

# Quantificação de resíduos de pesticidas em alho e cominho com o uso do espectrômetro de massa de alta resolução Orbitrap Exploris 120

Autores: Charles Yang, Ed George,  
Thermo Fisher Scientific, San José, CA

Palavras-chave: Explorador de Pesticidas, Aquisição de Dados Inteligente AcquireX, QuEChERS, Espectrômetro de Massa Orbitrap Exploris 120, Quantificação, Triagem, Massa Exata de Alta Resolução (HRAM), Cominho, Alho, Software TraceFinder



## Objetivo

Desenvolver e pré-validar um método instrumental multirresíduos que possa ser aplicado para a quantificação de resíduos de pesticidas em alho e cominho e que atenda os baixos níveis que exigem as legislações atuais. O **espectrômetro de massa Orbitrap Exploris™ 120 da Thermo Scientific™** foi operado em dois fluxos de trabalho diferentes: o primeiro fluxo de trabalho com o uso de uma Aquisição Independente de Dados de varredura total (FS-DIA) para a quantificação e confirmação, e o segundo com o uso de **um fluxo de trabalho inteligente AcquireXTM da Thermo Scientific™** com exclusão de ruído e aquisição de dados **retrospectiva filtrando** o espectro total, e identificando compostos com base em multiparâmetros. Estes métodos foram testados em relação a uma lista específica de pesticidas, com uma opção para a futura extensão para um número maior de analitos.

## Introdução

A demanda por análises rápidas e simples de uma grande lista multiclassas de pesticidas em diversos tipos de amostras de alimentos está crescendo a cada ano. Em todo o mundo, os pesticidas são utilizados para controlar pragas que são prejudiciais para as plantações, seres humanos e animais. Estas substâncias podem impor um risco significativo à saúde e, portanto, precisam ser detectados com exatidão em baixos níveis. As agências governamentais tipicamente estabelecem níveis máximos permitidos de resíduos de pesticidas em diferentes produtos de origem vegetal e animal, em concentrações abaixo de partes por bilhão (ppb ou µg/kg). Os regulamentos apresentam desafios analíticos significativos com relação aos níveis de quantificação e o grande número de analitos alvo.

Atualmente, os métodos LC de rotina são tipicamente baseados na espectrometria de massa com triplo quadrupolo. Nos últimos anos, os espectrômetros de massa Orbitrap™ da Thermo Scientific™ se tornaram

disponíveis, proporcionando mais confiança na identificação dos compostos com capacidades quantitativas comparáveis à MS/MS quadrupolo triplo. A exatidão da massa (tipicamente inferior a 5 ppm) minimiza as interferências de analitos que coeluem e os compostos extraídos da matriz e, portanto, reduz potencialmente resultados falso-positivos e falso-negativos. A preparação da amostra também é uma parte crítica do fluxo de trabalho. O uso de métodos QuEChERS (Baratos, Fáceis, Rápidos, Efetivos, Robustos e Seguros) tem sido amplamente adotado para a extração de resíduos de pesticidas de uma ampla variedade de matrizes de alimentos, incluindo temperos. Este trabalho descreve os parâmetros de desempenho do método com o novo instrumento Orbitrap de bancada, o espectrômetro de massa Orbitrap Exploris 120 para a quantificação de uma lista específica de pesticidas (Tabela 2) nos ou abaixo dos níveis legislativos (níveis de resíduo máximos - MRLs) em matrizes de cominho e alho. O método otimizado foi verificado de acordo com as diretrizes SANTE/12682/20191 e avaliado em relação à conformidade com as exigências de MRL da UE.

## Experimental

### Consumíveis

Reagentes	Número da parte
Acetonitrila, grau UHPLC-MS	A9561
Formiato de amônio > 99%	A115-50
Acetonitrila, grau UHPLC-MS	A4581
Ácido Fórmico, extra puro para HPLC	28905
Água, grau UHPLC-MS	W8-1

Consumíveis	Número da
Frasco de HPLC da Thermo Scientific™	A4954-010
Tampa/septo de HPLC da Thermo Scientific™	C4010-60A
Accucore™ aQ da Thermo Scientific™ 100 x 2,1 mm 2,6 µm	17326-102130

### Padrões

Todos os padrões de pesticidas foram adquiridos da Agilent Technologies™. Consulte a tabela de resultados para a identidade de todos os pesticidas investigados para a análise específica.

### Preparação de amostras

O cominho e o alho foram adquiridos de um mercado local e analisados em relação aos níveis de base de pesticidas.

### Preparo do padrão de calibração

Um estoque de mistura padrão foi preparado em acetonitrila a 100%, com uma concentração final de 1 µg/mL. Uma curva de calibração em matriz em 6 níveis de concentração, variação de 0,5 a 100 ng/mL, foi preparada através de spiking em extrato branco. Todos os níveis de calibração preparados em matriz (MMS) foram injetados oito vezes/nível, enquanto os calibrantes preparados a partir de extrato de matriz (MES, n = 5) foram testados individualmente em relação à eficiência e reprodutibilidade da extração.

#### Preparo das amostras de branco

1. Pesar 2 g de cada tempero em pó em um tubo cônico de 50 mL
2. Adicionar 15 mL de água com ácido acético a 1% na etapa 1 e misturar por 5 min e deixar repousar em temperatura ambiente por 10 min
3. Adicionar 15 mL de acetonitrila à mistura acima
4. Misturar vigorosamente por 1 minuto em um agitador vórtex
5. Adicionar QuEChERS (6 g de sulfato de magnésio, 1,5 g de acetato de sódio) ao tubo e agitar manualmente, de maneira vigorosa, por 1 min
6. Colocar em um agitador vórtex por 5 min
7. Centrifugar a 4.500 rpm por 5 min em temperatura ambiente
8. Transferir a camada de sobrenadante para um tubo cônico de 15 mL
9. Aspirar 2 mL da etapa 8 e filtrar por um filtro de 0,45 µm em um frasco de HPLC

#### Preparo das amostras correspondentes à matriz (MMS)

1. Pesar 2 g de cada tempero em um tubo cônico de 50 mL
2. **Para amostras MES** - *spike* da mistura de pesticidas a 1 µg/mL para obtenção final de concentrações de níveis 0,5, 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL; deixar a amostra com *spike* repousar à temperatura ambiente por 30 min
3. Para amostras MMS, prosseguir para a próxima etapa
4. Adicionar 15 mL de água com ácido acético a 1% à etapa 1 e misturar por 5 min e deixar repousar à temperatura ambiente por 10 min
5. Adicionar 15 mL de acetonitrila à mistura acima
6. Misturar vigorosamente por 1 min em um agitador vórtex

7. Adicionar sal QuEChERS ao tubo e agitar manualmente, de maneira vigorosa, por 1 min
8. Colocar em um agitador vórtex por 5 min
9. Centrifugar a 4500 rpm por 5 min em temperatura ambiente
10. Aspirar a camada superior em um frasco de 15 mL
11. Aspirar 2 mL da etapa 8 e filtrar por um filtro de 0,45 µm em um frasco cônico de 15 mL
12. Aliquotar em vials de HPLC de 1 mL e constituir níveis de calibração a 0,5, 1, 5, 10, 50 e 100 ng/mL com a mistura estoque

Uma amostra de 1 µL foi injetada em seguida no espectrômetro de massa de LC - Orbitrap Exploris 120 para a análise.

### Análise do instrumento

A análise das amostras foi realizada em um sistema de UHPLC binário Vanquish™ Flex da Thermo Scientific™ acoplado a um espectrômetro de massa Orbitrap Exploris 120.

Separação	
Coluna	Coluna Accucore aQ, 100 x 2,1 mm, 2,6 µm
Temperatura da coluna	25°C
Vazão	0,300 mL/min
Volume de injeção	1 µL
Fase móvel	A: Água com 5 mM de formiato de amônio, ácido fórmico a 0,1% B: Metanol com 5 mM de formiato de amônio, ácido fórmico a 0,1%
Gradiente	Tabela 1

Tabela 1. Programa de gradiente de UHPLC

Tempo [Min]	Velocidade de Fluxo [mL/min]	A%	B%	Curva
0,0	0,300	98	2	5
1,0	0,300	98	2	5
2,0	0,300	50	50	5
9,0	0,300	2	98	5
12,0	0,300	2	98	5
12,1	0,300	98	2	5
15,0	0,300	98	2	5

Configurações do MS Orbitrap Exploris 120	
Voltagem do spray	3,5 kV
Gás da bainha	30 arb
Gás auxiliar	6 arb
Sweep Gas	1 arb
Temp. capilar	290°C
Temp. do vaporizador	350°C
Polaridade iônica	Pos
Varição da massa de varredura total	m/z 100–1100
Resolução da varredura total	60.000
Resolução de DIA	15.000
Isolamento de Q1	m/z 200
ddMS <sup>2</sup>	15.000
Energia de colisão de HCD	nCE em etapas 18, 35, 60
Lente de RF	60

### Aquisição e processamento dos dados

Os dados foram adquiridos e processados com o uso do software TraceFinder™ da Thermo Scientific™ para assegurar a automação total, desde a configuração do instrumento até a coleta dos dados brutos, o processamento e o relato.

**Experimento 1:** Os dados adquiridos no modo FS-DIA foram analisados com uma tolerância de massa de extração de ± 5 ppm tanto para o íon precursor quanto os íons produto. Os analitos foram quantificados com base na massa exata do precursor da varredura total. Além disso, a confirmação dos pesticidas-alvo foi realizada por meio da correspondência de fragmentos dos DIA com o uso de uma biblioteca espectral de alta-resolução de curador.

**Experimento 2:** Em seguida, as amostras foram analisadas em relação a outros contaminantes, com o uso de uma nova função do software de 'mineração de dados' denominada fluxo de trabalho de aquisição de dados inteligente AcquireX. Esta funcionalidade apresenta diversos fluxos de trabalho. Um dos referidos fluxos de trabalho é a subtração de ruído e utiliza uma matriz de branco para gerar automaticamente uma lista de exclusão de coextratos da matriz antes da aquisição, ao mesmo tempo em que utiliza uma lista de inclusão de MS<sup>2</sup> específica com tempos de retenção para a especificidade adicionada em relação aos pesticidas específicos. Os dados foram extraídos com uma tolerância de massa de 5 ppm tanto para o íon precursor quanto para os íons produto de cada pesticida. Os analitos foram primeiramente quantificados no modo full scan e identificados com o uso de uma lista específica de pesticidas com base em biblioteca espectral. Todos os dados foram avaliados seguindo os critérios das Diretrizes SANTE com o uso de EC SANTE/12682/2019.<sup>1</sup>

## Resultados e discussão

**Experimento 1:** A validação interna simplificada para o método de triagem e quantitativo foi realizada para os pesticidas alvo. A linearidade das curvas de calibração para MMS foi avaliada numa faixa de ao de 0,5 a 100 ng/mL, para demonstrar o potencial do método para a análise quantitativa. A seletividade e a sensibilidade do método foram avaliadas por meio da comparação dos brancos (alho e cominho) e das MMS (alho e cominho) (respectivamente). A avaliação foi baseada na massa exata do analito no intervalo do tempo de retenção especificado ( $\pm 0,1$  min). A quantificação com base em aquisição de varredura por MS total com o uso de correspondência monoisotópica, a presença de íons fragmentos, e a correspondência com biblioteca espectral de alta resolução de pesticidas de alta curadoria foi utilizada para a identificação de acordo com as Referências 1 e 2. Os valores de aceitação foram estabelecidos em  $\leq 5$  ppm para a exatidão da massa (FS, DIA e ddMS2),  $\pm 0,1$  min para o tempo de retenção, reprodutibilidade no limite de quantificação (LOQ) e

RSD  $\leq 15\%$  e limite de detecção (LOD) entre 15 e 20% de RSD com no mínimo um fragmento de íon (FI) presente e  $\geq 50\%$  para a correspondência de LS; entretanto, os padrões de relato foram estabelecidos em  $\geq 60\%$  e  $R^2 \geq 0,9800$ . Os valores estabelecidos estão demonstrados na Tabela 2 para o cominho e na Tabela 3 para o alho. A Figura 1 demonstra alguns pesticidas selecionados ao longo da variação do tempo de retenção do método (1 a 10 min); enquanto a Figura 2 demonstra varreduras suficientes entre cada pico para a quantificação exata. As recuperações foram verificadas para o cominho (Tabela 2) e o alho (Tabela 3), para confirmar que o protocolo de extração tenha sido universal para ambas as matrizes em 3 níveis de concentração diferentes (1,3, 6,6, e 13,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e  $n = 5$  réplicas/concentração. Os resultados demonstram recuperações excelentes, entre 70 e 120%. Alguns compostos na variação de 60% demonstraram precisão excelente entre as réplicas e, assim, são permitidos sob a diretriz SANTE, Figura 3A e 3B (respectivamente).

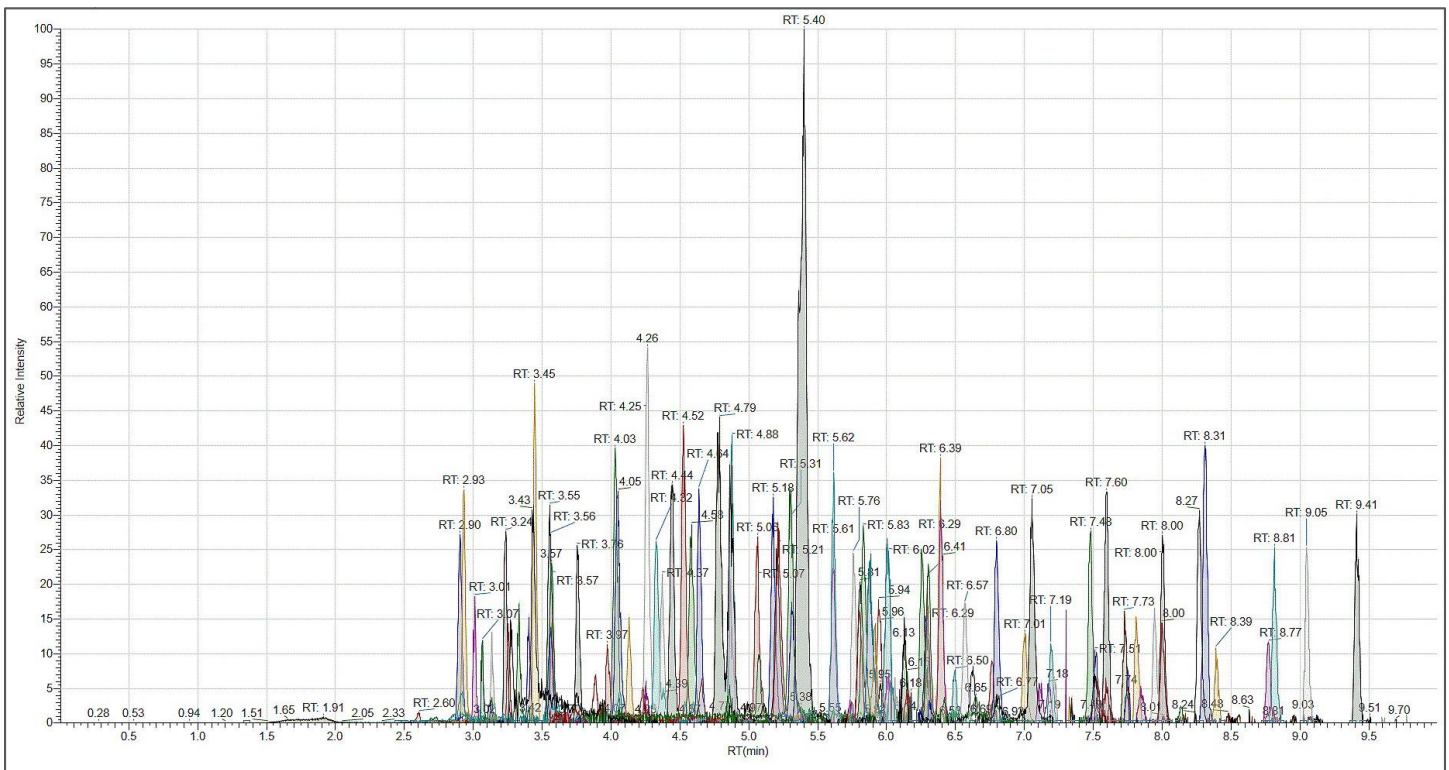


Figura 1. Análise LC-MS robusta demonstra *spike* de 10 ppb de pesticidas em alho (MMS) ao longo da variação do tempo de retenção do método (1 a 10 min) com tolerância de massa extraída de 5 ppm.

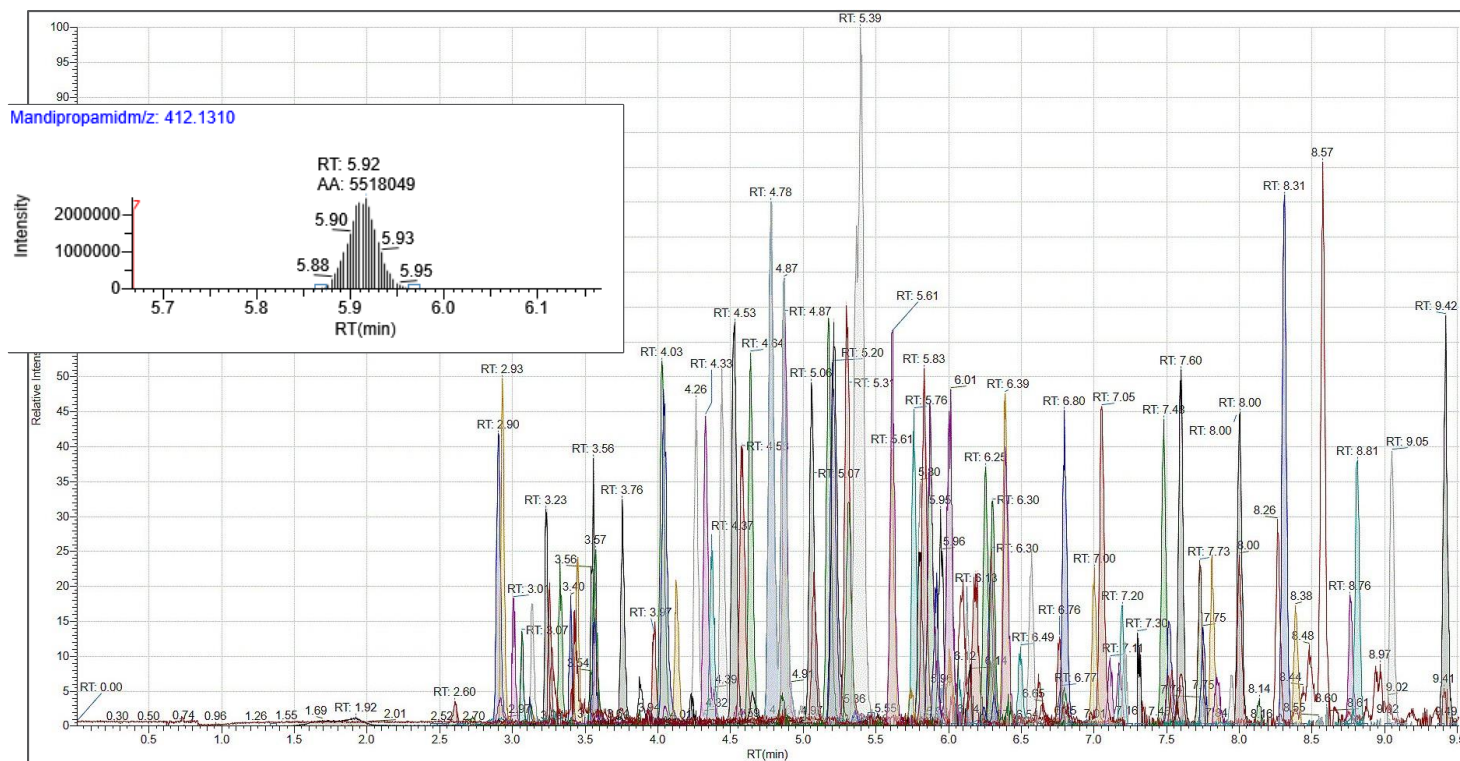


Figura 2. Cromatograma de todos os pesticidas em 15 min em MMS de cominho com *spike* de 10 ppb. O pico destacado em 5,92 min é a mandipropamida, com demonstração em 11 varreduras ao longo do íon de quantificação no modo full scan utilizado para a análise.

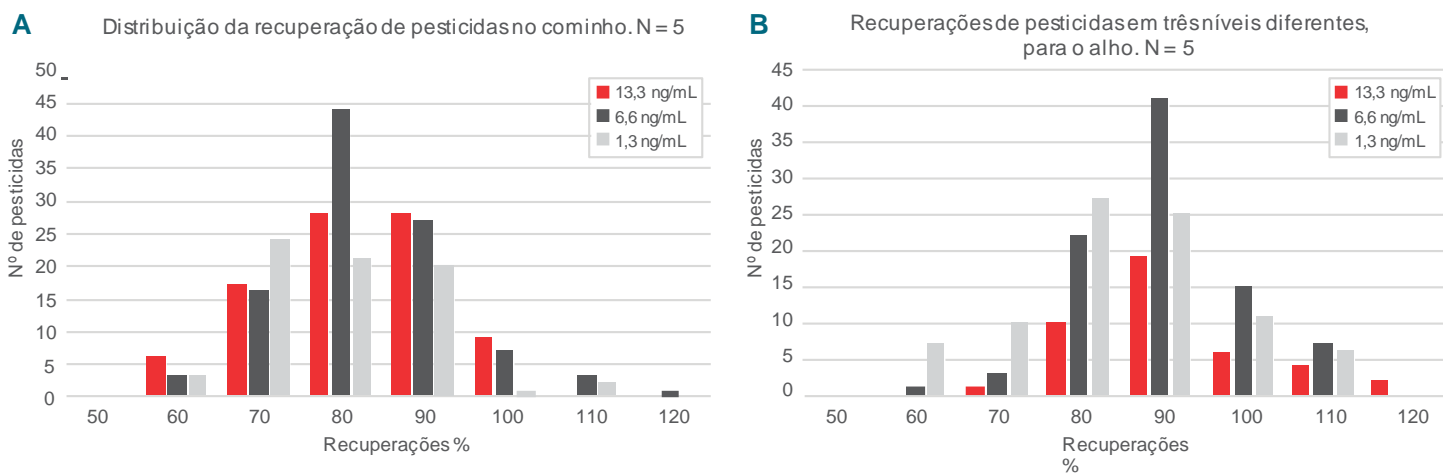


Figura 3. Recuperações de pesticidas no cominho e no alho a 1,3, 6,6 e 13,3 ng/mL para n = 5 réplicas.

Tabela 2. Tabela 2: Resultados para o cominho em amostras correspondentes à matriz.

Composto	TR	R2	LOD (µg/kg)	RSD %	LOQ (µg/kg)	RSD %	m/z (Delta)
Acetamiprida	3,57	0,9958	0,5	5,6	1,0	7,9	-0,5084
Ametrina	5,21	0,9998	0,5	4,0	1,0	3,4	-1,0413
Aminocarb	2,92	0,9912	0,5	4,5	1,0	2,1	-0,7369
Azoxistrobina	5,61	0,9988	0,5	10,9	1,0	6,8	-1,2467
Bupirimato	6,38	0,9995	0,5	9,4	1,0	10,2	-0,7869
Buprofezina	8,00	0,9997	0,5	10,9	1,0	6,3	-0,9227
Butafenacil (M+NH4)	6,28	0,9995	0,5	12,1	1,0	7,1	-1,2822
Carboxina	4,63	0,9999	0,5	4,0	1,0	3,7	-0,6692
Cloroxurona	6,39	0,9997	0,5	7,1	1,0	5,5	-0,9520
Difenoconazol	7,63	0,9995	0,5	19,5	1,0	12,1	-0,3241
Dimetoato	3,56	0,9940	0,5	8,7	1,0	6,3	-0,9419
Diniconazol	7,51	0,9995	0,5	8,7	1,0	5,9	-0,0527
Epoxiconazol	6,57	0,9998	0,5	4,3	1,0	4,4	-0,7599
Fenamidona	5,76	0,9989	0,5	11,4	1,0	4,6	-0,9582
Fenpiroximato	8,81	0,9997	0,5	3,6	1,0	5,2	0,2121
Fluometurona	4,87	0,9997	0,5	7,4	1,0	4,9	-1,5277
Fluoxastrobina	6,29	0,9997	0,5	4,2	1,0	5,9	-1,1107
Furalaxil	5,61	0,9989	0,5	7,6	1,0	5,3	-1,4410
Hexitiazox	8,39	0,9997	0,5	8,6	1,0	7,4	-0,2012
Isoproturona	5,17	0,9995	0,5	4,9	1,0	3,3	-1,2755
Mandipropamida	5,90	0,9991	0,5	7,5	1,0	6,3	-0,7357
Mefenacete	6,25	0,9997	0,5	3,4	1,0	3,3	-1,0224
Metabenztiазurona	5,31	0,9994	0,5	5,7	1,0	4,5	-1,6961
Metamidofós	1,90	0,9998	0,5	4,0	1,0	4,6	-1,4253
Metoprotrina	5,20	0,9998	0,5	6,2	1,0	2,8	-0,5563
Metribuzina	4,37	0,9997	0,5	7,4	1,0	5,1	-1,5369
Monocrotofós	3,25	0,9995	0,5	11,3	1,0	9,0	-1,1697
Monolinurona	4,86	0,9995	0,5	11,7	1,0	9,1	-1,5527
Nitempiram	3,14	0,9992	0,5	5,9	1,0	6,0	-0,7434
Ometoato	2,89	0,9992	0,5	3,5	1,0	2,6	0,4249
Penconazol	7,00	0,9998	0,5	6,4	1,0	6,2	-1,0242
Pencicurom	7,48	0,9996	0,5	7,2	1,0	5,1	-0,9575
Picoxistrobina	6,76	0,9996	0,5	11,7	1,0	3,2	-0,9320
Primicarb	4,04	0,9996	0,5	7,0	1,0	3,4	-0,6881
Prometon	4,76	0,9998	0,5	1,4	1,0	2,7	-0,5873
Prometrina	6,00	0,9989	0,5	20,0	1,0	4,6	-1,2734
Piracarbólida	4,52	0,9998	0,5	3,2	1,0	4,2	-0,6584
Pridabem	9,05	0,9997	0,5	9,5	1,0	5,0	-1,0661
Priproxifena	8,30	0,9998	0,5	3,5	1,0	3,3	-1,0473
Secbumetona	4,93	0,9998	0,5	4,4	1,0	3,1	-0,9921
Sidurona	5,80	0,9983	0,5	11,9	1,0	6,7	-0,7823
Simetrina	4,57	0,9998	0,5	2,5	1,0	2,7	-1,2065
Espirodiclofeno	8,77	0,9997	0,5	10,5	1,0	7,1	-0,7003
Espirotetramato	6,30	0,9997	0,5	6,2	1,0	6,9	-1,1484
Tebufenozida (M-C4H7)	6,79	0,9996	0,5	9,5	1,0	7,8	-0,9949
Tebufenpirade	8,00	0,9995	0,5	20,0	1,0	12,6	-0,3030

Tabela 2. Resultados para o cominho em amostras correspondentes à matriz. (continuação)

Composto	TR	R2	LOD (µg/kg)	RSD %	LOQ (µg/kg)	RSD %	m/z (Delta)
Tebutiurona	4,45	0,9997	0,5	4,7	1,0	4,0	-0,6862
Terbumetona	4,95	0,9997	0,5	3,3	1,0	3,2	-0,3174
Terbutrina	5,86	0,9987	0,5	7,8	1,0	3,7	-0,9583
Tiabendazol	3,55	0,9950	0,5	4,0	1,0	7,0	-1,3843
Tiacloprida	3,74	0,9995	0,5	4,0	1,0	3,6	-0,9874
Triadimefon	6,12	0,9992	0,5	12,2	1,0	11,8	-0,0261
Triciclazol	4,04	0,9994	0,5	4,3	1,0	3,4	-0,5886
Trifloxistrobina	7,59	0,9998	0,5	6,1	1,0	6,0	-0,8379
Triflumizol	7,81	0,9995	0,5	13,1	1,0	7,8	-1,0148
Zoxamida	7,19	0,9996	0,5	7,7	1,0	8,3	-0,6911
Bifenazato	6,29	0,9995	1,0	13,9	1,0	13,9	-2,4550
Carbofurano	4,32	0,9988	1,0	2,3	1,0	2,3	-1,2252
Ciclorona	5,29	0,9988	1,0	14,8	1,0	14,8	-0,4284
Hexaconazol	7,21	0,9994	1,0	14,6	1,0	14,6	0,1396
Metalaxil	5,05	0,9986	1,0	6,2	1,0	6,2	-0,5540
Espinetoram 1	7,84	0,9989	1,0	11,8	1,0	11,8	-2,9761
Tetraconazol	6,49	0,9995	1,0	9,5	1,0	9,5	-0,9881
Imidacloprid	3,40	0,9898	0,5	18,6	5,0	12,5	-1,5872
Acefato	2,73	0,9995	1,0	15,6	5,0	3,0	-0,3301
Benalaxil	7,05	0,9991	1,0	13,0	5,0	3,7	-0,5327
Carbendazim	3,33	0,9944	1,0	19,7	5,0	7,1	-0,7061
Carbetamida	4,15	0,9993	1,0	20,2	5,0	3,2	-1,8131
Cletodim	7,74	0,9991	1,0	15,3	5,0	5,3	0,4107
Dinotefurano	3,00	0,9829	1,0	15,8	5,0	13,4	-1,0205
Fenazaquina	9,42	0,9993	1,0	15,9	5,0	1,9	-1,4203
Fenurona	3,57	0,9893	1,0	17,8	5,0	6,5	-0,9612
Imazalil	5,07	0,9991	1,0	7,3	5,0	1,5	-0,5035
Ipconazol	7,73	0,9996	1,0	9,3	5,0	2,1	-0,3943
Oxadixil	3,98	0,9981	1,0	12,1	5,0	6,6	-2,0355
Benzoximato	7,33	0,9941	5,0	12,9	5,0	12,9	-0,9921
Ciromazina	2,60	0,9957	5,0	2,4	5,0	2,4	-0,7102
Dimetomorfe	6,00	0,9983	5,0	12,4	5,0	12,4	-1,4102
Fempropimorfe	5,82	0,9961	5,0	3,4	5,0	3,4	-0,6058
Flusilazol	6,75	0,9994	5,0	5,8	5,0	5,8	-1,2709
Furatiocarb	7,94	0,9946	5,0	1,7	5,0	1,7	1,5751
Hidrametilnona	7,86	0,9877	5,0	4,5	5,0	4,5	1,0364
Piperonil butoxida	8,13	0,9987	5,0	7,7	5,0	7,7	-0,2175
Propiconazol	7,11	0,9993	5,0	5,7	5,0	5,7	-1,4365
Espiroxamina	6,18	0,9987	5,0	7,2	5,0	7,2	-1,7801
Tiametoxam	3,23	0,9958	5,0	8,3	5,0	8,3	-0,6603
Triadimenol	6,31	0,9985	5,0	5,1	5,0	5,1	-1,0379
Metoxifenzida	6,14	0,9947	1,0	17,0	10,0	11,5	-2,1080
Clorantaniilprol	5,36	0,9987	5,0	11,8	10,0	5,2	-0,4684
Ciproconazol	6,07	0,9968	5,0	15,8	10,0	8,7	-0,4033
Tebufenozida	6,79	0,9570	10,0	8,8	10,0	8,8	0,7806

Tabela 3. Resultados para o alho em amostras correspondentes à matriz.

Composto	TR	R2	LOD (µg/kg)	RSD %	LOQ (µg/kg)	RSD %	m/z (Delta)
Acefato	2,73	0,9988	5,0	10,8	5,0	10,8	-0,8276
Acetamiprida	3,57	0,9765	5,0	3,0	5,0	3,0	-0,6452
Ametrina	5,21	0,9934	0,5	2,0	1,0	1,8	-0,2387
Aminocarb	2,92	0,9951	5,0	16,3	10,0	14,4	-1,4665
Azoxistrobina	5,61	0,9962	0,5	3,2	1,0	1,4	-0,1139
Benalaxil	7,05	0,9995	0,5	2,7	1,0	1,6	0,1222
Benzoximato	7,33	0,9986	1,0	6,7	1,0	6,7	-0,1539
Bifenazato	6,29	0,9988	0,5	3,5	1,0	1,7	-1,2390
Bitertanol	7,35	0,9994	0,5	6,4	1,0	3,5	2,3752
Bupirimato	6,38	0,9995	0,5	2,8	0,5	2,8	-0,0171
Buprofezina	8,00	0,9990	0,5	2,6	0,5	2,6	-0,2250
Butafenacil (M+NH4)	6,28	0,9996	0,5	3,3	0,5	3,3	1,5084
Carbetamida	4,15	0,9890	5,0	1,3	5,0	1,3	-0,9122
Carbofurano	4,32	0,9880	5,0	2,6	5,0	2,6	-1,1565
Carboxina	4,63	0,9930	0,5	15,5	5,0	3,4	-0,6046
Clorantraniliprol	5,36	0,9892	5,0	3,2	5,0	3,2	0,3547
Cloroxurona	6,39	0,9997	0,5	3,8	0,5	3,8	-0,6375
Cletodim	7,74	0,9992	0,5	4,6	0,5	4,6	-1,3688
Clotianidina	3,44	0,9592	5,0	6,8	5,0	6,8	-1,3778
Ciclurona	5,29	0,9941	5,0	8,8	5,0	8,8	0,0312
Ciproconazol	6,07	0,9976	0,5	4,2	1,0	2,4	0,4325
Ciromazina	2,60	0,9969	0,5	14,8	1,0	7,6	-3,2670
Difenoconazol	7,63	0,9989	0,5	4,6	1,0	3,3	0,1268
Dimetoato	3,56	0,9844	5,0	3,3	5,0	3,3	-0,9419
Dimetomorfe	6,00	0,9976	0,5	3,0	1,0	2,4	-0,4667
Diniconazol	7,51	0,9981	0,5	7,6	1,0	3,6	-0,0527
Dinotefurano	3,00	0,9928	1,0	6,7	1,0	6,7	0,1815
Epoxiconazol	6,57	0,9997	0,5	6,5	1,0	6,9	-0,4826
Fenamidona	5,76	0,9966	0,5	2,5	1,0	1,7	0,3129
Fenazaquina	9,42	0,9995	0,5	6,3	1,0	6,0	0,1693
Fembuconazol	6,66	0,9976	50,0	4,1	50,0	4,1	0,3916
Fempropimorfe	5,82	0,9978	0,5	3,6	1,0	1,7	-0,1043
Fenpiroximato	8,81	0,9992	0,5	4,7	0,5	4,7	-0,2939
Fenurona	3,57	0,9799	5,0	2,9	5,0	2,9	-0,9612
Fluometurona	4,87	0,9959	1,0	16,7	5,0	4,9	0,0434
Fluoxastrobina	6,29	0,9992	0,5	3,4	0,5	3,4	-0,5789
Flusilazol	6,75	0,9974	1,0	2,9	1,0	2,9	0,9495
Furalaxil	5,61	0,9963	0,5	2,6	0,5	2,6	-0,5319
Furatiocarb	7,94	0,9998	50,0	0,3	50,0	0,3	-0,4160
Hexaconazol	7,21	0,9998	0,5	3,9	0,5	3,9	-1,2207
Hexitiazox	8,39	0,9997	0,5	1,4	0,5	1,4	-0,1148
Hidrametilnona	7,86	0,9960	1,0	18,0	5,0	6,9	0,8515
Imazalil	5,07	0,9916	5,0	10,3	10,0	8,8	-1,6335
Imidacloprid	3,40	0,9512	5,0	7,4	5,0	7,4	-0,7529
Ipconazol	7,73	0,9993	0,5	3,9	0,5	3,9	-1,1249
Isoprotrurona	5,17	0,9938	0,5	12,6	1,0	3,1	-1,1282
Mandipropamida	5,90	0,9987	0,5	3,2	0,5	3,2	-0,3655



Tabela 3. Resultados para o alho em amostras correspondentes à matriz. (continuação)

Composto	TR	R2	LOD (µg/kg)	RSD %	LOQ (µg/kg)	RSD %	m/z (Delta)
Mefenacete	6,25	0,9987	0,5	3,3	0,5	3,3	-0,0021
Metalaxil	5,05	0,9919	5,0	16,0	10,0	7,1	-1,2076
Metabenzotiazurona	5,31	0,9938	0,5	2,5	1,0	2,0	-0,5967
Metamidofós	1,90	0,9990	5,0	0,9	10,0	1,4	-0,9955
Metoprotrina	5,20	0,9938	0,5	3,3	5,0	3,7	-0,2199
Metoxifenoazida	6,14	0,9983	0,5	5,6	1,0	8,1	0,1237
Metribuzina	4,37	0,9890	1,0	10,5	5,0	2,5	-0,4019
Mexacarbato	3,54	0,9746	5,0	9,6	5,0	9,6	-0,6659
Monolinurona	4,86	0,9947	5,0	17,2	10,0	8,8	-1,0561
Nitempiram	3,14	0,9977	0,5	18,2	5,0	11,9	-0,9685
Omatoato	2,89	0,9994	0,5	7,3	1,0	2,2	-0,2881
Oxadixil	3,98	0,9870	5,0	1,7	5,0	1,7	-0,1769
Penconazol	7,00	0,9998	0,5	2,5	0,5	2,5	1,0170
Pencicrom	7,48	0,9992	0,5	2,1	0,5	2,1	-0,7721
Picoxistrobina	6,76	0,9993	1,0	5,1	1,0	5,1	2,1354
Piperonil butoxida	8,13	0,9988	5,0	2,8	5,0	2,8	-0,8172
Primicarb	4,04	0,9895	0,5	15,9	5,0	1,1	-1,3899
Procloraz	7,26	0,9993	1,0	4,1	1,0	4,1	-0,6600
Prometon	4,76	0,9947	0,5	7,2	0,5	7,2	-0,3174
Prometrina	6,00	0,9982	0,5	2,8	1,0	1,3	0,2390
Propiconazol	7,11	0,9996	0,5	6,2	1,0	4,8	-0,0983
Piracarbolidia	4,52	0,9927	0,5	11,1	1,0	4,9	-0,3087
Piraclostrobina	7,31	0,9992	0,5	2,9	0,5	2,9	-0,7722
Pridabem	9,05	0,9996	0,5	4,3	1,0	4,5	0,6890
Pirimetanil	5,80	0,9967	0,5	2,0	1,0	1,4	-0,0508
Priproxifena	8,30	0,9994	0,5	1,7	0,5	1,7	-0,3842
Secbumetona	4,93	0,9945	5,0	16,3	10,0	7,9	-0,7222
Sidurona	5,80	0,9974	0,5	2,9	1,0	2,0	0,1993
Simetrina	4,57	0,9933	1,0	19,8	5,0	3,1	1,0027
Espinorram 1	7,84	0,9986	0,5	4,9	1,0	3,2	-1,0191
Espirodiclofeno	8,77	0,9968	0,5	2,2	1,0	2,3	-0,1807
Espirotetramato	6,30	0,9995	0,5	2,9	0,5	2,9	-0,1698
Espiroxamina	6,18	0,9991	0,5	12,2	1,0	3,4	-0,0407
Tebufenozida	6,79	0,9995	1,0	3,5	5,0	4,0	-0,0834
Tebufenozida (M-C4H7)	6,79	0,9997	0,5	2,2	1,0	1,0	0,2374
Tebufenopirade	8,00	0,9997	0,5	2,7	1,0	1,3	0,4276
Tebutiurona	4,45	0,9915	0,5	6,8	1,0	4,5	0,3128
Terbumetona	4,95	0,9944	5,0	16,4	10,0	7,7	-1,5993
Terbutrina	5,86	0,9978	1,0	1,5	5,0	1,3	-0,5802
Tetraconazol	6,49	0,9994	0,5	8,6	1,0	2,8	-0,9881
Tiabendazol	3,55	0,9793	1,0	18,4	5,0	3,1	-0,0249
Tiacloprida	3,74	0,9817	5,0	2,2	5,0	2,2	0,0981
Triadimefon	6,12	0,9984	0,5	3,4	1,0	2,9	-0,2337
Triadimenol	6,31	0,9985	1,0	7,1	1,0	7,1	-1,7593
Triciclazol	4,04	0,9880	0,5	18,7	5,0	1,6	-0,8294
Trifloxistrobina	7,59	0,9990	0,5	4,4	0,5	4,4	-0,1666
Triflumizol	7,81	0,9987	0,5	2,7	0,5	2,7	0,2197
Zoxamida	7,19	0,9993	0,5	3,9	0,5	3,9	0,7620

Experimento 2: A implementação do fluxo de trabalho de aquisição no modo AcquireX também auxilia na identificação de contaminados específicos e desconhecidos, com o uso de uma rotina única, para criar automaticamente uma lista de exclusão com base na análise por LC-MS do branco da matriz. O método do instrumento é atualizado automaticamente com a lista de exclusão, de modo que quando as amostras subsequentes são analisadas, os experimentos de MS<sup>2</sup> não são realizados nos sinais de base da matriz. Como resultado, mais tempo de ciclo é despendido no acionamento de MS<sup>2</sup> nos íons de interesse relevantes. Isto é inovador para o processamento de dados, porque minimiza os falso-positivos e falso-negativos. O software TraceFinder pode processar com eficiência

estes novos arquivos de dados complexos e extrai os resultados para ambos os fluxos de trabalho de quantificação específica e triagem desconhecida. O software TraceFinder pode passar facilmente de um fluxo de trabalho de quantificação específico para um fluxo de trabalho de triagem desconhecido, simplesmente selecionado uma caixa (Figura 4). O software pode utilizar rapidamente opções multipesquisas, desde bibliotecas espectrais customizadas até as múltiplas bibliotecas de espectros mzCloud™ da Thermo Scientific™ até a pesquisa na base de dados *online* ChemSpider™, utilizando a característica de Pesquisa Exaustiva, que pode passar de uma opção de pesquisa para a próxima, para assegurar que os melhores resultados sejam mostrados de cada um dos critérios de busca (Figura 5).

Figura 4. O software TraceFinder é facilmente configurável para realizar um fluxo de trabalho específico ou de triagem desconhecida.

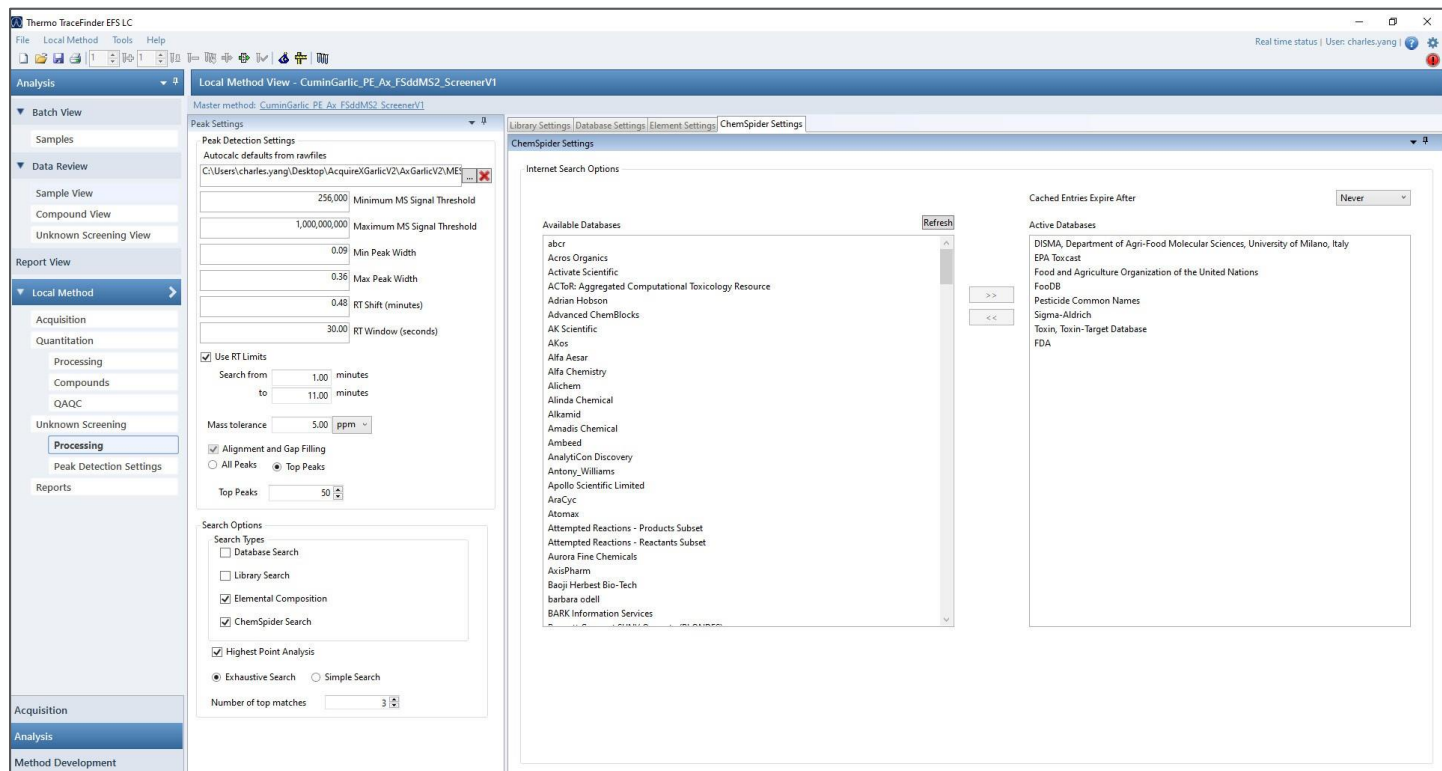
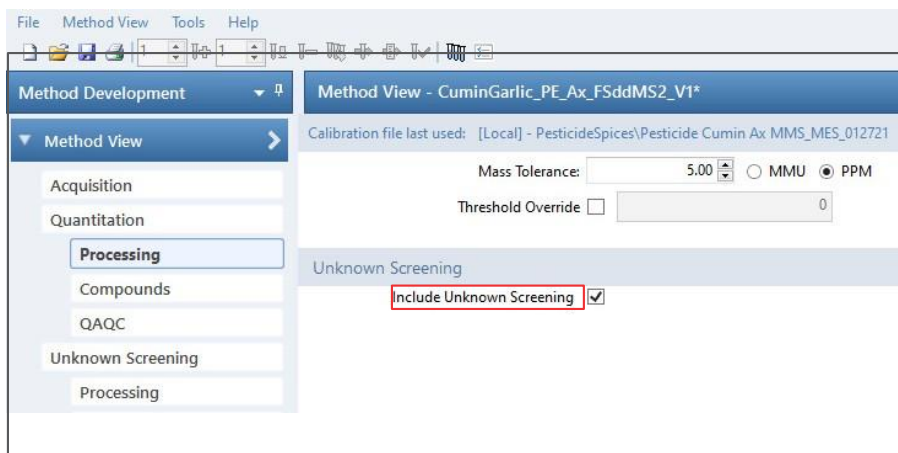


Figura 5. Os parâmetros de pesquisa desconhecida são facilmente ativados ao selecionar a caixa. As capacidades para a pesquisa em múltiplas bibliotecas espectrais mzCloud proporcionam a você a confiança da correspondência exata ou da base de dados específica *online* no ChemSpider.

A Figura 6 retrata a seção de revisão de dados rápida e fácil do fluxo de trabalho de quantificação com grades classificáveis e informativas na parte inferior. O composto destacado Fenpiroximato é demonstrado como um exemplo de exatidão de massa consistente do espectrômetro de massa Orbitrap Exploris 120.

Apenas aqueles alvos “não identificados” da seção anterior serão movidos para baixo na seção desconhecida, para serem adicionalmente identificados com o uso das diferentes bases de dados *online* ou bases de dados locais que não foram utilizadas anteriormente.

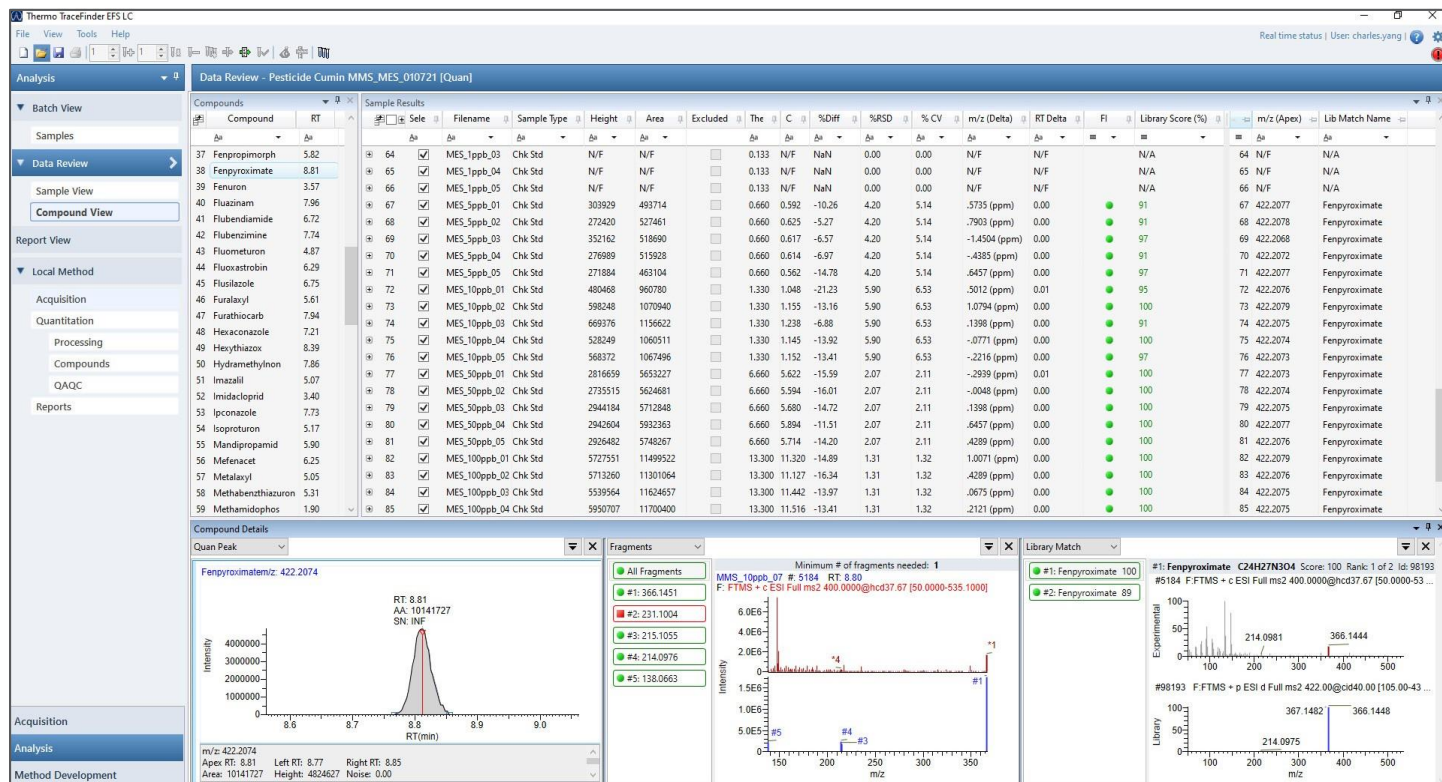


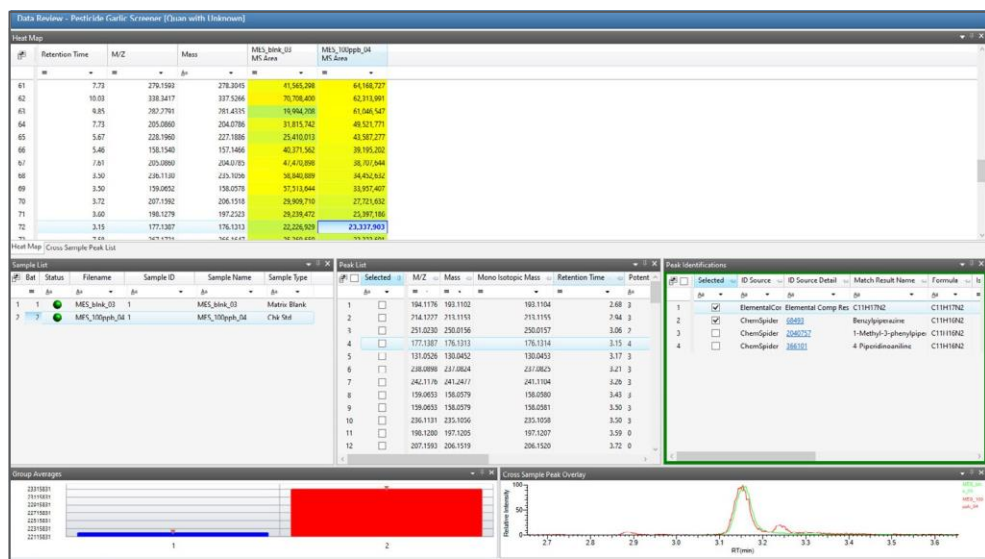
Figura 6. Uma rápida visão geral da quantificação de Fenpiroximato com uma pontuação da biblioteca de 100% e  $\Delta$ ppm de  $\leq 1$  ppm no nível de concentração de 10 ppb demonstrado acima.

Na Figura 7, a composição elementar e a base de dados ChemSpider foram utilizadas para identificar e rotular o(s) composto(s) provável(is) em questão. Para o cominho, um desconhecido foi identificado como ácido elaidolinoleico (Figura 8).

Um composto único, denominado 1-dodecil-2-pirrolidinona, foi identificado por meio de tentativas e mais pesquisas deverão ser realizadas no composto para confirmar a sua identidade (Figura 9). Para as amostras de alho, diversos compostos foram identificados;

(p. ex., octiliona, que é um agente fungicida e antibacteriano utilizado para o tratamento do cancro e de outras doenças fúngicas e bacterianas em árvores frutíferas). O proxano é um fármaco não esteroide anti-inflamatório utilizado para o tratamento da dor ou da inflamação em seres humanos, que pode ter sido transportado por meio do fornecimento de água até a fazenda. Ambos os compostos foram identificados por meio do ChemSpider, mas pesquisas adicionais deverão ser realizadas para a sua confirmação (Figura 10 e 11, respectivamente).

**Figura 7. Visão geral rápida da triagem desconhecida, onde a identificação é listada rapidamente. Aqui está um exemplo destacado de benzilpiperazina encontrada na amostra de alho, que não foi especificada.**



**Figura 8. Visão geral rápida da triagem desconhecida, que encontrou um desconhecido e identificou como Ácido elaidolinoleico.**

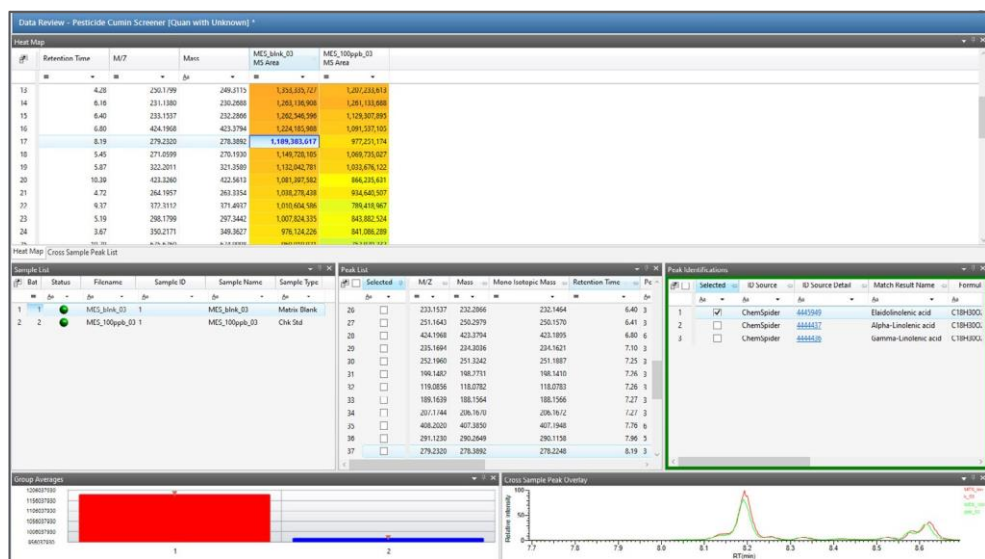


Figura 9. Um composto único, denominado 1-dodecil-2-pirrolidinona, também foi identificado.

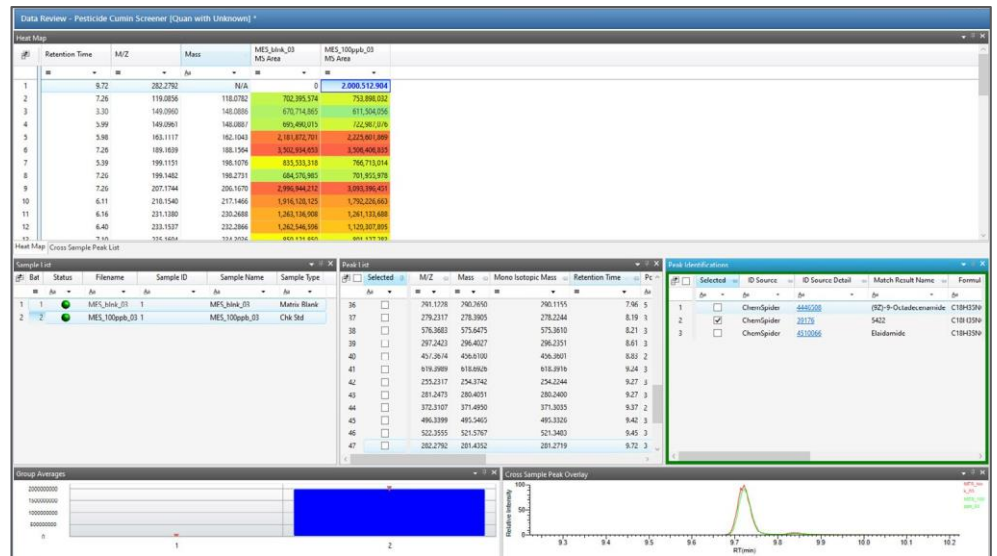


Figura 10. A octilina - um fungicida, foi identificada no alho.

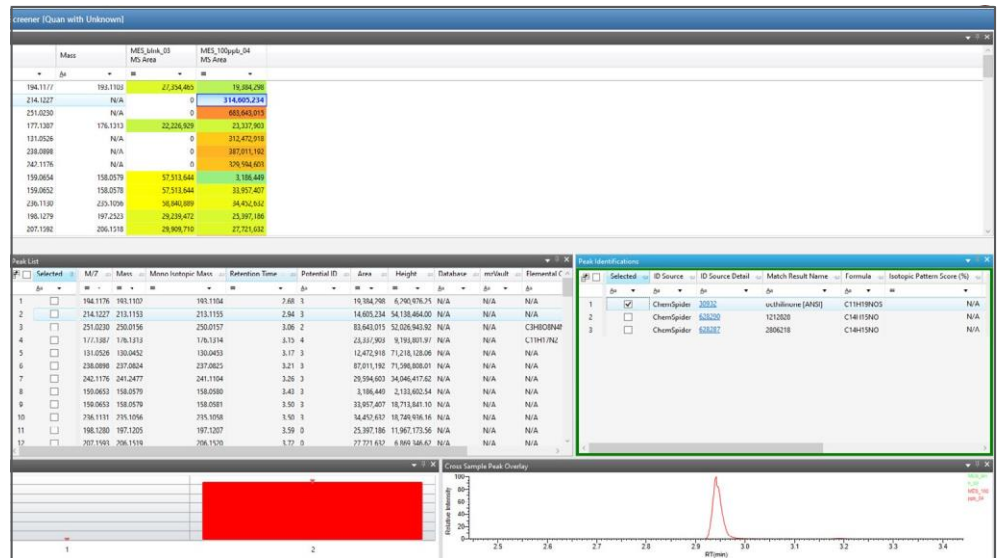
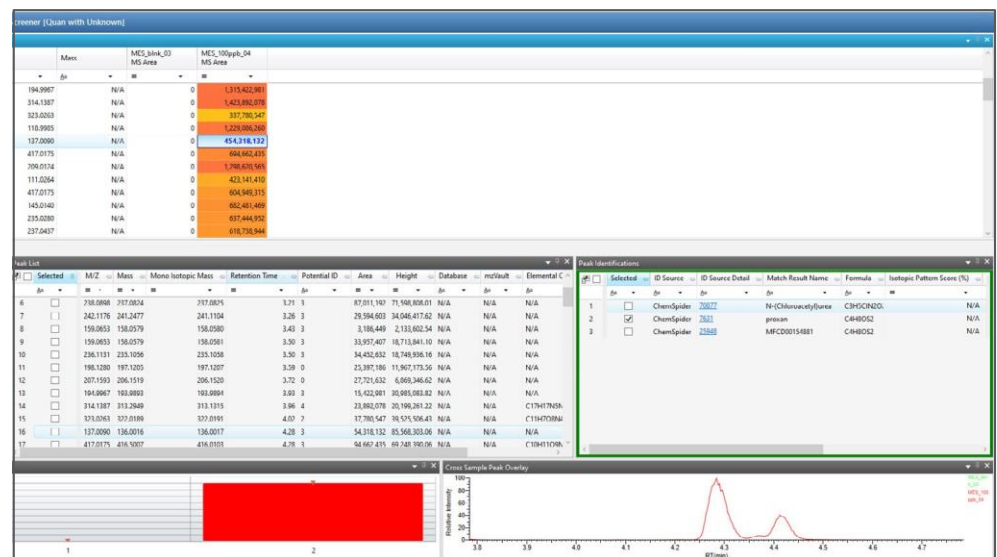


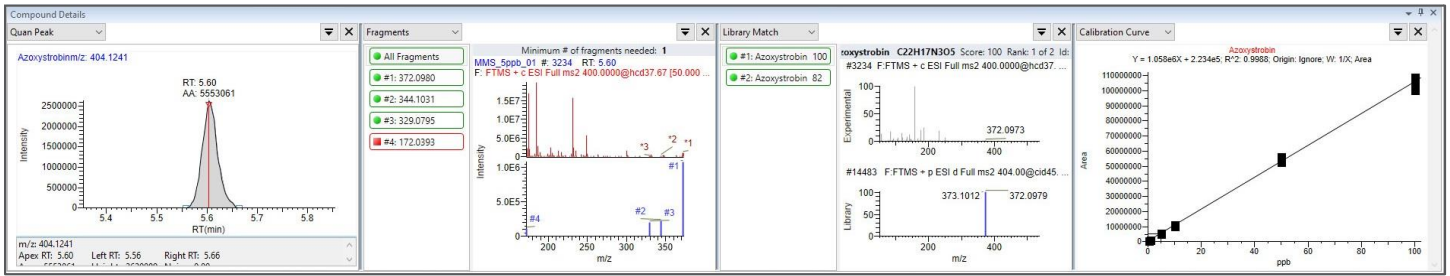
Figura 11. O proxano - fármaco anti-inflamatório, também foi identificado no alho.



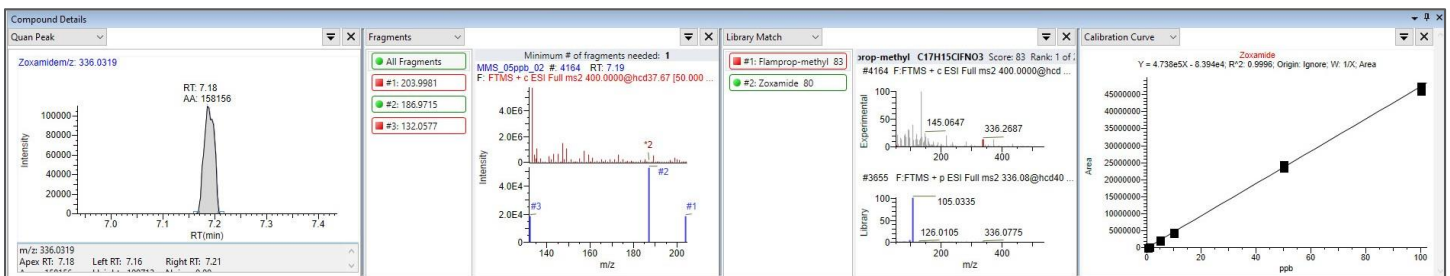
A Figura 12A-12D demonstra as curvas de calibração típicas (0,5 a 100 ng/mL) para Azoxistrobina, Zoxamida, Triflumizolem e Mefenacete no cominho e no alho (respectivamente). Mais de 95% dos pesticidas estudados apresentaram curvas de calibração com  $r^2 > 0,990$  (Tabelas 2 e 3). Os íons fragmentos de confirmação estão demonstrados na parte intermediária de cada painel a 0,5, 1 e 5 ng/mL para cada pesticida, com destaques coloridos (verdes) indicadores que são facilmente visíveis para demonstrar a passagem dos fragmentos de íons e os critérios de biblioteca de espectros locais de mzCloud de curador.

Um método de 100 pesticidas foi desenvolvido e otimizado, para assegurar que no mínimo um fragmento de íon fosse detectado por composto, enquanto os LODs e LOQs foram determinados conforme descrito pela Diretriz SANTE (SANTE/12682/2019).2

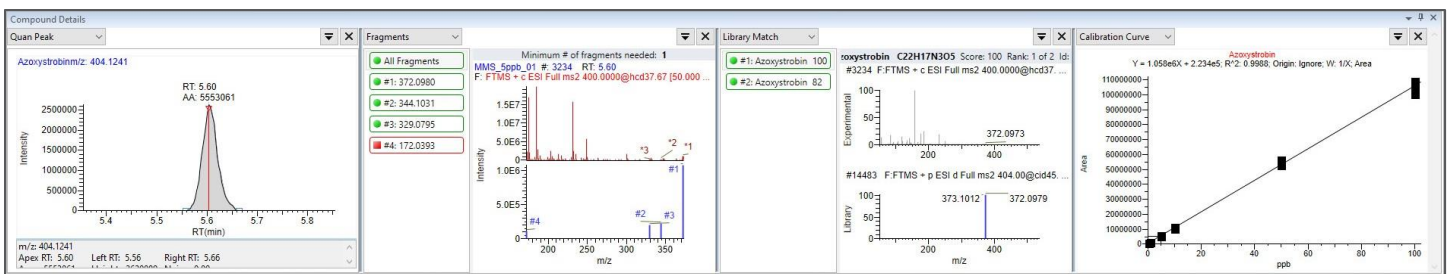
#### A) Azoxistrobina



#### B) Zoxamida



#### C) Triflumizolem



#### D) Mefenacete

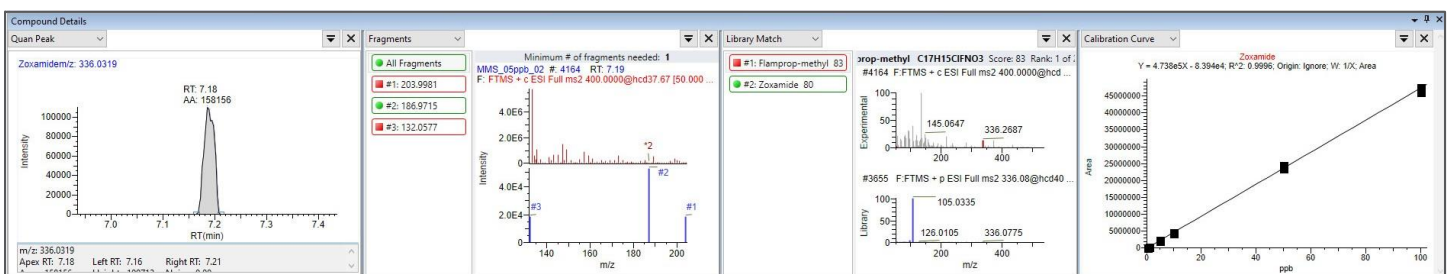


Figura 12. A quantificação e os íons de confirmação, junto com curva de calibração variando de 0,5 a 100 ppb para Azoxistrobina (A e B no Cominho) a 5 ppb e Zoxamida a 0,5 ppb e (C e D no Alho) Triflumizolem a 0,5 ppb e Mefenacete a 1 ppb demonstrados no software TraceFinder. Todos os resultados apresentam correspondência excelente dos fragmentos de íons de R2 e MS2. A técnica possibilita a quantificação e a triagem com confiança, com confirmação bem abaixo da ou na concentração de MRL.

## Conclusão

Um painel específico de pesticidas selecionado para a análise quantitativa em níveis inferiores aos MRLs da UE demonstrou proporcionar sensibilidade e robustez excelentes no cominho e no alho. O software TraceFinder proporciona a flexibilidade para identificar rapidamente uma contaminação desconhecida nas amostras. A capacidade de pesquisar as bases de dados *online* ajuda a identificar desconhecidos, tendo em vista a excelente exatidão de massa e o poder de alta resolução do espectrômetro de massa Orbitrap Exploris 120. Estas características reduzem significativamente o número de IDs possíveis e o novo fluxo de trabalho AcquireX, com o uso da subtração de ruído automática, facilita a identificação. O trabalho contínuo é necessário para determinar as substâncias químicas desconhecidas verdadeiras, seja por meio de síntese química, NMR ou outras técnicas para comprovar a autenticidade das identificações desconhecidas.

## Referências

1. SANTE Guidelines [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance\\_SANTE\\_2019\\_12682.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf) (acesso em Mar. 2021).
2. SANTE Guidelines [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_2017-11813.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf) (acesso em Mar. 2021).

Saiba mais em [thermofisher.com/pesticides](https://thermofisher.com/pesticides)