvas adquiridas em um supermercado local.

3.3 - Resultados e Discussões

Três etapas distintas caracterizam o mecanismo da polimerização por radical livre: iniciação, propagação e termino. A taxa de decomposição de um iniciador é controlada por variáveis distintas, como calor, luz e meios químicos/eletroquímicos (CORMACK; ELORZA; 2004). No presente trabalho, a benzofenona foi utilizada como um iniciador e foi ativada por radiação UV.

O ácido metacrílico foi empregado como monômero funcional e o etileno glicol dimetacrilato como agente de entrecruzamento para a polimerização. Como template, monuron e 2,4,5-T foram utilizados na síntese dos MIPs para análises do diuron e 2,4-D, respectivamente, pois são moléculas da mesma classe. A não utilização da mesma molécula como template e composto a ser analisado evita resultados falso-positivos causados por remanescentes do template no MIP.

Para verificar se houve uma modificação na membrana após a síntese do MIP, as membranas foram analisadas por MEV. A Figura 14 ilustra a modificação da superfície da membrana de celulose após a polimerização do MIP e NIP. É possível notar que uma rede polimérica cobre a maioria dos poros da membrana de celulose, dando evidências que a polimerização por radical livre ocorreu.

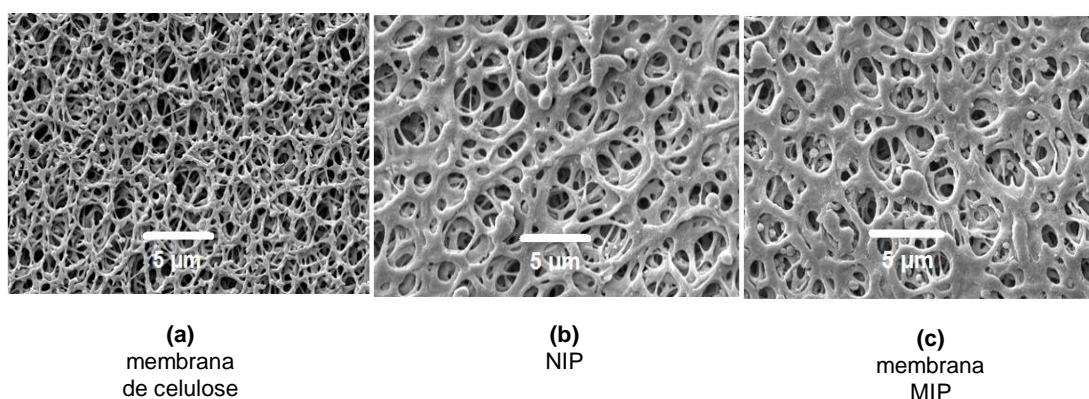


Figura 14: Imagem obtida por MEV ($\times 3000$) de (a) membrana de celulose, (b) NIP e (c) membrana MIP.

O processo de polimerização ilustrado na Figura 14c é o resultado de uma escolha adequada do template e do monômero funcional. Segundo Cormack e Elorza (2004), é necessário coincidir a funcionalidade do template com a funcionalidade do monômero funcional de forma complementar (ex., um doador de ligação de hidrogênio com um receptor de ligação de hidrogênio) para maximizar a processo de formação do MIP.

A seletividade da membrana MIP foi avaliada comparando as intensidades dos íons dos pesticidas obtidas pelo MIP e NIP. A Figura 15 demonstra um gráfico de barras das intensidades dos íons obtidas dos

espectros de massas no modo positivo da atrazina, metomil e diuron em extrato de uva (1000 ppb) utilizando a membrana MIP monuron e o NIP. Verificando a atrazina, é possível notar que não houve diferenças significativas entre as intensidades dos sinais obtidos por MIP e NIP. O mesmo também ocorre para o metomil. No entanto, ao verificar o diuron, nota-se que a intensidade do íon pela membrana MIP foi aproximadamente três vezes maior do que a obtida pelo NIP. Isso demonstra que a membrana MIP monuron tem alta seletividade e sítios específicos apenas para o diuron, e não para a atrazina e metomil. Este resultado era esperado devido à semelhança entre as moléculas do monuron e diuron.

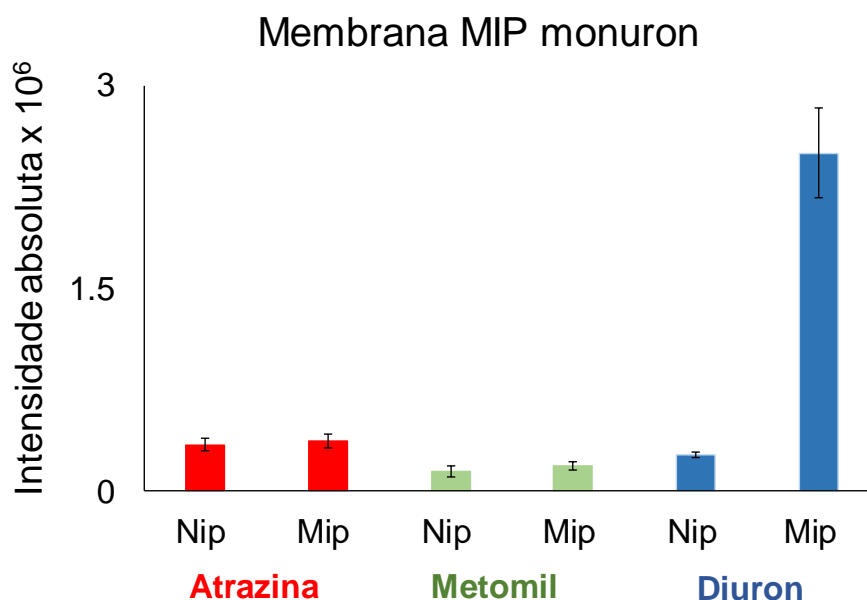


Figura 15: Gráfico de barras de intensidades de íons obtidas a partir de espectros de massas no modo positivo da atrazina, metomil e diuron em extrato de uva (1000 ppb) utilizando a membrana MIP monuron e NIP. As barras de erros mostram o desvio padrão das análises em triplicata.

Nas análises utilizando a membrana MIP 2,4,5-T (Figura 16), os espectros de massas foram obtidos no modo negativo com os pesticidas glifosato e 2,4-D em extrato de uva (1000 ppb). Com o glifosato não houve diferenças significativas entre as intensidades obtidas pelo NIP e MIP. Já com o 2,4-D a intensidade do sinal obtida pela membrana MIP foi muito maior em relação ao NIP. Assim como ocorreu na membrana MIP monuron, este resultado demonstra que a membrana MIP 2,4,5-T tem alta seletividade e

locais específicos para o 2,4-D, e não para o glifosato, devido à semelhança entre as moléculas 2,4,5-T e 2,4-D.

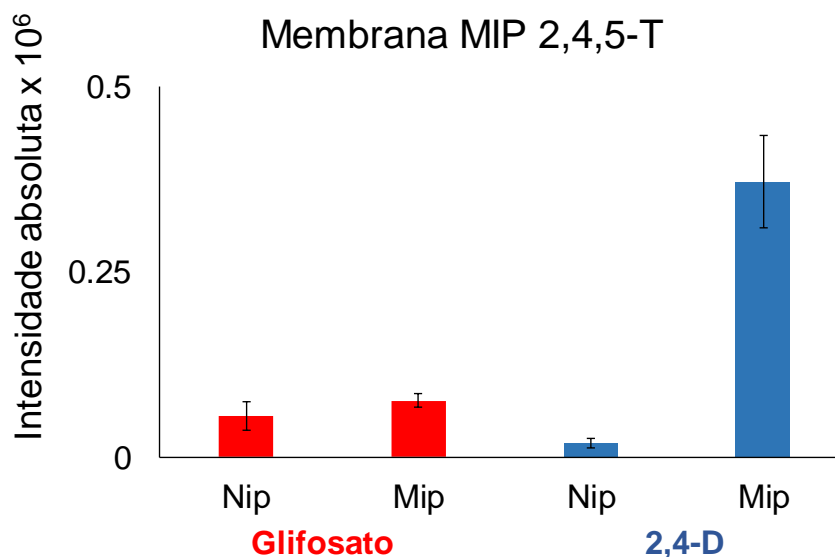


Figura 16: Gráfico de barras de intensidades de íons obtidas a partir de espectros de massas no modo negativo do glifosato e 2,4-D em extrato de uva (1000 ppb) utilizando a membrana MIP 2,4,5-T e NIP. As barras de erros mostram o desvio padrão das análises em triplicata.

A Figura 17 ilustra o espectro de MS/MS do diuron e 2,4-D em uma concentração de 1000 ppb em extrato de uva utilizando MIP-MSI-MS/MS no modo positivo e negativo, respectivamente. Como discutido no Capítulo II, a fragmentação do diuron produz um íon intenso com m/z 72 devido à perda da dicloroanilina. Já o espectro de MS/MS do 2,4-D apresenta um fragmento com m/z 161 oriundo da perda da oxiran-2-one (LIU et al., 2014). Desse modo, para avaliar a performance analítica da técnica MIP-MSI, as transições de m/z 233 para m/z 72 e m/z 219 para m/z 161 foram monitoradas em função da concentração do diuron e 2,4-D nos extratos das frutas, respectivamente.

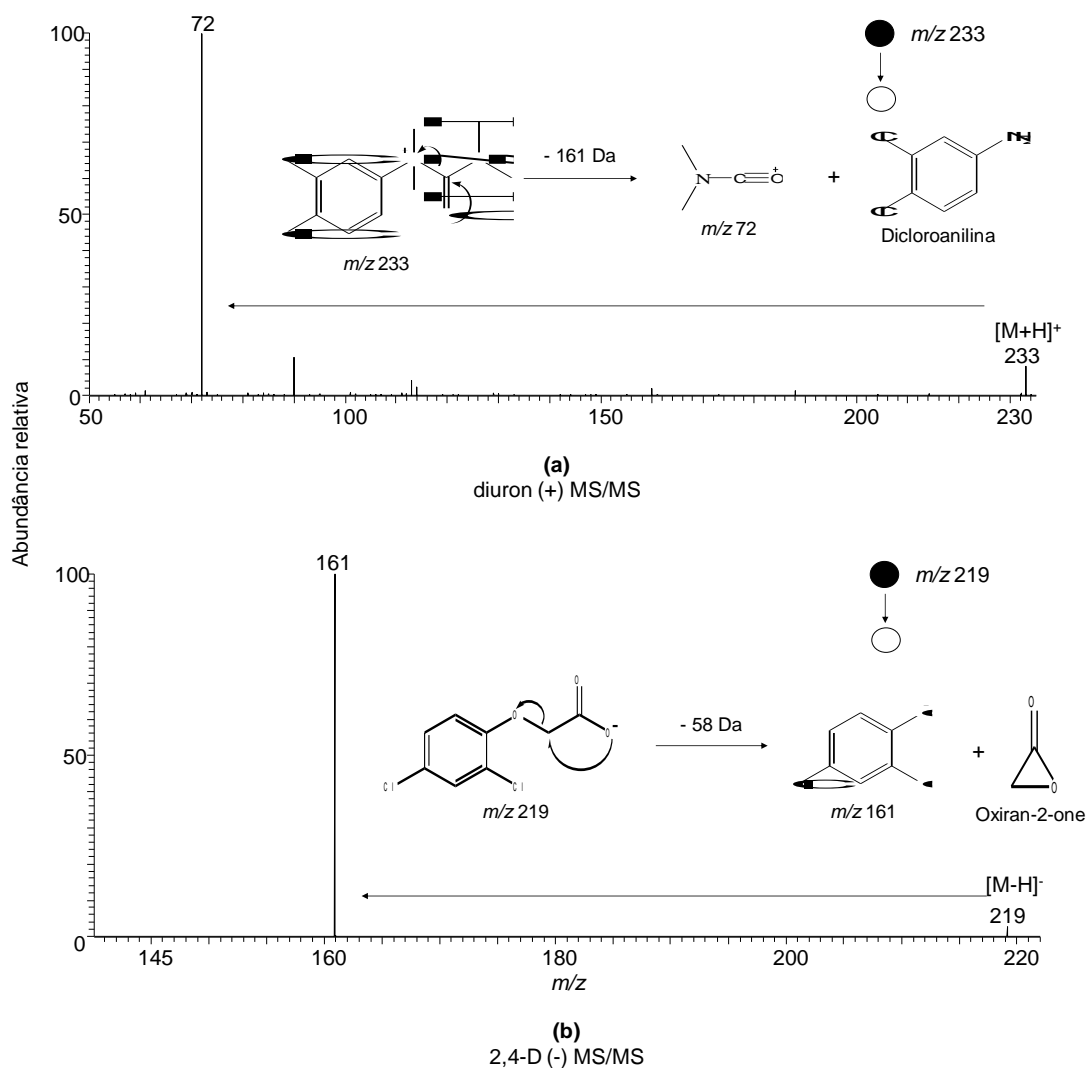


Figura 17: Espectros de MS/MS obtidos com (a) diuron utilizando MIP-MSI(+) e (b) com 2,4-D utilizando MIP-MSI(-) em extrato de uva (1000 ppb).

As curvas de calibração foram construídas utilizando concentrações de 10 a 1000 ppb em extratos de maçã, banana e uva (Figura 18). Linearidades adequadas foram encontradas com $R^2 > 0,99$ para os dois pesticidas em todos os extratos de frutas. No entanto, não foi utilizado um padrão interno para a construção das curvas analíticas. Geralmente, um padrão interno em análises quantitativas por MS é um composto deuterado que pode possuir um preço elevado ou estar indisponível. O esforço para encontrar resultados analíticos satisfatórios sem a necessidade de utilizar um padrão interno vem sendo demonstrado em alguns trabalhos utilizando MIPs e espectrometria de massas ambiente (FIGUEIREDO et al., 2010; BIESEN et al., 2010; WILEY et

al., 2010; MALAJ et al., 2012; BEACH; WALSH; MCCARRON, 2014; ZHANG et al., 2015; ZHOU et al., 2016). O presente trabalho pode contribuir com as tentativas de evitar o uso de padrões internos em determinadas análises.

Na Figura 18 também são demonstrados os valores de LOD e LOQ obtidos por MIP-MSI-MS. Os menores valores de LOD e LOQ foram obtidos pelo diuron em extrato de uva, 0,17 e 0,41 ppb, respectivamente, e os maiores foram obtidos pelo 2,4-D em extrato de maçã, 0,60 e 2,00 ppb, respectivamente. Todos os LODs e LOQs estão abaixo do limite máximo de resíduos (100 ppb) estabelecidos pela Anvisa para o diuron em bananas e uvas.

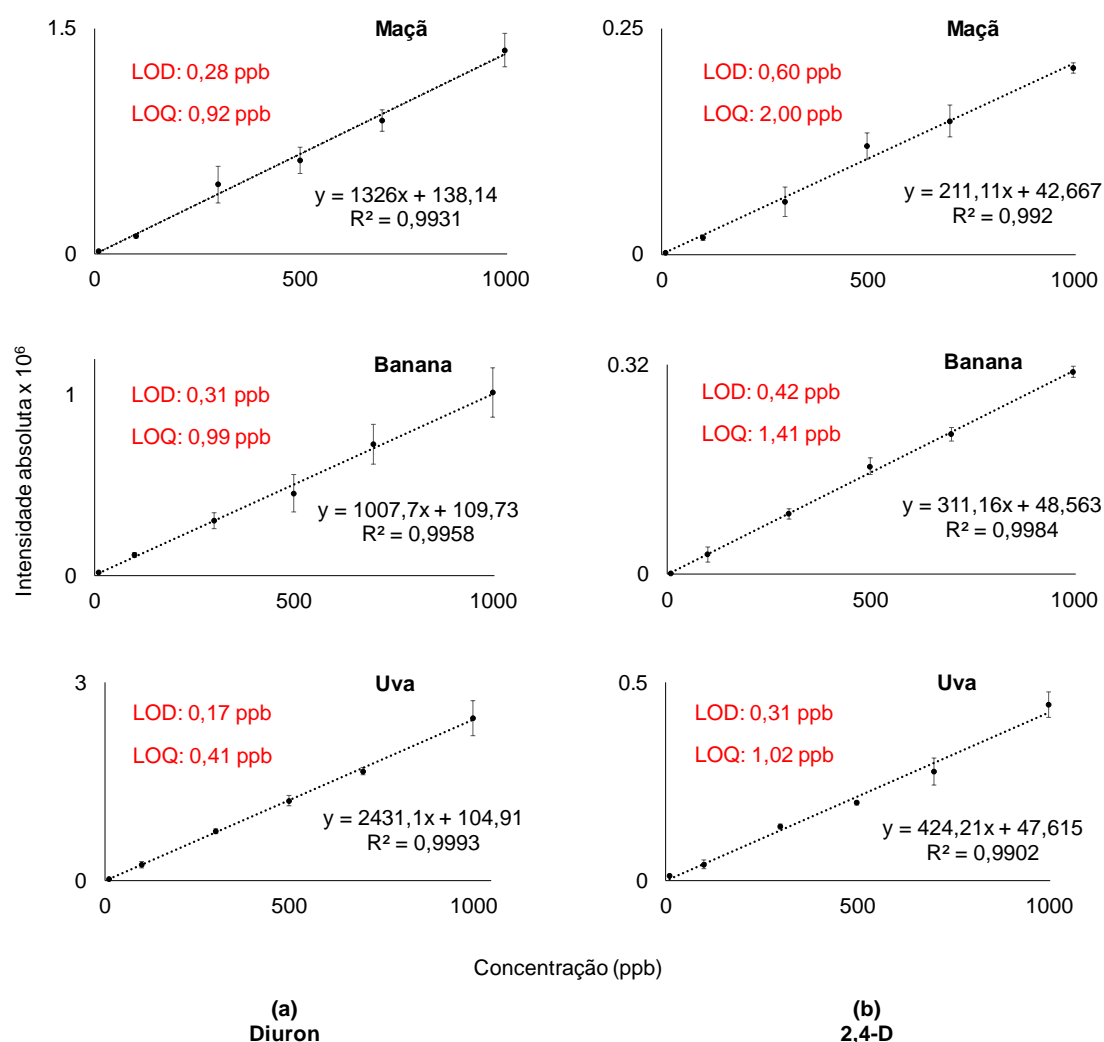


Figura 18: LODs, LOQs e curvas de calibração (10-1000 ppb) utilizando MIP-MSI-MS com: (a) diuron em extratos de maçã, banana e uva; (b) 2,4-D em extratos de maçã, banana e uva. As barras de erros mostram o desvio padrão das análises em triplicata.

Os valores de exatidão e precisão (intra-dia e inter-dia) obtidos por MIP-MSI-MS são mostrados na Tabela 5. Nas análises intra-dias do diuron, o menor valor de precisão (coeficiente de variação) foi de 2,8% no extrato de maçã em 400 ppb, e o menor valor de exatidão (erro relativo) foi de -1,0% no extrato de uva em 800 ppb. Nas análises inter-dias, o extrato de banana em 800 ppb obteve o menor valor de precisão, 2,6%, e o extrato de uva em 400 ppb obteve o menor valor de exatidão, -1,5%. Já nas análises intra-dias do 2,4-D, o menor valor de precisão foi de 6,7% no extrato de banana (800 ppb) e de exatidão foi de -0,8% no extrato de maçã (800 ppb). Nas análises inter-dias, o extrato de maçã (400 ppb) apresentou o menor valor de precisão, 2,5%, e o extrato de uva (15 ppb) demonstrou o menor valor de exatidão, 0,3%. Desse modo, os testes de precisão e exatidão apresentaram coeficientes de variação e erros relativos inferiores a 20%, em concordância com o estabelecido no Manual de Garantia da Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015). Estes resultados foram similares aos relatados por Figueiredo et al. (2010) (precisão e exatidão abaixo de 20%) utilizando MIP e espectrometria de massas ambiente (MIP-EASI-MS) para análise de fenotiazinas em amostras de urina.

Tabela 5: Valores de precisão e exatidão obtidos através da análise de diuron e 2,4-D em extrato de frutas por MIP-MSI-MS.

		Maçã			Banana			Uva			
Diuron		NC ^a (ppb)	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0
	Intra-dia	AC ^b (ppb)	16,0	394,6	790,9	17,5	411,2	771,5	16,9	389,3	791,7
	(n = 5)	Precisão (CV ^c %)	5,1	2,8	7,6	11,1	12,7	13,3	11,4	9,3	8,4
		Exatidão (E ^d %)	6,8	-1,3	-1,1	16,9	2,8	-3,6	12,9	-2,7	-1,0
		NC ^a (ppb)	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0
	Inter-dia	AC ^b (ppb)	16,3	375,0	730,6	17,3	421,9	780,6	16,4	394,0	772,8
	(n = 3)	Precisão (CV ^c %)	3,9	5,4	10,1	14,1	8,4	2,6	12,9	7,0	11,0
		Exatidão (E ^d %)	8,5	-6,2	-8,7	15,3	5,5	-2,4	9,2	-1,5	-3,4
2,4-D		NC ^a (ppb)	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0
	Intra-dia	AC ^b (ppb)	14,4	382,7	793,6	14,2	435,1	739,9	14,2	380,9	810,7
	(n = 5)	Precisão (CV ^c %)	15,1	14,9	11,7	11,8	11,4	6,7	10,9	15,4	15,7
		Exatidão (E ^d %)	-4,2	-4,3	-0,8	-5,6	8,8	-7,5	-5,1	-4,8	1,3
		NC ^a (ppb)	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0
	Inter-dia	AC ^b (ppb)	15,7	337,2	736,4	14,0	432,7	862,7	15,0	375,7	762,0
	(n = 3)	Precisão (CV ^c %)	9,2	2,5	6,9	10,3	3,1	6,0	9,6	5,2	4,3
		Exatidão (E ^d %)	4,6	-15,7	-8,0	-6,5	8,2	7,8	0,3	-6,1	-4,7

^aConcentração nominal. ^bConcentração analisada. ^cCoefficiente de variação. ^dErro relativo.

Os resultados do teste de recuperação variaram entre 96,4% e 116,9% para o diuron, e entre 92,5% e 108,8% para o 2,4-D, como demonstra a Tabela 6. Estes resultados foram similares aos reportados por Figueiredo et al. (2010) (96-106%). Os valores de recuperação obtidos por MIP-MSI-MS também apresentaram resultados semelhantes aos obtidos com MIP-SPE-GC-MS (recuperação entre 82,1 a 105,2%) para análise de pesticidas organofosforados em maçãs, peras e laranjas (WANG et al., 2013). Além disso, a recuperação obtida pelo método proposto neste trabalho demonstrou valores mais próximos de 100% do que o método MIP-SPE-HPLC-MS descrito por González-Sálamo et al. (2015).

Por fim, a técnica MIP-MSI-MS foi utilizada para detectar teores de diuron e 2,4-D em amostras reais. Dez unidades de cada fruta (maçã, banana e uva) foram coletadas em um supermercado local. Foram detectados teores de diuron em três bananas (4,0, 6,5 e 9,9 ppb). O limite máximo de resíduos permitido para o diuron em bananas é de 100 ppb, de acordo com a Anvisa. Não foram detectados diuron e 2,4-D nas outras frutas.

Apesar dos resultados satisfatórios, o método MIP-MSI-MS pode ser otimizado. O tempo de extração do MIP empregado aqui foi de 5 min e foi suficiente para garantir resultados qualitativos e quantitativos adequados. No entanto, outros tempos de extração podem ser estudados para verificar uma melhor resposta de análise. O solvente de lavagem também pode ser verificado. Este solvente desempenha um papel importante nas análises de MIP pois remove os componentes da amostra da matriz polimérica e reduz a interação não específica nos sítios de ligação, enquanto o analito permanece retido nos sítios de ligação (SANAGI et al., 2013). Neste trabalho foi utilizado água como solvente de lavagem, mas misturas de solventes (ex., água, metanol, acetonitrila) em diferentes proporções podem ser testadas.

Tabela 6: Valores de recuperação obtidos pela análise de diuron e 2,4-D em extrato de frutas por MIP-MSI-MS.

		Maçã			Banana			Uva		
Diuron	NC ^a (ppb)	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0
	AC ^b (ppb)	16,0	394,0	790,9	17,5	411,2	771,5	16,9	389,3	791,7
	Recuperação (%)	106,8	98,7	98,9	116,9	102,8	96,4	112,9	97,3	99,0
2,4-D	NC ^a (ppb)	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0	15,0	400,0	800,0
	AC ^b (ppb)	14,4	382,7	793,6	14,2	435,1	739,9	14,2	380,9	810,7
	Recuperação (%)	95,8	95,7	99,2	94,4	108,8	92,5	94,9	95,2	101,3

^aConcentração nominal. ^bConcentração analisada.

3.4 - Conclusão

Este trabalho demonstrou a combinação de MIP e PSI-MS para obter um novo método, o MIP-MSI-MS. Ambas as técnicas podem ser acopladas para fornecer uma superfície quimicamente seletiva a uma membrana de celulose que pode ser utilizada como suporte para analitos em análises por PSI-MS. Além disso, o MIP-MSI-MS é um método relativamente rápido de ser preparado, pois a membrana MIP é produzida em menos de 24 h e a análise por PSI-MS pode ser realizada em segundos. O MIP-MSI-MS apresentou curvas de calibração lineares ($R^2 > 0,99$) e LODs e LOQs em baixas concentrações (abaixo de 2 ppb). Também apresentou valores de precisão e exatidão abaixo de 20% e resultados satisfatórios de recuperação, de acordo com o MAPA. Por fim, o método MIP-MSI-MS foi utilizado para detectar teores de diuron e 2,4-D em amostras reais e possibilitou a detecção de diuron em bananas. Este método pode ser otimizado e ser estudado para possível aplicação em outros analitos e matrizes.

Capítulo IV:
**Análise da penetração de fungicida
em maçãs por MALDI *imaging* e
*infrared laser ablation sample transfer***

4.1 - Introdução

Os fungicidas agrícolas são compostos utilizados para inibir a ação de fungos em plantas (MATTHEWS, 2016). Um importante fungicida utilizado na agricultura brasileira é o imazalil, um composto do grupo dos imidazóis (CHEN et al., 2018). Este composto é amplamente empregado na prevenção da degradação de frutas através do controle do crescimento e da esporulação das cepas fúngicas (D'AQUINO et al., 2006). Seu modo de ação consiste na inibição da biossíntese do ergosterol, um componente essencial da membrana das células dos fungos (THIND, 2012). O imazalil é eficiente no controle de fungos do gênero *Penicillium*, como o *P. digitatum*, *P. italicum* e *P. expansum* (ERASMUS et al., 2015; JEONG et al., 2015), e tem sido amplamente utilizado em culturas de banana, laranja, maçã, mamão, manga, melão e melancia (ANVISA, 2016; MAPA, 2018). De acordo com a Anvisa (2018b), este fungicida faz parte da classe III (moderadamente tóxico) dentro da classificação toxicológica. Alguns estudos têm associado o imazalil como um possível indutor de tumor no fígado (TAMURA et al., 2016), além de causar desequilíbrio da microbiota intestinal e desordem no metabolismo hepático (JIN et al., 2017).

Geralmente, o imazalil é aplicado em frutas após a colheita por imersão, aspersão ou *spray* utilizando concentrações entre 1000 e 2000 ppm (CABRAS et al., 1999; ALTIERI et al., 2013; KELLERMAN et al., 2016). Como a aplicação ocorre diretamente na casca, há uma preocupação de que o fungicida possa penetrar a casca da fruta e se difundir para o interior. A tendência de difusão pode ser explicada pela alta polaridade do imazalil e pela alta polaridade do interior da fruta devido ao teor de água (KRUIVE et al., 2007).

Tradicionalmente, as análises de pesticidas em alimentos têm sido realizadas por meio de técnicas analíticas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (SHARMA et al., 2010; GRIMALT; DEHOUCK, 2016; UCLÉS et al., 2017) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) (STACHNIUK; FORMAL, 2016; MASIÁ et al., 2016). Ambas as técnicas demonstram elevados

desempenhos analíticos, mas fornecem informações limitadas sobre a distribuição dos pesticidas na amostra.

A *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI) *imaging* é uma técnica que permite a visualização da localização de moléculas em tecidos biológicos (ELLIS; BRUINEN; HEEREN, 2013; GESSEL; NORRIS; CAPRIOLI, 2014; SPENGLER, 2015; LAGARRIGUE; CAPRIOLI; PINEAU, 2016). Esta técnica opera através da criação de imagens químicas que são geradas plotando as intensidades dos íons do analito de interesse em um espaço 2D ou 3D correspondente à área da amostra que foi irradiada por um laser (KADAM; MISRA; ZAIMA, 2016). A maioria das aplicações da MALDI *imaging* tem sido em análises de tecido animal. No entanto, vários trabalhos têm demonstrado aplicações desta técnica em tecido vegetal e na verificação da localização espacial de pesticidas em alimentos (BOUGHTON et al., 2015; STURTEVANT; LEE; CHAPMAN, 2016; KADAM; MISRA; ZAIMA, 2016).

Se o objetivo não for apenas visualizar mas também quantificar o pesticida em partes específicas do alimento, seria necessário a utilização de uma técnica analítica complementar. A MALDI-MS não é uma técnica adequada para análises quantitativas devido à baixa reprodutibilidade ocasionada pela morfologia não homogênea das amostras causadas pela cristalização da matriz (PORTA et al., 2015; WANG et al., 2016). Já a *infrared laser ablation sample transfer* (IR-LAST) com análise offline por *electrospray ionization* (ESI) emerge como uma técnica adequada para a quantificação de compostos em tecidos biológicos, como já demonstrado no Capítulo I.

Neste trabalho, MALDI *imaging* e IR-LAST são combinadas para analisar a penetração do fungicida imazalil em maçãs. O objetivo é investigar a difusão do fungicida a partir da casca até à região interna da fruta utilizando MALDI *imaging* para obter informação da localização espacial e IR-LAST com ESI-MS para quantificação.

4.2 - Metodologia

4.2.1 - Materiais, Padrões Analíticos e Solventes

A acetonitrila (ACN) grau HPLC, o ácido fórmico e o ácido trifluoroacético (TFA) foram adquiridos da Thermo-Fisher Scientific (Waltham, EUA) e o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As lâminas de microscopia de vidro simples foram adquiridas da Thermo-Fisher Scientific, e as lâminas de microscopia com óxido de índio e estanho (ITO) da Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha). O imazalil foi adquirido da MedChem Express (Monmouth Junction, EUA), e as maçãs orgânicas foram coletadas em um supermercado local (Baton Rouge, EUA).

4.2.2 - Preparo de Amostras

Para os experimentos com MALDI *imaging*, 12 maçãs foram submersas por 2 min em um galão de vidro de 4 L contendo 2 L de uma solução aquosa de 1000 ppm de imazalil. Um grupo de 4 maçãs não foi tratado com imazalil para ser utilizado como controle no experimento. As maçãs foram armazenadas sob temperatura ambiente por 0, 1, 4 e 7 dias. A cada dia, 4 maçãs (3 contendo imazalil e 1 controle) foram removidas e fatias de 0,2 mm de espessura (uma fatia para cada maçã) foram adquiridas utilizando um *vibratome* (Vibratome 1500, Ted Pella, Redding, EUA) e depositadas em lâminas de vidro ITO. As fatias de maçã foram submetidas à secagem a vácuo por 15 min. Para os experimentos com IR-LAST, foi empregada a mesma abordagem descrita acima, porém, utilizando lâminas de microscopia de vidro simples e sem secagem a vácuo antes da amostragem.

4.2.3 - MALDI *Imaging*

Uma solução de 10 mg/mL de CHCA em 1:1 H₂O/ACN contendo 0,1% de TFA foi utilizada como solução de matriz que foi aplicada nas lâminas através de um *spray* utilizando um nebulizador pneumático (fluxo de 100

$\mu\text{L}/\text{min}$ e pressão de gás nitrogênio de 10 PSI). O *spray* contendo a matriz foi aplicado a uma distância de 8 cm da fatia de maçã e foram utilizados 14 ciclos de *spray* com 20 segundos cada. A matriz foi deixada secar durante 1 min entre cada ciclo. Os espectros de massas obtidos por MALDI foram adquiridos utilizando um espectrômetro de massas *tandem time-of-flight* (UltrafleXtreme, Bruker, Bremen, Alemanha). O instrumento é equipado com um laser Nd:YAG com comprimento de onda de 355 nm operando a uma taxa de repetição de 1 kHz. A superfície da amostra foi irradiada com 1000 disparos de laser e um *step size* de 200 μm no modo linear positivo. Após a aquisição dos dados, as imagens foram obtidas utilizando o software *FlexImaging* (Bruker). A intensidade do íon protonado do imazalil (m/z 297) foi utilizada para criar as imagens.

4.2.4 - IR-LAST

O sistema IR-LAST por laser de infravermelho (IV) médio já foi descrito anteriormente (PARK; MURRAY, 2011; DONNARUMMA; CAO; MURRAY, 2016). A Figura 19 ilustra um esquema geral da IR-LAST. A lâmina de microscopia contendo a fatia de maçã foi montada em um estágio de translação de dois eixos (LTA-HS, Newport, Irvine, EUA) operados com atuadores de 50 mm (LTA-HS, Newport) e um controlador de movimento (ESP3000, Newport). O lado inverso da lâmina contendo a amostra foi irradiado no modo de transmissão utilizando um oscilador paramétrico ótico pulsado ressonante no IV e ajustável por comprimento de onda (IR Opolette, OPOTEK, Carlsbad, EUA). A largura do pulso do laser foi de 5 ns, a taxa de repetição foi de 20 Hz e o comprimento de onda foi de 2,94 μm . O feixe foi direcionado à amostra em um ângulo de 45° e foi focalizado com uma lente de distância focal de 50 mm para obter um tamanho de *spot* de 200 \times 250 μm . A energia do laser foi ajustada para 2,2 mJ, o que corresponde a uma fluência de 44 kJ/m^2 . Áreas de 1 mm^2 da fatia de maçã foram irradiadas pelo laser a partir da casca até à região interna. Um tubo de microcentrífuga com 200 μL de ACN foi colocado aproximadamente 5 mm abaixo da lâmina de microscopia para capturar a amostra irradiada. Após a centrifugação, o

sobrenadante foi coletado, secado sob vácuo e ressuspensão em 30 μL de ACN com 0,1% de ácido fórmico. As amostras para a construção das curvas de calibração foram submetidas ao mesmo processo descrito acima, porém, utilizando fatias de maçãs que não continham imazalil e ressuspensão do material capturado em 30 μL de solução de imazalil em ACN com 0,1% de ácido fórmico, resultando nas concentrações de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 e 3 ppm. As soluções resultantes foram analisadas por ESI-MS.

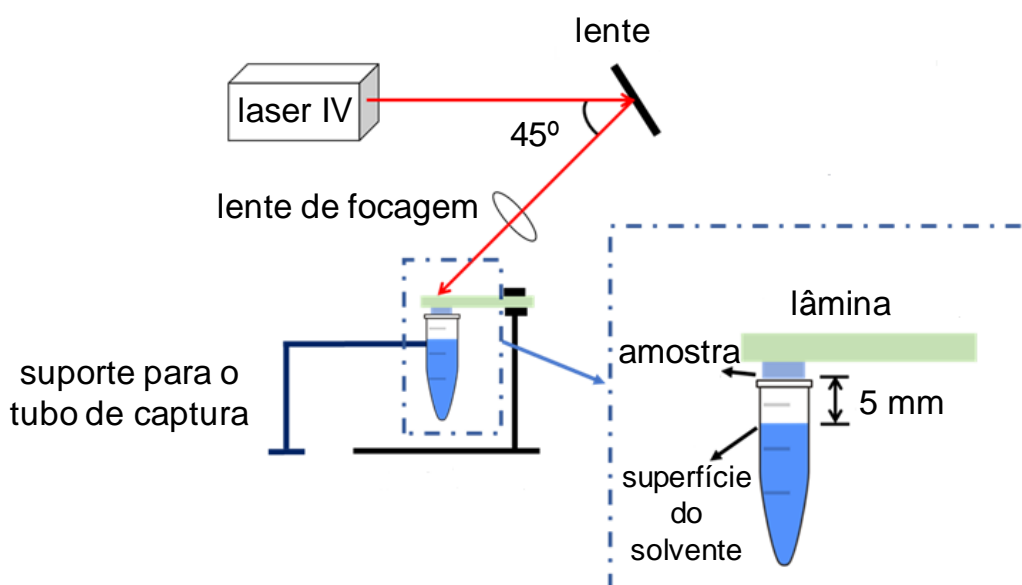


Figura 19: Esquema geral da técnica IR-LAST.
FONTE: adaptado de Wang et al. (2018).

A eficiência de transferência da IR-LAST foi determinada adicionando três concentrações conhecidas de imazalil (0,005, 0,1 e 1 ppm) em áreas de 1 mm^2 das fatias de maçã. O processo de aplicação do laser, captura e preparo das soluções para análise por ESI-MS foi realizado como descrito anteriormente. A intensidade do íon protonado do imazalil oriundo das soluções resultantes foi comparada com a intensidade do íon de um grupo controle de soluções de imazalil que foi preparado utilizando as mesmas concentrações descritas acima, mas que não foram submetidas à IR-LAST, tornando-se uma concentração nominal igual à eficiência de transferência teórica de 100%. A eficiência de transferência foi definida como a razão entre o material recuperado e o controle.

4.2.5 - ESI-MS

Os espectros de massas foram adquiridos utilizando um espectrômetro de massas *time-of-flight* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). A intensidade absoluta do íon protonado do imazalil (m/z 297,0571 [M+H]⁺) foi utilizada em todas as análises. Foram utilizados os seguintes parâmetros instrumentais: voltagem do capilar: 4 kV; temperatura do *drying gas*: 325 °C; temperatura do *sheath gas*: 375°; fluxo do *drying gas*: 10 L/min; fluxo do *sheath gas*: 11 L/min; volume de injeção: 1 µL. Os dados foram processados utilizando o software *Agilent MassHunter Qualitative Analysis* B.07.00.

4.3 - Resultados e Discussões

Um teste inicial foi realizado para determinar se o íon protonado do imazalil pode ser utilizado nas análises por MALDI *imaging*. A Figura 20 demonstra um espectro massas obtido por MALDI após a adição de 1 µL de uma solução de 1000 ppm de imazalil (em ACN) e 1,4 µL de uma solução de 10 mg/mL de CHCA (em 1:1 H₂O/ACN com 0,1% de ácido fórmico) em uma fatia de maçã (0,2 mm de espessura). O pico da base no espectro de massas é o m/z 297 que corresponde à massa nominal da molécula protonada. O padrão isotópico verificado em m/z 299 e m/z 301 é consistente com a presença de dois átomos de cloro. Os íons associados à matriz CHCA estão indicados e são os íons dominantes restantes no espectro de massas e não interferem com o íon do imazalil protonado. O limite de detecção (LOD) da técnica foi verificado através adição de uma solução de imazalil com CHCA numa fatia de maçã da maneira descrita acima. Baseado em um valor de três vezes o nível do ruído do branco, o LOD foi identificado como sendo 0,05 ppm.

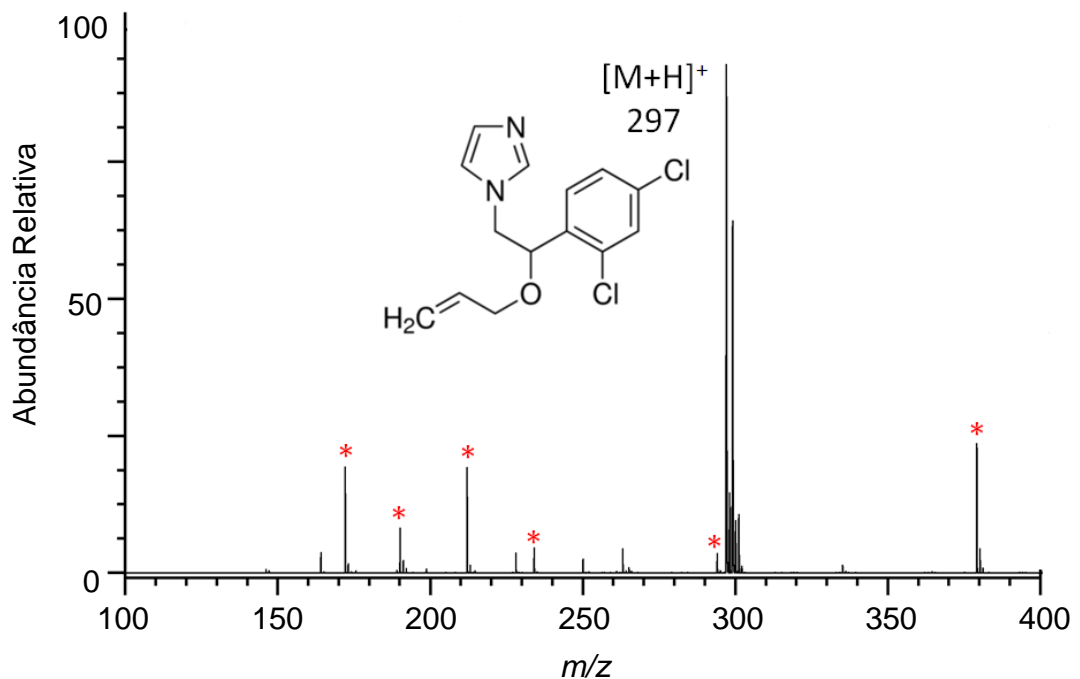


Figura 20: Espectro de massas obtido por MALDI-MS após a aplicação de 1 μ L de uma solução de 1000 ppm de imazalil (m/z 297 $[M+H]^+$) em uma fatia de maçã. Os íons oriundos da matriz CHCA estão marcados por asteriscos vermelhos.

Na Figura 21 são demonstrados os resultados obtidos por MALDI *imaging* através da análise do imazalil em fatias de maçãs em dias diferentes. A Figura 20a ilustra as imagens óticas, a Figura 20b demonstra as imagens obtidas por MALDI *imaging*, e a Figura 20c ilustra as imagens óticas e *imaging* mescladas. A imagem da Figura 20b foi obtida plotando a intensidade absoluta do íon m/z 297. Na maçã do grupo controle não foi detectado o íon do imazalil. No dia 0 (30 min após a aplicação do imazalil), o fungicida foi detectado na casca e não foi detectado na região interna. O mesmo ocorreu no dia 1. Porém, no dia 4 uma pequena quantidade de imazalil migrou aproximadamente 1 mm em direção à região interna, embora a maior quantidade tenha permanecido na casca. No dia 7, o composto migrou aproximadamente 3 mm para o interior da maçã.

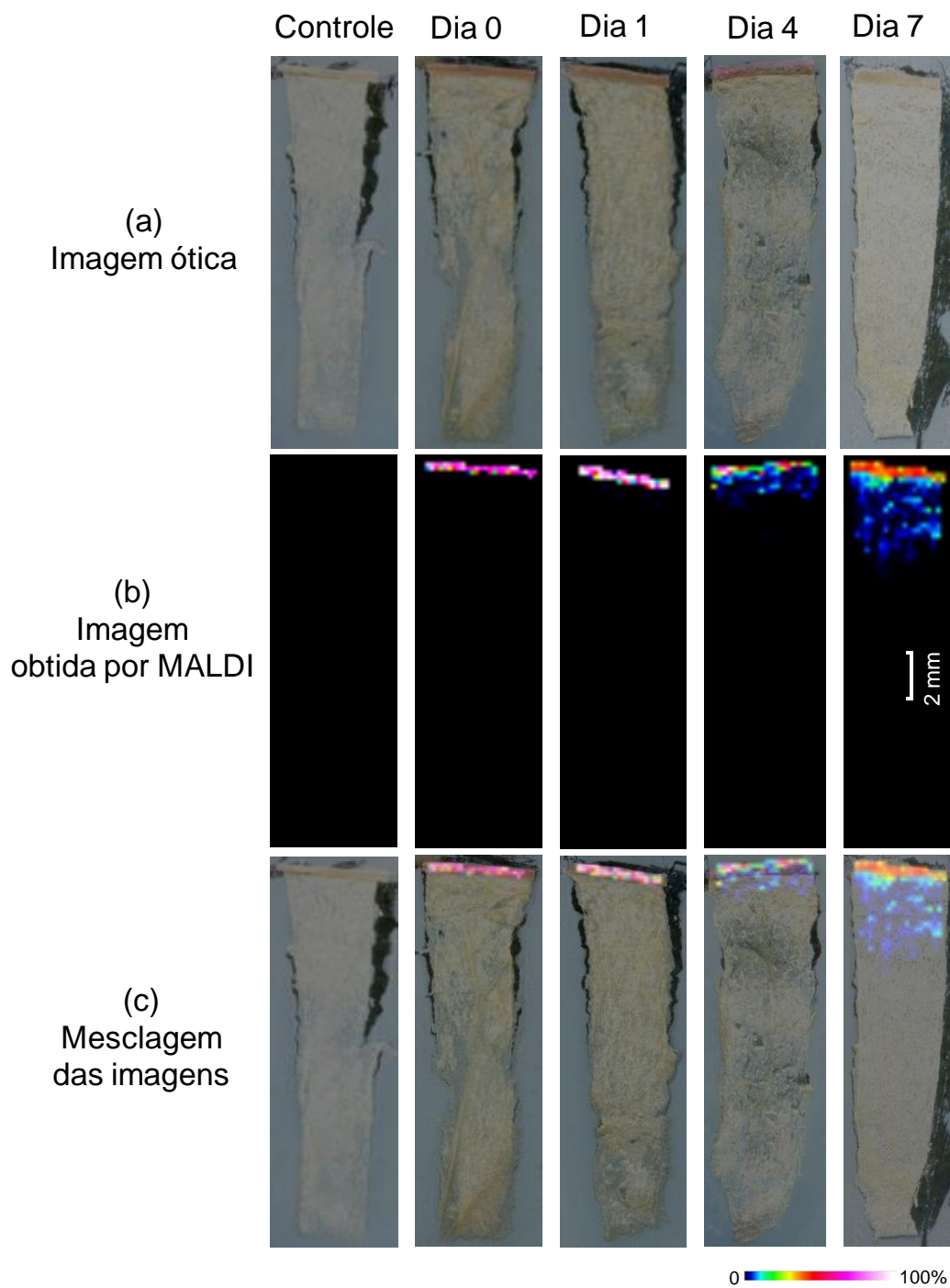


Figura 21: Análise da penetração do imazalil (m/z 297 $[M+H]^+$) em maçãs por MALDI *imaging* nos dias 0, 1, 4 e 7: (a) imagem ótica das fatias de maçã; (b) imagens obtidas por MALDI *imaging*; (c) mesclagem das imagens.

A IR-LAST com análise offline por ESI-MS foi utilizada para verificar a concentração de imazalil dentro da maçã. Áreas de 0,2 mm x 1 mm da casca e áreas de 1 mm x 1 mm da região interna foram submetidas ao laser IV e capturadas. O laser foi aplicado na maçã em um padrão diagonal, como

demonstra a Figura 22, com o objetivo de evitar a contaminação cruzada das regiões adjacentes. Experimentos adicionais demonstraram que a concentração de imazalil é constante nas regiões horizontais.

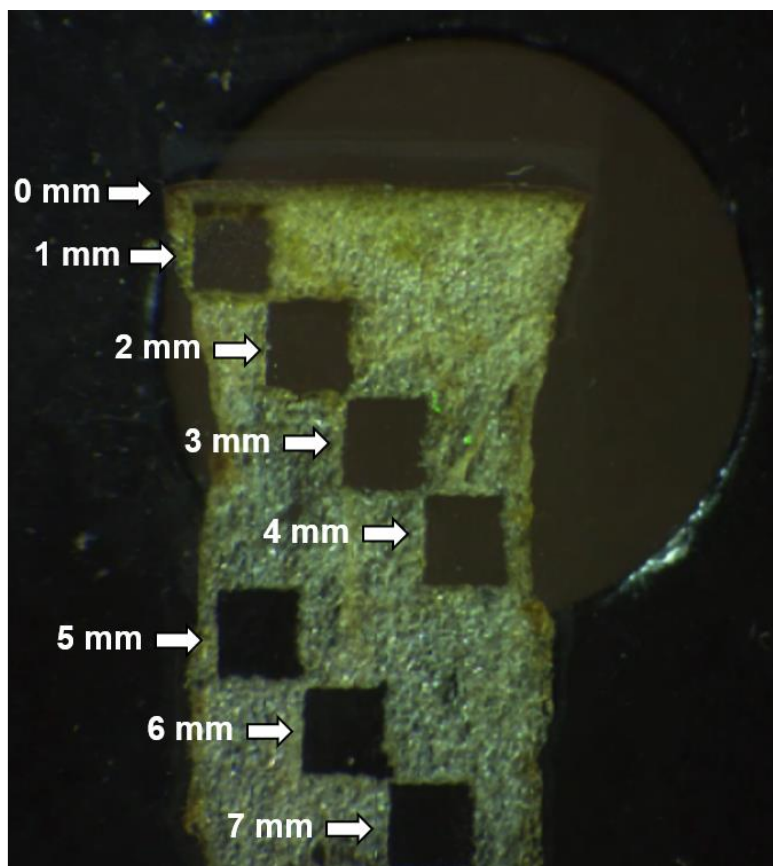


Figura 22: Regiões da maçã (1 mm de altura; 1 mm de largura; 0,2 mm de espessura) irradiadas por laser a partir da casca (0 mm) até à região interna (7 mm).

Antes da análise quantitativa, avaliou-se a eficiência de transferência da IR-LAST para o imazalil em maçãs (Tabela 7). Três soluções de diferentes concentrações de imazalil (em triplicata) foram depositadas em áreas de 1 mm² de três maçãs diferentes. Cada área de maçã foi submetida ao laser, capturada e analisada por ESI-MS. A eficiência de transferência foi determinada a partir da razão entre a intensidade do íon imazalil obtido do material capturado e um controle. Os resultados obtidos foram próximos de 60% e é similar a outros resultados reportados utilizando o mesmo sistema IR-LAST (WANG et al., 2017; WANG et al., 2018).

Tabela 7: Eficiência de transferência da técnica IR-LAST na análise de imazalil em maçãs.

Concentração (ppm)	Eficiência de transferência (%)
0,005	62 ± 2
0,1	61 ± 3
1	62 ± 3

As concentrações de imazalil da casca até a região interna da maçã são mostradas na Tabela 8. O limite de quantificação (LOQ) obtido pela análise de ESI-MS foi de 0,005 ppm baseado em 10 vezes o nível do ruído do branco. No dia 0, imazalil foi detectado apenas na casca (rotulado como 0 mm na Tabela 8) em uma concentração de 2,4 ppm. No dia 1, uma concentração de 0,024 ppm foi detectada no primeiro milímetro dentro da maçã. No dia 4, 0,015 ppm de imazalil foi verificado no terceiro milímetro dentro da fruta. No dia 7, 0,015 ppm foi detectado no sexto milímetro. Nenhum teor de imazalil foi encontrado em regiões além de seis milímetros. As concentrações obtidas no primeiro milímetro do dia 1, assim como no segundo e terceiro milímetros do dia 4 e no quarto ao sexto milímetros do dia 7, não foram encontradas nos resultados por MALDI *imaging* mostrados na Figura 21b devido ao limite de detecção da técnica (LOD = 0,05 ppm).

Tabela 8: Concentração de imazalil a partir da casca (0 mm) até à região interna (7 mm) em maçãs.

Distância a partir da casca (mm)	Concentração (ppm)			
	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 7
0	2,425 ± 0,105	2,161 ± 0,053	1,748 ± 0,093	1,252 ± 0,026
1	ALQ	0,024 ± 0,003	0,199 ± 0,016	0,415 ± 0,051
2	ALQ	ALQ	0,019 ± 0,002	0,181 ± 0,020
3	ALQ	ALQ	0,015 ± 0,002	0,059 ± 0,003
4	ALQ	ALQ	ALQ	0,022 ± 0,009
5	ALQ	ALQ	ALQ	0,019 ± 0,009
6	ALQ	ALQ	ALQ	0,015 ± 0,008
7	ALQ	ALQ	ALQ	ALQ

ALQ = abaixo do limite de quantificação

Observando a Tabela 8 e integrando as concentrações do dia 7 (soma das concentrações da casca ao sexto milímetro) e comparando o resultado com o dia 0, observa-se que aproximadamente 20% de imazalil está sendo perdido, ou seja, cerca de 3% de perda por dia. Para testar se esta perda poderia ser um resultado da fotodegradação, um tubo de microcentrífuga aberto contendo 1 ppm de solução de imazalil em ACN foi exposto à uma lâmpada UV de 254 nm durante 4 h a uma distância de aproximadamente 5 mm. Uma solução de imazalil a 1 ppm que não foi exposta à lâmpada UV foi utilizada como controle. Ambas as soluções resultantes foram analisadas por ESI-MS e os espectros de massas são mostrados na Figura 23. Um possível produto de degradação de m/z 261,0804 ($[C_{14}H_{13}ClN_2O]^+H^+$; perda de HCl do imazalil) foi encontrado, mas um sinal correspondente não foi observado nos espectros de massas obtidos por ESI ou MALDI na análise de imazalil em maçãs nos dias 0 a 7. Os espectros não apresentaram diferenças significativas no perfil químico que pudessem indicar a fotodegradação.

A taxa e a amplitude da migração de imazalil são consistentes com alguns estudos anteriores. Por exemplo, a distribuição de imazalil em frutas após armazenamento foi estudada anteriormente utilizando cromatografia gasosa e líquida. Num estudo de laranjas utilizando HPLC, verificou-se que 10 a 20% do imazalil aplicado penetrou a casca da fruta após uma semana (BROWN; DEZMAN, 1990). A distribuição de imazalil em limões foi analisada por GC-MS e verificou-se que a migração para o interior era lenta e que aproximadamente 10% do pesticida estava presente no albedo com o restante no flavedo após 60 dias. Alguns indícios de lenta degradação do fungicida ao longo do tempo foram observados (DORE et al., 2009). Um outro estudo sobre a distribuição de imazalil em maçãs quantificadas por HPLC mostrou que 70-90% do pesticida foi observado na casca após 20 dias. Aproximadamente 20-25% do pesticida permaneceu na fruta após 155 dias (CANO; PLAZA; MUÑOZ-DELGADO, 1987).

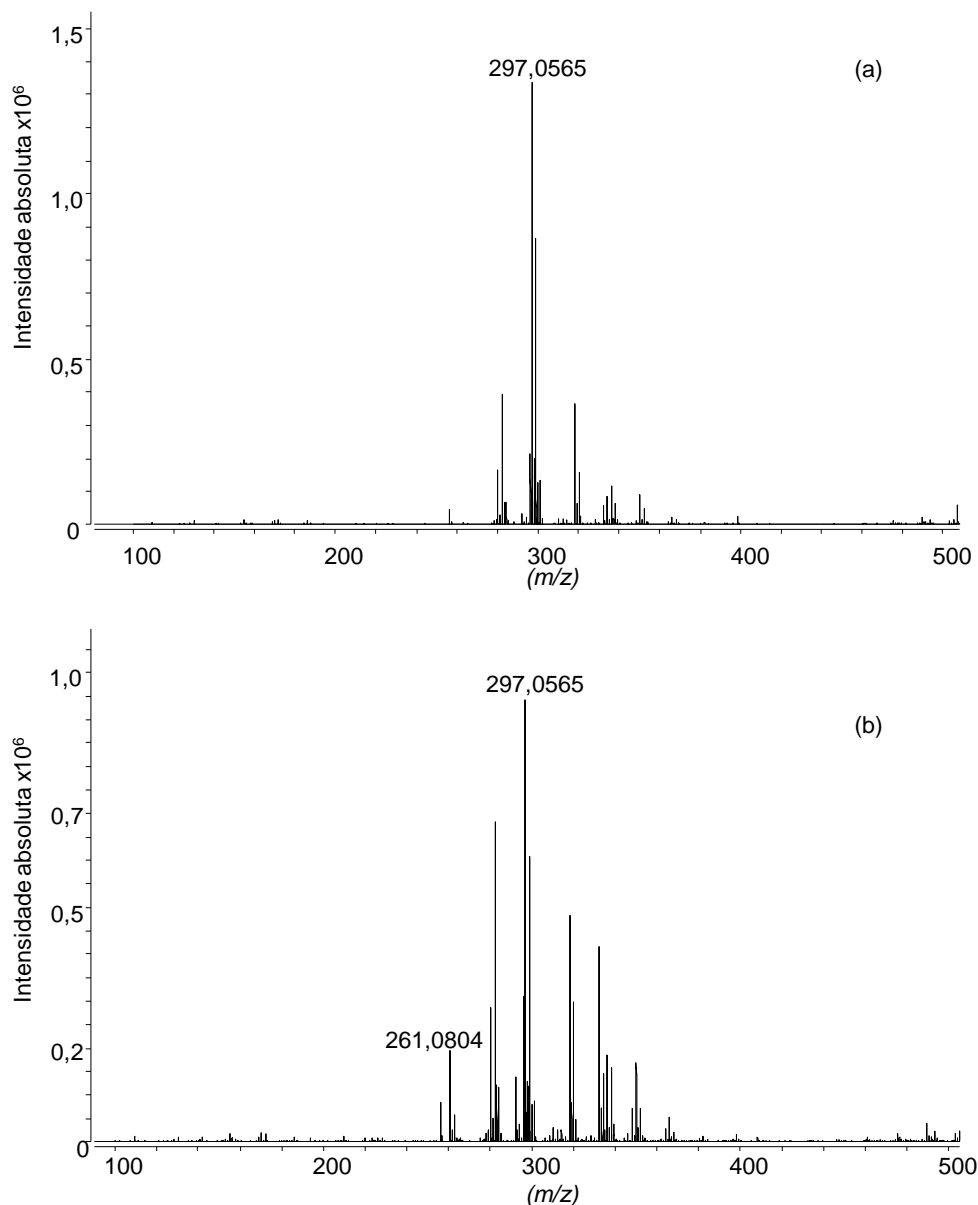


Figura 23: Espectro de massas por ESI(+) de uma solução de imazalil (m/z 297,0565 $[M+H]^+$): (a) não exposta à luz UV; (b) exposta à luz UV (254 nm) mostrando a presença do íon m/z 261,0804 $[C_{14}H_{13}ClN_2O]+H^+$, um produto da perda de HCl da molécula do imazalil.

4.4 - Conclusão

MALDI *imaging* e IR-LAST com análise offline por ESI-MS foram utilizadas para localizar e quantificar o fungicida imazalil em maçãs. MALDI *imaging* foi utilizada para visualizar a dinâmica de penetração do composto à medida que este migrava para o interior da maçã. Imagens de regiões das maçãs foram capazes de mostrar a profundidade de penetração do imazalil

em dias diferentes. No entanto, a IR-LAST com ESI-MS foi necessária para detectar teores de imazalil que não puderam ser detectados por MALDI. O fungicida foi detectado na parte interna da maçã um dia após sua aplicação. Além disso, a IR-LAST com ESI-MS foram utilizadas para quantificar a taxa de penetração do imazalil na maçã, que foi de aproximadamente 1 mm por dia. O declínio da concentração de imazalil na casca da maçã é perceptível ao longo dos dias. Sete dias após a aplicação do fungicida, 0,015 ppm foram encontrados no sexto milímetro da região interna da maçã. A amostragem ambiente tornou possível evitar etapas laboriosas de preparo de amostras que são geralmente empregadas em análises de pesticidas em frutas por técnicas tradicionais. A combinação de MALDI *imaging* e IR-LAST emerge como um meio adequado de verificar a dinâmica de migração de fungicidas para a região interna de frutas.

Conclusão geral

As técnicas de espectrometria de massas ambiente emergem como alternativas úteis para análise de pesticidas em alimentos devido às vantagens da redução de etapas de preparo de amostras que é comum nas técnicas convencionais.

Paper spray ionization (PSI) e *leaf spray* (LS) demonstraram semelhantes e altas performances nas análises de pesticidas em vegetais. Através dos dois métodos, foi possível construir curvas de calibração com linearidades adequadas, obtendo baixos limites de detecção e quantificação (faixa de ppb). A LS-MS apresentou uma pequena vantagem sobre PSI-MS, pois na primeira técnica, nenhum preparo de amostra foi necessário e o rastreamento de pesticidas foi realizado diretamente da amostra. Já em PSI-MS, uma etapa adicional de extração foi realizada. Todavia, a etapa de extração pode permitir a detecção dos pesticidas em todo o tecido vegetal em apenas uma análise, o que não ocorre na LS devido à necessidade de cortar a folha em pequenos triângulos e analisar cada um separadamente.

A combinação de *molecularly imprinted polymers* (MIPs) e PSI-MS proporcionou a obtenção de um novo método, o MIP *membrane spray ionization* (MIP-MSI). Ambas as técnicas foram acopladas para fornecer uma superfície quimicamente seletiva a uma membrana de celulose, e esta foi utilizada como substrato para analisar pesticidas em frutas. Além disso, MIP-MSI foi um método relativamente rápido de ser preparado, pois a membrana MIP foi produzida em algumas horas e a análise por PSI realizada em segundos. O método apresentou um desempenho analítico satisfatório, uma vez que forneceu curvas de calibração lineares e LODs e LOQs em baixas concentrações, além de apresentar valores de precisão e exatidão abaixo de 20%. O MIP-PSI pode ser desenvolvido e aprimorado para a detecção e quantificação de uma variedade de compostos em diferentes matrizes.

A taxa de migração de pesticidas para o interior das frutas foi quantificada por *infrared laser ablation sample transfer* (IR-LAST) com análise offline por *electrospray ionization* (ESI). A amostragem por IR-LAST reduziu a necessidade de etapas laboriosas de preparo de amostras que são geralmente utilizadas por técnicas convencionais de análise de pesticidas em frutas. Além disso, a IR-LAST proporcionou a possibilidade de quantificar

resíduos de pesticidas em locais específicos do alimento. Combinando IR-LAST com *matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) imaging*, foi possível verificar a dinâmica e a amplitude da penetração de pesticidas em frutas.

Referências Bibliográficas

- ALBERICI, R. M.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G. B.; ROMÃO, W.; LALLI, P. M.; BENASSI, M.; CUNHA, I. B.; EBERLIN, M. N. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. *Anal. Bional. Chem.*, v. 398, p. 265-294, 2010.
- ALTIERI, G.; RENZO, G. C. D.; GENOVESE, F.; CALANDRA, M.; STRANO, M. C. A new method for the postharvest application of imazalil fungicide to citrus fruit. *Biosyst. Eng.*, v. 115, p. 434-443, 2013.
- AMADOR, V. S.; PEREIRA, H. V.; SENA, M. M.; AUGUSTI, R.; PICCIN, E. Paper spray mass spectrometry for the forensic analysis of black ballpoint pen inks. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, v. 28, p. 1965-1976, 2017.
- ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Consulta pública nº 484, de 16 de março de 2018. 2018a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2858730/CONSULTA+P%C3%9ABLICA+N%C2%BA+484+--+GGTOX/18d3d6d5-0623-4daf-871b-f6825f92fd32>> Acesso em: 30 out. 2018.
- ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Monografias autorizadas. 2018b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>> Acesso em: 30 out. 2018.
- ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA), 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> Acesso em: 29 out. 2018.
- ASHOUR, M. B.; AHMED, O. M.; ASRAN, A. E. M.; ALI, M. A. Assessment of the preventive effects of *Salvia officinalis* and *Ruta graveolens* ethanolic leaf extracts on chlorpyrifos- and methomyl-induced renal toxicity and oxidative stress in albino rats. *Int. J. Prev. Med.*, v. 6, p. 34-44, 2017.
- BASURI, P.; SARKAR, D.; PARAMASIVAM, G.; PRADEEP, T. Detection of hydrocarbons by laser assisted paper spray ionization mass spectrometry (LAPSI MS). *Anal. Chem.*, v. 90, p. 4663-4668, 2018.
- BEACH, D. G.; WALSH, C. M.; MCCARRON, P. High-throughput quantitative analysis of domoic acid directly from mussel tissue using laser ablation electrospray ionization – tandem mass spectrometry. *Toxicon.*, v. 92, p. 75-80, 2014.
- BEHRENS, D.; ROUXEL, J.; BURGEOT, T.; AKCHA, F. Comparative embryotoxicity and genotoxicity of the herbicide diuron and its metabolites in

early life stages of *Crassostrea gigas*: implication of reactive oxygen species production. *Aquat. Toxicol.*, v. 175, p. 249-259, 2016.

BIESEN, G. V.; WISEMAN, J. M.; LI, J.; BOTTARO, C. S. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for the detection of analytes extracted by thin-film molecularly imprinted polymers. *Analyst*, v. 135, p. 2237-2240, 2010.

BILLS, B. J.; MANICKE, N. E. Development of a prototype blood fractionation cartridge for plasma analysis by paper spray mass spectrometry. *Clin. Mass Spectrom.*, 2016, 2, 18-24.

BOUGHTON, B. A.; THINAGARAN, D.; SARABIA, D.; BACIC, A.; ROESSNER, U. Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochem. Rev.*, v. 15, p. 445-488, 2015.

BOUSLIMANI, A.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. *Nat. Prod. Rep.*, v. 31, p. 718-729, 2014.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm> Acesso em: 29 out. 2018.

BROWN, G. E.; DEZMAN, D. J. Uptake of imazalil by citrus fruit after postharvest application and the effect of residue distribution on sporulation of *Penicillium digitatum*. *Plant Dis.*, v. 74, p. 927-930, 1990.

CABRAS, P.; SCHIRRA, M.; PIRISI, F. M.; GARAU, V. L.; ANGIANI, A. Factors affecting imazalil and thiabendazole uptake and persistence in citrus fruits following dip treatments. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p. 3352-3354, 1999.

CANO, M. P.; PLAZA, J. L. D. L.; MUÑOZ-DELGADO, L. Determination and persistence of imazalil in post-harvest-treated apples during cold storage. *Pestic. Sci.*, v. 19, p. 283-287, 1987.

CARVALHO, T. C. DE; 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 Sci. Int.*, v. 262, p. 56-65, 2016.

CARVALHO, T. C. DE; 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 Sci. Int.*, v. 262, p. 56-65, 2016.

CARVALHO, T. C.; OLIVEIRA, I. F.; TOSE, L. V.; VANINI, G.; KILL, J. B.; NETO, A. C.; MACHADO, L. F.; AMBROSIO, J. C. L.; LACERDA JR., V.; VAZ, B. G.; ROMÃO, W. Qualitative analysis of designer drugs by paper spray ionisation mass spectrometry (PSI-MS). *Anal. Methods*, v. 8, p. 614-620, 2016.

CHAVES, A. R.; QUEIROZ, M. E. C. In-tube solid-phase microextraction with molecularly imprinted polymer to determine interferon alpha 2a in plasma sample by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1318, p. 43-48, 2013.

CHEN, L.; ZHAO, B.; FAN, Z.; LIU, X.; WU, Q.; LI, H.; WANG, H. Synthesis of novel 3,4-chloroisothiazole-based imidazoles as fungicides and evaluation of their mode of action. *J. Agric. Food Chem.*, v. 66, p. 7319-7327, 2018.

CHEN, S.; CHANG, Q.; YIN, K.; HE, Q.; DENG, Y.; CHEN, B.; LIU, C.; WANG, Y.; WANG, L. Rapid analysis of bisphenol A and its analogues in food packaging products by paper spray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, v. 65, p. 4859-4865, 2017.

CHEN, Z.-F.; YING, G.-G. Occurrence, fate and ecological risk of five typicalazole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: a review. *Environ. Int.*, v. 8, p. 142-153, 2015.

CHENG, S.-C.; SHIEA, C.; HUANG, Y.-L.; WANG, C.-H.; CHO, Y.-T.; SHIEA, J. *Anal. Methods*, v. 9, p. 4924-4935, 2017.

CHIANG, S.; ZHANG, W.; OUYANG, Z. Paper spray ionization mass spectrometry: recent advances and clinical applications. *Expert Rev. Proteomics.*, v. 15, p. 781-789, 2018.

CHIU, K. S.; LANGENHOVE, A. V. High-performance liquid chromatographic/mass spectrometric and high-performance liquid chromatographic/tandem mass spectrometric analysis of carbamate pesticides. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, v. 18, p. 200-206, 1989.

CHO, Y.; AHMED, A.; ISLAM, A.; KIM, S. Developments in FT-ICR MS instrumentation, ionization techniques, and data interpretation methods for petroleomics. *Mass Spectrom. Rev.*, v. 34, p. 248-263, 2015.

CIMINO, A. M.; BOYLES, A. L.; THAYER, K. A.; PERRY, M. J. Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review. *Environ. Health Perspect.*, v. 125, p. 155-162, 2017.

CLENDINEN, C. S.; MONGE, M. E.; FERNÁNDEZ, F. M. Ambient mass spectrometry in metabolomics. *Analyst*, v. 142, p. 3101-3117, 2017.

CODY, R. B.; DANE, A. J. Paper spray ionization for ambient inorganic analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 28, p. 893-898, 2014.

CODY, R. B.; TAMURA, J.; DOWNARD, K. M. Quantitation of anthocyanins in elderberry fruit extracts and nutraceutical formulations with paper spray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, v. 53, p. 58-64, 2018.

COLLETES, T. C.; GARCIA, P. T.; CAMPANHA, R. B.; ABDELNUR, P. V.; ROMAO, W.; COLTRO, W. K. T.; VAZ, B. G. A new insert sample approach to paper spray mass spectrometry: a paper substrate with paraffin barriers. *Analyst*, v. 141, p. 1707-1713, 2016.

COOKS, R. G.; OUYANG, Z.; TAKATS, Z.; WISEMAN, J. M. Detection Technologies. Ambient mass spectrometry. *Science*, v. 311, p. 1566-1570, 2006.

CORMACK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation, *J. Chromatogr. B*, v. 804, p. 173-182, 2004.

CORREA, D. N.; SANTOS, J. M.; EBERLIN, L. S.; EBERLIN, M. N.; TEUNISSEN, S. F. Forensic chemistry and ambient mass spectrometry: a perfect couple destined for a happy marriage? *Anal. Chem.*, v. 88, p. 2515-2526, 2016.

DAMON, D. E.; DAVIS, K. M.; MOREIRA, C. R.; CAPONE, P.; CRUTTENDEN, R.; BADU-TAWIAH, A. K. Direct biofluid analysis using hydrophobic paper spray mass spectrometry. *Anal. Chem.*, v. 88, p. 1878-1884, 2016.

DANIELS, S. I.; CHAMBERS, J. C.; SANCHEZ, S. S.; MERRILL, M. A. L.; HUBBARD, A. E.; MACHERONE, A.; MCMULLIN, M.; ZHANG, L.; ELLIOTT, P.; SMITH, M. T.; KOONER, J. Elevated levels of organochlorine pesticides in South Asian immigrants are associated with an increased risk of diabetes. *JES*, v. 2, p. 832-841, 2018.

D'AQUINO, S.; SCHIRRA, M.; PALMA, A.; ANGIONI, A.; CABRAS, P.; MIGHELI, Q. Residue levels and effectiveness of pyrimethanil vs imazalil

when using heated postharvest dip treatments for control of penicillium decay on citrus fruit. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54p. 4721-4726, 2006.

DHOUIB, I. B.; ANNABI, A.; JALLOULI, M.; MARZOUKI, S.; GHARBI, N.; ELFAZAA, S.; LASRAM, M. M. Carbamates pesticides induced immunotoxicity and carcinogenicity in human: a review. *J. Appl. Biomed.*, v. 14, p. 85-90, 2016.

DHUMMAKUPT, E. S.; MACH, P. M.; CARMANY, D.; DEMOND, P. S.; MORAN, T. S.; CONNELL, T.; WYLIE, H. S.; MANICKE, N. E.; NILLES, J. M.; GLAROS, T. Direct analysis of aerosolized chemical warfare simulants captured on a modified glass-based substrate by "paper-spray" ionization. *Anal. Chem.*, v. 89, p. 10866-10872, 2017.

DOMINGOS, E.; CARVALHO, T. C. DE; 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. *Anal. Methods*, v. 9, p. 4400-4409, 2017.

DONG, X.; LIANG, S.; SUN, H. Analysis of herbicide atrazine and its degradation products in agricultural soil by ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Int. J. Environ. Agric. Res.*, v. 2, p. 29-35, 2016.

DONNARUMMA, F.; CAMP, E. E.; CAO, F.; MURRAY, K. K. Infrared laser ablation with vacuum capture for fingerprint sampling. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, v. 28, p. 1958-1964, 2017.

DONNARUMMA, F.; MURRAY, K. K. Laser ablation sample transfer for localized LC-MS/MS proteomic analysis of tissue. *J. Mass Spectrom.*, v. 51, p. 261-268, 2016.

DORE, A.; MOLINU, M. G.; VENDITTI, T.; D'HALLEWIN, G. Immersion of lemons into imazalil mixtures heated at 50 C alters the cuticle and promotes permeation of imazalil into rind wounds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, p. 623-631, 2009.

EL-BENDARY, H. M. Biochemical effects of methomyl on experimental animals. *App. Sci. Report*, v. 6, p. 32-36, 2014.

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

ELLIS, S. R.; BRUINEN, A. L.; HEEREN, R. M. A. A critical evaluation of the current state-of-the-art in quantitative imaging mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 406, p. 1275-1289, 2013.

ERASMUS, A.; LENNOX, C. L.; KORSTEN, L.; LESAR, K.; FOURIE, P. H. Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: impact and options. *Postharvest Biol Technol.*, v. 107, p. 66-76, 2015.

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. *Anal. Chem.*, v. 86, p. 7712-7718, 2014.

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

FELÍCIO, A. A.; FREITAS, J. S.; SCARIN, J. B.; ONDEI, L. de S.; TERESA, F. B.; SCHLENK, D.; ALMEIDA, E. A. de. Isolated and mixed effects of diuron and its metabolites on biotransformation enzymes and oxidative stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 149, p. 248-256, 2018.

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.

FREUND, D. M.; MARTIN, A. C.; COHEN, J. D.; HEGEMAN, A. D. Direct detection of surface localized specialized metabolites from *Glycyrrhiza lepidota* (American licorice) by leaf spray mass spectrometry. *Planta*, v. 247, p. 267-275, 2018.

GARRETT, R.; REZENDE, C. M.; IFA, D. R. Coffee origin discrimination by paper spray mass spectrometry and direct coffee spray analysis. *Anal. Methods*, v. 5, p. 5944-5948, 2013.

GERWICK, B. C.; SPARKS, T. C. Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. *Pest Manag. Sci.*, v. 70, p. 1169-1185, 2014.

GESSEL, M. M.; NORRIS, J. L.; CAPRIOLI, R. M. MALDI imaging mass spectrometry: spatial molecular analysis to enable a new age of discovery. *J. Proteomics*, p. 107, v. 71-82, 2014.

- GILDEN, R. C.; HUFFLING, K.; SATTLER, B. Pesticides and health risks. J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs., v. 39, p. 103-110, 2010.
- GÓMEZ-RÍOS, G. A.; REYES-GARCÉS, N.; BOJKO, B.; PAWLISZYN, J. Biocompatible solidphase microextraction nanoelectrospray ionization: an unexploited tool in bioanalysis. Anal. Chem., v. 88, p. 1259-1265, 2016.
- GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; AFONSO, M. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Evaluation of two molecularly imprinted polymers for the solid-phase extraction of natural, synthetic and mycoestrogens from environmental water samples before liquid chromatography with mass spectrometry. J. Sep. Sci., v. 38, p. 2692-2699, 2015.
- GOODMAN, J. E.; LOFTUS, C. T.; ZU, K. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and non-Hodgkin's lymphoma, gastric cancer, and prostate cancer: meta-analyses of the published literature. Ann. Epidemiol., v. 25, p. 626-636, 2015.
- GOODMAN, M.; MANDEL, J. S.; DESESSO, J. M.; SCIALLI, A. R. Atrazine and pregnancy outcomes: a systematic review of epidemiologic evidence. Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol., v. 101, p. 215-236, 2014.
- GRIMALT, S.; DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. J. Chromatogr. A, v. 1433, p. 1-23, 2016.
- GROSS, J. H. Mass spectrometry: a textbook. 3ed. Berlin, Springer, 2017. 968p.
- GUO, T.; ZHANG, Z.; YANNELL, K. E.; DONG, Y.; COOKS, R. G. Paper spray ionization mass spectrometry for rapid quantification of illegal beverage dyes. Anal. Methods, v. 9, p. 6273-6279, 2017.
- GUPTA, R. C. Reproductive and developmental toxicology. 1ed. Salt Lake City, Academic Press, 2017. 1460p.
- HAMID, A. M.; WEI, P.; JARMUSCH, A. K.; PIRRO, V.; COOKS, R. G. Discrimination of *Candida* species by paper spray mass spectrometry. Int. J. Mass Spectrom., v. 378, p. 288-293, 2015.
- HAN, F.; YANG, Y.; OUYANG, J.; NA, N. Direct analysis of in-gel proteins by carbon nanotubes-modified paper spray ambient mass spectrometry. Analyst, v. 140, p. 710-715, 2015.
- HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass spectrometry: principles and applications. 3ed. Chichester, John Wiley & Sons, 2007. 489p.

- HSU, C.-C.; DORRESTEIN, P. C. Visualizing life with ambient mass spectrometry. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 31, p. 24-34, 2015.
- HU, K.; TIAN, Y.; DU, Y.; HUANG, L.; CHEN, J.; LI, N.; LIU, W.; LIANG, Z.; ZHAO, L. Atrazine promotes RM1 prostate cancer cell proliferation by activating STAT3 signaling. *Int. J. Oncol.*, v. 48, p. 2166-2174, 2016.
- HUOVINEN, M.; LOIKKANEN, J.; NAARALA, J.; VÄHÄKANGAS, K. Toxicity of diuron in human cancer cells. *Toxicol. In Vitro*, v. 29, p. 1577-1586, 2015.
- HUSSAIN, S.; ARSHAD, M.; SPRINGAEL, D.; SØRENSEN, S. R.; BENDING, G. D.; DEVERS-LAMRANI, M.; MAQBOOL, Z.; MARTIN-LAURENT, F. Abiotic and biotic processes governing the fate of phenylurea herbicides in soils: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, v. 45, p. 1947-1998, 2015.
- IFA, D. R.; EBERLIN, L. S. Ambient ionization mass spectrometry for cancer diagnosis and surgical margin evaluation. *Clin. Chem.*, v. 62, p. 1-13, 2016.
- JAYAKODY, N.; HARRIS, E. C.; COGGON, D. Phenoxy herbicides, soft-tissue sarcoma and non-Hodgkin lymphoma: a systematic review of evidence from cohort and case-control studies. *Br. Med. Bull.*, v. 114, p. 75-94, 2015.
- JAYARAJ, R.; MEGHA, P.; SREEDEV, P. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip. Toxicol.*, v. 9, p. 90-100, 2016.
- JEONG, R.-D.; CHU, E.-H.; SHIN, E.-J.; LEE, E.-S.; KWAK, Y.-S.; PARK, H.-J. Antifungal effect of gamma irradiation and sodium dichloroisocyanurate against *Penicillium expansum* on pears. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 61, p. 437-445, 2015.
- JIN, C.; LUO, T.; ZHU, Z.; PAN, Z.; YANG, J.; WANG, W.; FU, Z.; JIN, Y. Imazalil exposure induces gut microbiota dysbiosis and hepatic metabolism disorder in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v. 22, p. 85-93, 2017.
- JURISCH, M.; AUGUSTI, R. Detection of signature forgery with erasable pens using paper spray mass spectrometry (PS-MS). *Anal. Methods*, v. 8, p. 4543-4546, 2016.
- KADAM, S. U.; MISRA, N. N.; ZAIMA, N. Mass spectrometry based chemical imaging of foods. *RSC Adv.*, v. 6, p. 33537-33546, 2016.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; BAHR, U.; HILLENKAMP, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, v. 78, p. 53-68, 1987.

KELLERMAN, M.; JOUBERT, J.; ERASMUS, A.; FOURIE, P. H. The effect of temperature, exposure time and pH on imazalil residue loading and green mould control on citrus through dip application. *Postharvest Biol. Technol.*, v. 121, p. 159-164, 2016.

KENNEDY, J. H.; PALATY, J.; GILL, C. G.; WISEMAN, J. M. Rapid analysis of fentanyl and other novel psychoactive substances (NPS) in substance use disorder patient urine using paper spray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 32, p. 1280-1286, 2018.

KIM, D.; HA, S. Y.; AN, J. G.; CHA, S.; YIM, U. H.; KIM, S. Estimating degree of degradation of spilled oils based on relative abundance of aromatic compounds observed by paper spray ionization mass spectrometry. *J. Hazard. Mater.*, v. 359, p. 421-428, 2018.

KIM, D.; YIM, U. H.; KIM, B.; CHA, S.; KIM, S. Paper spray chemical ionization: highly sensitive ambient ionization method for low-and nonpolar aromatic compounds. *Anal. Chem.*, v. 89, p. 9056-9061, 2017.

KIM, K.-H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.*, v. 575, p. 525-535, 2017.

KOUTROS, S.; SILVERMAN, D. T.; ALAVANJA, M. C.; ANDREOTTI, G.; LERRO, C. C.; HELTSHE, S.; LYNCH, C. F.; SANDLER, D. P.; BLAIR, A.; BEANE FREEMAN, L. E. Occupational exposure to pesticides and bladder cancer risk. *Int. J. Epidemiol.*, v. 45, p. 792-805, 2016.

KRIEGER, R. *Handbook of pesticide toxicology*. 3ed. Salt Lake City, Academic Press, 2010. 2342p.

KRUVÉ, A.; LAMOS, A.; KIRILLOVA, J.; HERODES, K. Pesticide residues in commercially available oranges and evaluation of potential washing methods. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.*, v. 56, p. 134-141, 2007.

LAGARRIGUE, M.; CAPRIOLI, R. M.; PINEAU, C. Potential of MALDI imaging for the toxicological evaluation of environmental pollutants. *J. Proteomics*, v. 144, p. 133-139, 2016.

LAN, H.; GAN, N.; PAN, D.; HU, F.; LI, T.; LONG, N.; QIAO, L. An automated solid-phase microextraction method based on magnetic molecularly imprinted

polymer as fiber coating for detection of trace estrogens in milk powder. J. Chromatogr. A, v. 1331, p. 10-18, 2014.

LEBARON, H. M.; FARLAND, J. M.; BURNSIDE, O. The triazine herbicides. 1ed. Amsterdam, Elsevier, 2011. 600p.

LEE, D. H.; LIND, P. M.; JACOBS, D. R. JR.; SALIHOVIC, S.; VAN BAVEL, B.; LIND, L. Association between background exposure to organochlorine pesticides and the risk of cognitive impairment: a prospective study that accounts for weight change. Environ. Int., v. 89, p. 179-184, 2016.

LI, Z.; JENNINGS, A. Worldwide regulations of standard values of pesticides for human health risk control: a review. Int. J. Environ. Res. Public Health, v. 14, p. 826-866, 2017.

LIU, J.; GU, Z.; YAO, S.; ZHANG, Z.; CHEN, B. Rapid analysis of *Callicarpa* L. using direct spray ionization mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal., v. 124, p. 93-103, 2016.

LIU, J.; WANG, H.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Leaf spray: direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry. Anal. Chem., v. 83, p. 7608-7613, 2011.

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

LIU, M.; HUANG, D.; QUAN, S.; ZHENG, J.; ZHANG, W.; LIU, L. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in an internal circulation three-phase fluidized photoreactor using N-TiO₂/γ-Al₂O₃ granule as adsorbent and photocatalyst. J. Environ. Eng., v. 140, p. 1-10, 2014.

MALAJ, N.; OUYANG, Z.; SINDONA, G.; COOKS, R. G. Analysis of pesticide residues by leaf spray mass spectrometry. Anal. Methods, v. 4, p. 1913-1919, 2012.

MANOCHA, P.; WAKODE, S. R.; KAUR, A.; ANAND, K.; KUMAR, H. A review: imidazole synthesis and its biological activities. Int. J. Pharm. Sci. Res., v. 1, p. 12-16, 2016.

MAPA. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-garantia-qualidade-analitica.pdf>> Acesso em: 02 nov. 2018.

MAPA. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em:
<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>
Acesso em: 30 out. 2018.

MARRAZZA, G. Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: a review. *Biosensors*, v. 4, p. 301-317, 2014.

MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *Trac Trend Anal. Chem.*, v. 45, p. 169-181, 2013.

MASIÁ, A.; SUAREZ-VARELA, M. M.; LLOPIS-GONZALEZ, A.; PICÓ, Y. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: a review. *Anal. Chim. Acta*, v. 936, p. 40-61, 2016.

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

MCKENNA, J.; JETT, R.; SHANKS, K.; MANICKE, N. E. Toxicological drug screening using paper spray high-resolution tandem mass spectrometry (HR-MS/MS). *J. Anal. Toxicol.*, v. 42, p. 300-310, 2018.

MICHEL, D.; GAUNT, M. C.; ARNASON, T.; EL-ANEED, A. Development and validation of fast and simple flow injection analysis–tandem mass spectrometry (FIA–MS/MS) for the determination of metformin in dog serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 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. *Anal. Chem.*, v. 89, p. 11779-11786, 2017.

MNIF, W.; HASSINE, A. I. H.; BOUAZIZ, A.; BARTEGI, A.; THOMAS, O.; ROIG, B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 8, p. 2265-2303, 2011.

MULLER, T.; COOKS, R. G. Differential rapid screening of phytochemicals by leaf spray mass spectrometry. *Bull. Korean Chem. Soc.*, v. 35, p. 919-924, 2014.

MUÑOZ-QUEZADA, M. T.; LUCERO, B. A.; BARR, D. B.; STEENLAND, K.; LEVY, K.; RYAN, P. B.; IGLESIAS, V.; ALVARADO, S.; CONCHA, C.; ROJAS, E.; VEGA, C. Neurodevelopmental effects in children associated

with exposure to organophosphate pesticides: a systematic review. *Neurotoxicology*, v. 39, p. 158-168, 2013.

NEMES, P.; VERTES, A., Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure, in vivo, and imaging mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, v. 79, p. 8098-8106, 2007.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P.; MAIPAS, S.; KOTAMPASI, C.; STAMATIS, P.; HENS, L. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Front. Public Health*, v. 4, p. 1-8, 2016.

NIESSEN, W. M. A. Group-specific fragmentation of pesticides and related compounds in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1217, p. 4061-4070, 2010.

OLIVEIRA JR, R. S. de; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. 1ed. Curitiba, Omnipax Editora, 2011. 348p.

PARK, S. G.; MURRAY, K. K. Infrared laser ablation sample transfer for MALDI and electrospray methods. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, v. 22, p. 1352-1362, 2011.

PARK, S.-G.; MURRAY, K. K. Ambient laser ablation sampling for capillary electrophoresis mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 27, p. 1673-1680, 2013.

PAULA, C. C. A. de; VALADARES, A.; JURISCH, M.; PICCIN, E.; AUGUSTI, R. Paper spray mass spectrometry applied in the monitoring of a chemical system in dynamic chemical equilibrium: the redox process of methylene blue. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 30, p. 1176-1180, 2016.

PAULA, C. de; JURISCH, M.; PICCIN, E.; AUGUSTI, R. Recognizing drug-facilitated crimes: detection and quantification of benzodiazepines in beverages using fast liquid–liquid extraction with low temperature partitioning and paper spray mass spectrometry. *Drug Test Anal.*, v. 10, p. 1348-1357, 2018.

PENG, M.-M; HAN, Y.-Q.; XIA, H.; HU, X.-Z.; ZHOU, Y.-X.; PENG, L.-J.; PENG, X.-T. Rapid and sensitive detection of the phenoxy acid herbicides in environmental water samples by magnetic solid-phase extraction combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, v. 41, p. 2221-2228, 2018.

PEREIRA, H. V.; AMADOR, V. S.; SENA, M. M.; AUGUSTI, R.; PICCIN, E. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection

for the forensic discrimination of beers. *Anal. Chim. Acta*, v. 940, p. 104-112, 2016.

PEREIRA, I.; CARVALHO, T. C. DE; ROMÃO, W.; FILGUEIRAS, P. R.; LAVIOLA, B. G.; RODRIGUES, C. M.; ABDELNUR, P. V.; VAZ, B. G. Differentiation of toxic and non-toxic leaves of *Jatropha curcas* L. genotypes by leaf spray mass spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 28, p. 1461-1466, 2017.

PETTIT, M. E.; DONNARUMMA, F.; MURRAY, K. K.; SOLOUKI, T. Infrared laser ablation sampling coupled with data independent high resolution UPLC-IM-MS/MS for tissue analysis. *Anal. Chim. Acta*, v. 1034, p. 102-109, 2018.

PORTA, T.; LESUR, A.; VAREGIO, E.; HOPFGARTNER, G. Quantification in MALDI-MS imaging: what can we learn from MALDI-selected reaction monitoring and what can we expect for imaging? *Anal Bioanal Chem.*, v. 407, p. 2177-2187, 2015.

PRUDENTE, I. R. G.; CRUZ, C. L.; NASCIMENTO, L. de C.; KAISER, C. C.; GUIMARÃES, A. G. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 63, p. 21-28, 2018.

PULLIAM, C. J.; BAIN, R. M.; WILEY, J. S.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Mass spectrometry in the home and garden. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, v. 26, p. 224-230, 2015.

RANI, M.; SHANKER, U.; JASSAL, V. Recent strategies for removal and degradation of persistent and toxic organochlorine pesticides using nanoparticles: a review. *J. Environ. Manage.*, v. 190, p. 208-222, 2017.

RAȚĂ, G.; SALA, F.; SAMFIRA, I. *Agricultural english*. 1ed. Newcastle upon Tyne, Cambridge Scholars Publishing, 2012. 385p.

RATNER, M. H.; FARB, D. H.; OZER, J.; FELDMAN, R. G.; DURSO, R. Younger age at onset of sporadic Parkinson's disease among subjects occupationally exposed to metals and pesticides. *Interdiscip. Toxicol.*, v. 7, p. 123-133, 2014.

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

REN, Y.; MCLUCKEY, M. N.; LIU, J.; OUYANG, Z. Direct mass spectrometry analysis of biofluid samples using slug-flow microextraction nano-electrospray ionization. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 53, p. 14124-14127, 2014.

- RESENDE, S. F.; TEODORO, J. A. R.; BINATTI, I.; GOUVEIA, R. L.; OLIVEIRA, B. S.; AUGUSTI, R. On-surface photocatalytic degradation of methylene blue: in situ monitoring by paper spray ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, v. 418, p. 107-111, 2017.
- REZEMOM, Y. H.; DONG, J.; MURRAY, K. K. Infrared laser-assisted desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, v. 133, p. 226-232, 2008.
- RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.*, v. 88, p. 546-582, 2016.
- RUSSO, R. E.; MAO, X.; GONZALEZ, J. J.; ZORBA, V.; YOO, J. Laser ablation in analytical chemistry. *Anal. Chem.*, v. 85, p. 6162–6177, 2013.
- SAGARKAR, S.; GANDHI, D.; DEVI, S. S.; SAKHARKAR, A.; KAPLEY, A. Atrazine exposure causes mitochondrial toxicity in liver and muscle cell lines. *Indian J. Pharmacol.*, v. 48, p. 200-207, 2016.
- SANAGI, M. M.; SALLEH, S.; IBRAHIM, W. A. W.; NAIM, A. A.; HERMAWAN, D.; MISKAM, M.; HUSSAIN, I.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the analysis of organophosphorus pesticides in fruit samples. *J. Food Comp. Anal.*, v. 32, p. 155-161, 2013.
- SARKAR, D.; SRIMANY, A.; PRADEEP, T. Rapid identification of molecular changes in tulsi (*Ocimum sanctum Linn*) upon ageing using leaf spray ionization mass spectrometry. *Analyst*, v. 137, p. 4559-4563, 2012.
- SARWAR, M. Inorganic insecticides used in landscape settings and insect pests. *Chem. Res. J.*, v. 1, p. 50-57, 2016.
- SCHRAGE, M.; SHEN, Y.; CLAASSEN, F. W.; ZUILHOF, H.; NIELEN, M. W. F.; CHEN, B.; BEEK, T. A. V. Rapid and simple neurotoxin-based distinction of Chinese and Japanese star anise by direct plant spray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1317, p. 246-253, 2013.
- SELLERGREN, B. Molecularly imprinted polymers: shaping enzyme inhibitors. *Nat. Chem.*, v. 2, p. 7-8, 2010.
- SENTHIL-NATHAN, S. Natural pesticide research. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v. 101, p. 1-2, 2018.
- SERGEYEVA, T. A.; MATUSCHEWSKI, H.; PILETSKY, S. A.; BENDIG, J.; SCHEDLER, U.; ULBRICHT, M. Molecularly imprinted polymer membranes

for substance-selective solid-phase extraction from water by surface photo-grafting polymerization. *J. Chromatogr. A*, v. 907, p. 89-99, 2001.

SHARMA, D.; NAGPAL, A.; PAKADE, Y. B.; KATNORIA, J. K. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: a review. *Talanta*, v. 82, p. 1077-1089, 2010.

SMITH, A. M.; SMITH, M. T.; MERRIL, M. A. L.; LIAW, J.; STEINMAUS, C. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and risk of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis accounting for exposure levels. *Ann. Epidemiol.*, v. 27, p. 281-289, 2017.

SNYDER, D. T.; SCHILLING, M. C.; HOCHWENDER, C. G.; KAUFMAN, A. D. Profiling phenolic glycosides in *Populus deltoides* and *Populus grandidentata* by leaf spray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Methods*, v. 7, p. 870-876, 2015.

SONG, Y.; JIA, Z. C.; CHEN, J. Y.; HU, J. X.; ZHANG, L. S. Toxic effects of atrazine on reproductive system of male rats. *Biomed. Environ. Sci.*, v. 27, p. 281-288, 2014.

SPARLING, D. W. *Ecotoxicology essentials: environmental contaminants and their biological effects on animals and plants*. 1 ed. Salt Lake City, Academic Press, 2016. 500p.

SPENGLER, B. Mass spectrometry imaging of biomolecular information. *Anal. Chem.*, v. 87, p. 64-82, 2015.

STACHNIUK, A.; FORNAL, E. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. *Food Anal. Method.*, v. 9, p. 1654-1665, 2016.

STOKVIS, E.; ROSING, H.; BEIJNEN, J. H. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 19, p. 401-407, 2005.

STOYTCHIEVA, M. *Pesticides in the modern world – effects of pesticides exposure*. 1.ed. Rijeka, InTech, 2011a. 376p.

STOYTCHIEVA, M. *Pesticides: the impacts of pesticides exposure*. 1.ed. Rijeka, InTech, 2011b. 446p.

STURTEVANT, D.; LEE, Y. J.; CHAPMAN, K. D. Matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for direct

visualization of plant metabolites in situ. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 37, p. 53-60, 2016.

SUN, X.; MIAO, Z.; YUAN, Z.; HARRINGTON, P. DE B.; COLLA, J.; CHEN, H. Coupling of single droplet micro-extraction with desorption electrospray ionization-mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, v. 301, p. 102-108, 2011.

SURATMAN, S.; EDWARDS, J. W.; BABINA, K. Organophosphate pesticides exposure among farmworkers: pathways and risk of adverse health effects. *Rev. Environ. Health*, v. 30, p. 65-79, 2015.

TADJIMUKHAMEDOV, F. K.; HUANG, G.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Rapid detection of urushiol allergens of *Toxicodendron* genus using leaf spray mass spectrometry. *Analyst*, v. 137, p. 1082-1084, 2012.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, v. 306, p. 471-473, 2004.

TAMURA, K.; INOUE, K.; TAKAHASHI, M.; MATSUO, S.; KODAMA, Y.; YOSHIDA, M. A crucial role of constitutive androstane receptor (CAR) in liver tumor development by imazalil in mice. *J. Toxicol. Sci.*, v. 41, p. 801-811, 2016.

TAVERNA, D.; DONNA, L. D.; BARTELLA, L.; NAPOLI, A.; SINDONA, G.; MAZZOTTI, F. Fast analysis of caffeine in beverages and drugs by paper spray tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 408, p. 3783-3787, 2016.

TAVERNA, D.; DONNA, L. D.; MAZZOTTI, F.; POLICICCHIO, B.; SINDONA, G. J. High-throughput determination of Sudan Azo-dyes within powdered chili pepper by paper spray mass spectrometry. *Mass Spectrom.*, v. 48, p. 544-547, 2013.

TAVERNA, D.; DONNA, L. D.; MAZZOTTI, F.; TAGARELLI, A.; NAPOLI, A.; FURIA, E.; SINDONA, G. Rapid discrimination of bergamot essential oil by paper spray mass spectrometry and chemometric analysis. *J. Mass Spectrom.*, v. 51, p. 761-767, 2016.

TEODORO, J. A. R.; PEREIRA, H. V.; CORREIA, D. N.; SENA, M. M.; PICCIN, E.; AUGUSTI, R. Forensic discrimination between authentic and counterfeit perfumes using paper spray mass spectrometry and multivariate supervised classification. *Anal. Methods*, v. 9, p. 4979-4987, 2017.

TEODORO, J. A. R.; PEREIRA, H. V.; SENA, M. M.; PICCIN, E.; ZACCA, J. J.; AUGUSTI, R. Paper spray mass spectrometry and chemometric tools for a fast and reliable identification of counterfeit blended Scottish whiskies. *Food Chem.*, v. 237, p. 1058-1064, 2017.

THIND, T. S. Fungicide resistance in crop protection: risk and management. 1ed. Wallingford, CABI, 2012. 284p.

THUNIG, J.; FLØ, L.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; HANSEN, S. H.; JANFELT, C. Liquid-phase microextraction and desorption electrospray ionization mass spectrometry for identification and quantification of basic drugs in human urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 26, p. 133-140, 2012.

TIAN, Y.; HE, J.; LIU, N.; HUANG, D.; LIU, Z.; YANG, Y.; CHEN, J.; ZHAO, B.; ZHAO, S.; LIANG, B. Atrazine exposure improves the proliferation of H22 cells in vitro and in vivo. *RSC Adv.*, v. 8, p. 21759-21767, 2018.

TSAI, C.-W.; TIPPLE, C. A.; YOST, R. A. Application of paper spray ionization for explosives analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 31, p. 1565-1572, 2017.

UCLÉS, S.; UCLÉS, A.; LOZANO, A.; MARTÍNEZ BUENO, M. J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Shifting the paradigm in gas chromatography mass spectrometry pesticide analysis using high resolution accurate mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1501, p. 107-116, 2017.

VENTER, A.; NEFLIU, M.; COOKS, R. G. Ambient desorption ionization mass spectrometry. *Trends Analyt. Chem.*, v. 27, p. 284-290, 2008.

VU, D. L.; RANGLOVÁ, K.; HÁJEK, J.; HROUZEK, P. Quantification of methionine and selenomethionine in biological samples using multiple reaction monitoring high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (MRM-HPLC-MS/MS). *J. Chromatogr. B*, v. 1084, p. 36-44, 2018.

WACKELIRG, J.; SCHIRHAGL, R. Applications of molecularly imprinted polymer nanoparticles and their advances toward industrial use: a review. *Anal. Chem.*, v. 88, p. 250-261, 2016.

WANG, C.-C.; LAI, Y.-H.; OU, Y.-M.; CHANG, H.-T.; WANG, Y.-S. Critical factors determining the quantification capability of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Phil. Trans. R. Soc. A*, v. 374, p. 1-14, 2016.

- WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. *Angew. Chem.*, v. 122, p. 889 -892, 2010.
- WANG, K.; DONNARUMMA, F.; BALDONE, M. D.; MURRAY, K. K. Infrared laser ablation and capture of enzymes with conserved activity. *Anal. Chim. Acta*, v. 1027, p. 41-46, 2018.
- WANG, K.; DONNARUMMA, F.; HERKE, S. W.; HERKE, P. F.; MURRAY, K. K. Infrared laser ablation sample transfer of tissue DNA for genomic analysis. *Anal Bioanal. Chem.*, v. 409, p. 4119-4126, 2017.
- WANG, X.; LI, X.; BAI, Y.; LIU, H. Just dip it: online coupling of “dip-it” polymer monolith microextraction with plasma assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Chem. Commun.*, v. 51, p. 4615-4618, 2015.
- 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. *J. Agric. Food Chem.*, v. 61, p. 3821-3827, 2013.
- WANG, X.; WANG, S.; CAI, Z. The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. *Trends Analyt. Chem.*, v. 52, p. 170-185, 2013.
- WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. Introduction of mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation. 4ed. Chichester, John Wiley & Sons, 2007. 861p.
- WEFERLING, N.; ZHANG, S. M.; CHIANG, C. H. Commercial organophosphorus chemicals: status and new developments. *Procedia Eng.*, v. 138, p. 291-301, 2016.
- WEI, P.; BAG, S.; PULLIAM, C. J.; SNYDER, D. T.; PIELAK, R. M.; COOKS, R. G. Analysis of bacteria using zero volt paper spray. *Anal. Methods*, v. 8, p. 1770-1773, 2016.
- WHITACRE, D. M. Reviews of environmental contamination and toxicology. 1ed. New York, Springer, 2013. 177p.
- WILEY, J. S.; GARCÍA-REYES, J. F.; HARPER, J. D.; CHARIPAR, N. A.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Screening of agrochemicals in foodstuffs using low-temperature plasma (LTP) ambient ionization mass spectrometry. *Analyst*, v. 135, p. 971-979, 2010.

WILM, M. Principles of electrospray ionization. *Mol. Cell Proteomics.*, v. 10, p. 1-8, 2011.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.*, v. 88, p. 4451-4459, 1984.

YANG, Q.; CHEN, B.; HE, M.; HU, B. Sensitive determination of seven triazine herbicide in honey, tomato and environmental water samples by hollow fiber based liquid-liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic capillary chromatography. *Talanta*, v. 186, p. 88-96, 2018.

YANG, Q.; MANICKE, N. E.; WANG, H.; PETUCCI, C.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Direct and quantitative analysis of underivatized acylcarnitines in serum and whole blood using paper spray mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 404, p. 1389-1397, 2012.

YANG, Q.; WANG, H.; MAAS, J. D.; CHAPPELL, W. J.; MANICKE, N. E.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, v. 312, p. 201-207, 2012.

YANNELL, K. E.; KESELY, K. R.; CHIEN, H. D.; KISSINGER, C. B.; COOKS, R. G. Comparison of paper spray mass spectrometry analysis of dried blood spots from devices used for in-field collection of clinical samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 409, p. 121-131, 2017.

YU, M.; WEN, R.; JIANG, L.; HUANG, S.; FANG, Z.; CHEN, B.; WANG, L. Rapid analysis of benzoic acid and vitamin C in beverages by paper spray mass spectrometry. *Food Chem.*, v. 268, p. 411-415, 2018.

ZHANG, C.; MANICKE, N. E. Development of a paper spray mass spectrometry cartridge with integrated solid phase extraction for bioanalysis. *Anal. Chem.*, v. 87, p. 6212-6219, 2015.

ZHANG, D.; WU, Y.; YUAN, Y.; LIU, W.; KUANG, H.; YANG, J.; YANG, B.; WU, L.; ZOU, W.; XU, C. Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces oxidative stress and apoptosis in mouse testis. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 141, p. 18-22, 2017.

ZHANG, M.; LIN, F.; XU, J.; XU, W. Membrane electrospray ionization for direct ultrasensitive biomarker quantitation in biofluids using mass spectrometry. *Anal. Chem.*, v. 87, p. 3123-3128, 2015.

ZHANG, N.; LI, Y.; ZHOU, Y.; HOU, J.; HE, Q.; HU, X.-G.; JIA, Y.-M.; YU, C.-Y.; NIE, Z. Rapid detection of polyhydroxylated alkaloids in mulberry using leaf spray mass spectrometry. *Anal. Methods*, v. 5, p. 2455-2460, 2013.

ZHOU, Z.; LEE, J. K.; KIM, S. C.; ZARE, R. N. Nanotip ambient ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, v. 88, p. 5542-5548, 2016.

ZRNČIĆ, M.; GROS, M.; BABIĆ, S.; KAŠTELAN-MACAN, M.; BARCELO, D.; PETROVIĆ, M. Analysis of anthelmintics in surface water by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, v. 99, p. 224-232, 2014.

Curriculum vitae

1 - Informações Pessoais

Nome Completo: Igor Pereira da Silva

Endereço eletrônico: igoraghape@hotmail.com

Naturalidade: Nortelândia - MT

Data de Nascimento: 20/05/1990

Filiação: Zuleide Ferreira Santana

Milton Pereira da Silva

2 - Formação acadêmica

Doutorado em Química	Universidade Federal de Goiás	2015-2018
Mestrado em Química	Universidade Federal de Mato Grosso	2013-2015
Bacharelado em Engenharia de Alimentos	Universidade do Estado de Mato Grosso	2007-2012

3 - Publicações

1 - SILVA, LIDYA C.; PEREIRA, IGOR; CARVALHO, THAYS C.; FILHO, JOÃO FRANCISCO ALLOCHIO; ROMÃO, WANDERSON; VAZ, BONIEK GONTIJO. Paper spray ionization and portable mass spectrometers: a review. *Analytical Methods*, 2019. DOI: 10.1039/C8AY02270D.

2 - PEREIRA, IGOR; RODRIGUES, MARCELLA FERREIRA; CHAVES, ANDRÉA RODRIGUES; VAZ, BONIEK GONTIJO. Molecularly imprinted polymer (MIP) membrane assisted direct spray ionization mass spectrometry for agrochemicals screening in foodstuffs. *Talanta*, v. 178, p. 507-514, 2018.

3 - CARDOSO, LETÍCIA SILVA; ESTRELA, FERNANDA NEVES; CHAGAS, THALES QUINTÃO; DA SILVA, WELLINGTON ALVES MIZAEI; COSTA, DENYS RIBEIRO DE OLIVEIRA; PEREIRA, IGOR; VAZ, BONIEK GONTIJO; RODRIGUES, ALINE SUELI DE LIMA; MALAFAIA, GUILHERME. The exposure to water with cigarette residue changes the anti-predator

response in female Swiss albino mice. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, p. 8592-8607, 2018.

4 - DA SILVA, IGOR PEREIRA; BRISSOW, ELSON; KELLNER FILHO, LUIS CLAUDIO; SENABIO, JAQUELINE; DE SIQUEIRA, KÁTIA APARECIDA; VANDRESEN FILHO, SAMUEL; DAMASCENO, JAQUELINE LOPES; MENDES, SUZANA AMORIM; TAVARES, DENISE CRISPIM; MAGALHÃES, LIZANDRA GUIDI; JUNIOR, POLICARPO ADEMAR SALES; JANUÁRIO, ANA HELENA; SOARES, MARCOS ANTÔNIO. Bioactive compounds of *Aspergillus terreus*-F7, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 33, p. 1-10, 2017.

5 - ESTRELA, FERNANDA NEVES; RABELO, LETÍCIA MARTINS; VAZ, BONIEK GONTIJO; DE OLIVEIRA COSTA, DENYS RIBEIRO; PEREIRA, IGOR; DE LIMA RODRIGUES, ALINE SUELI; MALAFAIA, GUILHERME. Short-term social memory deficits in adult female mice exposed to tannery effluent and possible mechanism of action. *Chemosphere*, v. 184, p. 148-158, 2017.

6 - BRISSOW, ELSON RUDIMAR; DA SILVA, IGOR PEREIRA; DE SIQUEIRA, KÁTIA APARECIDA; SENABIO, JAQUELINE ALVES; PIMENTA, LETICIA PEREIRA; JANUÁRIO, ANA HELENA; MAGALHÃES, LIZANDRA GUIDI; FURTADO, RICARDO ANDRADE; TAVARES, DENISE CRISPIM; SALES JUNIOR, POLICARPO ADEMAR; SANTOS, JANE LIMA; SOARES, MARCOS ANTÔNIO. 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum*-92C, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. *Parasitology Research*, v. 116, p. 1823-1830, 2017.

7 - SENABIO, JAQUELINE ALVES; DA SILVA, IGOR PEREIRA; SANTOS, JANE LIMA; SOARES, M. A. Antimicrobial and antioxidant activity of endophytic fungi isolated from *Hyptis suaveolens* roots. In: Marcos Antonio Soares; Mário Augusto Gonçalves Jardim. (Org.). *Natural resources in wetlands: from Pantanal to Amazonia*. 1ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2017, v. , p. 115-136.

8 - MENDES, THAIS P. P.; PEREIRA, IGOR; FERREIRA, MARCELLA RODRIGUES; CHAVES, ANDRÉA RODRIGUES; VAZ, BONIEK GONTIJO. 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.

9 - DOMINGOS, ELOILSON; CARVALHO, THAYS C.; PEREIRA, IGOR; VASCONCELOS, GÉSSICA ADRIANA; THOMPSON, CHRISTOPHER;

AUGUSTI, RODINEI; RODRIGUES, RAYZA R. T.; TOSE, LILIAN V.; SANTOS, HELOA; ARAUJO, JOYCE R.; VAZ, BONIEK G.; ROMÃO, WANDERSON. Paper spray ionization mass spectrometry applied to forensic chemistry - drugs of abuse, inks and questioned documents. *Analytical Methods*, v. 9, p. 4400-4409, 2017.

10 - PEREIRA, IGOR; RODRIGUES, STÉFANY R. M.; CARVALHO, THAYS C.; CARVALHO, VERÔNICA V.; SANZ LOBON, GERMAN; BASSANE, JOÃO F.; DOMINGOS, ELOILSON; ROMÃO, WANDERSON; AUGUSTI, RODINEI; VAZ, BONIEK 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.

11 - GUIMARAES, A. T. B.; FERREIRA, R. O.; RABELO, L. M.; SILVA, B. C. E.; SOUZA, J. M.; SILVA, W. A. M.; MENEZES, I. P. P.; RODRIGUES, A. S. L.; VAZ, B. G.; COSTA, D. R. O.; PEREIRA, I.; SILVA, A. R.; MALAFAIA, G. The C57BL/6J mice offspring originated from a parental generation exposed to tannery effluents shows object recognition deficits. *Chemosphere*, v. 164, p. 593-602, 2016.

12 - PEREIRA, IGOR; DE CARVALHO, THAYS; ROMÃO, WANDERSON; FILGUEIRAS, PAULO; LAVIOLA, BRUNO; RODRIGUES, CLENILSON; ABDELNUR, PATRÍCIA; VAZ, BONIEK. Differentiation of toxic and non-toxic leaves of *Jatropha curcas* L. genotypes by leaf spray mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, p. 1461-1466, 2016.

13 - DA SILVA, IGOR PEREIRA. Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. *Enciclopédia Biosfera*, v. 10, p. 3888-3905, 2014.

14 - DA SILVA, IGOR PEREIRA; ANDRADE, CRISTIANO JOSÉ; NEVES, ETNEY. Encapsulamento de óleo de buriti para produção de alimentos funcionais. *Revista CITINO*, v. 2, p. 18-27, 2012.