

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DENISE CARVALHO MELLO

**RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ERVAS VEGETAIS - VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS POR UHPLC-MS/MS E ANÁLISE**

BRASÍLIA – DF

2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DENISE CARVALHO MELLO

**RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ERVAS VEGETAIS - VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS POR UHPLC-MS/MS E ANÁLISE**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Eloisa Dutra Caldas

BRASÍLIA – DF

2023

DENISE CARVALHO MELLO

**RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ERVAS VEGETAIS - VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS POR UHPLC-MS/MS E ANÁLISE**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 12 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Eloisa Dutra Caldas – Presidente
Universidade de Brasília

Dra. Ionara Regina Pizzutti
Universidade Federal de Santa Maria

Dra. Andreia Nunes Oliveira Jardim
BASF

Dra. Patricia Diniz Andrade
Universidade de Brasília

Dr. Peter Rembischevski
Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Suplente

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Reinaldo e Edna, pelo apoio emocional e por terem me ajudado a não desistir. Às minhas irmãs, Adriana e Amanda. Todos me deram tanto apoio, que eu não teria espaço para descrever tudo. Minha mãe me ajudou tanto, inclusive no laboratório. Meu pai, que me levou para a UnB de madrugada para que eu pudesse adiantar o trabalho. Minhas irmãs, que se preocuparam comigo e tentaram me ajudar como possível.

À professora Eloisa, pela orientação, ensinamentos e incentivo. Por acreditar em mim, quando eu mesma não acredito.

À CAPES, FAP, Ministério da Justiça e Universidade de Brasília pelo apoio financeiro.

À Nayara pela amizade, conversas, ensinamentos, companheirismo.

À Ana Júlia por ter ajudado na primeira etapa da realização desse trabalho.

À Camila pela amizade e por ter ajudado no preparo das amostras e à Ágatha, por ter destilado o dimetil sulfato, que foi essencial na etapa final do trabalho.

À Gabriele, que ficou pouco tempo, mas me ajudou em uma etapa do trabalho, além de descontrair nos momentos difíceis.

À Patrícia Diniz, Joseane, Beatriz, Gabriel, Esmeralda, Larissa, Cláudia, Ettore, Patrícia Montes e todos do laboratório que de alguma forma estiveram presentes ao longo dessa trajetória. Obrigada pela amizade, companheirismo e toda a ajuda.

À Sabrina Castro, Laura Pacheco, Thiago Cebolo e David Arty pela paciência nos últimos momentos do Doutorado, em que não pude me dedicar ao trabalho como eu deveria.

Resumo

Ervas vegetais são usadas para o preparo de chás e como material para a fabricação de medicamentos fitoterápicos e ambos são muito utilizados pela população. Entretanto, elas podem conter contaminantes e resíduos que podem representar riscos à saúde dos consumidores, portanto, seus níveis devem ser monitorados. Nesse trabalho, métodos por UHPLC-MS/MS para determinação multirresíduo de pesticidas (MMR), etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC, mancozebe e metiram) e seu produto de degradação etilenotioureia (ETU), responsável pela toxicidade crônica dessa subclasse, foram validados em ervas vegetais secas. A extração das amostras no método MMR é feita com acetonitrila (ACN) acidificada, sulfato de magnésio (MgSO_4) e acetato de sódio (CH_3COONa), e purificação por fase sólida dispersiva com amina primária secundária (PSA). O preparo de amostra no método EBDC inclui a complexação com EDTA em meio alcalino, derivatização em EBDC-dimetil utilizando solução de dimetil sulfato em ACN, seguido de adição de MgSO_4 e cloreto de sódio (NaCl) e PSA. No método ETU, as amostras são extraídas com ACN, adicionando L-cisteína, seguido de MgSO_4 , NaCl e PSA. Mistura de sete plantas (flor, folha, caule e casca) foi usada como controle para a validação dos métodos. Os métodos foram aplicados para análise de amostras de 33 diferentes tipos de ervas. O MMR foi validado para 65 pesticidas e o limite de quantificação (LOQ) variou entre 0,005 e 0,025 mg kg^{-1} ; das 75 amostras analisadas, 35% foram positivas (\geq limite de detecção, LOD) para pelo menos um pesticida, sendo o carbendazim (até 1,602 mg kg^{-1}) e o imidacloprido os mais detectados (38,7 e 30,7% das amostras positivas, respectivamente). Mancozebe foi utilizado para validação do método EBDC, com LOQ de 0,03 mg kg^{-1} (0,02 mg kg^{-1} CS_2); 16,5% das 103 amostras analisadas foram positivas para EBDC (\geq LOD, até 1,05 mg kg^{-1} ou 0,59 mg kg^{-1} de CS_2). Nenhuma das 89 amostras analisadas para ETU (LOQ de 0,03 mg kg^{-1}) foi positiva. No Brasil, somente dois pesticidas têm registro para uso em ervas vegetais analisadas neste estudo (linuron em camomila e metomil em amora), indicando o uso indevido de pesticidas no campo. A ingestão diária dos pesticidas pelo consumo de chá preparado com as ervas vegetais analisadas variou entre 0,002 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pc (peso corpóreo) (tebuconazol, cáscara sagrada) e 0,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pc (carbendazim, camomila), o que não representa risco potencial aos consumidores. Os resultados desse estudo indicam a importância de se analisar ervas vegetais quanto à presença de pesticidas, que não podem ser usados quando a destinação da planta é o preparo de medicamentos.

Palavras-chave: drogas vegetais; pesticidas; UHPLC-MS/MS, ditiocarbamatos; etileno-bis-ditiocarbamatos; mancozebe; etilenotioureia.

Abstract

Dry medicinal herbs are used for tea preparation, and as material for phytotherapy medicines, and both are largely used by the population. However, they may contain contaminants and residues that may pose a risk health to consumers, and their levels should be monitored. In this work, UHPLC-MS/MS methods for multiresidue pesticides (MMR), ethylene-bis-dithiocarbamates (EBDC, mancozeb and metiram), and its degradation product ethylenethiourea (ETU), responsible for chronic toxicity of this subclass, were validated in different dry herbs. Sample extraction in the MMR method is performed with acidified acetonitrile (ACN), magnesium sulfate ($MgSO_4$), and sodium acetate (CH_3COONa), followed by purification by dispersive solid-phase with secondary primary amine (PSA). Sample preparation for determination of EBDC includes complexation with EDTA in alkaline medium, derivatization to form EBDC-dimethyl using dimethyl sulfate, followed by addition of $MgSO_4$, sodium chloride (NaCl), and PSA. In the ETU method, samples are extracted with ACN, adding L-cysteine, followed by $MgSO_4$, NaCl, and PSA. A mixture of seven plants (flower, leaf, stem and bark) was used as control for method validations, which were applied to analyze samples of 33 different types of plants. MMR was validated for 65 pesticides, and the limit of quantification (LOQ) ranged from 0.005 to 0.025 $mg\ kg^{-1}$; 35% of the 75 samples analyzed were positive (\geq the limit of detection, LOD) for at least one pesticide, with carbendazim (up to 1.602 $mg\ kg^{-1}$), and imidacloprid being the most detected (38.7 and 30.7% of positive samples, respectively). Mancozeb was used to validate the EBDC method, with LOQ of 0.03 $mg\ kg^{-1}$ (0.02 $mg\ kg^{-1}\ CS_2$); 16.5% of the 103 analyzed samples were positive for EBDC (\geq LOD, up to 1.05 $mg\ kg^{-1}$ or 0.59 $mg\ kg^{-1}\ CS_2$). None of the 89 samples analyzed for ETU (LOQ of 0.03 $mg\ kg^{-1}$) were positive. Only two of the analyzed pesticides are registered in Brazil for use in the investigated herbs (linuron in chamomile, and methomyl in black mulberry), indicating that good agricultural practices are not being applied in herb cultivation. The daily intake of pesticides through the consumption of the dry medicinal herbs analyzed ranged from 0.002 $\mu g\ kg^{-1}\ bw$ (body weight) (tebuconazole, cascara buckthorn) to 0.8 $\mu g\ kg^{-1}\ bw$ (carbendazim, chamomile), and does not represent a potential risk to consumers. The results of this study indicate the need to analyze herbs regarding pesticides, which cannot be used when the plants are to be used for medicine preparation.

Keywords: *dry herbs; pesticides; UHPLC-MS/MS, dithiocarbamates; ethylene-bis-dithiocarbamates; mancozeb; ethylenethiourea.*

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Ácidos utilizados como matéria-prima na produção dos pesticidas organofosforados.	17
Figura 2 – Inseticidas organofosforados investigados neste estudo (Fonte: ANVISA, 2023a).	19
Figura 3 – Ácido utilizado como matéria-prima na síntese dos pesticidas carbamatos.	19
Figura 4 – Inseticidas carbamatos investigados nesse estudo (Fonte: ANVISA, 2023a).	20
Figura 5 – Estrutura do piretróide do Tipo II deltametrina. A estrutura básica dos piretróides consiste em uma porção ácido e uma porção álcool. Piretróides do Tipo II possuem um grupo ciano no carbono α da porção álcool (Adaptado de Hughes et al., 2012).	21
Figura 6 – Alguns inseticidas piretróides registrados no Brasil, dos quais a fenpropatrina foi investigada nesse estudo. Com exceção da bifentrina, todos possuem toxicidade Tipo II por conterem o grupo ciano (CN) na molécula (ANVISA, 2023a; Jardim, 2012).	21
Figura 7 – Fungicidas triazóis investigados nesse estudo (ANVISA, 2023a)	22
Figura 8 – Estruturas relacionadas aos ditiocarbamatos. (A) ácido ditiocarbâmico, carbamato e ditiocarbamato; (B) Síntese dos ditiocarbamatos (Kanchi et al., 2013); (C) Brassinin.....	23
Figura 9 – Decomposição dos etileno-bis-ditiocarbamatos e reações que levam à formação de etilenotiourea (ETU) (IPCS, 1988).	24
Figura 10 – (a) Sistema vertical de hidrólise de fungicidas ditiocarbamatos para análise espectrofotométrica. (b) Reação de hidrólise do tiram e formas de determinação do CS ₂ formado (Adaptado de Mozzaquatro et al., 2019).	37
Figura 11 – Sequência de reação para determinação de EBDC (M = metal) utilizando o método de metilação (Hayama e Takada, 2008).....	39
Figura 12 – Processo da análise do risco (Adaptado de Caldas, 2017).	44

CAPÍTULO 1

Figure 1.1 – Flowchart of sample preparation procedure for the determination of pesticides in dry herbs.....	57
Figure 1.2 – A: Residual mass (g) of co-extractives of 42 dry medicinal herb samples B: Range and mean of suppression matrix effect (%) of all 49 analytes tested for selected samples (4000QTrap LC-MS/MS). *For guarana and passion fruit samples, signal enhancement was also observed for some compounds.	60
Figure 1.3 – Summary of validation data for the 66 pesticides in dry medicinal herbs conducted in the 6500+QTrap UHPLC-MS/MS. Matrix effect fortification levels 1 to 5: 5, 10, 20, 40, 80 pg μL^{-1} , respectively, for 2,4-D, acephate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, ethion, fenitrothion, fenpyroximate, fenpropathrin, fenthion,	

phenthoate, flutriafol, heptenophos, linuron, malathion, methiocarb, metribuzin, myclobutanil, methyl paraoxon, prochloraz, propanil, prothiofos, quinalphos, thiamethoxam e trichlorfon, and 1, 3, 5, 7 and 15 pg μL^{-1} , respectively, for the other analytes. Recovery, repeatability and intermediate precision fortification levels: low, medium and high: 0.025, 0.1 and 0.4 mg kg^{-1} , respectively, for 2.4-D, acephate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, ethion, fenitrothion, fenpyroximate, fenpropathrin, fenpyroximate, fenthion, phenthoate, flutriafol, heptenophos, linuron, malathion, methiocarb, metribuzin, myclobutanil, methyl paraoxon, prochloraz, profenofos, propanil, prothiofos, quinalphos, thiamethoxam and trichlorfon, and 0.005, 0.025 and 0.075 mg kg^{-1} , respectively, for the other analytes.63

Figure 1.4 – 6500+QTrap UHPLC/MS/MS ion chromatogram of A: 66 analytes at 7 or 20 pg μL^{-1} ; B: gotu kola sample 87/20, showing the 14 detected analytes in the inserts. With exception of ametryn ($< 0.005 \text{ mg kg}^{-1}$), all the other compounds were present at quantified levels (Table S1.5).67

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 – Fluxograma do preparo de amostras para determinação de etileno-bis-ditio-carbamatos em ervas vegetais.80

Figura 2.2 – Fluxograma do preparo de amostras para determinação de etilenotioureia em ervas vegetais.80

Figura 2.3 – Cromatogramas ESI+ de soluções 15 pg μL^{-1} de: A: EBDC-dimetil resultante da metilação do mancozebe (área – $1,30 \times 10^8$ e tempo de retenção (TR) – 6,09 min); B: EBDC-dimetil resultante da metilação do metiram (área – $1,44 \times 10^8$ e TR – 6,11 min); C: EBDC-dimetil (área – $1,31 \times 10^8$ e TR – 6,10 min); D: EBDC-dimetil resultante da metilação de solução de mistura de mancozebe + metiram (área – $2,73 \times 10^8$ e TR – 6,11 min).86

Figura 2.4 – Cromatogramas ESI+ da injeção de acetonitrila (ACN) e solução de ETU em ACN (5 pg μL^{-1}), mostrando a instabilidade da linha de base dos cromatogramas em dois dias diferentes: dia 1 (A e B) e dia 2 (C e D). A fase móvel utilizada foi água + 5 mM de formiato de amônio e acetonitrila87

Figura 2.5 – Cromatogramas ESI+ de etilenotioureia 20 pg μL^{-1} em matriz (mistura de ervas secas) utilizando A: eluição isocrática e B: eluição por gradiente. Metanol foi usado como fase orgânica.88

Figura 2.6 – Resumo dos dados de validação para ditio-carbamatos da subclasse EBDC em ervas vegetais secas por UHPLC-MS/MS. *n=4; **n=8.90

Figura 2.7 – Resumo dos dados de validação para ETU, produto de degradação dos EBDC, em ervas vegetais secas por UHPLC-MS/MS. *n=4; **n=8; ***n=9.91

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 – Limites Máximos de Resíduos (LMR) de pesticidas em algumas plantas usadas como alimento e/ou no preparo de chás.....	8
Tabela 2 – Métodos multirresíduo para determinação de resíduos de pesticidas em ervas vegetais	29

CAPÍTULO 1

Table 1.1 – Limit of Quantification (LOQ), and of detection (LOD = 1/3 LOQ) for the 65 pesticides validated in the 6500+QTrap UHPLC/MS/MS	64
Table 1.2 – Pesticides detected in dry medicinal herbs (UPHLC-MS/MS, 6500+ QTrap)	68
Table 1.3 – Chronic and acute risk assessment from the consumption of dry herbs used for tea preparation	72

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 – Parâmetros otimizados do LC-MS/MS Applied Biosystem®/MDS Sciex® 6500+ QTrap para os compostos etilenotiourea e etileno-bis-ditiocarbamato-dimetil	81
Tabela 2.2 – Resultados das amostras positivas para EBDC, analisadas por UHPLC-MS/MS.....	92
Tabela 2.3 – Avaliação de risco da exposição a EBDC pelo consumo de ervas vegetais.....	96

MATERIAL SUPLEMENTAR

Capítulo 1

Table S1.1 – Chromatographic and mass spectra parameters of the 66 pesticides analyzed by UHPLC-MS/MS Applied Biosystem®/MDS Sciex® 6500+ QTRAP.....	117
Table S1.2 – Matrix effect (%) determined by LC-MS/MS 4000QTRAP for 49 pesticides in nine selected dry medicinal herbs	121
Table S1.3 – Matrix effect (%) of the control dry medicinal herb for the analysis of 66 pesticide by UHPLC-MS/MS (6500+QTRAP).....	124
Table S1.4 – Validation data for the 66 pesticides analyzed by UHPLC-MS/MS (6500+QTRAP).....	128
Table S1.5 – Results of pesticide analysis of 76 dry medicinal plant samples by UHPLC-MS/MS (6500+Qtrap).....	131

Capítulo 2

Tabela S2.1 – Resultados das análises de EBDC e ETU em 103 amostras de ervas vegetais.....	136
---	-----

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DA LITERATURA

Quadro 1 – Imagens de plantas medicinais e de suas correspondentes droga vegetal e medicamento fitoterápico.	15
Quadro 2 – Estruturas e características dos ditiocarbamatos de uso permitido no Brasil	25

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACHÉ	Acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variâncias
ARfD	<i>Acute Reference Dose</i>
CE	<i>Collision energy</i>
CV	Coeficiente de variação
CXP	<i>Collision cell exit potential</i>
DP	<i>Declustering potential</i>
EBDC	Etileno-bis-ditiocarbamatos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPA	<i>U.S. Environmental Protection Agency</i>
ESI	Ionização por <i>eletrospray</i>
ETU	Etilenotioureia
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FSANZ	<i>Food Standards Australia New Zealand</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
INCHEM	<i>Internationally Peer Reviewed Chemical Safety Information</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
LMR	Limite máximo de resíduo
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	Metanol
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MMR	Método multirresíduo

nd	Não detectado
OF	Organofosforados
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PBDC	Propileno-bis-ditiocarbamatos
PNCRC	Programa Nacional de Resíduos e Contaminantes
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PSA	<i>Primary Secondary Amine</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
UHPLC-MS/MS	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DA LITERATURA	3
1. Breve histórico do uso de plantas medicinais	3
2. Legislação de plantas medicinais no Brasil.....	5
3. Propriedades terapêuticas de algumas ervas vegetais.....	9
3.1 Alcachofra (<i>Cynara scolymus</i> L.)	9
3.2 Amora (<i>Morus alba</i> , <i>M. rubra</i> e <i>M. nigra</i> L.).....	10
3.3 Camomila (<i>Matricaria chamomilla</i> L.).....	10
3.4 Cavalinha (<i>Equisetum arvense</i> L.).....	10
3.5 Centella asiática (<i>Centella asiatica</i> L.).....	11
3.6 Chá verde (<i>Camellia sinensis</i> L.)	11
3.7 Chapéu-de-couro (<i>Echinodorus macrophyllus/ Echinodorus grandiflorus</i>) ...	12
3.8 Ginkgo biloba (<i>Ginkgo biloba</i> L.).....	12
3.9 Guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Kunth).....	12
3.10 Maracujá-amarelo, maracujá-roxo (<i>Passiflora edulis</i>).....	13
3.11 Sene (<i>Senna alexandrina</i> Mill.).....	13
3.12 Unha-de-gato (<i>Uncaria tomentosa/U. guianensis</i>).....	14
4. PESTICIDAS.....	17
4.1 Toxicidade dos pesticidas.....	17
4.1.1 Organofosforados	17
4.1.2 Carbamatos	19
4.1.3 Piretróides.....	20
4.1.4 Triazóis	22
4.1.5 Ditiocarbamatos e etilenotiureia.....	22
5. Métodos de análise de resíduos de pesticidas.....	26
5.1 Métodos multirresíduo	26
5.2 Métodos multirresíduo para análise de pesticidas em ervas vegetais secas	27
5.3 Métodos para análise de fungicidas ditiocarbamatos	36
5.4 Métodos de análise de etilenotiureia.....	40
6. Validação de métodos analíticos.....	41
7. Avaliação de risco da exposição humana a resíduos de pesticidas.....	43
7.1 Avaliação de risco de resíduos de pesticidas em ervas vegetais	46
III. OBJETIVOS	48

1. Objetivo Geral	48
2. Objetivos específicos	48
IV. ESTRUTURA DA TESE	49
CAPÍTULO 1. Pesticide residues in dry herbs used for tea preparation by UHPLC-MS/MS: method validation and analysis.....	50
Abstract.....	50
1. Introduction	51
2. Materials and Methods.....	52
2.1 Reference materials and reagents.....	52
2.2 Standard solution preparation.....	53
2.3 Sampling.....	53
2.4 Instrumentation	54
2.5 Gravimetric test of co-extractives and matrix effects (4000QTrap LC-MS/MS)	55
2.6 Extraction and clean-up (6500+QTrap UHPLC-MS/MS).....	56
2.7 Method validation (6500+QTrap UHPLC-MS/MS)	57
3. Results and discussion	59
3.1 Gravimetric test of co-extractives and matrix effect	59
3.2 Method validation.....	61
3.3 Sample analysis.....	66
4. Conclusion	73
CAPÍTULO 2. Determinação de etileno-bis-ditiocarbamatos e etilenotiourea em ervas vegetais por UHPLC-MS/MS.....	75
Resumo.....	75
1. Introdução	76
2. Materiais e métodos.....	78
2.1 Padrões analíticos e reagentes.....	78
2.2 Preparo de soluções e suspensões.....	78
2.3 Preparo de amostras (extração e clean-up).....	78
2.3.1 Método EBDC.....	78
2.3.2 Método ETU.....	79
2.4 UHPLC-MS/MS.....	81
2.5 Amostras.....	82
2.6 Validação dos métodos.....	83
3. Resultados e discussão	85
3.1 Método EBDC.....	85

3.2 Método ETU.....	87
3.3 Validação dos métodos.....	89
3.4 Análise de amostras	92
4. Conclusão	96
V. CONCLUSÕES FINAIS	98
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	117

I. INTRODUÇÃO

Ervas vegetais são usadas como suplementos nutricionais, prevenção e tratamento de doenças há milhares de anos em vários países e culturas, devido aos seus efeitos benéficos, fácil acesso e por possuírem baixos efeitos adversos (Shaban et al., 2016; Wei et al., 2016). Com o aumento da popularidade e da expansão global do mercado desses produtos, a segurança e qualidade das plantas e dos fitoterápicos preparados a partir delas se tornaram uma grande preocupação para as autoridades de saúde, indústria farmacêutica e para o público (Kosalec et al., 2009; WHO, 2007). Existem vários contaminantes e resíduos que podem estar presentes nestas ervas e causar riscos à saúde dos consumidores, tais como, metais pesados, partículas radioativas, micotoxinas e pesticidas (Gondo et al., 2016; WHO, 2007). A Organização Mundial da Saúde (OMS) orienta que a análise de resíduos de pesticidas seja incluída nos regulamentos dos países membros. No Brasil, a RDC N° 26/2014, norma que regulamenta o registro de Medicamentos Fitoterápicos e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos, incluiu a necessidade de apresentação de resultados de análises de resíduos de pesticidas nesses medicamentos (ANVISA, 2019a; BRASIL, 2014).

Os pesticidas são amplamente utilizados no mundo todo para controlar pragas que podem afetar negativamente a produção agrícola, mas precisam ser usados adequadamente para que sejam economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis (Tadeo et al., 2012). O uso excessivo de pesticidas e os potenciais efeitos adversos à saúde, fazem com que o monitoramento de seus resíduos nos alimentos seja essencial (Zhang et al., 2011; Biziuk e Stocka, 2015).

Métodos multirresíduo (MMR) permitem o monitoramento de vários compostos de diferentes classes químicas em um mesmo procedimento, com a utilização de cromatografia líquida ou gasosa acoplada a espectrometria de massas (Rutkowska et al., 2018; Besil et al., 2017). MMR, porém, não incluem os fungicidas ditiocarbamatos devido à insolubilidade da maioria desses compostos em solventes orgânicos. O método mais utilizado para determinação de ditiocarbamatos se baseia na determinação do dissulfeto de carbono (CS_2) liberado durante a análise (Cullen, 1964; Keppel, 1969; Caldas et al., 2001). Entretanto, a análise não indica o composto aplicado no campo, informação essencial para averiguar seu uso legal e refinar a

avaliação de risco da exposição humana (IPCS, 1993). A etilenotioureia (ETU) é o metabólito responsável pela toxicidade dos etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC) mancozebe, o fungicida mais utilizado no Brasil (IBAMA, 2023), e metiram (IPCS/INCHEM, 1993; IARC, 2001), e pode ser formado durante o processo de secagem das plantas durante a fabricação da droga vegetal. Portanto, sua determinação é necessária.

Esse trabalho tem como objetivos desenvolver um MMR para avaliar a presença de pesticidas de diferentes classes, e métodos para determinação de EBDC e etilenotioureia em amostras de ervas vegetais secas utilizando cromatografia líquida de ultra performance (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) acoplada à espectrometria de massas (*mass spectrometry*) em série (UHPLC-MS/MS).

II. REVISÃO DA LITERATURA

1. BREVE HISTÓRICO DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS

Plantas medicinais são espécies vegetais, cultivadas ou nativas, que contêm propriedades ou compostos que podem ser usados com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2014; WHO, 1998). Elas são usadas como suplementos nutricionais, para prevenção e tratamento de doenças há milhares de anos em vários países e culturas por serem de fácil acesso e por possuírem baixos efeitos adversos (Shaban et al., 2016; Wei et al., 2016).

O homem primitivo dependia essencialmente da natureza para a sua sobrevivência e foi através de tentativas, da casualidade e de observações, que as propriedades úteis e nocivas dos vegetais foram sendo descobertas (Almeida, 2011; Tomazzoni et al., 2006). Apenas em 1828, quando Friedrich Wöhler sintetizou a ureia a partir do cianato de amônio, uma substância inorgânica, o homem soube que era possível dar origem a uma substância orgânica a partir de outra fonte que não fosse vegetal, animal ou mineral. Esse fato mostra que em grande parte da história da humanidade, as plantas foram a única fonte de cura que o homem possuía em seu alcance (Almeida, 2011).

Referências históricas mostram que as plantas medicinais eram utilizadas em praticamente todas as antigas civilizações e sabe-se que a primeira documentação foi encontrada na obra chinesa *Pen Ts'ao* ("A Grande Fitoterapia"), de Shen Nung, que remonta à 2800 a.C. (Petrovska, 2012; Eldin e Dunford, 2001). No Brasil, a história do uso de plantas no tratamento de doenças possui influências da cultura africana, indígena e europeia. Os escravos africanos contribuíram com a tradição do uso de plantas em seus rituais religiosos e pelas propriedades terapêuticas descobertas por eles de maneira empírica. Os indígenas utilizavam diversas plantas e os conhecimentos de suas propriedades de cura foram transmitidos e melhorados de geração em geração. Quando chegaram no Brasil, os europeus se depararam com uma flora diversificada e com conhecimentos indígenas, os quais foram combinados com as informações trazidas da Europa e utilizados por eles devido à escassez de remédios na colônia (Tomazzoni et al., 2006; Silva et al., 2017; Argenta et al., 2011).

A partir do século XIX, devido ao progresso científico da química, os princípios ativos dos produtos de origem natural que possuíam propriedades medicinais

começaram a ser isolados, proporcionando um avanço na fitoterapia, que constituiu a base da terapêutica medicamentosa até meados do século XX (Tomazzoni et al., 2006; Pereira, 2013; Monteiro e Brandelli, 2017). Entretanto, no final do século XIX, a síntese química começou a se desenvolver de maneira muito intensa, a medicina tradicional passou a ser vista como atraso tecnológico em países desenvolvidos, e os medicamentos sintéticos passaram a atrair as pessoas com a promessa de cura mais rápida (Tomazzoni et al., 2006; Monteiro e Brandelli, 2017). Em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, a fitoterapia nunca deixou de ser importante, sendo muitas vezes a principal fonte de assistência médica nesses locais (WHO, 2007a). No entanto, no Brasil, também houve uma diminuição do uso de plantas medicinais diante do processo de industrialização ocorrido no país nas décadas de 1940 e 1950 (Bruning et al., 2012).

De acordo com a estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), no início da década de 90, 80% da população dos países em desenvolvimento dependia principalmente da medicina tradicional (Akerle, 1992). Nas últimas décadas, a fitoterapia passou a ser cada vez mais usada mesmo em países industrializados (WHO, 2007a), e o ressurgimento do interesse em plantas medicinais mundialmente, pode ser atribuído em parte à disseminação da suposição de que produtos tidos como naturais seriam inofensivos (Kosalec et al., 2009). Outros fatores que levaram ao aumento do uso de plantas medicinais foram a percepção de que os medicamentos industrializados não são capazes de prover cura para todas as doenças, a presença quase inevitável de efeitos adversos, o difícil acesso da população à assistência médica e o custo das drogas sintéticas (Huie, 2002; Monteiro e Brandelli, 2017; Shaban et al., 2016).

No Brasil, apesar da grande aceitação dos fármacos sintéticos, nas décadas de 1980 e 1990, algumas práticas populares, como o uso terapêutico de plantas medicinais, começaram a ser resgatadas no meio científico, a fim de complementar as práticas de saúde vigentes (Rocha et al., 2015; Silveira e Ramires, 2014). O interesse em plantas medicinais aumentou ainda mais após a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), por meio da Portaria Ministerial n.º 971, de 3 de maio de 2006. Nesse documento, acupuntura, homeopatia e fitoterapia foram integradas aos procedimentos do SUS (Santos, 2016; BRASIL, 2006), o que incentivou a pesquisa e o

desenvolvimento de produtos baseados em espécies bioativas nacionais (Rocha et al., 2015).

Nesse cenário de evolução da tecnologia e das indústrias farmacêuticas, as plantas medicinais passaram a ser industrializadas a fim de se obter medicamentos fitoterápicos (Silva et al., 2017).

2. LEGISLAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL

A primeira edição da Farmacopeia Brasileira, elaborada por Rodolfo Albino e publicada em 1929, foi um acontecimento importante com relação ao esforço de se regulamentar a manipulação de produtos de origem vegetal no Brasil (Tappin e Lucchetti, 2007). Este documento incluía 280 espécies de plantas usadas na medicina tradicional e na medicina convencional, tratando de aspectos de controle de qualidade e produção (Brandão et al., 2009; Tappin e Lucchetti, 2007).

O país possui legislação específica para o registro de medicamentos fitoterápicos desde 1967 após a publicação da Portaria Nº 22, emitida pela extinta Secretaria de Vigilância Sanitária, que estabeleceu normas para o emprego de preparações fitoterápicas (BRASIL, 1967). Na Portaria Nº 6 de 31 de janeiro de 1995 (BRASIL, 1995), criada como resultado do trabalho do Grupo de Estudos de Produtos Fitoterápicos (GEPFITO), o conceito de produto fitoterápico foi ampliado e foi incluída a necessidade de apresentação de estudos de toxicologia e farmacologia pré-clínica e clínica, a fim de comprovar a eficácia e a segurança dos produtos (Oshiro et al., 2016). A partir de 2000, a regulamentação de plantas medicinais e seus derivados passou a ser feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com a publicação da Resolução RDC Nº 17 de 24 de fevereiro de 2000 (BRASIL, 2000). Essa RDC estabeleceu parâmetros de qualidade para o registro de medicamentos fitoterápicos, incluindo a análise de metais pesados segundo critérios farmacopeicos e passou a usar o termo “medicamento fitoterápico”, categorizando-o em três classes: medicamento fitoterápico tradicional, medicamento fitoterápico novo e medicamento fitoterápico similar. Com a publicação da RDC Nº 48 de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004), essas definições deixaram de existir e passaram a ser agrupadas e regulamentadas dentro da definição de fitoterápico. Além disso, foi incluída a informação de que medicamento fitoterápico não é droga vegetal e sim um medicamento cujos princípios ativos são exclusivamente derivados de drogas

vegetais, e não permitia que cápsulas contendo drogas vegetais fossem registradas como medicamentos fitoterápicos (Pereira, 2013). Posteriormente, na RDC N° 14 de 31 de março de 2010 (BRASIL, 2010), o registro de medicamentos contendo drogas vegetais como substância ativa voltou a ser permitido, desde que fossem apresentados testes pré-clínicos e clínicos que comprovassem sua segurança e a eficácia. Adicionalmente, testes para avaliação das micotoxinas aflatoxinas passaram a ser exigidos no momento do registro (Carvalho et al., 2011).

A RDC N° 26 de 13 de maio de 2014 (BRASIL, 2014) regulamenta o registro de Medicamentos Fitoterápicos (MF) e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF). A RDC 26/2014 traz as seguintes definições:

Planta medicinal: espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos;

Droga vegetal: planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta/colheita, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada

Chá medicinal: droga vegetal com fins medicinais a ser preparada por meio de infusão, decocção ou maceração em água pelo consumidor

Matéria-prima vegetal: compreende a planta medicinal, a droga vegetal ou o derivado vegetal;

Fitoterápico: produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal;

Segundo a RDC 26/2014, os medicamentos fitoterápicos são passíveis de registro, sendo obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade.

A RDC 26/2014 incluiu a necessidade de apresentação de laudo de análise da droga vegetal, indicando o método utilizado, especificação e resultados obtidos para um lote de vários ensaios, incluindo a determinação de metais pesados; determinação de resíduos de pesticidas e afins; determinação de radioatividade, quando aplicável; determinação de contaminantes microbiológicos e determinação de micotoxinas, estipulando um prazo de dois anos para que as empresas apresentassem os resultados dessas análises, além de análises das micotoxinas ocratoxinas,

fumonisinias e tricotecenos. Esse prazo foi prorrogado ou suspenso posteriormente, por meio das RDCs Nº 77/2016, 93/2016, 105/2016, 196/2017 e 235/2018 (ANVISA, 2019a). Na RDC Nº 235/2018 (BRASIL, 2018), foi previsto que as empresas deveriam apresentar as análises de ocratoxinas, fumonisinias, tricotecenos e resíduos de pesticidas em até no máximo 365 dias da data de publicação da Resolução. A empresa fabricante do fitoterápico deve apresentar laudo da droga vegetal emitido pelo fornecedor do derivado vegetal.

A RDC Nº 105/2016 (BRASIL, 2016) estabelece que a análise de resíduos de pesticidas deve ser realizada apenas para fitoterápicos registrados, ficando isentos os que comprovadamente foram obtidos de espécies vegetais cultivadas por agricultura orgânica. Ademais, nessa mesma resolução, foi incluída uma lista de 250 pesticidas selecionados para análise, sem limites máximos estabelecidos, pertencentes a diferentes classes químicas, incluindo ditiocarbamatos (CS_2), organofosforados, carbamatos e piretróides.

A inclusão da determinação de resíduos de pesticidas em ervas vegetais e seus derivados, insere na legislação um ponto essencial no controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos que serão produzidos, já que estas substâncias podem causar riscos à saúde do usuário, ou, de acordo com ANVISA (2019a), podem “influenciar na qualidade do tratamento, por alterar o perfil dos constituintes secundários responsáveis pelo efeito terapêutico”.

A Instrução Normativa Nº 159/2022 (BRASIL, 2022) inclui partes específicas de espécies vegetais autorizadas para o preparo de chás”, muitas delas também utilizadas com fins terapêuticos, incluído a camomila (capítulos florais) e guaraná (sementes). O uso de pesticidas é autorizado para algumas culturas que são usadas como alimento ou preparo de chás, com estabelecimento de Limite Máximos de Resíduo (LMR) (Tabela 1). Porém, o uso de pesticidas não é autorizado em plantas com uso destinado apenas para o preparo de medicamentos, e, portanto, resíduos não devem ser encontrados (ANVISA, 2019a; ANVISA 2023a), o que fortalece a importância de se ter um controle da utilização de pesticidas nesse tipo de planta.

Tabela 1 – Limites Máximos de Resíduos (LMR) de pesticidas em algumas plantas usadas como alimento e/ou no preparo de chás.

Nome comum/nome científico (parte utilizada para o preparo de chás)^a	Ingredientes ativos^b	LMR (mg kg⁻¹)^b
Amora / <i>Rubus</i> spp (frutos)	Metomil	0,015
Camomila ou Maçanilha / <i>Matricaria recutita</i> L. e <i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauscher (capítulos florais)	Linurom	0,05
Guaraná / <i>Paullinia cupana</i> L. (sementes)	Abamectina	0,06
	Acetamiprido	0,1
	Azoxistrobina	6
	Beta-cipermetrina	0,02
	Bifentrina	0,3
	Boscalida	2
	Buprofezina	0,3
	Captana	5
	Ciprodinil	1,5
	Clorotalonil	15
	Cresoxim-metílico	0,3
	Difenoconazol	0,3
	Dimetomorfe	0,7
	Espinetoram	0,07
	Fenpiroximato	0,1
	Flutriafol	0,5
	Fluxaproxade	0,7
	Glifosato	0,1
	Lambda-cialotrina	1
	Mancozebe	3
	Mandipropamida	2
	Mefentrifluconazol	0,15
	Metomil	0,01
	Picoxistrobina	0,1
	Piraclostrobina	0,7
	Piriproxifem	0,05
	Teflubenzurom	0,2
	Tiabendazol	6
Tiofanato-metílico	0,5	
Maracujá-azedo / <i>Passiflora edulis</i> F. Flavicarpa Degener (polpa dos frutos)	Abamectina	0,06
	Acetamiprido	0,1
	Azoxistrobina	0,4
	Beta-cipermetrina	0,02
	Trifloxistrobina	0,05
	Boscalida	1
	Bifentrina	0,3
	Buprofezina	0,3
	Captana	5
	Casugamicina	0,05
	Ciprodinil	1,5
	Cletodim	0,05
	Cloretos de benzalcônio	10
	Clorfenapir	0,05
Cloridrato de cartape	0,05	

	Clorotalonil	15
	Cresoxim-metílico	0,2
	Deltametrina	0,1
	Difenoconazol	0,2
	Dimetomorfe	0,7
	Espinetoram	0,07
	Espinosade	0,01
	Espiromesifeno	0,7
	Etofenproxi	0,3
	Fenpiroximato	0,1
	Flupiradifurone	0,4
	Flutriafol	0,5
	Fluxapiroxade	0,7
	Formetanato	0,05
	Glifosato	0,1
	Imidacloprido	0,2
	Indoxacarbe	0,07
	Lambda-cialotrina	1
	Mancozebe	3
	Mandipropamida	2
	Mefentrifluconazol	0,15
	Metiram	3
	Metomil	0,01
	Picoxistrobina	0,1
	Piraclostrobina	0,7
	Piriproxifem	0,05
	Propargito	0,04
	Tebuconazol	0,1
	Teflubenzurom	0,2
	Tiabendazol	1
	Tiofanato-metílico	0,5
	Trifloxistrobina	0,05

a: BRASIL, 2005; b: ANVISA, 2023a

3. PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DE ALGUMAS ERVAS VEGETAIS

3.1 Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)

A alcachofra (*Cynara scolymus*), pertencente à família Asteraceae, é uma planta nativa do Mediterrâneo, sendo encontrada no Brasil em regiões montanhosas (Jacociunas et al., 2013). Suas folhas, das quais é produzida a droga vegetal, são ricas em compostos polifenólicos e inulina, e seus extratos, obtidos das folhas secas, são comercializados principalmente para o tratamento de doenças do fígado (Ceccarelli et al., 2010). Estudos mostraram que os extratos da alcachofra possuem diversos efeitos, incluindo colerético (estimula a produção de bile pelo fígado), hipocolesterolêmico (diminuição do colesterol), atividades antioxidantes, antidispéptico, antiflatulento e diurético (ANVISA, 2016; Ceccarelli et al., 2010).

3.2 Amora (*Morus alba*, *M. rubra* e *M. nigra* L.)

As espécies pertencentes ao gênero *Morus*, conhecidas como amora, pertencem à família Moraceae, sendo as mais conhecidas a *Morus alba*, *M. rubra* e *M. nigra*, que se distribuem na Índia, China, Japão, África do Norte, Arábia e sudeste europeu, entre outras regiões. A amoreira se adapta bem ao clima brasileiro e se concentra na região do Vale do Rio São Francisco (Figueredo et al., 2018; Rodrigues et al., 2019).

As espécies *Morus* são ricas em compostos fenólicos, incluindo flavonoides e antocianinas, que são de grande interesse biológico, farmacológico e estrutural devido às suas propriedades antioxidantes (Rodrigues et al., 2019). O material vegetal da amora que são de interesse farmacológico são os frutos (que podem ser utilizados no preparo de chás) e folhas, e entre suas propriedades terapêuticas, além da antioxidante, estão os efeitos na diabetes mellitus, propriedades antimicrobiana, antidopaminérgica, antimutagênica, anticarcinogênica (Rodrigues et al., 2019; Hussain et al., 2017; BRASIL, 2015a).

3.3 Camomila (*Matricaria chamomilla* L.)

A camomila (*Matricaria chamomilla* L.), da família Asteraceae, é originária do norte da Europa e cultivada em vários países, incluindo o Brasil (BRASIL, 2015b). Rica em óleos essenciais, cumarinas e flavonoides, é uma das plantas mais utilizadas com propósitos medicinais e suas inflorescências secas e partes aéreas são utilizadas para a fabricação de droga vegetal, e para o preparo de chás (BRASIL, 2005; BRASIL, 2015b; Shebbo et al., 2020). Muito conhecida por suas propriedades sedativas (Shinomiya et al., 2005), a camomila também possui outras propriedades terapêuticas, tais como, antiespasmódica, ansiolítica e anti-inflamatória em afecções da cavidade oral (ANVISA, 2016).

3.4 Cavalinha (*Equisetum arvense* L.)

Cavalinha (*Equisetum arvense* L.) é uma planta pertencente à família Equisetaceae, distribuída na América do Norte, África do Norte, Europa e Norte da Ásia (Zia-ur-Rehman et al., 2022). Suas folhas e partes aéreas são utilizadas com fins terapêuticos por possuírem em sua composição diversas classes de fitoquímicos,

como alcaloides, terpenoides, flavonoides, esteróis, fenóis, fitoesteróis, taninas e saponinas. A cavalinha é muito usada como diurético, além de possuir outras propriedades farmacológicas, como anticâncer, anti-hipertensiva e anti-inflamatória (Luanda et al., 2023).

3.5 Centella asiática (*Centella asiatica* L.)

Centella asiatica L. Urban é uma planta medicinal pertencente ao gênero *Centella* (família Apiaceae), que compreende mais de 50 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, como o sudeste asiático, África do Sul, América do Sul e México (Chandrika & Kumarab, 2015; Prasad et al., 2019).

A droga vegetal da *Centella asiatica* consiste em folhas secas da planta e suas propriedades medicinais são devido à presença de diversos fitoconstituintes, como terpenos, fenóis, vitaminas, minerais, poliacetileno e ácidos graxos. Entre esses constituintes, o principal ingrediente ativo são as saponinas triterpênicas, que podem ser responsáveis por sua ampla ação terapêutica, incluindo anti-inflamatória, antibacteriana, neuroprotetora, antidiabética, hepatoprotetora, ansiolítica, antidepressiva, antiepiléptica (Prasad et al., 2019; ANVISA, 2019c).

3.6 Chá verde (*Camellia sinensis* L.)

Camellia sinensis L., pertencente à família Teaceae, é uma planta nativa da China e a partir de suas folhas e brotos são produzidos o chá branco, chá verde, chá amarelo, chá oolong (ou vermelho), chá preto e chá pu-ehr. Cada tipo de chá é processado e fermentado de maneiras diferentes, o que os diferencia em termos de composição química (Bortolini et al., 2021). O chá verde, produzido a partir de folhas ou brotos não fermentados da *Camellia sinensis* L., é reconhecido por seus benefícios à saúde, pois possui diversos constituintes bioativos, como os polifenóis, que contribuem para suas propriedades antioxidante, anticâncer e anti-inflamatória. Ele é consumido em mais de 160 países, incluindo o Brasil (Silva et al., 2023; Xing et al., 2019). O chá verde também é rico em ácido cafeico, cafeína, ácido clorogênico e ácido cumárico e possui outras propriedades terapêuticas, como antiviral, efeito protetor ao intestino, cardiovascular e respiratório (Oliveira et al., 2023).

3.7 Chapéu-de-couro (*Echinodorus macrophyllus*/ *Echinodorus grandiflorus*)

O gênero *Echinodorus*, da família Alismataceae inclui cerca de 45 espécies, que ocorrem predominantemente em regiões tropicais da América do Sul, e 25 delas são encontradas no Brasil. As duas espécies mais conhecidas e utilizadas como plantas medicinais no Brasil são a *Echinodorus grandiflorus* e a *Echinodorus macrophyllus*, que possuem características botânica e medicinal semelhantes. O gênero é representado por espécies aquáticas que crescem habitualmente submersas em água e que apresentam folhas coriáceas — semelhantes ao couro — daí o nome “chapéu-de-couro”, pelo qual ambas as espécies anteriormente citadas são conhecidas (Marques et al., 2017; Strada et al., 2017).

A droga vegetal do chapéu-de-couro consiste em suas folhas secas e são utilizadas na medicina popular para o tratamento de problemas renais, hepáticos, respiratórios, artrites, reumatismos, sífilis, doenças de pele, como anti-inflamatório, analgésico, anti-hipertensivo, anti-helmíntico, diurético e como cataplasma para hérnias (Marques et al., 2017; Alves, 2011; ANVISA, 2016).

3.8 Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.)

Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.), da família Ginkgoaceae, é produzido a partir das folhas da árvore ginkgo, que cresce na China, Coreia, Japão, Europa e nos Estados Unidos (Jacobs e Browner, 2000; ANVISA, 2016). Suas folhas contêm flavonol, glicosídeos flavonoides, lactonas, ginkgolídeos e outros ingredientes ativos responsáveis pelas propriedades farmacológicas do extrato da planta. As indicações terapêuticas do ginkgo biloba incluem distúrbios cognitivos, vertigem e zumbidos (tinnitus) resultantes de distúrbios circulatórios, distúrbios circulatórios periféricos, como câibras e instabilidade emocional (Radunz et al., 2020; ANVISA, 2016).

3.9 Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth)

O gênero *Paullinia*, da família Sapindaceae, inclui aproximadamente 200 espécies de lianas neotropicais que ocorrem predominantemente na América tropical e subtropical. Esse gênero inclui a espécie *Paullinia cupana* Kunth, economicamente importante e comumente conhecida como “guaraná” no Brasil (Freitas et al., 2007; Schimpl et al., 2013). Essa espécie possui duas variedades botânicas, que se diferem pela forma, tamanho, cor do fruto e por crescerem em localidades diferentes —

enquanto a *P. cupana* var. “*typica*” é observada na Venezuela e na Colômbia, a *P. cupana* var. “*sorbilis*” (guaraná) é encontrada no Brasil, sendo originária de Maués, no estado do Amazonas (Nascimento Filho et al., 2001; Freitas et al., 2007). O guaraná é uma trepadeira lenhosa e perene que pode alcançar 10 m de altura, gerando cachos contendo em torno de 50 frutos, os quais podem possuir até três sementes (Henman, 1982).

As sementes dos frutos do guaraná são utilizadas para fins terapêuticos e no preparo de chás, principalmente devido ao alto teor de cafeína, 4 vezes maior do que o teor presente no café, 10 vezes maior do que no chá e 30 vezes maior do que no cacau (Edwards et al., 2005; BRASIL, 2005). As sementes da *P. cupana* também são ricas em teofilina, teobromina, celulose e amido (Heard et al., 2006; Simões, 2003), possuindo propriedades estimulante, antitumoral, antioxidante, antiplaquetária, anti-inflamatória, entre outras (Smith e Atroch, 2010; Schimpl et al., 2013).

3.10 Maracujá-amarelo, maracujá-roxo (*Passiflora edulis*)

O maracujá pertence à família Passifloraceae, sendo o gênero *Passiflora* o principal e maior gênero dessa família, possuindo cerca de 400 espécies. As espécies do gênero *Passiflora* distribuem-se em regiões de clima tropical, sendo mais raras na Ásia, Austrália e África tropical. A produção comercial do maracujá é principalmente das espécies *Passiflora edulis* Sims (maracujá-roxo) e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener (maracujá-amarelo) (Patel, 2009; Rodriguez-Amaya, 2003).

A droga vegetal da *Passiflora edulis* é produzida a partir de suas folhas secas e entre os compostos presentes estão os glicosídeos, fenóis, alcaloides, carotenoides, flavonoides, ácido l-ascórbico e aminoácidos (Zeraik et al., 2010; Costa e Tupinambá, 2005; ANVISA, 2016). A polpa dos frutos também pode ser usada no preparo de chás (BRASIL, 2005). O maracujá possui propriedades sedativa, diurética, analgésica, vermífuga, antitumoral, e pode ser usada no tratamento de dependência química, obesidade, controle de tremores e distúrbios nervosos diversos (Dhawan et al., 2003; Costa e Tupinambá, 2005; Zeraik et al., 2010).

3.11 Sene (*Senna alexandrina* Mill.)

Senna alexandrina Mill. (sene, sinônimo: *Cassia angustifolia* Vahl) pertence à família Fabaceae (ou Leguminosae) e possui várias espécies distribuídas pelo mundo,

especialmente em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Europa e América Latina, incluindo o Brasil (Oladeji et al., 2021). O sene possui propriedades laxantes por possuir em suas folhas e brotos, senosídeos A e B e glucosídeos, sendo indicado para o tratamento de constipação intestinal ocasional (Jnanesha et al., 2021; ANVISA, 2016).

























3.12 Unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*/*U. guianensis*)













O gênero *Uncaria* (família Rubiaceae) contém aproximadamente 34 espécies, as quais se distribuem principalmente em regiões tropicais, como sudeste da Ásia, África e sudeste americano (Zhang et al., 2015a; Ridsdale, 1978). As espécies representantes desse gênero na América do Sul e Central são a *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *U. guianensis* (Aubi.) Gmel (Ridsdale, 1978).

As cascas da unha-de-gato são usadas no preparo de chás, como suplemento no tratamento de diversas doenças, incluindo diabetes, câncer, além da limpeza do trato intestinal e condições inflamatórias como a artrite (Zhang et al., 2015a; ANVISA, 2016).

O Quadro 1 apresenta imagens de plantas medicinais, sua droga vegetal/chá e medicamento fitoterápico correspondentes.

Quadro 1 – Imagens de plantas medicinais e de suas correspondentes droga vegetal e medicamento fitoterápico.

Nome	Planta ^a	Droga vegetal/chá ^b	Medicamento fitoterápico ^c
Alcachofra			
Amora			
Camomila			
Cavalinha			
Centella asiática			
Chá verde			
Chapéu-de-couro			
Ginkgo biloba			

Nome	Planta ^a	Droga vegetal/chá ^b	Medicamento fitoterápico ^c
Guaraná			
Maracujá			
Sene			
Unha-de-gato			

Imagens: a: <https://www.freepik.com>; b: Amostras coletadas para o presente estudo; c: <https://www.drogariarosario.com.br> (alcachofra); <https://www.lojarelvaverde.com.br> (amora, chá verde, guaraná), <https://www.drogariaminasbrasil.com.br> (camomila, maracujá), <https://www.drogafuji.com.br> (sene), <https://www.oficialfarma.com.br> (cavalinha, centella asiática, chapéu-de-couro, ginkgo biloba, unha-de-gato)

4. PESTICIDAS

Segundo a LEI N° 7.802/1989, os agrotóxicos, aqui referidos como pesticidas, são definidos como:

Agrotóxicos e afins - produtos e 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 plantadas, e de outros ecossistemas e 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, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Eles podem ser classificados em diferentes critérios, tais como, finalidade, classes químicas, grupos funcionais, modo de ação e toxicidade. De acordo com sua estrutura química, os pesticidas são categorizados em grupos, sendo que os herbicidas glifosato e 2,4-D são os mais utilizados no Brasil, seguidos do mancozebe, um fungicida ditiocarbamato (IBAMA, 2023). Dentre os inseticidas, os organofosforados (acefato, malationa, clorpirifós), carbamatos (metomil, carbosulfano) e piretróides (bifentrina, lambda-cialotrina) estão entre os mais utilizados (IBAMA, 2023).

4.1 Toxicidade dos pesticidas

4.1.1 Organofosforados

Os organofosforados (OF) são uma classe de pesticidas altamente tóxicos para os vertebrados, mas por serem instáveis e não persistentes, são usados em grandes quantidades no mundo todo para o controle de pragas (Doble et al., 2005; Lim e Bolstad, 2018). Os compostos pertencentes a essa classe são ésteres do ácido fosfórico ou do ácido tiofosfórico (Figura 1).

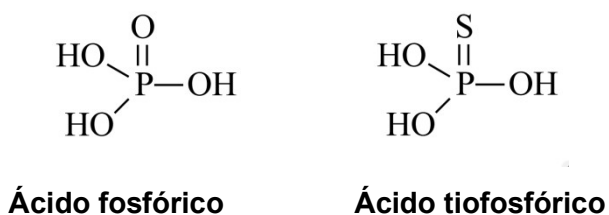


Figura 1 – Ácidos utilizados como matéria-prima na produção dos pesticidas organofosforados.

Os OF foram sintetizados pela primeira vez pelo químico alemão Gerhard Schraeder no final dos anos 1930. Ele sintetizou milhares de moléculas e eventualmente uma delas, a parationa, foi introduzida no mercado agrícola, vindo a se tornar um dos inseticidas mais utilizados dentro dessa classe, sendo seu uso posteriormente descontinuado na maioria dos países, inclusive o Brasil (Costa, 2019; ANVISA, 2023a).

A toxicidade dos pesticidas organofosforados está atribuída à fosforilação do sítio ativo da acetilcolinesterase (AChE) — classe de enzimas que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) — nas terminações nervosas, causando sua inativação. Com a perda da AChE disponível, o órgão efector se torna superestimulado pelo acúmulo de ACh. Esse acúmulo leva a uma contínua estimulação dos receptores muscarínicos, atingindo o sistema nervoso parassimpático, seguida da estimulação dos receptores nicotínicos, atingindo o sistema simpático e o sistema nervoso central (Moretto, 2014; English e Webster, 2012; Costa, 2019; Roberts e Reigart, 2013). Os efeitos no sistema nervoso periférico incluem salivação excessiva, lacrimejamento, suor e diarreia (Eicher, 2009). Atualmente, existem 17 pesticidas organofosforados registrados no Brasil para uso agrícola (ANVISA, 2023a) e a estrutura química de alguns deles está apresentada na Figura 2. O acefato é o inseticida mais comercializado no Brasil e foi o sexto mais vendido no país em 2021 (IBAMA, 2023).

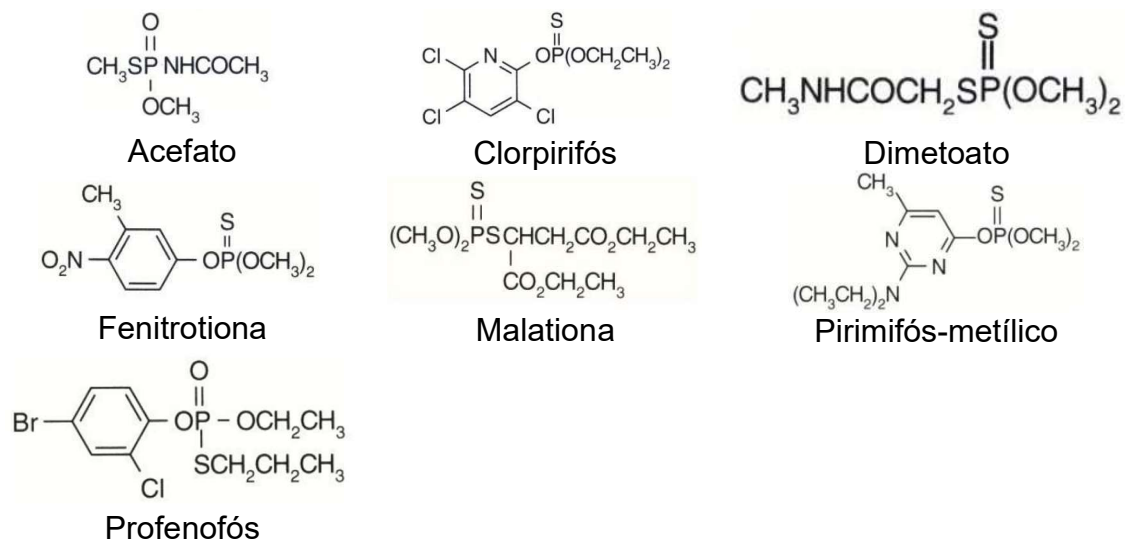
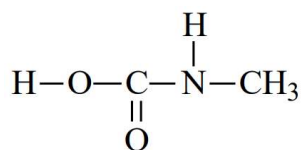


Figura 2 – Inseticidas organofosforados investigados neste estudo (Fonte: ANVISA, 2023a).

4.1.2 Carbamatos

Os carbamatos foram sintetizados pela primeira vez no início dos anos 1930, através da síntese de ésteres alifáticos do ácido carbâmico (Figura 3). Por possuírem baixo poder inseticida, eles foram introduzidos no mercado a princípio como fungicidas. Na década de 50, vários aril ésteres derivados do ácido metilcarbâmico com alta ação inseticida foram sintetizados, mas se tornaram inseticidas apenas nos anos 1960, após a restrição do uso de hidrocarbonetos clorados e do reconhecimento da toxicidade de muitos ésteres organofosfóricos (Costa, 2019).



Ácido carbâmico

Figura 3 – Ácido utilizado como matéria-prima na síntese dos pesticidas carbamatos.

A toxicidade dos carbamatos, assim como nos organofosforados, está relacionada ao acúmulo de ACh nas terminações nervosas. No caso dos carbamatos, a enzima AChE sofre uma carbamilação, e a combinação carbamila-acetilcolinesterase se dissocia mais rapidamente em meio aquoso do que complexo fosforila-acetilcolinesterase produzido pelos compostos organofosforados (Roberts e Reigart, 2013; Costa, 2019). Os sintomas de intoxicação por carbamatos são os mesmos observados na intoxicação por organofosforados, incluindo urinação, diarreia, salivação, fasciculação dos músculos e efeitos no Sistema Nervoso Central.

Entretanto, comparado aos OF, no geral a intoxicação aguda pelos carbamatos é resolvida em algumas horas (Costa, 2019).

Atualmente, existem 9 pesticidas carbamatos registrados no Brasil para uso agrícola (ANVISA, 2023a) e a estrutura química de alguns deles está apresentada na Figura 4.

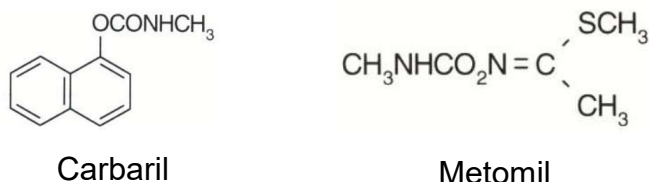


Figura 4 – Inseticidas carbamatos investigados nesse estudo (Fonte: ANVISA, 2023a).

4.1.3 Piretróides

Os piretróides são inseticidas sintéticos, quimicamente análogos às piretrinas, substâncias naturais provenientes do extrato da flor *Chrysanthemum cinerariaefolium* (piretro). O extrato piretro contém seis ésteres com propriedade inseticida, as chamadas piretrinas, que são instáveis e se decompõem rapidamente quando expostas à luz. Devido a essa instabilidade, seus análogos sintéticos — os piretróides — foram desenvolvidos na década de 70 como resultado dos esforços em modificar a estrutura das piretrinas naturais, a fim de melhorar o problema da fotoestabilidade, mas retendo a atividade inseticida e relativamente baixa toxicidade aguda do piretro (Soderlund et al., 2002; Roberts e Reigart, 2013). Têm alto poder inseticida, baixa persistência ambiental e baixa toxicidade em mamíferos, que são três vezes menos sensíveis aos piretróides do que os insetos. Os piretróides têm sido cada vez mais utilizados, substituindo compostos com maior toxicidade, como os organofosforados (Costa, 2019; Ray e Fry, 2006).

Todos os inseticidas piretróides contêm uma porção ácido, uma ligação éster central e uma porção álcool, e podem ser divididos em dois tipos, classificação baseada em sinais tóxicos observados em ratos: Tipo I e Tipo II (Verschoyle e Aldridge, 1980; Soderlund et al., 2002). A diferença estrutural entre os dois tipos de piretróides é a presença de um grupo ciano no carbono α da porção álcool da molécula nos piretróides do Tipo II (Figura 5). Os efeitos de intoxicação aguda por piretróides do Tipo I e II são a Síndrome-T (tremor) e Síndrome-CS (coreoatetose com salivação), respectivamente (Soderlund et al., 2002).

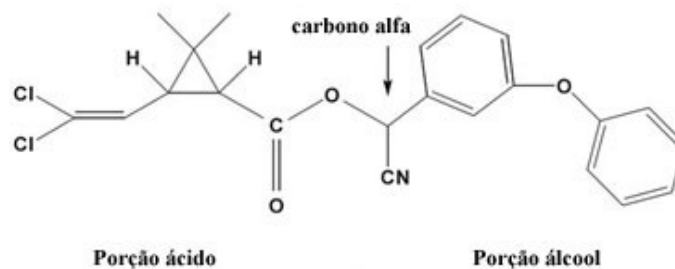


Figura 5 – Estrutura do piretróide do Tipo II deltametrina. A estrutura básica dos piretróides consiste em uma porção ácido e uma porção álcool. Piretróides do Tipo II possuem um grupo ciano no carbono α da porção álcool (Adaptado de Hughes et al., 2012).

O principal mecanismo de ação tóxica dos piretróides nos insetos e nos mamíferos é o bloqueio dos canais de sódio e cloreto (Soderlund et al., 2002). Como resultado, células excitáveis (nervo e músculo) são os principais alvos da toxicidade dessa classe de pesticidas (Bradberry et al., 2005). Os piretróides se ligam aos receptores dos canais de sódio e diminuem sua taxa de inativação, aumentando o influxo de íons Na^+ no neurônio (Shafer et al., 2005).

Atualmente, existem 30 pesticidas piretróides registrados no Brasil para uso agrícola (ANVISA, 2023a) e a estrutura química de alguns deles está apresentada na Figura 6.

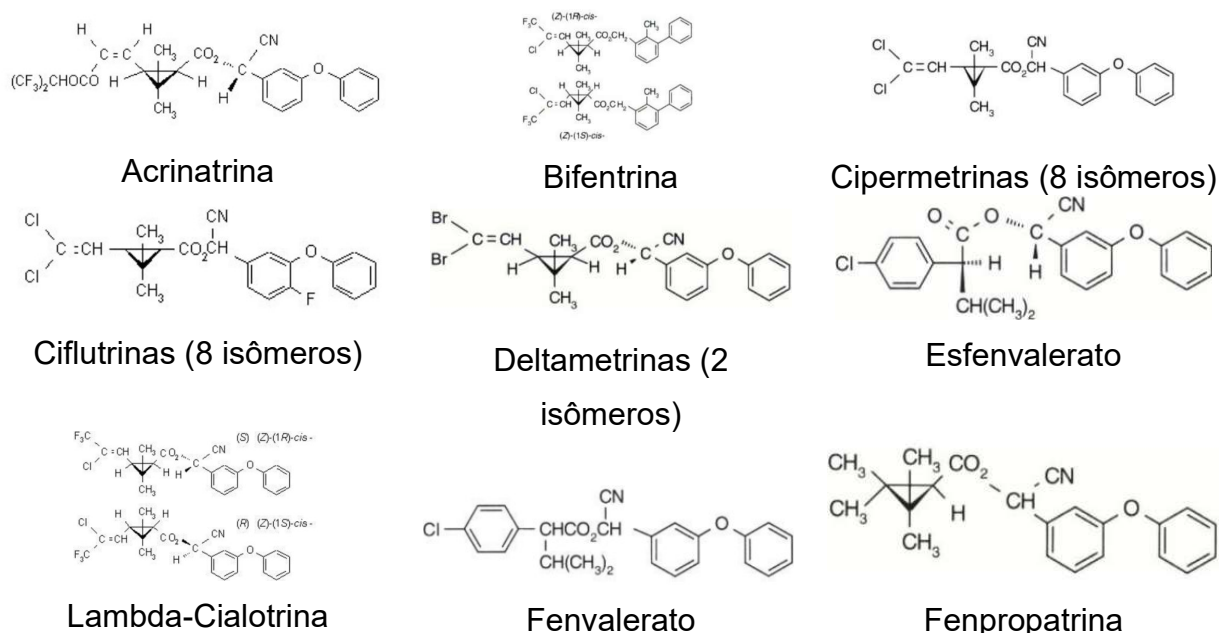


Figura 6 – Alguns inseticidas piretróides registrados no Brasil, dos quais a fenpropatrina foi investigada nesse estudo. Com exceção da bifentrina, todos possuem toxicidade Tipo II por conterem o grupo ciano (CN) na molécula (ANVISA, 2023a; Jardim, 2012).

4.1.4 Triazóis

Os fungicidas azóis possuem uma vasta atividade antifúngica e são usados tanto para prevenir como para curar infecções por fungos, inclusive na medicina humana, sendo classificados em triazóis e imidazóis, de acordo com sua estrutura química. A presença do anel triazol nas moléculas desta classe é responsável por seu mecanismo de ação fungicida, que envolve a inibição da enzima lanosterol 14-alfa-desmetilase (CYP51), que possui um importante papel na biossíntese do ergosterol, componente essencial para a estrutura e função da membrana celular do fungo. A ausência do ergosterol altera a fisiologia da membrana celular, o que pode levar à morte celular ou à inibição do crescimento e replicação das células dos fungos (Zarn et al., 2003; Shoham et al. 2017). É provável que o mesmo mecanismo de ação fungicida seja responsável pelos efeitos tóxicos observados em mamíferos, já que a enzima esterol 14-alfa-desmetilase é expressa no homem. Entre os efeitos adversos observados em estudos com animais de laboratório estão efeitos no desenvolvimento, reprodutivos, hepatotoxicidade, hepatocarcinogenicidade e tumores na tireoide e testículos por via não-genotóxica (EFSA, 2009).

Atualmente, existem 16 pesticidas triazóis registrados no Brasil para uso agrícola (ANVISA, 2023a) e a estrutura química de alguns deles está apresentada na Figura 7.

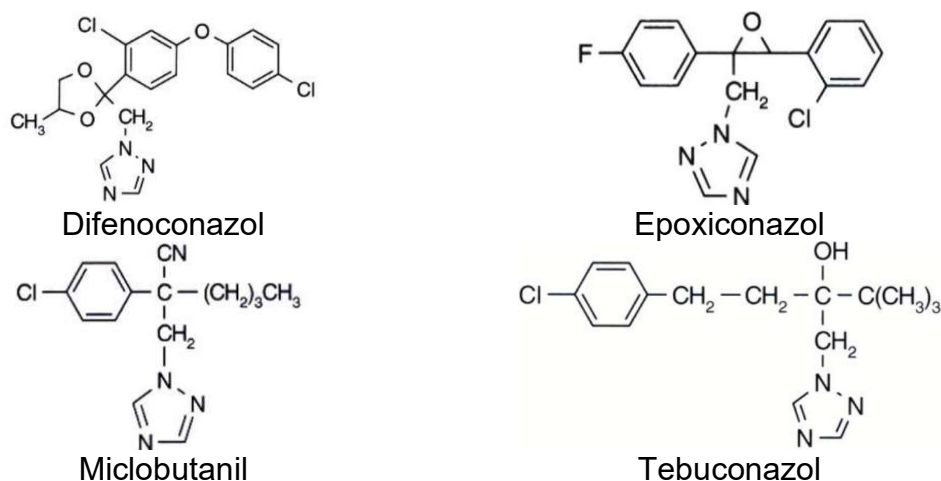


Figura 7 – Fungicidas triazóis investigados nesse estudo (ANVISA, 2023a)

4.1.5 Ditiocarbamatos e etilenotiureia

Os fungicidas ditiocarbamatos são uma classe de compostos organosulfurados muito utilizados desde a década de 40 para controlar cerca de 400 fungos patogênicos

em diversas culturas (Stevens e Breckenridge, 2001). Eles são usados como fungicidas na produção agrícola de frutas e vegetais, no tratamento de sementes, solo e foliar. São também usados como repelentes de roedores, aditivos na vulcanização da fabricação da borracha, aditivos em lubrificantes e como antioxidantes (Schmidt et al., 2013).

Os ditiocarbamatos são derivados do ácido ditiocarbâmico ($\text{NH}_2\text{CS}_2\text{H}$), análogos aos carbamatos (CH_3NO_2), onde ambos os átomos de oxigênio são substituídos por átomos de enxofre (Figura 8A). São sintetizados a partir da reação de aminas primária e secundária com dissulfeto de carbono sob condições alcalinas (Kanchi et al., 2013; Figura 8B). As fitoalexinas da família das crucíferas, como o brassinin (Figura 8C), são fontes naturais de ditiocarbamatos, que são biosintetizados como proteção ao ataque de fungos (Perz et al., 2000).

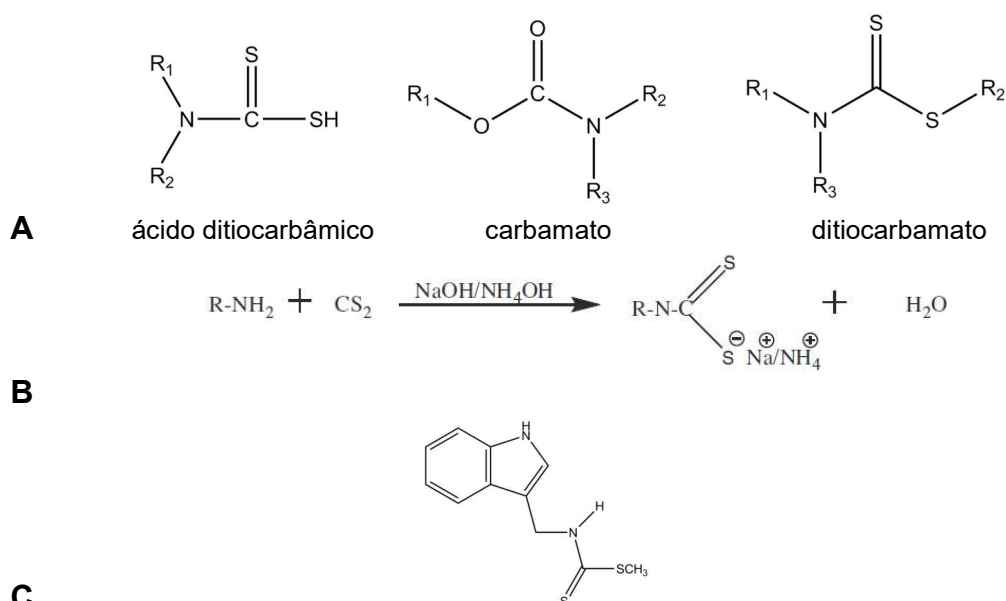


Figura 8 – Estruturas relacionadas aos ditiocarbamatos. (A) ácido ditiocarbâmico, carbamato e ditiocarbamato; (B) Síntese dos ditiocarbamatos (Kanchi et al., 2013); (C) Brassinin.

Os ditiocarbamatos possuem relativa baixa toxicidade aguda e a exposição da população geral resulta da presença de resíduos destes compostos em alimentos que foram tratados no campo. A toxicidade crônica dos ditiocarbamatos é atribuída principalmente aos produtos de metabolização dos compostos pertencentes à subclasse dos etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC) e do propileno-bis-ditiocarbamato (PBDC) propinebe (etilenotiourea (ETU, imidazolidina 2-tiona) e propilenotiourea (PTU, 4-metil imidazolidina 2-tiona), respectivamente), que mostraram ser

carcinogênicos em estudos com animais de laboratório (Doerge e Takazawa, 1990; Rubino et al., 2014; Kazos et al., 2007).

A etilenotioureia é uma tionamida heterocíclica e sua introdução no meio ambiente ocorre principalmente pelo uso dos fungicidas EBDC, como o mancozebe e metiram. A Figura 9 mostra o mecanismo de decomposição dos EBDC a ETU, que pode ocorrer nos organismos vivos (vegetais e animais), no ambiente e durante o processamento de alimentos e de outros materiais vegetais.

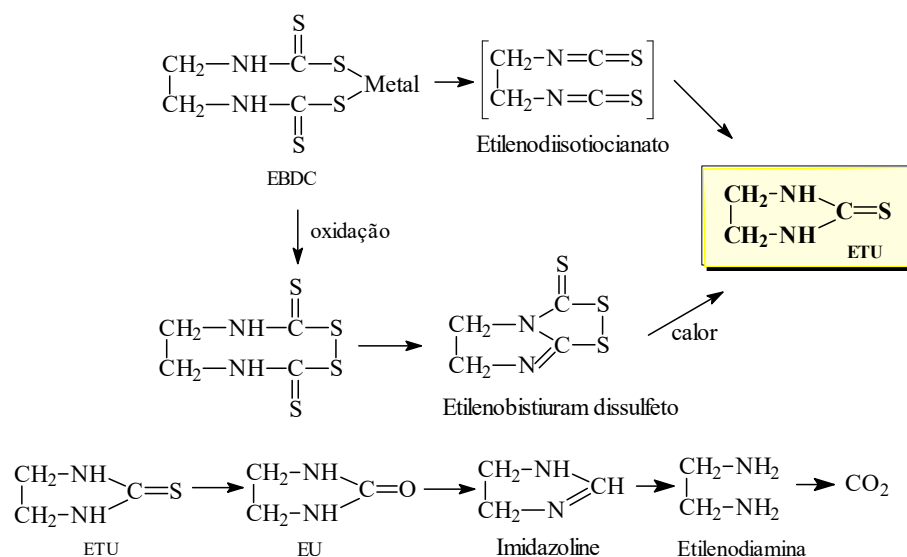


Figura 9 – Decomposição dos etileno-bis-ditiocarbamatos e reações que levam à formação de etilenotioureia (ETU) (IPCS, 1988).

Estudos demonstraram efeitos na tireoide de roedores cronicamente expostos à ETU, que também demonstrou ter efeitos teratogênicos em ratos expostos via oral ou cutânea a esse composto, causando anormalidades no sistema nervoso central e no esqueleto (EPA, 1992). Redução no peso de filhotes, tamanho da ninhada e número de ninhadas viáveis foram observados após exposição de camundongos à ETU (Hardin et al., 1987; Dearfield, 1994). Em outro estudo, foi demonstrado que baixas doses de ETU podem interferir na homeostase da tireoide e no perfil do hormônio reprodutivo em ratos (Maranghi, 2013). Em 1993, o JMPR estabeleceu uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) para o grupo dos EBDC de 0–0,03 mg kg⁻¹ de peso corpóreo (pc), com base nos efeitos na tireoide de ratos (FAO/WHO, 1993). Esta IDA se aplica ao mancozebe sozinho ou em combinação com o outros EBDC. Uma IDA para ETU também foi alocada nesta mesma reunião (0–0,004 mg kg⁻¹ pc).

O mancozebe é o fungicida mais utilizado no Brasil e o terceiro mais vendido

no país de acordo com o relatório de comercialização de pesticidas publicado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, IBAMA (IBAMA, 2023), e resíduos de fungicidas ditiocarbamatos estão entre os mais detectados em alimentos em programas de monitoramento em alimentos no país (Jardim e Caldas, 2012; ANVISA, 2019b). O Quadro 2 mostra as estruturas dos fungicidas ditiocarbamatos permitidos no Brasil (ANVISA, 2023a), sua solubilidade e formas de uso. A baixa solubilidade do mancozebe, metiram e propinebe em água e solventes orgânicos se deve à estrutura polimérica desses compostos.

Quadro 2 – Estruturas e características dos ditiocarbamatos de uso permitido no Brasil

Ditiocarbamato	Estrutura	Solubilidade	Uso no Brasil ²
Mancozebe¹: (C ₄ H ₆ N ₂ S ₄ Mn) _x (Zn) _y , x/y=11; 271,2 g mol ⁻¹ (monômero)		Praticamente insolúvel em água e na maioria dos solventes.	Aplicação foliar em 70 culturas.
Metiram¹: (C ₁₆ H ₃₃ N ₁₁ S ₁₆ Zn ₃) _x ; 1088,6 g mol ⁻¹ (monômero)		Água: 2,1–4 mg L ⁻¹ (20°C); Praticamente insolúvel em solventes orgânicos.	Aplicação foliar (18 culturas) e em sulco de plantio (batata).
Propinebe³: (C ₅ H ₈ N ₂ S ₄ Zn) _x ; 289,8 g mol ⁻¹ (monômero)		Água: <0,01 mg L ⁻¹ (20°C); Solventes orgânicos: <0,1 mg L ⁻¹ .	Aplicação foliar em 8 culturas.
Metam-sódico⁴: C ₂ H ₄ NNaS ₂ ; 129,17 g mol ⁻¹		Água: 722 g L ⁻¹ ; solúvel em metanol.	Aplicação no solo em 5 culturas.
Tiram¹: C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄ ; 240,4 g mol ⁻¹		Água: 30 mg L ⁻¹ (25°C) Solúvel em acetona, clorofórmio e outros solventes orgânicos.	Tratamento de semente (27 culturas) e solo (2 culturas).

1. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/index.html>; 2. ANVISA, 2023a; 3. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation04/PROPINEB.pdf; 4. <http://www.cn-agro.com/fungicidas/Metam-sodium.html>

5. MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

5.1 Métodos multirresíduo

Existe uma grande variedade de culturas e pesticidas com diferentes propriedades e estruturas químicas. Para analisar a presença de pesticidas nessa diversidade de culturas, são necessários métodos analíticos que permitam o monitoramento de vários compostos em um mesmo procedimento, os quais são chamados de métodos multirresíduo (MMR). Nesses métodos, o preparo de amostra deve ser eficiente a fim de se eliminar possíveis interferentes que possam prejudicar a obtenção de resultados confiáveis. Esse processo inclui etapas de extração e purificação (*clean-up*) para se obter um extrato contendo os analitos de interesse e com o mínimo possível de compostos provenientes da matriz (Tadeo et al., 2012).

Entre os vários métodos disponíveis, destaca-se o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), desenvolvido por Anastassiades et al. (2003) com o objetivo de superar as limitações dos métodos multirresíduo existentes na época. O método QuEChERS original consiste em uma etapa de extração por agitação manual usando acetonitrila, seguida de uma etapa de partição com adição de sais (sulfato de magnésio, $MgSO_4$ e cloreto de sódio, $NaCl$) e uma etapa de purificação por extração dispersiva (SPE dispersivo, dSPE) utilizando PSA (amina primária secundária) e $MgSO_4$. Posteriormente foram propostas modificações ao método QuEChERS, com o objetivo de extrair um número maior de compostos e para promover uma limpeza mais efetiva em determinadas matrizes. A adição de tampões na extração, por exemplo, melhora a recuperação de analitos dependentes do pH e a adição de C18 na etapa de purificação ajuda na limpeza de matrizes que possuem gordura. Em amostras pigmentadas, a adição de carvão ativado promove a redução do teor de clorofila dos extratos obtidos durante a análise (Prestes et al., 2011). A detecção pode ser realizada por cromatografia gasosa e/ou cromatografia líquida acopladas a diferentes detectores (GC-MS, GC-MS/MS, GC-FPD, GC-ECD, LC-MS, LC-MS/MS).

O método QuEChERS original (Anastassiades et al., 2003) foi desenvolvido para extrair resíduos de pesticidas em matrizes que possuam alto teor de água (mais de 75% de umidade), como frutas e vegetais. Para culturas secas, ou que possuem menos de 25% de umidade, é necessário otimizar a extração reduzindo-se a quantidade de amostra e adicionando-se água à amostra a ser analisada. Esse

procedimento faz com que os poros da amostra se tornem mais acessíveis ao solvente de extração (Kolberg et al., 2011).

A análise de ervas secas representa um desafio em análises de resíduos de pesticidas, devido à presença de uma grande quantidade de co-extrativos nessas matrizes, como lipídeos, pigmentos naturais, açúcares e óleos essenciais, tornando-as matrizes complexas em análises cromatográficas, o que ocasiona diversos problemas analíticos (Ghani, 2014; Lozano et al., 2012). Quando a espectrometria de massas é usada, compostos presentes na matriz podem causar supressão ou ampliação do sinal instrumental, principalmente em matrizes secas (Rutkowska et al., 2018).

5.2 Métodos multirresíduo para análise de pesticidas em ervas vegetais secas

Vários métodos de preparo de amostra foram desenvolvidos para melhorar a determinação analítica multirresíduo em ervas vegetais, os quais incluem o uso de extração sólido-líquido (SLE) (Rodrigues et al., 2007), extração em fase sólida (SPE) (Chen et al., 2012; Hou et al., 2016; Li et al., 2017; Park et al., 2006; Tong et al., 2013), dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) (Liu et al., 2015; Zuin et al., 2003b; Aquino et al., 2011; Cao et al., 2015; Abhilash e Singh, 2008), extração com fluido supercrítico (SFE) (Zuin et al., 2003a), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (Chen et al., 2013) e extração assistida por micro-ondas (MAE) (Pareja et al., 2015). A identificação e a quantificação dos pesticidas podem ser feitas por cromatografia gasosa (GC) acoplada a detectores de massas (GC-MS, GC-MS/MS), captura de elétrons (ECD, *Electron Capture Detector*), fotométrico de chama (FPD, *Flame Photometric Detector*), nitrogênio e fósforo (NPD, *Nitrogen Phosphorus Detector*) e cromatografia líquida (LC) acoplada a detectores de massas (LC-MS, LC-MS/MS), entre outros.

Trabalhos disponíveis na literatura aplicaram o método QuEChERS para analisar resíduos de pesticidas em ervas secas. Lozano et al. (2012) validaram um método para 32 pesticidas em amostras de camomila e três tipos de chás (chá verde, chá preto e chá vermelho) através de um método QuEChERS modificado, utilizando diferentes sais e reagentes nas etapas de extração (acetonitrila e fosfato de trifênila), partição (sulfato de magnésio, cloreto de sódio, citrato trissódico dihidratado e hidrogenocitrato de dissódio sesqui-hidratado) e purificação (cloreto de cálcio anidro

e PSA), com detecção por LC-MS/MS. Os Limites de Quantificação (LOQ) variaram entre 0,01 e > 0,1 mg kg⁻¹. Besil et al. (2017) utilizou três métodos baseados no QuEChERS para determinar 24 pesticidas em calêndula (margarida) com detecção por LC-MS/MS. O método QuEChERS original foi o que gerou o menor efeito de matriz, com LOQ entre 0,01 e 0,1 mg kg⁻¹. Steiniger et al. (2010) determinaram 22 pesticidas em chá verde utilizando um método QuEChERS modificado, combinando PSA, MgSO₄ e C18, e quantificação por GC-MS/MS, com LOQ variando entre 0,0375 e 1,2 mg kg⁻¹. Rutkowska et al. (2018) determinaram 235 pesticidas em *Centaurea cyanus L.* (escovinha), *Matricaria chamomilla L.* (camomila) e *Thymus vulgaris L.* (tomilho). Diferentes tipos de *clean-up* foram testados e o que apresentou o menor efeito de matriz foi a técnica de SPE dispersivo com uma combinação de PSA, ENVI-Carb e MgSO₄, com posterior adição de 5% de ácido fórmico e gotas de dodecano. A detecção foi feita por GC-MS/MS, com LOQ variando entre 0,001 e 0,002 mg kg⁻¹. Ghani (2014) desenvolveu e validou um método multirresíduo para dez pesticidas em erva-doce, utilizando um método QuEChERS modificado e detecção por GC-ECD, com LOQ de 0,05 mg kg⁻¹.

A Tabela 2 resume trabalhos reportados na literatura que investigaram a presença de pesticidas em ervas vegetais utilizando métodos multirresíduo, com informação sobre o método analítico utilizado.

Tabela 2 – Métodos multirresíduo para determinação de resíduos de pesticidas em ervas vegetais

Matriz	Técnica	Tratamento da amostra	Número de pesticidas	LOQ	Recuperação	Referência (país)
<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	UHPLC-MS/MS	QuEChERS modificado: Adição de 10 mL de água a de 2 g de amostra, agitação em vórtex (20 s), hidratação por 15 min. Extração com ACN, MgSO ₄ e NaCl e clean-up com PSA e Z-Sep (sílica modificada com óxido de zircônio). Eluição em ACN.	21	0,02–0,05 mg kg ⁻¹	77–103%	Zhang et al., 2021 (China)
<i>Citri reticulatae pericarpium</i> , <i>Ziziphi spinosae semen</i> , <i>Crataegi fructus</i> , <i>Polygalae radix</i> , <i>Lonicerae japonicae flos</i> , <i>Cuscutae Semen</i> e <i>Codonopsis radix</i>	GC-EI-MS/MS	QuEChERS modificado: Adição de ACN contendo 10% de água, MgSO ₄ , NaCl à amostra. <i>Clean-up</i> com PSA, C18, GCB. MgSO ₄ . Eluição em ACN.	201	≤ 0,0225 mg kg ⁻¹	70–120%	Fu et al., 2019 (China)
<i>Centaurea cyanus</i> L. (escovinha), <i>Matricaria chamomilla</i> L. (camomila) e <i>Thymus vulgaris</i> L. (tomilho)	GC-MS/MS	QuEChERS modificado: Hidratação com água fria durante 10 min. Extração com MgSO ₄ , NaCl, C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O e C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O. <i>Clean-up</i> usando d-SPE com PSA, ENVI-Carb e MgSO ₄ , com posterior adição de 5% de ácido fórmico e gotas de dodecano.	235	0,001–0,002 mg kg ⁻¹	60–128%	Rutkowska et al., 2018 (Polônia)
<i>Calendula officinalis</i> L. (calêndula ou margarida)	LC-MS/MS	QuEChERS original (A), tampão acetato (B) e tampão citrato (C) Melhores resultados obtidos com (A): Adição de ACN, NaCl, MgSO ₄ à amostra previamente hidratada durante 10 min. <i>Clean-up</i> com dSPE usando PSA:MgSO ₄ .	24	0,01–0,1 mg kg ⁻¹	61,1–126,6%	Besil, et al., 2017 (Uruguai)

Matriz	Técnica	Tratamento da amostra	Número de pesticidas	LOQ	Recuperação	Referência (país)
<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	GC-MS	SPE: Adição de ACN à amostra, seguido de evaporação em rotavapor e transferência do concentrado para um cartucho SPE Envi-Carb/LC-NH ₂ . Eluição com acetonitrila:tolueno (3:1).	107	0,002–1,7 mg kg ⁻¹	70–120% para a maior parte dos pesticidas	Li et al., 2017 (China)
<i>Cynara cardunculus</i> L. subsp. <i>Cardunculus</i> (alcachofra)	GC-MS e LC-MS/MS	QuEChERS modificado: Adição de ACN à amostra hidratada durante 30 min, seguido de adição de MgSO ₄ , NaCl, C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O e C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O. <i>Clean-up</i> com CaCl ₂ e PSA. O método QuEChERS obteve melhores resultados quando comparado com outros dois métodos (MSPD e extração com acetato de etila).	84	LC-MS/MS: 0,01 mg kg ⁻¹ para metade dos pesticidas GC-MS: 0,005 e 0,01 mg kg ⁻¹	70–120%	Machado et al., 2017 (Uruguai)
<i>Origanum majorana</i> L. (manjerona), <i>Thymus vulgaris</i> L. (tomilho), <i>Matricaria recutita</i> (camomila)	GC-MS/MS	Adição de acetato de etila:n-hexano (6:4) à amostra previamente hidratada, seguido de adição de sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄). <i>Clean-up</i> com florisil e PSA. (Método obteve melhores resultados quando comparado com extração usando acetato de etila ou QuEChERS).	160	0,05 mg kg ⁻¹ , exceto para 9 pesticidas	70–100% para a maioria dos pesticidas	Taha e Gadalla, 2017 (Egito)
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze cv. Mengshan (chá verde)	GC-MS/MS	SPE: Adição de ACN à amostra (sem hidratação), seguido de MgSO ₄ , NaCl, citrato trissódico dihidratado e hidrogenocitrato de dissódio sesquihidratado. <i>Clean-up</i> com cartuchos SPE PSA/GCB. Eluição com ACN:tolueno (3:1).	101	0,0011–0,0253 mg kg ⁻¹	70–120% para a maior parte dos pesticidas	Hou et al., 2016 (China)
<i>Camellia sinensis</i>	LC-MS/MS	MSPD: Homogeneização da amostra com C18 e florisil. Transferência da mistura para uma coluna de purificação. Eluição com acetonitrila.	5 carbamatos, 4 organofosforados e 7 piretróides	0,00003–0,00474 mg kg ⁻¹	87,7–99,6%	Cao et al., 2015 (China)

Matriz	Técnica	Tratamento da amostra	Número de pesticidas	LOQ	Recuperação	Referência (país)
<i>Morinda officinalis</i>	GC-ECD e (GC-MS para confirmação)	Extração e <i>clean-up</i> realizados por ASE/MSPD (extração acelerada por solvente assistida por dispersão de matriz em fase sólida). Amostras homogêneas com extrelut e florilil antes de serem inseridas no extrator.	33 organoclorados e 9 piretróides	0,00004–0,008 mg kg ⁻¹	69,3–112%	Liu et al., 2015 (China)
<i>Ilex paraguariensis</i> (erva-mate)	GC-FPD (GC–(ITD)-MS para confirmação)	(A) MAE: Adição de ACN à amostra e extração por microondas. Adição de tolueno e evaporação com N ₂ . <i>Clean-up</i> : Dissolução do extrato evaporado em ACN com posterior purificação em cartuchos de sílica e ENVI-carb. (B) QuEChERS modificado: Adição de ACN à amostra hidratada com gelo picado. Adição de MgSO ₄ , NaCl, C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O e C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O. <i>Clean-up</i> com MgSO ₄ , PSA e GCB.	42 organofosforados	(A) 0,004 mg kg ⁻¹ para 19 analitos (B) 0,04 mg kg ⁻¹	(A) 19–118% (B) 43–134% Método (B) apresentou efeitos de matriz menores.	Pareja et al., 2015 (Uruguai)
<i>Pimpinella anisum</i> (erva-doce)	GC-ECD	QuEChERS modificado: Hidratação com água deionizada por 10 min. Extração com ACN acidificada com 1% de ácido acético (HAc), MgSO ₄ e NaCl. <i>Clean-up</i> em tubo dSPE.	10	0,05 mg kg ⁻¹	82,29–116,3%	Ghani, 2014 (Egito)
<i>Morinda officinalis</i>	GC-FPD e (GC-MS para confirmação)	QuEChERS modificado: Adição de ACN:água (9:1) à amostra, seguido de MgSO ₄ e NaCl. <i>Clean-up</i> com PSA, GCB e MgSO ₄ .	30 organofosforados	0,01–0,04 mg kg ⁻¹	75,01–118,89%	Liu et al., 2014 (China)
<i>Mentha piperita</i> L. (hortelã)	GC/ECD/NPD	QuEChERS modificado: Adição de ACN e água à amostra. Adição de MgSO ₄ , NaCl, C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O e C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O. <i>Clean-up</i> com MgSO ₄ , PSA e GCB. Eluição com éter de petróleo.	46	0,01 mg kg ⁻¹ para a maioria dos compostos e 0,004 mg kg ⁻¹ para os organoclorados	70–120% exceto para o clorotalonil, folpet, imazalil e spiroxamine	Słowik-Borowiec, 2014 (Polônia)

Matriz	Técnica	Tratamento da amostra	Número de pesticidas	LOQ	Recuperação	Referência (país)
Ginseng	UHPLC-MS/MS	QuEChERS modificado com DLLME (microextração líquido-líquido dispersiva): Adição de ACN, MgSO ₄ e NaCl à amostra previamente hidratada durante 1 hora. Extrato homogeneizado com clorofórmio. Etapa DLLME: Transferência da mistura para um tubo contendo água deionizada com concentração de sal de 8%. Eluição em metanol.	39	0,00001–0,001 mg kg ⁻¹	70–120%	Chen et al., 2013 (China)
<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn (lótus)	GC-ECD (GC-MS para confirmação)	QuEChERS modificado (selecionado após testes com diferentes solventes de extração e agentes purificadores): Adição de n-hexano:acetato de etila (4:1) à amostra. <i>Clean-up</i> com florisil.	36	0,005–0,5 mg kg ⁻¹	60,84–119,91%	Miao et al., 2013 (China)
Plantas medicinais chinesas	GC-MS/MS	SPE: Adição de sulfato de sódio anidro e ACN à amostra, seguido de ultrassom. Concentração em rotavapor. <i>Clean-up</i> com cartucho SPE Carb/NH ₂ . Eluição com acetonitrila:tolueno (3:1).	103	0,00003–0,01188 mg kg ⁻¹	70–120% para a maior parte dos pesticidas	Tong et al., 2013 (China)
Plantas utilizadas na medicina tradicional chinesa	UHPLC-MS/MS	Método A (QuEChERS): Adição de ACN+0,1% HAc, MgSO ₄ e NaCl à amostra. <i>Clean-up</i> com dSPE usando PSA, GCB, MgSO ₄ ou PSA, C18, MgSO ₄ . Eluição em ácido fórmico em metanol:água (3:2). Método B (<i>clean-up</i> alternativo usando SPE): extrato evaporado em rotavapor e diluído com ACN:tolueno (3:1). Transferência para um cartucho Envi Carb-II/PSA SPE ou Supelclean C18 SPE (para amostras	116	< 0,01 mg kg ⁻¹	70–120%	Chen et al., 2012 (China)

Matriz	Técnica	Tratamento da amostra	Número de pesticidas	LOQ	Recuperação	Referência (país)
		gordurosas). Eluição em ácido fórmico em metanol:água (3:2).				
<i>Camellia sinensis</i> (chá verde, vermelho e preto) e <i>Matricaria chamomilla</i> (camomila)	LC-MS/MS e GC-MS/MS	QuEChERS modificado: Adição de ACN e trifetil fosfato (TEP) à amostra previamente hidratada. Posteriormente, adição de MgSO ₄ , NaCl, citrato trissódico dihidratado e hidrogenocitrato de dissódio sesquihidratado. <i>Clean-up</i> com CaCl ₂ e PSA seguido de adição de ACN com 5% de ácido fórmico após vortex e centrifugação.	86	0,01–0,1 mg kg ⁻¹ e >0,1 mg kg ⁻¹ em alguns casos	70–120% para a maior parte dos pesticidas	Lozano et al., 2012 (Espanha)
<i>Camellia sinensis</i> (chá verde)	UHPLC-QqQ-MS/MS	QuEChERS modificado (método de preparo de amostra selecionado após comparação com outros 3 métodos): Adição de 10 mL de ACN acidificada com 1% de HAC à amostra previamente hidratada, seguido de MgSO ₄ e acetato de sódio. Sem <i>clean-up</i> .	100	≤ 0,025 mg kg ⁻¹	70–117%	Martínez-Domínguez et al., 2015 (Espanha)
<i>Hyptis pectinata</i> (Sambacaitá)	GC-MS	MSPD: Homogeneização da amostra com C18 ligada à sílica e posterior transferência para uma coluna MSPD contendo lã de vidro silanizada e sulfato de sódio anidro. Eluição com diclorometano.	Ametrina, tetraconazol, flumetralina, tebuconazol, pirimetanil, diclofuanida e cresoxim-metílico	0,05–0,1 mg kg ⁻¹	83–127%	Aquino et al., 2011 (Brasil)
<i>Cordia salicifolia</i> (chá de bugre)	GC/MS	Amostra foi homogeneizada com turfa ou alumina neutra em um gral. Transferência da mistura para uma coluna de polipropileno contendo lã de vidro silanizada, Na ₂ SO ₄ anidro e C18. Eluição com	Acefato, clorprofam, pirimicarbe, bifentrina, tetradifona e fosadona	0,15–0,25 mg kg ⁻¹	64–118%	Carvalho et al., 2010 (Brasil)

Matriz	Técnica	Tratamento da amostra	Número de pesticidas	LOQ	Recuperação	Referência (país)
		cicloexano:diclorometano (3:1) e evaporação em rotavapor.				
<i>Camellia sinensis</i> (chá verde)	GC-MS/MS	QuEChERS modificado: Homogeneização com água seguida de extração com acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético. <i>Clean-up</i> com d-SPE combinando PSA, MgSO ₄ e C18.	22	0,0375–1,2 mg kg ⁻¹	78–115%	Steiniger et al., 2010 (EUA)
<i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal (ashwagandha), <i>Ocimum sanctum</i> L. (manjerição santo), <i>Achyranthes aspera</i> L. (carrapicho)	GC-ECD	MSPD: Maceração da amostra com acetona:diclorometano (3:1). Homogeneização com Na ₂ SO ₄ . <i>Clean-up</i> com MSPD (Florisil) e eluição com a mesma mistura de solventes (acetona:diclorometano (3:1)).	Aldrin, endrin, dieldrin, isômeros HCH	LOD ≤ 0,001 mg kg ⁻¹	88–98%	Abhilash e Singh, 2008 (Índia)
<i>Mikania laevigata</i> (guaco), <i>Maytenus ilicifolia</i> (espinheira-santa) e <i>Cordia verbenacea</i> (erva baleeira)	GC-MS (modo SIM)	SLE com n-hexano:diclorometano (4:1). <i>Clean-up</i> por extração em fase sólida com florisil e sílica gel. Eluição em n-hexano-diclorometano.	9 organoclorados	0,003–0,03 mg kg ⁻¹	70–124%	Rodrigues et al., 2007 (Brasil)
<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	GC-ECD/NPD	SPE: GC-NPD - Adição de NaCl e ACN à amostra e posterior concentração em rotavapor. Eluição com n-hexano. GC-ECD - O extrato obtido do procedimento acima foi transferido para um cartucho SPE LC-Florisil. Eluição com n-hexano/acetona.	18	0,003–0,2 mg kg ⁻¹	72,3–117,2%	Park et al., 2006 (Coreia do Sul)
<i>Passiflora</i> L. (maracujá)	HRGC-ECD/FPD	SFE usando CO ₂ como fase móvel.	7 organoclorados e 6 organofosforados	LOD: 1–46 pg µL ⁻¹ (ECD) 7–14,5 pg µL ⁻¹ (FPD)	69,8–107,1%	Zuin et al., 2003a (Brasil, Itália)

Matriz	Técnica	Tratamento da amostra	Número de pesticidas	LOQ	Recuperação	Referência (país)
<i>Passiflora</i> L. (maracujá)	HRGC-ECD	MSPD: homogeneização da amostra com florisil. Transferência para uma coluna de alumina neutra e Na ₂ SO ₄ . Eluição com n-hexano:acetato de etila (70:30).	7 organoclorados 4 organofosforados	LOD: 2–12 pg µL ⁻¹	75,2–111%	Zuin et al., 2003b (Brasil)

5.3 Métodos para análise de fungicidas ditiocarbamatos

Métodos multirresíduo não incluem os fungicidas ditiocarbamatos, já que a maioria desses compostos são polímeros e praticamente insolúveis nos solventes orgânicos normalmente usados em análises MMR, além de serem instáveis. Essas características dos ditiocarbamatos foram a base do desenvolvimento dos métodos atualmente mais utilizados para análise desses compostos, que se baseiam na determinação do CS₂ liberado quando o ditiocarbamato presente no alimento é submetido a uma hidrólise ácida (Cullen, 1964; Keppel, 1969; Caldas et al., 2001). O CS₂ liberado pode ser quantificado por espectrofotometria ou por cromatografia gasosa (Figura 10b), e o resultado é expresso como mg CS₂/kg de alimento. O método espectrofotométrico consiste na determinação do complexo cúprico formado após a liberação do CS₂ durante a decomposição ácida do ditiocarbamato na presença de cloreto de estanho como agente redutor. O CS₂ liberado durante a hidrólise é complexado em uma solução de acetato cúprico, dietanolamina e etanol, e o complexo analisado no espectrofotômetro a 435 nm. A análise pode ser realizada em um sistema de vidrarias dispostas horizontalmente (Cullen, 1964; Keppel, 1969), ou verticalmente (Caldas et al., 2001). A Figura 10a ilustra o sistema vertical, desenvolvido por Caldas et al. (2001).

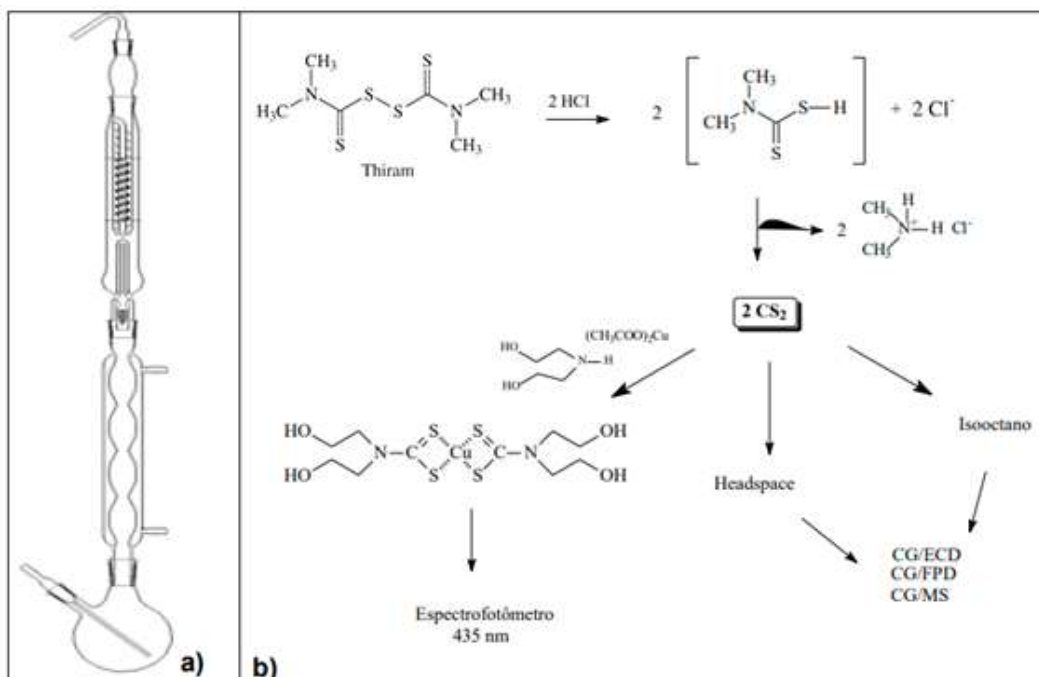


Figura 10 – (a) Sistema vertical de hidrólise de fungicidas ditiocarbamatos para análise espectrofotométrica. (b) Reação de hidrólise do tiram e formas de determinação do CS₂ formado (Adaptado de Mozzaquatro et al., 2019).

No método de detecção do CS₂ por cromatografia gasosa (GC), a hidrólise ácida dos ditiocarbamatos presentes nos alimentos ocorre em um frasco fechado (*headspace*) e o CS₂ gerado é injetado diretamente no cromatógrafo a gás (Hill, 1992; Jianren et al., 1989; Friedrichs, 1995), ou extraído simultaneamente em um solvente orgânico (isooctano ou hexano) antes da injeção (Harrington, 1998; Crnogorac e Schwack, 2009). A técnica de extração utilizando solvente orgânico é uma alternativa ao método de *headspace*, que possibilita que outros compostos voláteis além do CS₂, os quais também contêm enxofre em suas estruturas, sejam coletados e injetados no cromatógrafo gasoso, o que pode interferir nos resultados (Crnogorac e Schwack, 2009). Nas duas técnicas, a detecção pode ser feita por captura de elétrons (GC-ECD; Royer et al., 2001), fotometria de chama (GC-FPD; Hill, 1992) ou espectrometria de massas (GC-MS; Mujawar et al., 2014).

Os limites de quantificação (LOQ) reportados por estudos utilizando diferentes formas de detecção do CS₂ normalmente se encontram na faixa entre 0,05 e 0,1 mg CS₂ kg⁻¹ (Royer et al., 2001; Caldas et al., 2001; Vareli, et al. 2007, Jardim et al., 2014, Mozzaquatro et al., 2019).

Os LMR para o grupo ditiocarbamatos no Brasil e em outros países estão estabelecidos em níveis de CS₂ (ANVISA, 2023a; European Commission, 2023; FSANZ, 2023; FAO/WHO, 1993). A determinação de ditiocarbamatos como CS₂, porém, tem duas limitações importantes. A primeira é que não permite a distinção entre os compostos ditiocarbamatos presentes na amostra e a segunda é que culturas que possuem geração fitogênica de CS₂ (como repolho, couve, brócolis, rúcula, alho poró e cebola) fornecem resultados falso-positivos (Stertz e Freitas, 2003). Além de ser importante para confirmar se o produto usado no campo tem registro autorizado para a cultura, a determinação seletiva dos compostos ditiocarbamatos presentes nos alimentos é necessária para uma avaliação de risco refinada da exposição a estes fungicidas na dieta, já que a toxicidade não é a mesma entre os compostos (IPCS, 1993).

Métodos analíticos para determinação específica dos ditiocarbamatos em frutas e vegetais têm sido reportados na literatura, e envolvem a transformação do composto ditiocarbamato em seus respectivos sais de sódio, deixando seus ânions disponíveis para análise. Essa transformação acontece após tratamento alcalino na presença de agentes complexantes, como o EDTA, que está ilustrado na Figura 11. Blasco et al. (2004) desenvolveram um método para análise dos ditiocarbamatos dazomet, disulfiram, tiram e dos metabólitos ETU e PTU em abacate, cereja, limão, noz, aveia, laranja, pêssego, arroz e tomate. As amostras foram extraídas por dispersão de matriz em fase sólida com *carbograph*, eluídas com uma mistura de diclorometano e metanol e os compostos analisados por LC-MS. Os LOQ variaram entre 0,25 e 2,5 mg kg⁻¹. Hayama e Takada (2008) desenvolveram um método para determinação de EBDC por LC-MS/MS em caqui, pêra, morango, repolho, alface e espinafre, com LOQ de 0,0008 mg kg⁻¹. Durante a extração, após tratamento das amostras com EDTA, L-cisteína, água e solução de dimetil sulfato em acetonitrila, os extratos de acetonitrila foram particionados com sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio (Figura 11) e purificados com PSA.

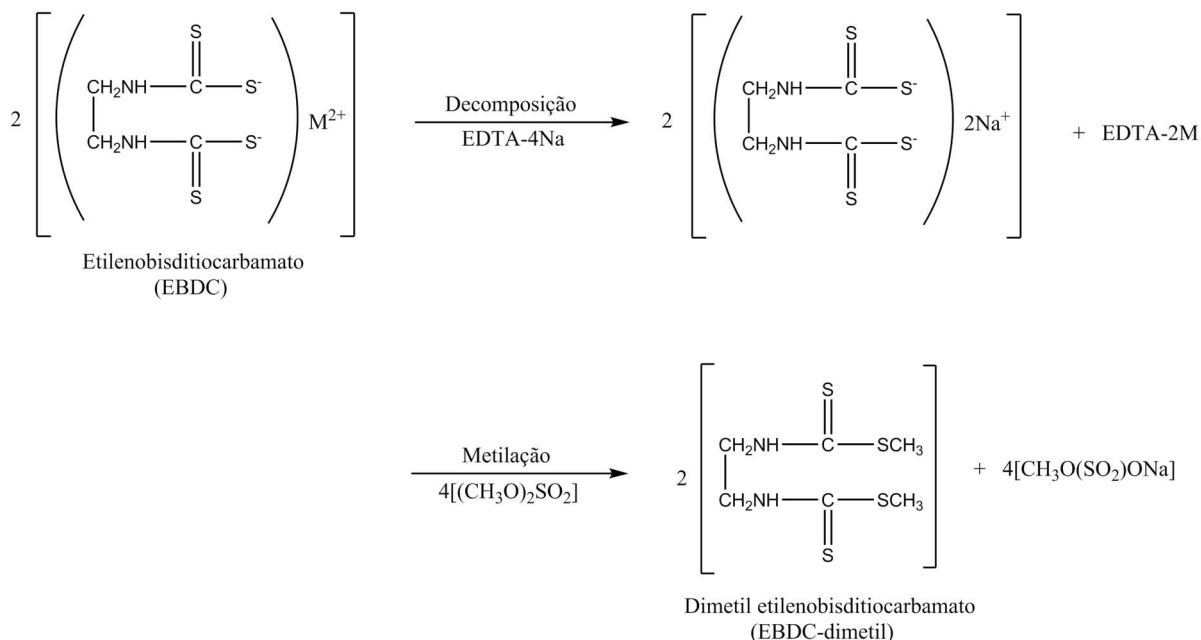


Figura 11 – Sequência de reação para determinação de EBDC (M = metal) utilizando o método de metilação (Hayama e Takada, 2008).

Al-Alam et al. (2017) validaram um método de determinação de dez ditiocarbamatos (dazomet, metam-sódico, ferbam, ziram, zinebe, manebe, mancozebe, metiram, nabam e propinebe) em vegetais e obtiveram LOQ na faixa de 0,00013–0,00066 mg kg⁻¹. O método combinou técnicas de metilação por par-iônico, detecção por HPLC a 272 nm e espectrometria de absorção atômica. Kakitani et al. (2017) publicaram um método para análise de 10 ditiocarbamatos em cerveja, suco de fruta e amostras de malte. O procedimento consiste na conversão dos ditiocarbamatos em sais de sódio solúveis em água na presença de bicarbonato de sódio e metilação com dimetil sulfato. A extração dos compostos metilados foi conduzida usando o método QuEChERS e detecção por LC-MS/MS. Os LOQs variaram entre 0,00014 e 0,00697 mg kg⁻¹. Yang et al. (2023) desenvolveram um método de determinação de quatro EBDC em frutas e vegetais por UPLC-MS/MS. A extração das amostras foi feita com solução de L-cisteína hidrocloreto e EDTA alcalino, e a metilação com iodometano, com posterior purificação pelo método QuEChERS. Os LOD obtidos foram de 0,005 mg kg⁻¹ e 0,01 mg kg⁻¹ para frutas e vegetais, respectivamente.

Alguns estudos de análise de ditiocarbamatos em ervas vegetais foram encontrados na literatura. da Silva et al. (2022) validaram um método de determinação

indireta de ditiocarbamatos em erva-mate por GC-MS (em níveis de CS₂), com LOQ de 0,1 mg kg⁻¹ (extração com isooctano, cloreto de estanho II e ácido clorídrico). Yun-cheng et al. (2004) validaram método de determinação de ditiocarbamatos em *Panax ginseng* por cromatografia gasosa (*headspace*) e obtiveram LOQ de 0,1 mg kg⁻¹. Zhang et al. (2015b) validaram um método de determinação de mancozebe em *Schisandra chinensis* (Turcz.) bail. por UPLC com detector UV (272 nm), utilizando metilação. O LOQ obtido foi de 0,05 mg kg⁻¹.

5.4 Métodos de análise de etilenotioureia

Apesar da análise de etilenotioureia não estar prevista na legislação, sua determinação é essencial, pois a ETU é responsável pela toxicidade crônica do mancozebe, ditiocarbamato mais utilizado no Brasil, e pode ser formada durante o processo de secagem das plantas para serem utilizadas como droga vegetal (IPCS/INCHEM, 1993; IARC, 2001).

Ao contrário de seus precursores, os EBDC, a ETU é um composto polar, solúvel em água, possui baixa volatilidade, e pode ser extraída de material vegetal por solventes ou mistura de solventes, como diclorometano, metanol/água e clorofórmio/etanol. Métodos de extração baseados no QuEChERS também são utilizados (López-Fernández et al., 2014; Zhou et al., 2013).

Métodos que utilizam cromatografia gasosa estão descritos na literatura, porém, essa técnica só pode ser realizada após derivatização da ETU extraída (Dubey et al., 1997), o que torna a análise mais demorada e suscetível a erros, gerando baixa recuperação (Zhou et al., 2013; López-Fernández et al., 2014). Matisová et al. (1984) otimizaram um método de cromatografia gasosa para determinação de ETU por derivatização em trigo e uva tratados com mancozebe, e em vinho produzido com uvas tratadas. A ETU derivatizada como S-benzil-ETU produziu resultados satisfatórios (recuperações > 90%), mas a S-butil-ETU apresentou baixa recuperação (33% para vinho), mostrando que a análise da ETU derivatizada nem sempre produz bons resultados.

Métodos de análise de ETU por cromatografia líquida, acoplada a detectores UV ou *diodo array* (DAD), espectrometria de massas (MS) ou eletroquímicos, que não

necessitam da etapa de derivatização, também foram reportados na literatura (López-Fernández et al., 2014). Garcinuño et al. (2004) otimizou um método de HPLC-DAD UV para determinar simultaneamente manebe e seus principais metabólitos (ETU, EBIS-sulfeto de etileno bis-isotiocianato e EU - etilenoureia) em tomate após extração com uma mistura de solventes (acetonitrila/diclorometano/clorofórmio), com LOQ de 0,45, 0,040 e 0,35 mg kg⁻¹ para manebe, ETU e EU, respectivamente. A identidade do EBIS, produto de degradação do manebe, também foi verificada por espectrometria de massas. Bolzoni et al. (1993) desenvolveram um método de determinação de ETU e PTU em produtos de tomate e purês de frutas. Os analitos foram extraídos com diclorometano em colunas EXtrelux® e a purificação dos extratos foi conduzida usando cartuchos Sep-Pak C18. A detecção foi realizada por HPLC-detector eletroquímico, com LOQ de 0,003 mg kg⁻¹.

Zhou et al. (2013) utilizou um método baseado no QuEChERS para extrair ETU de amostras de pepino e batata, com detecção por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). As amostras foram extraídas com acetonitrila alcalina (contendo 1% de NH₃.H₂O), seguida de partição líquido-líquido pela adição de MgSO₄ e cloreto de sódio (NaCl) e purificação dos extratos por SPE dispersivo com PSA e MgSO₄. A separação foi feita em uma coluna ZIC-pHILIC, com LOQ de 0,005 mg kg⁻¹.

Até onde se tem conhecimento, não há estudos de análise de etilenotioureia em ervas vegetais reportados na literatura.

6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Validação é um estudo experimental e documentado, com o objetivo de demonstrar que determinado método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade pretendida (BRASIL, 2011; BRASIL, 2017). Normalmente um estudo de validação de métodos de separação inclui os seguintes parâmetros:

- **Seletividade:** capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias a serem analisadas na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Esse parâmetro pode ser avaliado a partir da análise de um número apropriado de amostras “brancas” e verificação da presença de interferentes na região do analito de interesse (INMETRO, 2020; BRASIL, 2011).
- **Linearidade:** habilidade, dentro de uma determinada faixa, de um procedimento

analítico obter resultados diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra (ICH, 2005). Para avaliar a linearidade, deve-se construir uma curva analítica contendo no mínimo cinco níveis de concentração e verificar a ausência de dados discrepantes (*outliers*) que pode ser feita pelo teste de Grubbs, e a homogeneidade das variâncias dos resíduos (homoscedasticidade), que pode ser avaliada pelo teste de Cochran. Caso os dados sejam heteroscedásticos, deve-se testar diferentes regressões ponderadas lineares e selecionar o fator de ponderação mais adequado. Os coeficientes de correlação (r) e a significância da regressão pela Análise de Variâncias (ANOVA) também devem ser avaliados (INMETRO, 2020).

- **Precisão (Repetibilidade e Precisão intermediária):** expressa o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas de uma mesma amostra sob condições definidas (ICH, 2005). Geralmente a precisão é expressa pelo coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR), calculado através da equação $CV = DPR = (\text{desvio padrão} / \text{média}) \times 100$, cujo valor deve ser $\leq 20\%$ para ser considerado aceitável. A repetibilidade é o desvio padrão de medidas de um analito, obtido usando o mesmo método, na mesma amostra ou amostras, em um mesmo laboratório, sem alterar o analista e os equipamentos utilizados. A precisão intermediária é avaliada pela repetição do experimento variando uma ou mais condições, tais como, diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes dias de análise (SANTE, 2021; INMETRO, 2020).
- **Tendência/Recuperação:** grau de concordância entre o valor de referência aceito e o valor encontrado. A recuperação é expressa normalmente em porcentagem, calculada através da equação $(\text{valor observado} / \text{valor esperado}) \times 100$. A faixa de recuperação aceitável está na faixa de 70–120%, mas em casos excepcionais, valores de recuperação de até 30% podem ser aceitos, desde que o método tenha valores de precisão $\leq 20\%$. A recuperação na rotina de análise é a performance do método em cada lote de amostras analisadas (ICH, 2005; BRASIL, 2011; INMETRO 2020; SANTE, 2021).
- **Limite de Detecção:** menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, como um valor exato. Pode ser

estabelecido como a concentração do analito que gera um sinal de três vezes a razão sinal/ruído do equipamento (ICH 2005; BRASIL, 2011).

- **Limite de Quantificação:** menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser quantitativamente determinado com precisão e exatidão apropriados (ICH, 2005).
- **Robustez:** medida da capacidade de um procedimento analítico permanecer inalterado por pequenas variações nos parâmetros do método, fornecendo uma indicação de sua confiança durante um uso rotineiro. É um parâmetro opcional dentro dos estudos de validação (ICH, 2005; INMETRO, 2020).

Em métodos multirresíduo, todos os analitos contemplados pelo escopo do método precisam ser validados, e matrizes representativas podem ser utilizadas para validar métodos mono e multirresíduo (BRASIL, 2011).

7. AVALIAÇÃO DE RISCO DA EXPOSIÇÃO HUMANA A RESÍDUOS DE PESTICIDAS

O homem tem se beneficiado do uso de pesticidas no controle de pragas e doenças em diferentes setores, sendo o setor agrícola o maior consumidor desse grupo de produtos químicos (cerca de 85% da produção mundial) (Kim et al., 2017). Uma vez que são designados para exterminar certos organismos, os pesticidas possuem alta toxicidade, o que gera preocupação com relação à exposição humana a essas substâncias e aos seus efeitos na saúde (Damalas e Eleftherohorinos, 2011). A exposição da população geral aos pesticidas ocorre principalmente pelo consumo de alimentos (Jardim e Caldas, 2009), mas a presença desses compostos em ervas vegetais para o preparo de medicamentos fitoterápicos ou preparo de chá pode também contribuir de maneira importante para a exposição. Portanto, além do monitoramento de pesticidas presentes nos alimentos e nas ervas vegetais, avaliar o risco causado pela exposição humana a essas substâncias é fundamental para o desenvolvimento de padrões alimentares seguros (IPCS, 2009).

No Brasil, o processo de registro de pesticidas é realizado pela ANVISA, a qual também é responsável por avaliar o risco da exposição humana a essas substâncias (ANVISA, 2023b). Internacionalmente, os comitês científicos da OMS e Organização para

Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization - FAO*) conduzem os procedimentos de avaliação de risco a fim de subsidiar o estabelecimento de padrões alimentares pelo *Codex Alimentarius*. O JMPR (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*) é responsável por avaliar resíduos de pesticidas nos alimentos (WHO, 2007b).

A avaliação do risco faz parte de um processo maior, a *análise do risco*, a qual também engloba o *gerenciamento do risco* e a *comunicação do risco* (Figura 12). Enquanto a avaliação do risco é um processo fundamentado na ciência, o gerenciamento do risco envolve tomada de decisões por parte das agências reguladoras, que levam em consideração as informações técnicas relativas ao dano à saúde e ao risco, bem como os fatores políticos, sociais e econômicos. A comunicação do risco, por sua vez, trata-se de uma troca de informações interativa sobre riscos à saúde ou ao meio ambiente, que envolve os avaliadores, gerenciadores, mídia, grupos de interesse e o público em geral (IPCS, 2004). Os três processos que compõem a análise do risco interagem entre si, conforme ilustra a Figura 12.



Figura 12 – Processo da análise do risco (Adaptado de Caldas, 2017).

Risco pode ser definido como a probabilidade de um efeito adverso ocorrer em um organismo, sistema ou (sub)população causado sob circunstâncias específicas através da exposição a um agente (IPCS, 2004). A avaliação do risco estabelece o risco como

função de dois componentes, a toxicidade e a exposição (Equação 1), ou seja, o risco depende do grau de toxicidade da substância e da quantidade à qual uma população foi exposta (Caldas, 2017; Jardim e Caldas, 2009).

$$\text{Risco} = f(\text{toxicidade, exposição}) \quad (1)$$

O processo de avaliação do risco inclui quatro etapas: as duas primeiras são a identificação do dano/perigo e caracterização do dano (relação dose-resposta), ambas são referentes ao componente “toxicidade”; seguidas das etapas de avaliação da exposição e caracterização do risco (IPCS, 2004; Caldas, 2017).

Na primeira etapa da avaliação do risco, a *identificação do dano*, são identificados tipo e natureza dos efeitos adversos que uma substância pode causar quando um organismo, sistema ou (sub)população são expostos a ela (IPCS, 2004). Fontes de informação que podem ser usadas nessa etapa incluem a relação estrutura molecular e atividade (*Structure-Activity Relationship - SAR*), testes *in vitro*, estudos com animais de laboratório e estudos com seres humanos (Jardim e Caldas, 2009).

Na etapa de *caracterização do dano (relação dose/resposta)*, avalia-se a relação quantitativa entre a exposição a uma substância e a incidência de resposta de um efeito adverso à saúde (IPCS, 2009). Estudos com animais de laboratório e informações de estudos em humanos podem ser usados como fontes de informação para essa etapa (Caldas, 2017; Jardim e Caldas, 2009). Nessa etapa é estimado o NOAEL (*No-Observed-Adverse-Effect Level*) ou seja, a dose que não causou um efeito adverso nos animais testados, que é utilizado no cálculo da Ingestão Diária Aceitável (IDA), parâmetro de segurança de ingestão crônica (ingestão de pequenas quantidades da substância durante um longo período) (Jardim e Caldas, 2009).

A terceira etapa da avaliação de risco, a *avaliação da exposição*, é definida como a avaliação da exposição de um organismo, sistema ou (sub)população a uma substância (IPCS, 2004). Essa avaliação depende de dados de concentração da substância no alimento ou droga, em mg kg^{-1} , consumo do alimento ou droga, em kg e peso corpóreo individual ou de uma população em estudo, dado em kg. Normalmente, os níveis de resíduos diminuem após o processamento, pois esse procedimento usualmente leva à

degradação química da substância em questão. O aumento do nível das substâncias pode ocorrer durante o processo de desidratação do alimento, como no caso de ervas vegetais secas vendidas para consumo, ou quando sua degradação gera um produto mais tóxico, como é o caso dos fungicidas etileno-bis-ditiocarbamatos, que dão origem à ETU (Jardim e Caldas, 2009).

No Brasil, dados de consumo de alimentos são obtidos da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF), publicados pelo IBGE (IBGE, 2020). No caso da exposição por meio de ervas vegetais secas utilizadas para preparo de chás, esse consumo pode ser obtido diretamente das recomendações de uso do produto (Caldas e Machado, 2004).

A avaliação da exposição crônica, ou seja, da exposição que ocorre diariamente, durante um longo período, é realizada através do cálculo da Ingestão Diária, em mg kg^{-1} peso corpóreo/dia, de uma determinada substância, conforme a Equação 2:

$$\text{Ingestão} = \frac{\sum(R_i \times C_i)}{\text{peso corpóreo}} \quad (2)$$

onde R é o valor da concentração da substância no alimento/droga i (mg kg^{-1}) e C é o consumo diário (kg), desse alimento/droga pela população/indivíduo em estudo (Jardim e Caldas, 2009).

A *caracterização do risco*, última etapa da avaliação do risco, pode ser definida como a determinação qualitativa e, quando possível, quantitativa, incluindo as incertezas esperadas, da probabilidade de ocorrência de efeitos adversos conhecidos e potenciais de um agente em um dado organismo, sistema ou (sub)população sob condições definidas de exposição (IPCS, 2004). Nessa etapa, a ingestão crônica estimada é comparada com a IDA, e expressa como %IDA (IPCS, 2009). A exposição pode representar risco quando a %IDA for maior que 100. Na avaliação de risco agudo, advindo da exposição no período de 24 horas, o parâmetro toxicológico é a dose de referência aguda (ARfD).

7.1 Avaliação de risco de resíduos de pesticidas em ervas vegetais

Estudos de avaliação de risco de resíduos de pesticidas em ervas vegetais foram reportados na literatura, em grande parte da China. A China é a maior exportadora de

medicamentos tradicionais chineses no mundo e o crescimento global do interesse na medicina tradicional chinesa, aumentou a preocupação dos chineses com a segurança das ervas utilizadas na fabricação dos medicamentos tradicionais chineses (Xiao et al., 2019). Assim, muitos estudos em plantas medicinais são conduzidos nesse país.

Li et al. (2017) realizaram avaliação de risco de resíduos de pesticidas em *Lonicera japonica* Thunb., uma planta medicinal chinesa. Nesse estudo, todas as amostras tiveram resíduos detectáveis e 38 pesticidas foram encontrados no total. Os valores de %IDA dos pesticidas detectáveis variaram de $6,7 \times 10^{-6}$ a 3,3% e o risco de dois grandes grupos detectados foi baixo, com valores de %IDA menores do que 1%, exceto pelo ometoato e triadmenol. Wu et al. (2020) realizaram avaliação de risco de resíduos de pesticidas em amostras de *Lonicera japonica* Thunb. O quociente de risco agudo (QR=ingestão/ARfD) do carbofurano, encontrado nesse estudo, foi de 1,54 para população específica (feto, bebês e grávidas ou mulheres lactantes), indicando um potencial risco agudo para a saúde. Na avaliação de risco cumulativa a 30 compostos, entre eles o fipronil, ometoato, carbofurano, clorpirifós e imidacloprido, o índice de risco (IR= Σ QR) agudo dos inseticidas pelo consumo de *L. japonica* por crianças foi de 1,34, sugerindo um potencial risco agudo cumulativo (IR > 1). O estudo de Xiao et al. (2019) realizou a análise da exposição a resíduos de pesticidas em *Paeoniae Radix Alba*, *Chaenomeles Fructus* e *Moutan Cortex*, com QR menores que 1, sem indicar riscos à saúde. Xu et al. (2020) realizaram a avaliação da exposição de resíduos de pesticidas em *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. A avaliação de risco agudo e crônico da exposição humana aos pesticidas realizada no estudo indicou que os resíduos encontrados nas amostras de *D. officinale* (secas ou *in natura*), não causariam risco à saúde humana.

III. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Otimizar e validar métodos para determinação de resíduos de pesticidas em ervas vegetais secas por UHPLC-MS/MS, analisar amostras e os riscos da exposição pelo consumo de chás.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Otimizar e validar método multirresíduo para determinação de pesticidas de várias classes;
2. Determinar os níveis de pesticidas em amostras de ervas vegetais secas pelo método multirresíduo;
3. Otimizar e validar método analítico para determinação de fungicidas de etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC);
4. Otimizar e validar método analítico para determinação do metabólito etilenotiourea (ETU);
5. Determinar os níveis de EBDC e ETU em amostras de ervas vegetais secas.
6. Avaliar o risco da exposição crônica da população a pesticidas pelo consumo de chás preparados com as ervas vegetais secas.

IV. ESTRUTURA DA TESE

A tese está dividida em dois capítulos, que apresentam os resultados obtidos durante os estudos realizados para o desenvolvimento dos métodos estudados, a fim de atingir os objetivos propostos no trabalho.

O primeiro capítulo (Capítulo 1. *Pesticide residues in dry herbs used for tea preparation by UHPLC-MS/MS: method validation and analysis*) descreve os resultados do desenvolvimento de método multirresíduo em ervas vegetais secas, análise de amostras e avaliação de risco da exposição à fenpropatrina pelo consumo de chá de camomila. Este Capítulo responde aos objetivos 1, 2 e 6.

O segundo capítulo (Capítulo 2. Determinação de etileno-bis-ditiocarbamatos e etilenotiourea em ervas vegetais por UHPLC-MS/MS) apresenta os resultados do desenvolvimento de dois métodos — etileno-bis-ditiocarbamatos e etilenotiourea — análise de amostras e avaliação de risco. Este Capítulo responde aos objetivos 3, 4, 5 e 6.

CAPÍTULO 1. PESTICIDE RESIDUES IN DRY HERBS USED FOR TEA PREPARATION BY UHPLC-MS/MS: METHOD VALIDATION AND ANALYSIS

ABSTRACT

Dry herbs are used for tea preparation and as material for phytotherapy medicines, and both are widely used by the population. However, herbs may contain contaminants and residues that could pose a health risk to consumers, and their levels should be monitored. In this work, a multiresidue method was validated for the analysis of 65 pesticides in different dry herbs. The samples were extracted with acidified acetonitrile, $MgSO_4$ and CH_3COONa , purified by dispersive solid phase with PSA, and the pesticides were quantified by UHPLC-MS/MS. A mixture of seven herbs composed of different plant parts was used as a control for method validation. Recovery ranged from 70 to 120% with a few exceptions; repeatability and intermediate precision was below 20% for 92% of the compounds. Limit of quantification (LOQ) ranged from 0.005 to 0.100 $mg\ kg^{-1}$. The method was applied for the analysis of 75 samples of 33 different dry herbs. About 35% of samples were positive ($\geq LOD$, $< LOQ$) for at least one pesticide (up to 1.60 $mg\ kg^{-1}$). Carbendazim and imidacloprid were the pesticides most detected (38.7 and 30.7% of positive samples, respectively). Only two of the analyzed pesticides are registered in Brazil for use in the investigated herbs, indicating that good agricultural practices are not being applied in herb cultivation in the country. A risk assessment for the consumption of dry herbs containing different pesticides did not indicate any health concern for consumers.

Key words: dry herbs; pesticides; multiresidue method; QuEChERS; monitoring; UHPLC-MS/MS.

1. INTRODUCTION

Plants have been widely used for tea preparation and as nutritional supplements for disease prevention and treatment for thousands of years in many countries and cultures. They are easily accessible, have low adverse effects, and most people consider them harmless (Kosalec et al., 2009; Shaban et al., 2016). Many plants contain bioactive compounds with therapeutic properties, including anti-inflammatory, antiviral, antitumor and analgesic (Aye et al., 2019). Rahman et al. (2012) observed a decrease in the blood glucose level of rats with alloxan-induced diabetes mellitus when administered with gotu kola juice (*Centella asiatica*), which contains triterpene saponins (Gohil et al., 2010). Studies with rats have demonstrated antineoplastic, and antioxidative activity of *Uncaria tomentosa* (cat's claw) and improvement in cognition, memory and learning (Castilhos et al., 2020; Dreifuss et al., 2013). Campos et al. (2011) studied the stimulant properties of guarana (*Paullinia cupana*) extracts on symptoms of fatigue, sleep quality, anxiety, depression and menopause in patients with breast cancer. The patients randomly received 50 mg of guarana or placebo, and the results showed that guarana significantly improved the FACIT-F (Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue), FACT-ES (Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Endocrine Symptoms), and BFI (Brief Fatigue Inventory) global scores compared to placebo.

There are several contaminants and residues present in herbs and herbal medicines that may cause potential health risks for consumers, such as heavy metals, radioactive particles, mycotoxins and pesticides (Shaban et al., 2016). Thus, the safety and quality of these preparations have become a major concern for health authorities, pharmaceutical industries, and the public (Kosalec et al., 2009; WHO, 2007). Pesticides are widely used to control pests that can affect agricultural production, including herbs, but they need to be used properly to be economically viable, safe for human health and environmentally sustainable (Caldas, 2019). The World Health Organization (WHO) advises member countries to include analysis of pesticides and contaminants in their regulations (WHO, 2007). In Brazil, RDC 26/2014 requires the analysis of pesticide residues, mycotoxins and heavy metals in medicinal herbs and their derivatives, to guarantee the quality and safety of these products (ANVISA, 2019a; BRAZIL, 2014).

There are several types of herbs used for tea preparation and for medicinal purposes, and different plant parts can be used (stem, flowers, stalks, leaves, barks, roots, seeds). Pesticide determination in dry herbs is challenging due to the low water content (< 25%), and to the presence of a large number of co-extractives in the matrix, such as lipids, chlorophyll, sugars and natural pigments (Abbas et al., 2017; Ghani, 2014; Rutkowska, 2018). Determination of pesticides in dry medicinal herbs has been reported in the literature, mainly using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) (Anastassiades et al., 2003) with some modifications (Besil et al., 2017; Ghani, 2014; Lozano et al., 2012; Rutkowska et al. 2018; Steiniger et al., 2010). However, most studies validate the method for a limited number of herbs, and analyses are performed only for validated plants.

This work aimed to validate a multiresidue method applicable to different matrices to analyze pesticides in samples of different types and parts of dry medicinal herbs by LC-MS/MS (liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry). The method was satisfactorily applied in the analysis of 75 samples of 33 dry herbs collected in the local market. Additionally, a risk assessment from the consumption of dry herbs containing different pesticides was performed.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Reference materials and reagents

Certified reference standards of 66 pesticides (purity 95.50–100%) were purchased from Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany (zoxamide), Sigma-Aldrich, Germany (acetamiprid, atrazine, fenpyroximate, pencycuron, pyridaphenthion) and AccuStandard, USA (other compounds). The selection of analytes was based on the list in RDC 26/2014, which includes 250 pesticides registered or banned in the country. The most frequently detected pesticides in the Program for the Analysis of Pesticide Residues in Food (PARA – *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos*) were also taken into account (ANVISA, 2019b). In this work, compounds amenable to liquid chromatography were analyzed.

Methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) HPLC grade and gradient grade were obtained from Merck (Darmstadt, Germany); ammonium formate ($\geq 99.0\%$) and formic

acid (98%) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland); magnesium anhydrous sulfate (MgSO_4 , $\geq 99.5\%$) from Sigma-Aldrich (Missouri, USA); sodium acetate anhydrous (CH_3COONa , 99.5%) from J.T. Baker (New Jersey, USA); and PSA was obtained from Supelco (Pennsylvania, USA).

2.2 Standard solution preparation

Stock solutions of each of the 66 analytes assessed in this study (Table S1.1) were prepared in MeOH, ethyl acetate, toluene or ACN at 1 mg mL^{-1} . Mixing working solutions were prepared in MeOH at concentrations of $5\text{--}150 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ (acetamiprid, ametryn, atrazine, azoxystrobin, boscalid, buprofezin, carbendazim, carbofuran, carbofuran 3-OH, chlorfenvinphos, cyromazine, diazinon, dicrotophos, difenoconazole, dimethoate, epoxiconazole, fipronil, fluquinconazole, imazalil, imidacloprid, malaoxon, metalaxyl-M, methamidophos, methomyl, monocrotophos, omethoate, pencycuron, pyraclostrobin, pyridaphenthion, pirimicarb, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, profenofos, pyrazophos, tebuconazole, thiabendazole, thiobencarb, thiophanate-methyl, triazophos, trifloxystrobin, zoxamide) or $20\text{--}800 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ (2,4-D, acephate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, ethion, fenitrothion, fenpyroximate, fenpropathrin, fenthion, flutriafol, heptenophos, linuron, malathion, methiocarb, metribuzin, methyl paraoxon, myclobutanil, phenthoate, prochloraz, propanil, prothiofos, quinalphos, thiamethoxam, trichlorfon). All solutions were stored in amber vials at $\leq -15^\circ\text{C}$.

2.3 Sampling

Seventy-five samples of 33 different dry medicinal herbs were collected from 2018 to 2020 in different establishments and compounding pharmacies in the Federal District, Brazil: artichoke (*Cynara scolymus*, $n=4$); black mulberry (*Morus nigra*, $n=2$); angelica (*Angelica officinalis* L., $n=2$); mountain arnica (*Arnica montana*, $n=1$); “arnica-do-mato” (*Solidago microglossa*, $n=2$); “assa-peixe” (*Vernonia polyanthes*, $n=1$); “barbatimão” (*Stryphnodendron barbatiman*, $n=1$); boldo (*Peumus boldus*, $n=5$); chamomile (*Matricaria chamomilla*/*Matricaria recutita*, $n=4$); “canela-de-velho” (*Miconia albicans*, $n=2$); “carqueja” (*Baccharis trimera*, $n=1$); cascara buckthorn (*Rhamnus purshiana*, $n=2$); horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*, $n=1$); horsetail (*Equisetum arvense*/*Equisetum*

hyemale, n=4); gotu kola (*Hydrocotyle asiatica*, n=2); green tea (*Camelia sinensis*, n=4); leather hat (*Echinodorus macrophyllus*, n=3); chlorela (*Chlorella pyrenoidosa*, n=2); comfrey (*Symphytum officinale*, n=1); “espinheira santa” (*Maytenus ilicifolia*, n=3); bladder wrack (*Fucus vesiculosus*, n=2); ginkgo (*Ginkgo biloba*, n=2); guarana (*Paullinia cupana*, n=2); hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis/Hibiscus sabdariffa*, n=2); Peruvian maca (*Lepidium meyenii*, n=1); muira puama (*Ptychopetalum olacoides*, n=2); mulungu (*Erythrina velutina/Erythrina mulungu*, n=2); passion fruit (*Passiflora incarnata/Passiflora alata*, n=2); myrcia (*Myrcia multiflora*, n=1); senna (*Senna alexandrina/Cassia angustifolia vahl./Cassia acutifoli*, n=5); spirulina (*Arthrospira (Spirulina) platensis*, n=2); puncture vine (*Tribulus terrestris*, n=1); and cat’s claw (*Uncaria tomentosa*, n=3).

Upon arrival at the laboratory, the samples were stored at room temperature and subsequently processed and homogenized in a blender (leaves, stems and flowers) or in a mill (stems, bark), with the exception of powdered products, which were only homogenized before analysis. The choice of dry medicinal herbs investigated was based on the Brazilian Herbal Medicines Memento (ANVISA, 2016), Brazilian National List of Essential Medicines (BRAZIL, 2020), Braga and Silva (2021) and an informal survey of the best-selling herbs in compounding pharmacies and establishments in the Federal District.

2.4 Instrumentation

This work was initiated using a 4000QTrap LC-MS/MS system (Applied Biosystem/MDS Sciex, MA, USA) to perform the gravimetric test of co-extractives and matrix effect of selected samples. The system consists of a UFLC Shimadzu (Kyoto, Japan), with binary pump (LC-20AD), degasser, automatic sampler, column oven (CTO-20AC) and controller (CBM-20A), coupled to a triple quadrupole mass spectrometer with TurbolonSpray source and electrospray ionization in positive mode (ESI+). Chromatographic separation was performed on a Synergi 4 µm Fusion RP 80A column, 50 x 2.00 mm (Phenomenex) with a Fusion-RP 4 x 2.0 mm pre-column. MS/MS optimization, ionization source parameters and chromatographic conditions were described by Mozzaquatro et al. (2022). Data were acquired in scheduled Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) mode and analyzed with Analyst® v. 1.5.2 (Sciex).

Further, a new LC-MS/MS system was acquired (6500+QTrap, MDS Sciex, MA, USA) and used for method validation and sample analysis. The system consists of a Exion LC Sciex AD Series UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) system (MA, USA), with a binary pump, degasser, automatic sampler, column oven (AC) and controller, coupled to a triple quadrupole mass spectrometer with IonDrive™ Turbo V source and electrospray ionization in positive and negative modes. Data acquisition was performed using Analyst® v. 1.7.2 and processed in Sciex OS v. 1.6.2. MS/MS optimization for the 66 analytes studied was performed by direct infusion, at a flow rate of 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, of solutions of the compounds in MeOH:H₂O (50:50) with 5 mM ammonium formate and 0.1% acid formic, at concentrations of 50–100 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$. Chromatographic separation was performed on a LUNA Omega Polar C18 1.6 μm 100A, 100 x 2.1 mm UHPLC column (Phenomenex) with SecurityGuard Ultra Cartridges UHPLC Fully Porous Polar C18 2.1 mm pre-column. The mobile phase consisted of water with 5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid (phase A) and MeOH with 5 mM ammonium formate and 0.1% formic acid (phase B). The flow rate was set at 0.3 mL min^{-1} , with gradient elution: 0–0.5 min 10% B, 0.5–10 min 10% to 100% B, 10–12 min 100% B, 12–15 min 10% B (run time: 15 min). The injection volume was set at 1 μL and the column oven temperature at 50°C. Data were acquired in Scheduled MRM mode. The ionization source conditions were: temperature (TEM) at 450°C, entrance potential (EP) of 10 eV and -10 eV (ESI+ and ESI-, respectively), curtain gas (CUR) at 40 psi, collision gas (CAD) medium, ion spray voltage (IS) 5500 V and -4500 V (ESI+ and ESI-, respectively), ion source gas of 65 psi and 50 psi (GS1 and GS2, respectively). With the exception of 2,4-D and fipronil, all analytes were analyzed in positive mode. The optimized parameters of the compounds in the 6500+QTrap LC-MS/MS system are shown in Table S1.1 (Supplementary Material).

2.5 Gravimetric test of co-extractives and matrix effects (4000QTrap LC-MS/MS)

When developing the method, it was clear that it would be very time-consuming to determine the matrix effects of each one of the 33 different dry herbs to be included in the study. Furthermore, samples of the same dry herb type have a single part of the plant (e.g., leaves or flower) or include other parts (e.g., bark or stems). Hence, matrix effect

(and validation) investigation using one kind of herb or plant part would not cover all possible samples of dry herbs available on the market. Taking a pragmatic approach, a co-extractive experiment was conducted to identify herbs that would potentially cover a large range of types and samples with different matrix effects to help decide which sample to use as a control in the method validation.

The gravimetric test was performed with 42 samples out of the 75 available for the study. Each sample (n=2) was extracted with ethyl acetate + 1% acetic acid, MgSO₄ and CH₃COONa (Mozzaquatro et al., 2022), 5 mL of the extract transferred to a previously weighed test tube, the extract was evaporated to dryness in CentriVap at 60°C, the tube was weighed again, and the residual mass was calculated (Santos et al., 2019). Based on the results of this test, the matrix effect of selected dry medicinal herb types was investigated. The sample was extracted with ethyl acetate and cleaned up according to Mozzaquatro et al. (2022); the evaporated extract was fortified with a mix solution of 49 pesticides to a final concentration of 100 pg μL⁻¹ (MeOH:H₂O; 1:1) and injected in the 4000QTrap LC/MS/MS. A vial containing only the analytes at the same concentration in solvent was prepared, and also injected in the LC-MS/MS. The matrix effect was calculated as [% ME = ((peak area of analyte in matrix/peak area of the analyte in solvent)-1) x 100] (SANCO, 2021).

2.6 Extraction and clean-up (6500+QTrap UHPLC-MS/MS)

Although in the preliminary study the extraction was conducted with ethyl acetate (Section 2.5), in the 6500+QTrap UHPLC-MS/MS the method showed similar performance when using ACN (data not shown). As the objective was to have the same method for pesticide and mycotoxin determination (which performed better with ACN extraction, not covered here), ACN was used as extraction solvent. Briefly, 1 g of dry herb sample was hydrated with Milli-Q water for 15 min, extracted with ACN + 1% formic acid, MgSO₄, and CH₃COONa, and purified with MgSO₄ and PSA. Then, 750 μL of the extract was evaporated to dryness at room temperature in a sample concentrator (CentriVap), resuspended in 500 μL of MeOH:water (50:50), and filtered through a syringe filter before injection in LC-MS/MS. Figure 1.1 shows a flowchart of sample preparation procedure.

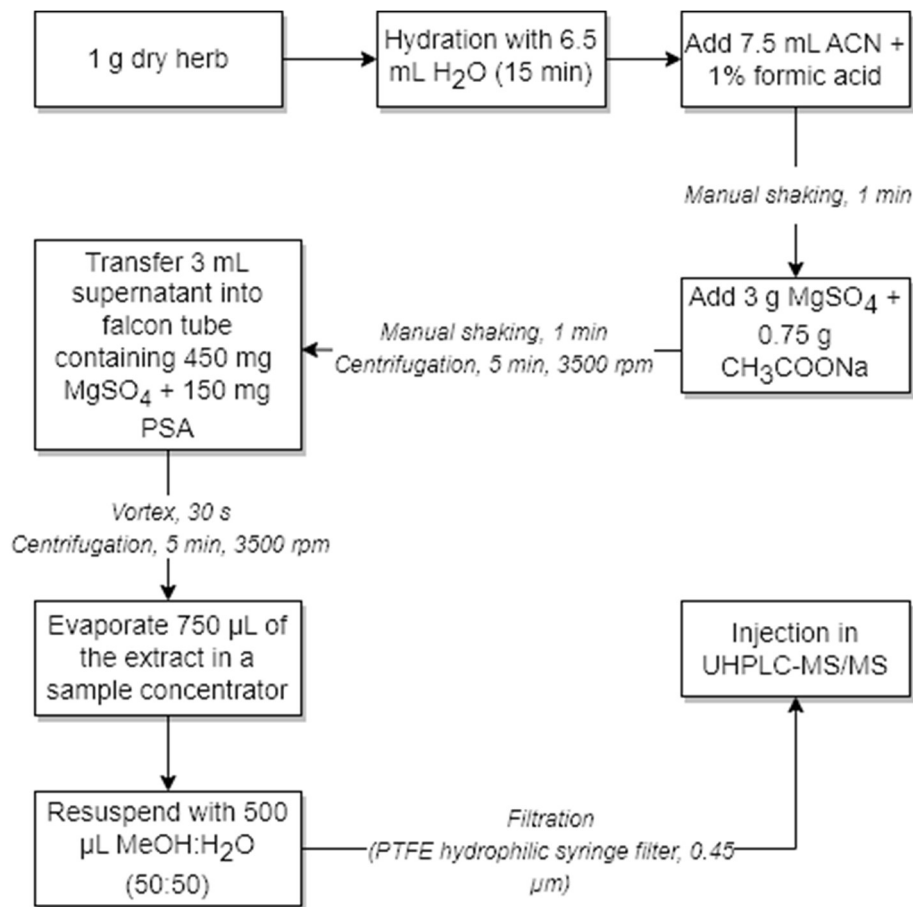


Figure 1.1 – Flowchart of sample preparation procedure for the determination of pesticides in dry herbs.

2.7 Method validation (6500+QTrap UHPLC-MS/MS)

Method validation was performed using a control matrix sample prepared as a mixture of different dry medicinal herb types, selected based on the results of the tests for co-extractives and matrix effects (Section 2.5). The method was validated for 66 pesticides for selectivity, linearity, matrix effect, recovery, repeatability, and intermediate precision (INMETRO, 2020).

Selectivity was assessed by checking the presence of interferents in the control matrix at the same retention time as the monitored ions.

Linearity was assessed through standard curve analysis prepared in control matrix (in-matrix post-extraction standard curve) at 5 calibration levels and 3 replicates for each level: 5, 10, 20, 40, 80 pg µL⁻¹ for 2,4-D, acephate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, ethion, fenitrothion, fenpyroximate, fenpropathrin, fenthion, phenthoate, flutriafol,

heptenophos, linuron, malathion, methiocarb, metribuzin, myclobutanil, methyl paraoxon, prochloraz, propanil, prothiofos, quinalphos, thiamethoxam and trichlorfon; and 1, 3, 5, 7 and 15 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ for the other analytes. The least squares method was used to estimate linear regression, the Grubbs test to verify the presence of outliers, the Cochran test for variance homogeneity, and ANOVA to determine the correlation coefficient (r) and significance of the regression (INMETRO, 2020). For heteroscedastic standard curves, $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{0.5}$, $1/y$, $1/y^2$ and $1/y^{0.5}$ weightings were tested in order to determine the best regression fit.

Matrix effect was assessed to verify if matrix components interfere in the identification of the compounds under study, enhancing or suppressing the analytical signal. In-matrix standard curves were prepared for all analytes (5 levels and 3 replicates) and compared with standard curves prepared in MeOH:H₂O (50:50) (5 levels and 3 replicates). The matrix effect was calculated as previously described. Values below or above 20% indicate signal suppression and enhancement, respectively, and those within the $\pm 20\%$ range were considered acceptable.

Recovery (%) and repeatability (relative standard deviation, %RSD) were assessed by fortifying the control sample at three concentration levels (low, medium, and high) with $n=5$ for each level, on the same day, by the same analyst. The following levels were assessed: 0.025, 0.100 and 0.400 mg kg^{-1} for 2,4-D, acephate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, ethion, fenitrothion, fenpropathrin, fenthion, phenthoate, flutriafol, heptenophos, linuron, malathion, methiocarb, metribuzin, methyl paraoxon, myclobutanil, prochloraz, propanil, quinalphos, thiamethoxam and trichlorfon; 0.025, 0.050, 0.100 and 0.400 mg kg^{-1} for fenpyroximate and prothiofos and 0.005, 0.025 and 0.075 mg kg^{-1} for the other analytes.

Intermediate precision (% RSD) was assessed by repeating the recovery experiment (same analyst) on a different day.

The method LOQ was defined as the lowest level with acceptable mean recovery (70–120%), and repeatability and intermediate precision less than or equal to 20% (SANTE, 2021). Mean recovery rates outside the range were accepted (not lower than 30% or higher than 140%) when repeatability was lower than 20% (SANTE, 2021).

Samples with pesticides detected (LOD = 1/3 LOQ) but at levels lower than the LOQ were considered positive, and the levels reported as traces.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Gravimetric test of co-extractives and matrix effect

Figure 1.2A shows the results of the co-extractive study for the 42 samples. A green tea sample had the highest residual mass (0.12 g), and a Peruvian maca sample, the lowest (0.0012 g). Different residual masses were obtained for samples of the same plant, such as “espinheira santa” and guarana, showing that the number of co-extractives also depend on other factors such as planting conditions, parts included and drying process. Nine representative samples of the 42 samples were selected in 3 groups to determine matrix effect according to residual mass: high residual mass: boldo (0.1 g); medium residual mass: senna, artichoke, chamomile, and “espinheira santa” (0.05-0.04 g); low residual masses: gotu kola, guarana, passion fruit, and “espinheira santa” (0.02-0.005g). A summary of the results is shown in Figure 1.2B, and the details in Table S1.2. All the samples showed a suppression matrix effect for all compounds, except for guarana and passion fruit, for which signal enhancement was observed for some compounds (23 pesticides for guarana, and 1 pesticide for passion fruit, highest of 62% for heptenophos). For all samples, the mean matrix effect was due to signal suppression (Figure 1.2B).

The results shown in Figure 1.2 indicated that a higher co-extractive mass does not always lead to a higher matrix effect, and vice-versa, and that samples from the same plant can generate different co-extractive and matrix effects, which supports the approach of using different herbs to compose a control sample to be used in the method validation. In addition to the fact that samples of the same herb can have different plant parts, as discussed previously, this could be due to other characteristics not related to the plant itself, such as its growing conditions, processing, and drying methods.

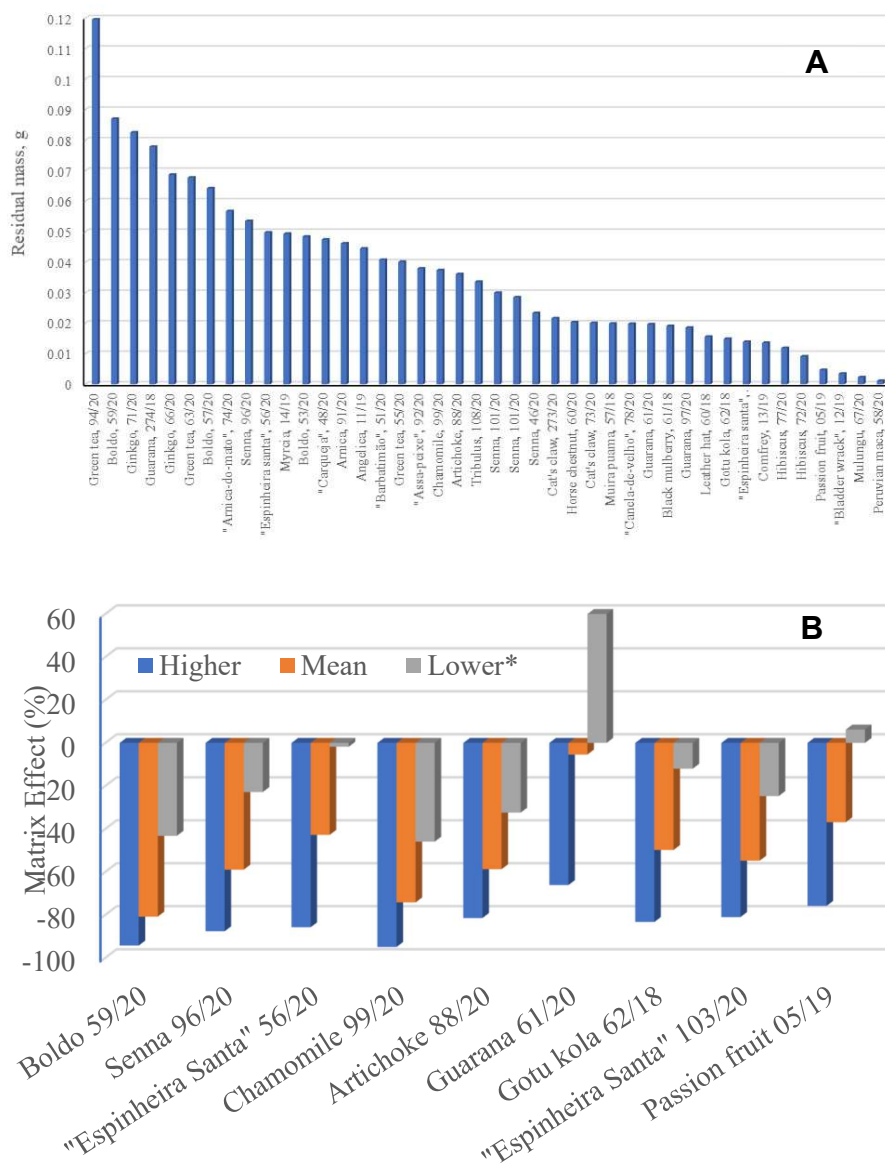


Figure 1.2 – A: Residual mass (g) of co-extracts of 42 dry medicinal herb samples **B:** Range and mean of suppression matrix effect (%) of all 49 analytes tested for selected samples (4000QTrap LC-MS/MS). *For guarana and passion fruit samples, signal enhancement was also observed for some compounds.

Although the co-extractive and the preliminary matrix effect tests were performed using ethyl acetate extraction, the results were used to select a pool of dry herbs to be used as control in the method validation (ACN extraction), in an attempt to capture the dry herb matrix variability. This control sample was prepared with 19 samples of 7 herb types, to include different plant parts, previously confirmed using the 4000QTrap LC-MS/MS system as not containing the investigated analyte (49 analytes tested): leaves/barks of

boldo (n=4), artichoke (n=3), “espinheira santa” (n=2), cat’s claw (n=1) and senna (n=5); flowers and stems of chamomile (n=2) and bark of cascara buckthorn (n=1) and cat’s claw (n=1). The control sample was prepared with 20 g of each sample, homogenized (850 µm, 20 mesh) and analyzed by the optimized method in the 6500+QTrap system, where no residues were detected for all 66 pesticides.

3.2 Method validation

No interferences were observed at the same retention time for the ions monitored in the control matrix, indicating method selectivity. Figure 1.3 summarizes the matrix effect data, and Table S1.3 shows the individual values for each analyte assessed. As matrix effect was greater than $\pm 20\%$ for most compounds at all fortification levels, mainly with signal suppression effect (Table S1.3), the analytes were quantified against an in-matrix post-extraction standard curve (external calibration). Figure 1.3A shows a chromatogram of a control matrix fortified with all 66 analytes.

The linearity of the in-matrix standard curve showed heteroscedastic behavior for 43 analytes ($C_{\text{calculated}} > C_{\text{tabulated};5;3}$). For these compounds, weighted linear regression was used for quantification (Miller and Ambrus, 2000), and the following weights were selected: $1/x^2$ for pyridaphenthion and $1/x$ for 2,4-D, acephate, acetamiprid, ametryn, azoxystrobin, buprofezin, carbaryl, carbendazim, carbofuran, cyromazine, clorfenvinfos, chlorpyrifos-methyl, dicrotophos, difenoconazole, dimethoate, ethion, fenpyroximate, fenpropathrin, phenthoate, fipronil, fluquinconazole, flutriafol, imazalil, imidacloprid, malathion, metalaxyl-M, methamidophos, monocrotophos, omethoate, pencycuron, pyraclostrobin, pirimicarb, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, prochloraz, profenofos, quinalphos, thiabendazole, triazophos, trichlorfon, trifloxystrobin and zoxamide. Homoscedastic behavior was observed for the other analytes ($C_{\text{calculated}} < C_{\text{tabulated};5;3}$). Correlation coefficients (r) were equal to or greater than 0.99, except for diazinon (0.96) and dimethoate, malathion and prochloraz (0.98). All weighted regressions for their respective curves were significant ($p < 0.05$).

Figure 1.3 also shows a summary of the results for recovery, repeatability, and intermediate precision, and Table S1.4 details the results for all analytes assessed. Repeatability was less than 20% for all analytes at all levels of fortification. Recovery

values between 70 and 120% were obtained for most compounds, with the mean below 70% obtained for cyromazine at medium and high levels (60-64%, respectively) and for 2,4-D at all levels (27-33%), and above 120% at the lowest fortification level for fenpyroximate (125%), pirimiphos-ethyl (123%) and prothiofos (165%). Although recoveries were outside the acceptable levels, repeatability was less than 20%, and the method was considered validated for these compounds. Low recoveries of 2,4-D were also found by Lozano et al. (2012) when analyzing *Camellia sinensis* and chamomile (*Matricaria chamomilla*), probably due to the use of PSA for clean-up. The ability to remove interferences from the matrix by PSA is due to the presence of amine groups in its structure, which have basic properties, enabling hydrogen bond formation with matrix components. 2,4-D has carboxyl groups, which can bind to PSA resulting in low recoveries (Lozano et al., 2012). One key issue in pesticide residue analysis of dry plants/herbs is the hydration step. Jadhav et al. (2017) showed no impact on cardamom powder incurred residues when the hydration step included soaking for 30 min. before extraction or not, but when soaking was used, the RSDs were significantly lower (< 10%) compared to the RSDs of when the soaking step was omitted (> 20%). In the present study, the dry herb sample was soaked in water for 15 min. before extraction, and probably was not an important factor to explain the higher RSD for some compounds.

Recoveries for thiophanate-methyl were 208, 42 and 17% for the low, medium and highest fortification levels, respectively. Intermediate precision was higher than 20% for fenpyroximate (32–53%), prothiofos (40% at the lowest level, 21–25% at the others), thiophanate-methyl (58–65%), and fipronil and pencycuron at the low level (21%). Based on the overall results (Table S1.4) a LOQ of 0.025 mg kg⁻¹ was established for 2,4-D, acephate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, ethion, fenitrothion, fenprothrin, fenthion, phenthoate, flutriafol, heptenophos, linuron, malathion, methiocarb, metribuzin, methyl paraoxon, myclobutanil, prochloraz, propanil, quinalphos, thiamethoxam and trichlorfon (23 compounds), and 0.005 mg kg⁻¹ for the other analytes (40 compounds). The experiment was repeated for fenpyroximate and prothiofos at the 0.050 mg kg⁻¹ level, giving unsatisfactory recoveries (126 and 136%) and the LOQ was defined as 0.100 mg kg⁻¹ for both analytes (Table S1.4). The method was not validated for thiophanate-methyl, and the results for this analyte were considered only qualitative.

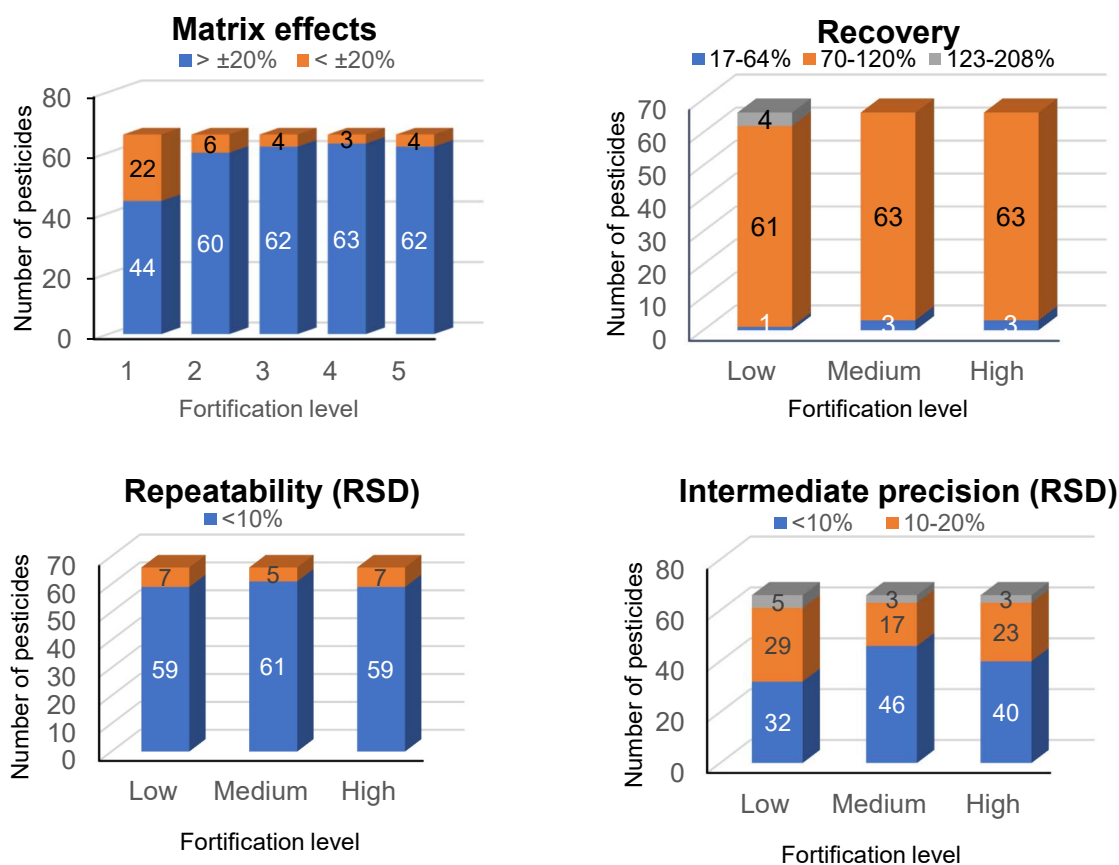


Figure 1.3 – Summary of validation data for the 66 pesticides in dry medicinal herbs conducted in the 6500+QTrap UHPLC-MS/MS. Matrix effect fortification levels 1 to 5: 5, 10, 20, 40, 80 μL^{-1} , respectively, for 2,4-D, acephate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, ethion, fenitrothion, fenpyroximate, fenpropathrin, fenthion, phenthoate, flutriafol, heptenophos, linuron, malathion, methiocarb, metribuzin, myclobutanil, methyl paraoxon, prochloraz, propanil, prothiofos, quinalphos, thiamethoxam and trichlorfon, and 1, 3, 5, 7 and 15 μL^{-1} , respectively, for the other analytes. Recovery, repeatability and intermediate precision fortification levels: low, medium and high: 0.025, 0.1 and 0.4 mg kg^{-1} , respectively, for 2,4-D, acephate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, ethion, fenitrothion, fenpyroximate, fenpropathrin, fenpyroximate, fenthion, phenthoate, flutriafol, heptenophos, linuron, malathion, methiocarb, metribuzin, myclobutanil, methyl paraoxon, prochloraz, profenofos, propanil, prothiofos, quinalphos, thiamethoxam and trichlorfon, and 0.005, 0.025 and 0.075 mg kg^{-1} , respectively, for the other analytes.

Table 1.1 shows the LOQs established for each of the 65 analytes validated in this study. LOQs reported in this study were within the range of those reported in the literature for different dry herbs. Besil et al. (2017) validated a LC-MS/MS method for 24 pesticides on calendula at LOQs of 0.010 to 0.100 mg kg^{-1} (extraction with ACN, NaCl, MgSO_4 , clean-up with PSA and MgSO_4). Chen et al. (2016), validated a GC-MS/MS method for

227 pesticides in green tea, ginseng, ginkgo leaves, saw palmetto, spearmint, and black pepper at LOQs of 0.01 to 0.03 mg kg⁻¹ (extraction with ACN, MgSO₄ and NaCl, clean-up with solid phase extraction using carbon coated on alumina (CCA/PSA or CCA/PSA/C18)). Lozano et al. (2012) validated a method for 86 pesticides in green tea and chamomile at LOQs of 0.010–0.100 mg kg⁻¹ (extraction with ACN and triphenyl phosphate, MgSO₄, NaCl, trisodium citrate dihydrate and disodium hydrogen citrate sesquihydrate, clean-up with CaCl₂ and PSA) and detection by LC-MS/MS and GC-MS/MS. A similar method was used by Machado et al. (2017) for 84 pesticides in artichoke at LOQs of 0.010 mg kg⁻¹ (LC-MS/MS), or 0.005 and 0.010 mg kg⁻¹ (GC-MS). Chen et al. (2013) achieved lower LOQs (0.00001-0.001 mg kg⁻¹) using ACN, MgSO₄ and NaCl extraction, homogenization with chloroform, followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of 39 pesticides in ginseng (UHPLC-MS-MS).

Table 1.1 – Limit of Quantification (LOQ), and of detection (LOD = 1/3 LOQ) for the 65 pesticides validated in the 6500+QTrap UHPLC/MS/MS

Pesticide	LOQ (LOD), mg kg⁻¹	Pesticide	LOQ (LOD), mg kg⁻¹	Pesticide	LOQ (LOD), mg kg⁻¹
2.4-D	0.025 (0.008)	Fenitrothion	0.025 (0.008)	Pencycuron	0.005 (0.002)
Acephate	0.025 (0.008)	Fenpropathrin	0.025 (0.008)	Phenthoate	0.025 (0.008)
Acetamiprid	0.005 (0.002)	Fenpyroximate	0.1 (0.03)	Pirimicarb	0.005 (0.002)
Ametryn	0.005 (0.002)	Fenthion	0.025 (0.008)	Pirimiphos-ethyl	0.005 (0.002)
Atrazine	0.005 (0.002)	Fipronil	0.005 (0.002)	Pirimiphos-methyl	0.005 (0.002)
Azoxystrobin	0.005 (0.002)	Fluquinconazole	0.005 (0.002)	Prochloraz	0.025 (0.008)
Boscalid	0.005 (0.002)	Flutriafol	0.025 (0.008)	Profenofos	0.005 (0.002)

Buprofezin	0.005 (0.002)	Heptenophos	0.025 (0.008)	Propanil	0.025 (0.008)
Carbaryl	0.025 (0.008)	Imazalil	0.005 (0.002)	Prothiofos	0.1 (0.03)
Carbendazim	0.005 (0.002)	Imidacloprid	0.005 (0.002)	Pyraclostrobin	0.005 (0.002)
Carbofuran	0.005 (0.002)	Linuron	0.025 (0.008)	Pirazophos	0.005 (0.002)
Carbofuran 3-OH	0.005 (0.002)	Malaoxon	0.005 (0.002)	Pyridaphenthion	0.005 (0.002)
Chlorfenvinphos	0.005 (0.002)	Malathion	0.025 (0.008)	Quinalphos	0.025 (0.008)
Chlorpyriphos	0.025 (0.008)	Metalaxyl-M	0.005 (0.002)	Tebuconazole	0.005 (0.002)
Chlorpyriphos-methyl	0.025 (0.008)	Methamidophos	0.005 (0.002)	Thiabendazole	0.005 (0.002)
Cyromazine	0.005 (0.002)	Methiocarb	0.025 (0.008)	Thiamethoxam	0.025 (0.008)
Diazinon	0.005 (0.002)	Methomyl	0.005 (0.002)	Thiobencarb	0.005 (0.002)
Dicrotophos	0.005 (0.002)	Metribuzin	0.025 (0.008)	Triazophos	0.005 (0.002)
Difenoconazole	0.005 (0.002)	Monocrotophos	0.005 (0.002)	Trichlorfon	0.025 (0.008)
Dimethoate	0.005 (0.002)	Myclobutanil	0.025 (0.008)	Trifloxystrobin	0.005 (0.002)
Epoxiconazole	0.005 (0.002)	Omethoate	0.005 (0.002)	Zoxamide	0.005 (0.002)
Ethion	0.025 (0.008)	Methyl paraoxon	0.025 (0.008)		

3.3 Sample analysis

In total, 75 samples of 33 different dry medicinal herbs were analyzed in the 6500+QTrap UHPLC-MS/MS, of which 34.6% were positive (at least traces, \geq LOD, $<$ LOQ) for at least one analyte assessed. Thirty pesticides were found and carbendazim was the most detected analyte, present in 10 samples (38.5% of positive samples), followed by imidacloprid (8 samples, 30.7%). The highest concentrations found were 1.28 and 1.60 mg kg⁻¹ of carbendazim in gotu kola and chamomile samples, respectively.

The validated method's performance during routine analysis was assessed through the inclusion of fortified samples with all the analytes at one level (0.100, 0.025 or 0.005 mg kg⁻¹) and two replicates (quality control samples). Mean recovery was satisfactory for all analytes except for 2,4-D (38%), cyromazine (60%), fenpropathrin (147%), fenthion (50%), prothiofos (146%) and thiophanate-methyl (17%). Only fenpropathrin was detected in the analyzed samples (4 samples). Thiophanate-methyl (not satisfactorily validated) was monitored but not detected in any sample. Prothiofos and fenpyroximate had questionable intermediate precision results (Table S1.4), but they were not detected in any samples.

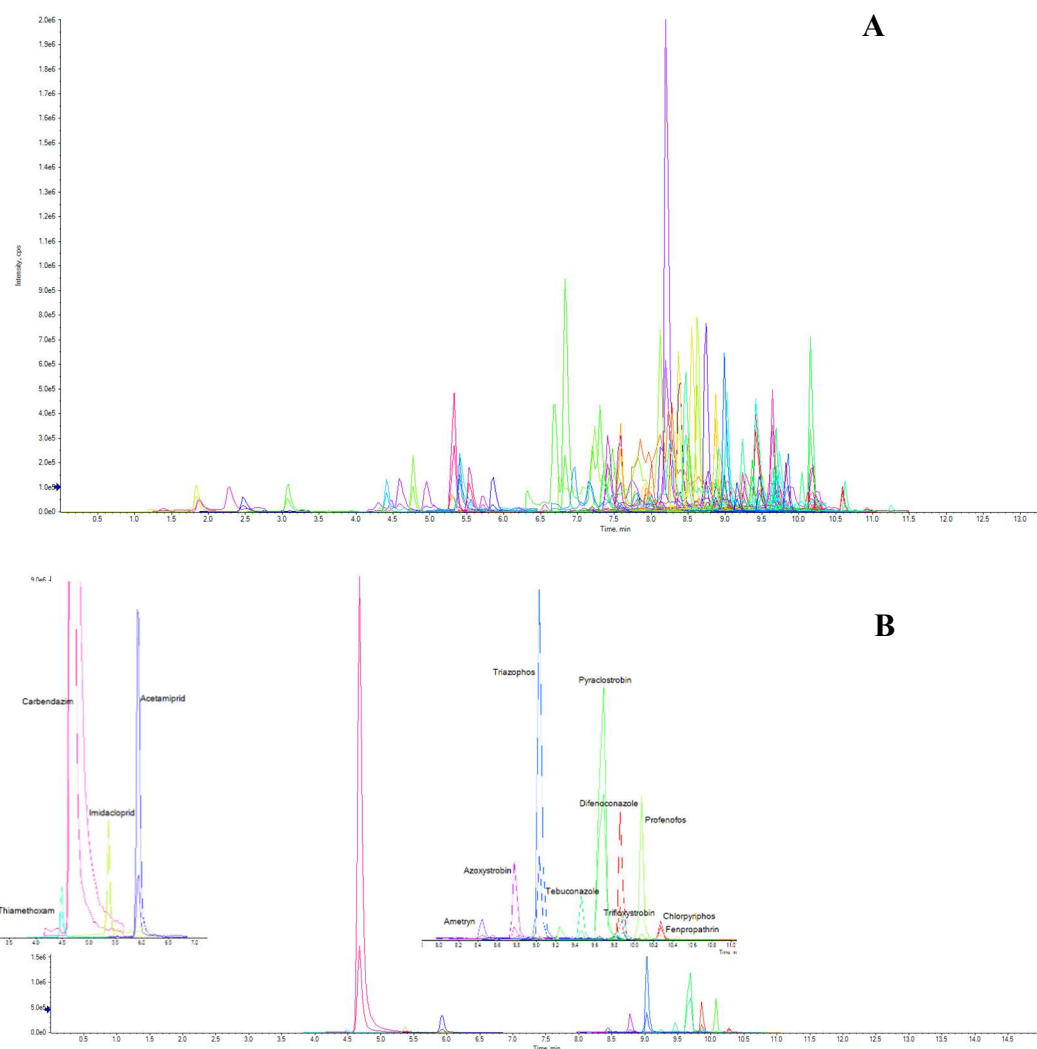


Figure 1.4 – 6500+QTrap UHPLC/MS/MS ion chromatogram of A: 66 analytes at 7 or 20 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$; B: gotu kola sample 87/20, showing the 14 detected analytes in the inserts. With exception of ametryn ($< 0.005 \text{ mg kg}^{-1}$), all the other compounds were present at quantified levels (Table S1.5).

Table 1.2 shows the detected analytes and the concentrations when $\geq \text{LOQ}$, and Table S1.5 shows the results of all samples in detail. Figure 1.4B shows the chromatogram of a sample of gotu kola (87/20), one of the samples with the highest number of pesticides detected (14). With exception of ametryn ($< 0.005 \text{ mg kg}^{-1}$), all the other compounds were present at quantified levels, ranging from 0.009 mg kg^{-1} for azoxystrobin to 1.28 mg kg^{-1} for carbendazim (Table S1.5).

Table 1.2 – Pesticides detected in dry medicinal herbs (UPHLC-MS/MS, 6500+ QTrap)

Pesticide (LOQ, mg kg⁻¹)	Positive samples (n^a)	Concentration range, mg kg⁻¹ (Traces, n^b)
Acetamiprid (0.005)	Chamomile ^d (1), Gotu kola (1), Green tea (1), Ginkgo (2), Tribulus (1)	0.005-0.068
Ametryn (0.005)	Gotu kola (1)	(1)
Atrazine (0.005)	Ginkgo (1)	(1)
Azoxystrobin (0.005)	Chamomile ^d (1), Gotu kola (1), Tribulus (1)	0.006-0.009 (1)
Buprofezin (0.005)	Green tea (1), Ginkgo (1), Spirulina (1), Tribulus (1)	0.006-0.007 (1)
Carbaryl (0.025)	Guarana (2), Hibiscus ^f (1)	(3)
Carbendazim (0.005)	Angelica (1), "Arnica-do-mato" (1), Chamomile ^d (1), Horsetail ^e (1), Gotu kola (1), Green tea (1), Ginkgo (2), Tribulus (1), Cat's claw (1)	0.005-1.602 (2)
Carbofuran ^c (0.005)	Tribulus (1)	(1)
Chlorpyrifos (0.025)	Chamomile ^d (1), Gotu kola (1), Ginkgo (1)	0.032-0.075
Difenoconazole (0.005)	Gotu kola (1), Ginkgo (1), Tribulus (1)	0.022-0.087
Epoxiconazole (0.005)	Ginkgo (1)	(1)
Fenitrothion (0.025)	Arnica (1)	0.486
Fenpropathrin (0.025)	Chamomile ^d (2), Gotu kola (1), Ginkgo (1)	0.042-0.198 (1)
Imazalil (0.005)	Artichoke (1), Chamomile ^d (1)	0.018-0.044
Imidacloprid (0.005)	Arnica (2), Arnica-do-mato (1), Chamomile ^d (1), Gotu kola (1), Green tea (1), Ginkgo (2), Tribulus (1)	0.006-0.081 (1)
Linuron (0.025)	Arnica-do-mato (1), Chamomile ^d (1)	0.463 (1)
Malaoxon (0.005)	Chamomile ^d (1)	0.006
Malathion (0.025)	Chamomile ^d (1)	0.255
Metalaxyl-M (0.005)	Chamomile ^d (1), Ginkgo (1), Tribulus (1)	0.017-0.051 (1)
Methomyl (0.005)	Artichoke (1), Black mulberry (1), "Canela-de-velho" (1)	0.007 (2)

Pesticide (LOQ, mg kg ⁻¹)	Positive samples (n ^a)	Concentration range, mg kg ⁻¹ (Traces, n ^b)
Paraoxon-methyl (0.025)	Ginkgo (1)	0.031
Pirimiphos-methyl (0.005)	Green tea (1)	0.005
Profenofos (0.005)	Gotu kola (1), Green tea (1)	0.031-0.095
Pyraclostrobin (0.005)	Chamomile ^d (1), Gotu kola (2), Ginkgo (1)	0.066-0.386 (1)
Quinalphos ^c (0.025)	Boldo (1)	0.034
Tebuconazole (0.005)	Cáscara sagrada (1), Horsetail ^e (1), Gotu kola (1), Ginkgo (1), Tribulus (1)	0.004-0.101 (1)
Thiamethoxam (0.025)	“Canela-de-velho” (1), Gotu kola (1), Comfrey (1), Ginkgo (2), Tribulus (1)	0.005-0.026 (1)
Triazophos ^c (0.005)	Gotu kola (1), Green tea (1)	0.013-0.074
Trifloxystrobin (0.005)	Arnica (1), “Arnica-do-mato” (1), Gotu kola (1)	0.005-0.010 (3)
Zoxamide (0.005)	Angelica (1), Leather hat (2)	0.006-0.029

a: number of positive samples (at least traces, \geq LOD, $<$ LOQ); b: number of samples at trace levels; c: no registration in the country; d: *Matricaria sp.*; e: *Equisetum sp.*; f: *Hibiscus sabdariffa*.

In principle, no pesticide should be detected in plants if no authorization is granted by the regulatory agency, although residues found at very low levels by sensitive equipment may come from cross-contamination from nearby treated crops. Among the analytes found in the herb samples, only two have maximum residue levels (MRL) established in the Brazilian legislation (linuron for chamomile, MRL of 0.02 mg kg⁻¹, and methomyl for black mulberry, MRL of 0.05 mg kg⁻¹) (ANVISA, 2019a; ANVISA, 2023a). One black mulberry sample had trace levels of methomyl ($<$ 0.005 mg kg⁻¹), and one chamomile sample contained 0.463 mg kg⁻¹ of linuron, above its MRL. Considering that the MRL is established in the fresh material and that dry chamomile for tea preparation has about 10% water content (Misturi et al., 2020), the level found in the dry sample adjusted for water content (0.046 mg kg⁻¹ of linuron) is over 2 times higher than the MRL.

Carbendazim was the most detected pesticide, found in 13.3% of analyzed samples, with concentrations varying between 0.005 and 1.602 mg kg⁻¹ (chamomile). In

2022, ANVISA (Brazilian Health Regulatory Agency) determined the precautionary suspension of the importation, manufacture, commercialization, and distribution of carbendazim and the prohibition of the active ingredient due to its mutagenic potential, reproductive toxicity and effects on embryo-fetal development (ANVISA, 2022). In 2021, carbendazim ranked 14th among the commercialized pesticides in Brazil (IBAMA, 2023), but it did not have an approved use for any herb analyzed in this work at the time of sample collection (2018-2022) and is not included in the Brazilian Pharmacopoeia list.

Carbendazim is a metabolite of thiophanate-methyl and its residues may come from the use of this compound. Thiophanate-methyl is authorized in Brazil for passion fruit (foliar application), but no residues of this compound or its metabolite were found in the two passion fruit leaf samples analyzed, although the method was not considered validated for this pesticide due to low or high recovery. Furthermore, malathion and its main metabolite malaoxon were found in a chamomile sample at concentrations of 0.255 and 0.006 mg kg⁻¹, respectively (Table S1.5). According to the Brazilian Pharmacopoeia, malathion plus its metabolite should not exceed 1 mg kg⁻¹. Quinalphos (boldo) and triazophos (gotu kola and green tea), found at levels above 0.010 mg kg⁻¹, are also not authorized for use in Brazil (ANVISA, 2023b). Traces of carbofuran (< LOQ), which is also no longer authorized in the country (ANVISA, 2023b), was detected in one tribulus sample.

The Brazilian Pharmacopoeia includes acceptable limits for 71 pesticides in herbal drugs at levels that vary from 0.01 to 2 mg kg⁻¹ (ANVISA, 2019c), similar to the list published in the European Pharmacopeia (2019). The list includes 21 pesticides investigated in the present study (not linuron or methomyl), and pesticides no longer registered in the country, such as quinalphos. In both cases (MRL and Pharmacopeia limits), the levels are above the LOQ obtained in this work, which also makes the method suitable for evaluating pesticides in herbs for compliance. The Codex Alimentarius has established MRL for 5 pesticides in herbs, with levels ranging from 0.01 (for abamectin) to 70 mg kg⁻¹ (for azoxystrobin); MRLs for individual herbs are also established, including buprofezin and fipronil (1.5 mg kg⁻¹) and imidacloprid (20 mg kg⁻¹) in basil, but none of the herbs analyzed in the present study has Codex MRLs (CAC, 2023)

Data from PARA, coordinated by ANVISA and the Brazilian National Plan for Residue and Contaminant Control (PNCRC – *Plano Nacional de Controle de Resíduos e*

Contaminantes), coordinated by the Ministry of Agriculture (MAPA), show that irregular pesticide use in Brazil is common. Data from the two programs (2001 to 2010) showed that 72% of irregularities were due to illegal pesticide use for the crop (Jardim and Caldas, 2012). The 2017/2018 PARA report showed that carbendazim, imidacloprid and tebuconazole had the highest detection rates (11, 16 and 12% of the analyzed samples, respectively) in the 4616 fruit and vegetable samples analyzed (ANVISA, 2019b). The herbs assessed in this work are not included in the Brazilian monitoring programs, and the results indicate illegal use of pesticides that should be investigated by national authorities and manufacturers of these products, as required by the RDC 26/2014 (ANVISA, 2019a; BRAZIL, 2014).

3.4 Dietary risk assessment

The potential risk to health from the dietary intake of pesticides present in crops, including dried medicinal herbs, can be assessed through a risk assessment process (Caldas & Velde-Koerts, 2017). Since not all samples collected contained consumption instructions, in a conservative approach, a daily intake of 2 tablespoons (30 g) indicated on some labels was assumed for all herbs evaluated. The intake estimation considered the consumption of the herb by a person weighing 60 kg. The values found were compared with the Acceptable Daily Intake (ADI) for each pesticide found. The results are shown in Table 1.3. Although residues were detected in arnica and comfrey products, they are not recommended to be consumed as tea, only for external use (ANVISA, 2021), and are not included in the Table 1.3.

The daily intake of pesticides through the consumption of the dry medicinal herbs analyzed ranged from 0.002 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw (body weight) (tebuconazole, cascara buckthorn) to 0.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ bw (carbendazim, chamomile), accounting for 4%, and 0.01% of the acceptable daily intakes of tebuconazole (ADI of 30 $\mu\text{g kg bw}^{-1}$), and carbendazim (ADI of 20 $\mu\text{g kg bw}^{-1}$), respectively (ANVISA, 2023a), not representing a potential risk to consumers. This conclusion most likely holds even when considering other dietary sources of exposure to pesticides (Jardim et al., 2018a).

Table 1.3 – Chronic and acute risk assessment from the consumption of dry herbs used for tea preparation

Pesticide (ADI*, µg/kg bw)	Mean concentration (n) mg kg⁻¹	Sample	Intake, µg/kg bw (%ADI)
Acetamiprid (24)	0.02 (1)	Chamomile	0.01 (0.04)
	0.07 (1)	Gotu kola	0.04 (0.2)
	0.07 (1)	Green tea	0.04 (0.2)
	0.006 (2)	Ginkgo	0.003 (0.01)
	0.03 (1)	Tribulus	0.02 (0.06)
Ametryn (72)	0.003 (1)	Gotu kola	0.001 (0.002)
Atrazine (20)	0.003 (1)	Ginkgo	0.001 (0.05)
Azoxystrobin (20)	0.009 (1)	Gotu kola	0.005 (0.02)
	0.003 (1)	Chamomile	0.001 (0.006)
	0.006 (1)	Tribulus	0.003 (0.02)
Buprofezin (10)	0.006 (1)	Green tea	0.003 (0.03)
	0.02 (1)	Ginkgo	0.01 (0.1)
	0.007 (1)	Tribulus	0.004 (0.04)
Carbendazim (20)	2 (1)	Chamomile	0.8 (4)
	1 (1)	Gotu kola	0.7 (3)
	0.005 (1)	Green tea	0.003 (0.01)
	0.4 (2)	Ginkgo	0.2 (1)
	0.1 (1)	Tribulus	0.05 (0.3)
	0.01 (1)	Cat's claw	0.005 (0.03)
	0.003 (1)	Angelica	0.001 (0.006)
	0.003 (1)	Horsetail	0.001 (0.006)
	0.01 (1)	Guarana	0.006 (0.2)
Carbaryl (3)	0.01 (1)	Hibiscus	0.006 (0.2)
	0.08 (1)	Gotu kola	0.04 (0.4)
Chlorpyrifos (10)	0.03 (1)	Ginkgo	0.02 (0.2)
	0.09 (1)	Gotu kola	0.05 (0.008)
Difenoconazole (600)	0.02 (1)	Ginkgo	0.01 (0.002)
	0.02 (1)	Tribulus	0.01 (0.002)
	0.003 (1)	Ginkgo	0.001 (0.04)
Epoxiconazole (3)	0.1 (2)	Chamomile	0.06 (0.2)
Fenpropathrin (30)	0.1 (1)	Gotu kola	0.05 (0.2)
	0.01 (1)	Ginkgo	0.006 (0.02)
	0.02 (1)	Artichoke	0.01 (0.03)
Imazalil (30)	0.01 (1)	Chamomile	0.005 (0.02)
Imidacloprid (50)	0.01 (1)	Chamomile	0.005 (0.01)
	0.03 (1)	Gotu kola	0.02 (0.03)
	0.01 (2)	Green tea	0.01 (0.02)

Pesticide (ADI*, µg/kg bw)	Mean concentration (n) mg kg ⁻¹	Sample	Intake, µg/kg bw (%ADI)
	0.07 (2)	Ginkgo	0.03 (0.07)
	0.02 (1)	Tribulus	0.01 (0.02)
	0.2 (1)	Chamomile	0.1 (0.03)
Malathion (300)	0.02 (1)	Chamomile	0.01 (0.01)
Metalaxyl-M (80)	0.05 (1)	Tribulus	0.03 (0.03)
	0.007 (1)	“Canela-de-velho”	0.004 (0.02)
Methomyl (20)	0.003 (1)	Artichoke	0.001 (0.006)
	0.003 (1)	Black mulberry	0.001 (0.006)
	0.005 (1)	Green tea	0.003 (0.008)
Pirimiphos-methyl (30)	0.1 (1)	Gotu kola	0.05 (0.5)
Profenofos (10)	0.03 (1)	Green tea	0.02 (0.2)
	0.4 (1)	Chamomile	0.2 (0.5)
Pyraclostrobin (40)	0.1 (2)	Gotu kola	0.05 (0.1)
	0.07 (1)	Ginkgo	0.04 (0.09)
	0.004 (1)	Cascara buckthorn	0.002 (0.01)
Tebuconazole (30)	0.1 (1)	Gotu kola	0.05 (0.2)
	0.04 (1)	Ginkgo	0.02 (0.07)
	0.03 (1)	Tribulus	0.02 (0.05)
	0.003 (1)	Horsetail	0.001 (0.004)
	0.03 (1)	Gotu kola	0.02 (0.08)
Thiamethoxan (20)	0.04 (2)	Ginkgo	0.02 (0.09)
	0.03 (1)	Tribulus	0.02 (0.08)
	0.01 (1)	“Canela-de-velho”	0.006 (0.03)
	0.07 (1)	Gotu kola	0.04 (0.4)
Triazophos (10)	0.01 (1)	Green tea	0.005 (0.1)
Trifloxystrobin (30)	0.01 (1)	Gotu kola	0.005 (0.02)
	0.006 (1)	Angelica	0.003 (0.0006)
Zoxamide (500)	0.03 (2)	Leather hat	0.003 (0.003)

* From ANVISA, with exception of triazophos (JMPPR, 2013)

4. CONCLUSION

In this study, a method for the analysis of 65 pesticides in dry medicinal herbs by UHPLC-MS/MS was validated, using a mixture of 7 different plants as a control sample at LOQs ranging from 0.005 to 0.100 mg kg⁻¹. The method includes extraction with acidified acetonitrile, MgSO₄ and CH₃COONa and clean-up by dispersive solid phase with PSA/MgSO₄. To the best of our knowledge, this is the most comprehensive study with respect

to pesticides in dry herbs, as it covers 33 different plants (leaves, stems, seeds, algae, fruits, roots, stems and/or flowers).

Of the 75 samples of dry medicinal herbs analyzed, 34.6% were positive for at least one pesticide. Most pesticides present in the samples are not allowed in the analyzed herbs by ANVISA, indicating that good agricultural practices are not being respected by farms that grow these plants, which reinforces the importance of developing methods and analyzing pesticide residues in these plants to guarantee safe products for consumers.

CAPÍTULO 2. DETERMINAÇÃO DE ETILENO-BIS-DITIOCARBAMATOS E ETILENOTIOUREIA EM ERVAS VEGETAIS POR UHPLC-MS/MS

RESUMO

Métodos de determinação dos ditiocarbamatos pertencentes à subclasse dos etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC) e de seu produto de degradação etilenotioureia (ETU), responsável pela toxicidade crônica dos EBDC, foram validados por UHPLC-MS/MS, em diferentes tipos de ervas vegetais secas. No método EBDC, os compostos foram inicialmente complexados com EDTA, derivatizados e extraídos com dimetil sulfato em acetonitrila, sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl) e purificados com amina primária secundária (PSA). No método ETU, L-cisteína-hidroclorato monohidratada foi adicionada às amostras antes da extração com acetonitrila, $MgSO_4$ e NaCl e purificação com PSA. Uma mistura de sete ervas composta por diferentes partes das plantas foi utilizada como controle na validação dos métodos. A recuperação variou entre 79–113% para EBDC e 81–109% para ETU. A repetibilidade e precisão intermediária foi $< 20\%$ para os dois métodos. O limite de quantificação (LOQ) foi de $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ para EBDC ($0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ de CS_2) e ETU. No total, 103 amostras de 33 ervas vegetais secas diferentes foram analisadas pelos dois métodos. Cerca de 22,3% foram positivas para EBDC (\geq LOD, limite de detecção). Não há ditiocarbamatos registrados no Brasil para uso nas ervas cujo resultado foi positivo, indicando o uso ilegal de pesticidas ou contaminação cruzada, uma vez que foram detectadas baixas concentrações na maior parte das amostras (\geq LOD, $<$ LOQ). Não foram detectados resíduos de ETU em nenhuma das amostras analisadas. A exposição aos EBDC pelo consumo de ervas vegetais foi estimada para as amostras positivas e não indicou risco à saúde dos consumidores, porém essas plantas devem ser monitoradas para evitar o uso ilegal de produtos, principalmente quando destinadas ao uso terapêutico.

1. INTRODUÇÃO

O uso de ervas vegetais para a preparação de chás e com propósitos medicinais possui origem muito antiga, e ao longo dos séculos, por meio de tentativas, casualidade e observações, as propriedades úteis e nocivas dos vegetais foram sendo descobertas (Almeida, 2011; Tomazzoni et al., 2006). Adicionalmente, estas ervas podem conter substâncias potencialmente tóxicas, como metais pesados, partículas radioativas, micotoxinas e pesticidas (Shaban et al., 2016), cujos níveis devem ser monitorados quando destinado para uso medicinal, de acordo com a RDC 26/2014 (ANVISA, 2019a; BRASIL, 2014).

O uso de pesticidas não é recomendado no cultivo de ervas vegetais destinadas ao uso terapêutico (ANVISA, 2019a), mas alguns compostos são registrados em plantas que também são usadas como alimento, como camomila, amora, guaraná e maracujá, que na forma seca são usados no preparo de chás, inclusive com fins terapêuticos (ANVISA, 2023). Partes específicas de espécies vegetais usadas com fins terapêuticos são autorizadas para o preparo de chás de acordo com a “Lista das partes de espécies vegetais autorizadas para o preparo de chás”, que consta no Anexo I da Instrução Normativa - IN Nº 159/2022, incluindo o abacaxi (polpa dos frutos), maçã (frutos), amora (frutos), camomila (capítulos florais), guaraná (sementes) e maracujá (polpa dos frutos). Dados dos programas de monitoramento PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos) e o PNCRC (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes), indicam o uso irregular de pesticidas em frutas e vegetais (Jardim e Caldas, 2012; ANVISA 2019b). Ervas vegetais, porém, não estão incluídas nos programas e a presença de pesticidas nestes produtos no país é desconhecida.

No Brasil, cinco fungicidas da classe dos ditiocarbamatos são registrados para uso em várias culturas, incluindo o mancozebe e o metiram, classificados como etileno-bis-ditiocarbamatos (EBDC) (ANVISA, 2023). Dados do PARA 2017/2018 mostraram que os ditiocarbamatos estão entre os pesticidas mais detectados nas 4616 amostras de frutas e vegetais analisadas (ANVISA, 2019b), sendo o mancozebe o fungicida mais utilizado (aproximadamente 45.560 toneladas em 2022) e o terceiro pesticida mais vendido no país em 2022 (IBAMA, 2023). Os métodos mais utilizados atualmente para determinação de ditiocarbamatos se baseiam na determinação do produto de degradação comum a

estes compostos, o dissulfeto de carbono (CS₂), e os limites máximos de resíduos (LMR) para os ditiocarbamatos estabelecidos no Brasil e em outros países estão em níveis de CS₂ (ANVISA, 2023a; European Commission, 2023; FSANZ, 2023; FAO/WHO, 1993). Porém, a determinação por CS₂ não permite a distinção entre os compostos ditiocarbamatos presentes na amostra, diferenciação que é necessária para identificar a aplicação de boas práticas agrícolas no campo e para uma avaliação de risco refinada da exposição a estes fungicidas na dieta, já que a toxicidade não é a mesma entre os compostos (IPCS, 1993).

A toxicidade crônica dos ditiocarbamatos da subclasse EBDC é atribuída principalmente ao seu metabólito formado em mamíferos e plantas, a etilenotiourea (ETU), que mostrou ser carcinogênica em estudos com animais de laboratório (Doerge e Takazawa, 1990; Rubino, 2014; Kazos et al., 2007). A ETU pode também ser formada durante o processamento de produtos de origem vegetal, incluindo processos de secagem (IPCS/INCHEM, 1993; IARC, 2001).

Métodos analíticos para determinação direta dos ditiocarbamatos têm sido reportados na literatura, mas a maioria dos estudos foi realizado em frutas e vegetais frescos (Hayama e Takada, 2008; Al-Alam et al., 2017; Kakitani et al., 2017; Yang et al., 2023). Sayed et al. (2022) desenvolveram método analítico para determinação de EBDC em camomila (LOQ 0,05 mg kg⁻¹ EBDC-dimetil), entretanto amostras reais não foram analisadas. Zhang et al. (2015b) validaram um método de determinação de mancozebe em *Schisandra chinensis* (Turcz.) bail. por UPLC com detector UV (272 nm), utilizando metilação (LOQ 0,05 mg kg⁻¹ EBDC-dimetil). Métodos de análise de ETU por cromatografia líquida também foram reportados em frutas e vegetais frescos (Zhou et al., 2013; López-Fernández et al., 2014; Garcinuño et al., 2004).

O objetivo desse trabalho foi a validação de métodos analíticos para determinação de EBDC e ETU em diferentes tipos de ervas vegetais secas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS), analisar amostras coletadas no comércio e avaliar o risco dos consumidores devido a exposição a estes compostos pelo consumo de chás preparados com estas ervas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Padrões analíticos e reagentes

Padrão analítico certificado de EBDC-dimetil (pureza 98,9%) foi obtido da Hayashi Pure Chemical® (Japão), mancozebe (pureza 97,5%) e metiram (pureza 90,0%) da AccuStandard® e etilenotiourea (pureza 99,68%) da Dr. Ehrenstorfer®.

Metanol e acetonitrila grau HPLC e LC-MS/MS foram obtidos da Merck® e formiato de amônio (pureza $\geq 99,0\%$) e ácido fórmico (pureza 98%) da Fluka®. Sulfato de magnésio anidro (MgSO_4 , pureza $\geq 99,5\%$), L-cisteína hidrocloreto monohidratada (pureza $\geq 99,0\%$), EDTA (pureza 99,0–101%) e dimetil sulfato (pureza $\geq 99,9\%$) foram obtidos da Sigma-Aldrich®. Cloreto de sódio (NaCl, pureza 100,1%) foi obtido da marca J.T. Baker®. Amina primária secundária (PSA) foi obtida da Supelco®.

2.2 Preparo de soluções e suspensões

As soluções ou suspensões estoque de todos os analitos foram preparadas em acetonitrila, na concentração de 1 mg mL^{-1} . As suspensões estoque de mancozebe e metiram foram diluídas em solução aquosa de L-cisteína-EDTA para obtenção da solução de trabalho ($1000 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$). Solução de L-cisteína-EDTA foi preparada pela adição de 25 g de L-cisteína hidrocloreto monohidratada e 37,2 g de EDTA em 500 mL de água Milli-Q®, com pH ajustado para 9,6–10,0. Solução estoque de EBDC-dimetil foi diluída em acetonitrila ($1000 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$). Solução de dimetil sulfato (0,05 M) foi preparada em acetonitrila.

As soluções de trabalho de mancozebe foram utilizadas na fortificação da amostra controle e as de EBDC-dimetil, no preparo de curva analítica. As soluções de trabalho de ETU, usadas no preparo de curva analítica e fortificação da amostra controle, foram preparadas a partir da diluição da solução estoque em acetonitrila (1000, 100 e $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$). Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar a temperaturas $< -15^\circ\text{C}$.

2.3 Preparo de amostras (extração e clean-up)

2.3.1 Método EBDC

O método de extração foi baseado no estudo em camomila (matriz seca) desenvolvido por Sayed et al. (2022). Dez mililitros de solução aquosa de L-cisteína-

EDTA foram transferidos para um tubo falcon de 50 mL contendo 1 g da amostra, seguido por agitação durante 1 minuto. Solução de dimetil sulfato em ACN foi adicionada à amostra, seguido por agitação em mesa agitadora Certomat® BS-T. MgSO₄ e NaCl foram adicionados ao tubo, o qual foi agitado manualmente por mais 1 minuto. A mistura foi centrifugada, 3 mL da fase orgânica (superior) foram transferidos para um tubo falcon contendo MgSO₄ e PSA. O tubo foi agitado por 30 segundos no vórtex, centrifugado, o extrato resultante filtrado em filtro de seringa diretamente no vial. A análise foi feita por UHPLC-MS/MS. A Figura 2.1 mostra detalhes do procedimento de extração do método EBDC.

2.3.2 Método ETU

O procedimento de preparo de amostra consistiu na adição de L-cisteína e água Milli-Q® em tubo falcon de 50 mL contendo 1 g de amostra. A amostra foi mantida em repouso durante 15 minutos para absorção da água, com posterior adição de 10 mL de ACN e agitação manual (1 minuto). MgSO₄ e NaCl foram transferidos para o tubo, seguido de agitação manual por 1 minuto e centrifugação; 3 mL da fase orgânica foram transferidos para um tubo falcon de 15 mL contendo MgSO₄ e PSA, o tubo foi agitado em vórtex durante 30 segundos e centrifugado; 500 µL do extrato purificado foram transferidos para um vial, evaporados até a secura em Centrivap®, seguido de ressuspensão com 1000 µL de MeOH:H₂O (50:50) e filtração em filtro de seringa para subsequente análise em UHPLC-MS/MS. A Figura 2.2 ilustra o procedimento de extração do método ETU.

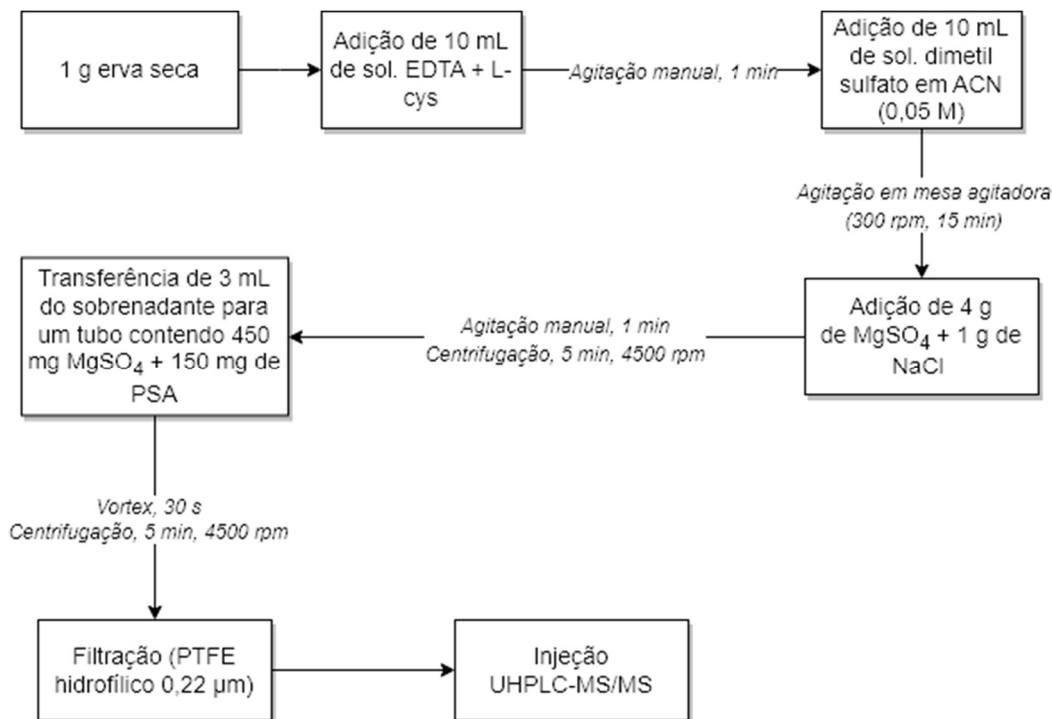


Figura 2.1 – Fluxograma do preparo de amostras para determinação de etileno-bis-ditio-carbamatos em ervas vegetais.

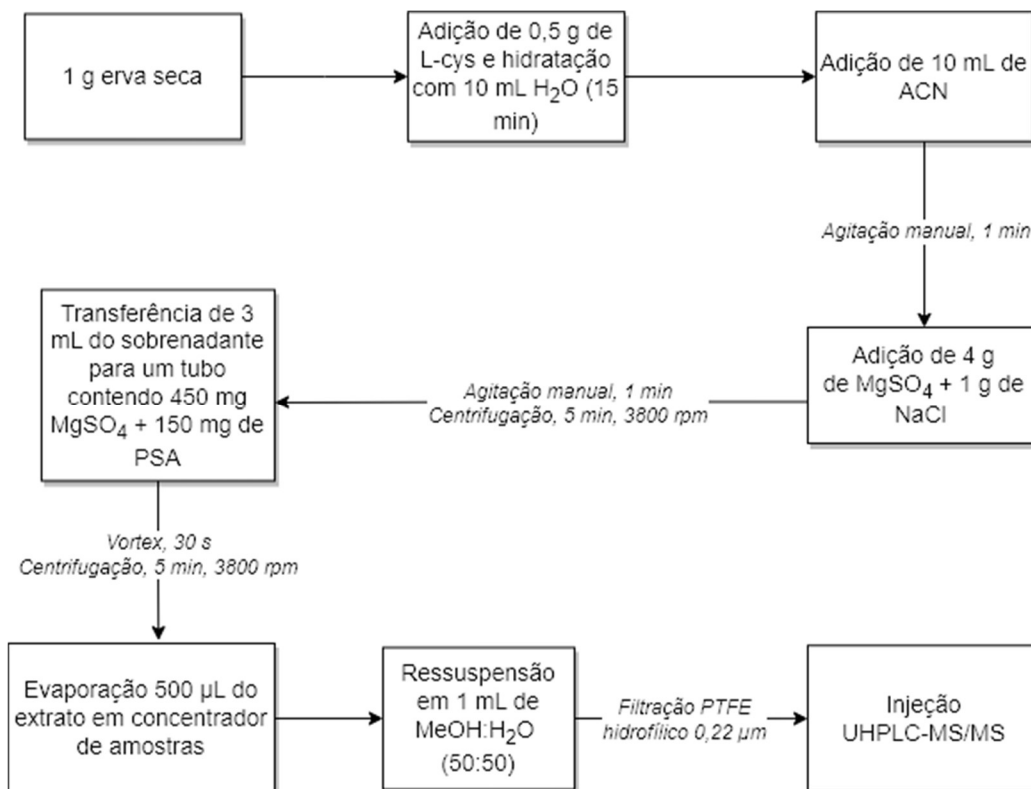


Figura 2.2 – Fluxograma do preparo de amostras para determinação de etilenotiureia em ervas vegetais.

2.4 UHPLC-MS/MS

Sistema UHPLC ExionLC Sciex® AD Series, com bomba binária, degaseificador, amostrador automático, forno de coluna (AC) e controladora, acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo (6500+ QTRAP, Applied Biosystem®/MDS Sciex®, Foster City, EUA) com fonte IonDrive™ Turbo V e ionização por eletrospray no modo positivo (ESI+). A aquisição dos dados foi realizada no software Analyst® v. 1.7.2 e o tratamento dos resultados no software Sciex OS v. 1.6.2. A otimização MRM (*multiple reaction monitoring*) foi realizada pela infusão direta de soluções de EBDC-dimetil ou ETU diluídas em MeOH:H₂O (50:50) com adição de 0,1% de ácido fórmico (EBDC-dimetil) ou 5 mM de formiato de amônio (ETU). A Tabela 2.1 mostra os parâmetros otimizados do espectrômetro de massas para EBDC-dimetil e ETU. As condições de otimização da fonte foram: métodos EBDC e ETU: *temperature* (TEM) em 450°C e *entrance potential* (EP) em 10 eV; EBDC: *curtain gas* (CUR) em 50 psi, *collision gas* (CAD) *low*, *ion spray voltage* (IS) 4500 V, *ion source gas* de 50 psi e 40 psi (GS1 e GS2, respectivamente); método ETU: CUR em 30 psi, CAD *medium*, IS de 5000 V, *ion source gas* de 45 psi (GS1 e GS2).

Tabela 2.1 – Parâmetros otimizados do LC-MS/MS Applied Biosystem®/MDS Sciex® 6500+ QTrap para os compostos etilenotiourea e etileno-bis-ditiocarbamato-dimetil

Composto	Dwell	Íon	Íons		DP* (V)	CE* (V)	CXP* (V)
	time (msec)	precursor (m/z)	m/z	produto (m/z)			
Etilenotiourea	250	[M+H] ⁺	103	44,2 (Q)	86	21	20
				60 (q)	86	45	28
EBDC-dimetil	250	[M+H] ⁺	241	193 (Q)	41	10	16
			184	117 (q)	41	15	16

*DP: *Declustering Potential*; CE: *Collision Energy*; CXP: *Collision Cell Exit Potential*. Q: íon de quantificação; q: íon de confirmação.

Com exceção da programação da eluição por gradiente, as fases móveis e os demais parâmetros de cromatografia foram os mesmos para ambos os métodos. A separação cromatográfica foi realizada na coluna UHPLC LUNA Omega Polar C18 1.6 µm 100A, 100 x 2.1 mm (Phenomenex) com pré-coluna SecurityGuard ULTRA Cartridges

UHPLC Fully Porous Polar C18 2.1 mm. A fase móvel foi composta por água + 5 mM de formiato de amônio + 0,1% de ácido fórmico (fase A) e metanol + 5 mM de formiato de amônio + 0,1% de ácido fórmico (fase B). A vazão foi estabelecida em 0,2 mL/min com eluição por gradiente: método EBDC: 0–6 min 10% de B, 6–8 min 95% de B, 8,1–10 min 10% de B, tempo de corrida de 10 minutos; método ETU: 0–3 min 10% de B, 3–9 min até 100% de B, 9–11 min, 100% de B, 11–11,50, 10% de B, até 14 min, tempo de corrida de 14 minutos. O volume de injeção foi estabelecido em 1 µL e a temperatura do forno de coluna em 40°C para os dois métodos.

2.5 Amostras

Cento e três amostras de 33 tipos de ervas vegetais secas foram adquiridas entre os anos de 2018 a 2023 em diferentes estabelecimentos e farmácias de manipulação do Distrito Federal: alcachofra (*Cynara scolymus*, n=8); amora (*Morus nigra*, n=2); angélica (*Angelica officinalis* L., n=3); arnica montana (*Arnica montana*, n=1); arnica-do-mato (*Solidago microglossa*, n=2); assa-peixe (*Vernonia polyanthes*, n=1); barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*, n=1); boldo (*Peumus boldus*, n=7); camomila (*Matricaria chamomilla*/*Matricaria recutita*, n=9); canela-de-velho (*Miconia albicans*, n=2); carqueja (*Baccharis trimera*, n=1); cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*, n=2); castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum*, n=1); cavalinha (*Equisetum arvense*/*Equisetum hyemale*, n=6); centella asiática (*Hydrocotyle asiatica*, n=2); chá verde (*Camelia sinensis*, n=7, incluindo amostra de chá verde + laranja amarga); chapéu-de-couro (*Echinodorus macrophyllus*, n=3); clorela (*Chlorella pyrenoidosa*, n=2); confrei (*Symphytum officinale*, n=1); espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*, n=3); fucus (*Fucus vesiculosus*, n=2); ginkgo biloba (*Ginkgo biloba*, n=4); guaraná (*Paullinia cupana*, n=3); hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis*/*Hibiscus sabdariffa*, n=2); maca peruana (*Lepidium meyenii*, n=1); marapuama (*Ptychopetalum olacoides*, n=2); moringa orgânica (*Moringa oleífera*, n= 1); mulungu (*Erythrina velutina*/*Erythrina mulungu*, n=2); maracujá (*Passiflora incarnata*/*Passiflora alata*, n=2); assa-peixe (*Myrcia multiflora*, n=1); sene (*Senna alexandrina*/*Cassia angustifolia vahl.*/*Cassia acutifoli*, n=10); espirulina (*Arthrospira (Spirulina) platensis*, n=2); tribulus (*Tribulus terrestris*, n=1); unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*, n=6).

Ao chegarem no laboratório, as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente, processadas e homogeneizadas em liquidificador (folhas, talos e flores) ou moinho (caule e casca), exceto os produtos em pó, que foram apenas homogeneizados antes da pesagem e análise. A escolha das ervas vegetais investigadas foi baseada no Memento Fitoterápico (ANVISA, 2016), Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, RENAME (BRASIL, 2020), Braga e Silva (2021) e uma pesquisa informal realizada em farmácias de manipulação e estabelecimentos sobre as ervas mais vendidas no Distrito Federal.

2.6 Validação dos métodos

Uma mistura de diferentes tipos e partes de ervas vegetais secas foi utilizada como amostra controle para a validação dos métodos. A seleção das amostras do “branco” controle foi realizada conforme descrito anteriormente (Capítulo 1) e incluiu boldo do Chile, alcachofra, espinheira santa, unha-de-gato, sene, camomila e cáscara sagrada. Todas as amostras selecionadas para o preparo da mistura foram testadas nos métodos otimizados e deram resultados negativos para EBDC e ETU.

Os parâmetros seletividade, linearidade, efeito matriz, recuperação, repetibilidade e precisão intermediária foram avaliados (INMETRO, 2020; SANTE, 2021).

A *seletividade* dos métodos foi avaliada pela verificação da presença de interferentes na matriz controle e nos solventes, no mesmo tempo de retenção dos íons monitorados.

O *efeito matriz* foi avaliado para verificar se componentes da matriz interferem na identificação dos compostos, aumentando ou suprimindo o sinal analítico. Curvas preparadas em extrato de matriz “branca” foram comparadas com curvas preparadas em acetoneitrila ou MeOH:H₂O (50:50) para os métodos EBDC e ETU, respectivamente (8 níveis e 3 replicatas no método EBDC e 5 níveis e 3 replicatas no método ETU). A porcentagem de efeito matriz foi calculada pela equação [%EM = ((área do pico do analito em matriz/área do pico do analito em solvente)-1) x 100] (SANTE, 2021). Valores abaixo e acima de 0% indicam supressão e aumento de sinal, respectivamente, e valores abaixo de ± 20 foram considerados aceitáveis.

A *linearidade* foi avaliada pela análise de curvas analíticas preparadas em extrato “branco” da matriz controle. No método EBDC as curvas foram feitas em oito níveis e três replicatas cada nível (3; 5; 15; 25; 40; 60; 80; 100 pg μL^{-1}). No método ETU, cada um dos cinco níveis de calibração foi analisado em três replicatas (1,5; 2,5; 5; 10; 20 pg μL^{-1}). O método dos mínimos quadrados foi utilizado para estimar a regressão linear, o teste de Grubbs para verificar a presença de *outliers*, o teste de Cochran para a homogeneidade das variâncias e a ANOVA para determinar os coeficientes de correlação (r) e a significância das regressões (INMETRO, 2020). Curvas com comportamento heteroscedástico foram ajustadas, testando diferentes regressões ponderadas lineares e selecionando o fator de ponderação (w_i) mais adequado (Miller e Ambrus, 2000). Foram testados os fatores de ponderação $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{0.5}$, $1/y$, $1/y^2$ e $1/y^{0.5}$, e a seleção do fator mais adequado foi realizada pelo cálculo da porcentagem do erro relativo (%ER) para cada w_i , conforme a equação: $\%ER = [(C_{encontrada} - C_{nominal})/C_{nominal}] \times 100$. A %ER compara a concentração experimental ($C_{encontrada}$), calculada a partir da equação da reta obtida para os fatores de ponderação testados, com a concentração teórica ($C_{nominal}$). O melhor w_i , é aquele que gera as menores %ER (Almeida et al., 2002).

A *recuperação (%)* e a *repetibilidade (desvio padrão relativo, %RSD)* foram avaliadas por meio da fortificação da amostra controle em quatro níveis de concentração ($n=5$ para cada nível), no mesmo dia, pelo mesmo analista. Os níveis 0,03; 0,05; 0,15 e 0,40 mg kg^{-1} foram avaliados no método EBDC e 0,03; 0,05; 0,10 e 0,20 mg kg^{-1} no método ETU. A *precisão intermediária (%RSD)* foi avaliada pela repetição do experimento de recuperação de cada método, pelo mesmo analista em um dia diferente.

Os *limites de quantificação (LOQ)* dos métodos foram definidos como o menor nível onde foram obtidas recuperações aceitáveis (70–120%), além de valores de repetibilidade e precisão intermediária menores ou iguais a 20% (SANTE, 2021; INMETRO, 2020). Compostos presentes nas amostras que apresentaram valores menores ou iguais ao limite de detecção (LOD), ou seja, $1/3$ do LOQ, foram reportados como traços.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Método EBDC

Ditiocarbamatos da subclasse dos EBDC são insolúveis em solventes orgânicos, portanto, agentes complexantes como o EDTA são adicionados durante o preparo de amostra, com o objetivo de transformar o composto em seu respectivo sal de sódio solúvel em água. O EDTA funciona como quelante dos metais presentes na estrutura dos EBDC, permitindo que seus ânions se tornem acessíveis para análise (Hayama e Takada, 2008; Crnogorac e Schwack, 2009; Chung e Wong, 2022). Os sais de sódio formados após tratamento com EDTA podem reagir com co-extrativos presentes nas amostras, o que diminui a recuperação. Para resolver esse problema, Gustafsson e Fahlgren (1983) adicionaram L-cisteína ao processo, que atua como estabilizador antioxidante dos compostos. Gustafsson e Thompson (1981) também reportaram que a eficiência da transformação dos EBDC em sais de sódio diminui se o pH do meio for menor do que 9,5, o que também foi observado por Hayama e Takada (2008) durante a análise de amostras ácidas como tangerina e morango. Sendo assim, solução de L-cisteína-EDTA com pH na faixa 9,6–10,0, ajustado com solução aquosa de NaOH 10% (Sayed et al., 2022) foi utilizada na etapa de decomposição/complexação dos EBDC e hidratação das amostras de ervas secas.

Após a etapa de complexação, solução de dimetil-sulfato em acetonitrila (0,05 M) foi adicionada para metilação dos compostos, transformando-os em EBDC-dimetil. O uso do iodometano como reagente de metilação dissolvido em solventes não polares, também foi reportado na literatura (Gustafsson e Thompson 1981; Gustafsson e Fahlgren, 1983). Entretanto, o iodometano resulta em rendimentos de derivatização menores quando comparado ao dimetil sulfato, que aumenta o rendimento em mais de 15% (Hayama e Takada, 2008). Além disso, o extrato em acetonitrila obtido após o preparo de amostra pode ser diretamente injetado no UHPLC-MS/MS, diminuindo o número de etapas do procedimento. Portanto, assim como outros estudos disponíveis na literatura (López-Fernández et al., 2012; Sayed et al., 2022), dimetil sulfato em ACN (0,05 M) foi selecionado como reagente de metilação.

Por ser o fungicida mais utilizado no país, e com o maior número de culturas de consumo humano registradas para seu uso (70 culturas; ANVISA, 2023), o mancozebe

foi usado como composto representativo dos EBDC (mancozebe e metiram) na fortificação da amostra controle durante a validação do método e para o controle de qualidade (QC). EBDC-dimetil foi usado no preparo das curvas de calibração e a fim de verificar a eficiência da complexação e metilação dos EBDC.

Teste em solvente foi conduzido, comparando os cromatogramas de solução do padrão de EBDC-dimetil, com soluções de EBDC-dimetil resultante da metilação do mancozebe, do metiram, e da mistura de mancozebe e metiram, todas na concentração de $15 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ em acetonitrila. O experimento foi realizado em dois dias diferentes, uma replicata para cada solução. A análise das áreas obtidas dos cromatogramas para cada solução mostra que a área da mistura de dois compostos EBDC pós-metilação é o dobro da área dos cromatogramas dos compostos metilados injetados separadamente (Figura 2.3), confirmando a eficiência das reações para ambos compostos.

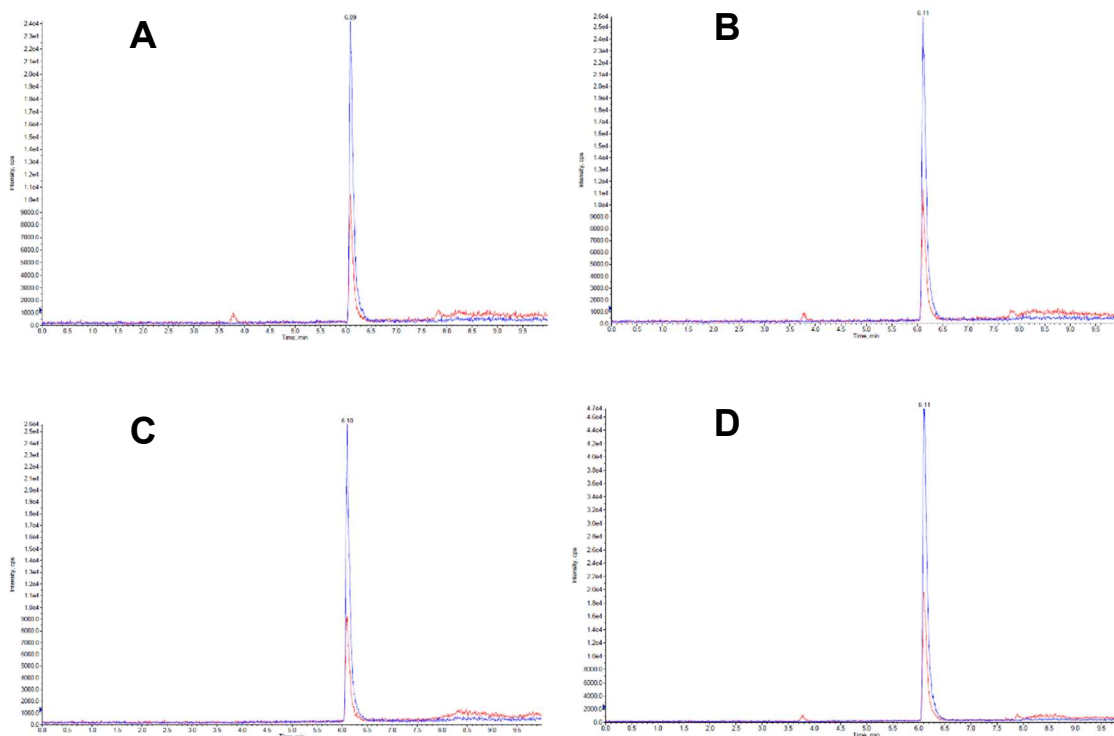


Figura 2.3 – Cromatogramas ESI+ de soluções $15 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ de: A: EBDC-dimetil resultante da metilação do mancozebe (área – $1,30 \times 10^8$ e tempo de retenção (TR) – 6,09 min); B: EBDC-dimetil resultante da metilação do metiram (área – $1,44 \times 10^8$ e TR – 6,11 min); C: EBDC-dimetil (área – $1,31 \times 10^8$ e TR – 6,10 min); D: EBDC-dimetil resultante da metilação de solução de mistura de mancozebe + metiram (área – $2,73 \times 10^8$ e TR – 6,11 min).

3.2 Método ETU

Diferentes tipos de eluição e solventes foram avaliados a fim de se obter as melhores condições para a determinação de etilenotiourea. Primeiramente, eluição isocrática foi testada com fase móvel composta por 5% água + 5 mM de formiato de amônio e 95% ACN, vazão 0,2 mL/min, volume de injeção de 5 μ L e forno de coluna em 30°C (Zhou et al., 2013). Nessas condições foi observada uma instabilidade na intensidade da linha de base na transição de quantificação (m/z 103 > 44), o que também prejudicou a intensidade do pico cromatográfico. A Figura 2.4 mostra a injeção de ACN e ETU em dois dias diferentes. No dia 1, com a linha de base da acetonitrila baixa, o pico do composto apareceu definido e com boa intensidade (Figura 2.4 A e B), o que não aconteceu quando a linha de base do solvente estava elevada (Figura 2.4 C e D). Estes resultados mostram uma instabilidade do sistema e pouca repetibilidade dos resultados.

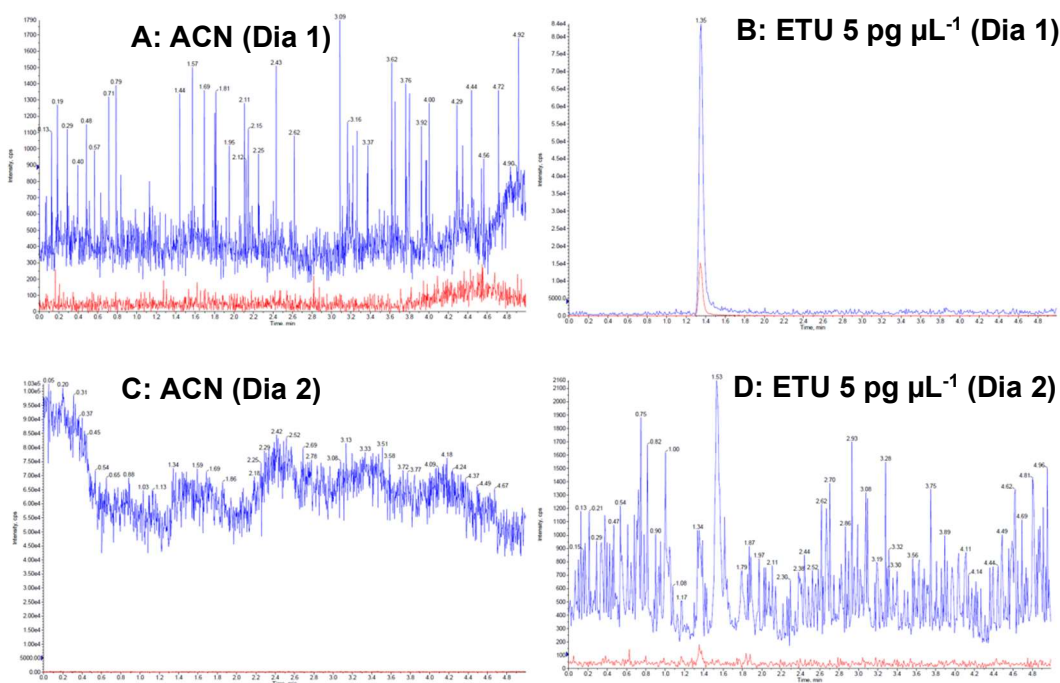


Figura 2.4 – Cromatogramas ESI+ da injeção de acetonitrila (ACN) e solução de ETU em ACN (5 μ g μ L⁻¹), mostrando a instabilidade da linha de base dos cromatogramas em dois dias diferentes: dia 1 (A e B) e dia 2 (C e D). A fase móvel utilizada foi água + 5 mM de formiato de amônio e acetonitrila

A ACN foi então substituída pelo metanol como fase orgânica nas mesmas condições cromatográficas avaliadas anteriormente. Embora a linha de base tenha

permanecido estável ao longo dos dias, a eficiência cromatográfica diminuiu em comparação com quando ACN foi usada como fase móvel. Eluição em gradiente, utilizando água + 5 mM de formiato de amônio (fase A) e MeOH (fase B) como fases móveis, foi avaliada com o objetivo de aumentar a sensibilidade do composto: 0–3 min 10% de B, 3–9 min até 100% de B, 9–11 min, 100% de B, 11–11,50, 10% de B, mantendo nessa proporção até 14 min. A temperatura do forno foi ajustada para 40°C para diminuir a pressão do sistema. A comparação entre cromatogramas de íons da solução de ETU 20 pg μL^{-1} preparada em extrato de matriz (mistura de ervas secas) após a extração, utilizando eluição isocrática e gradiente (Figura 2.5), mostrou que o gradiente se mostrou mais eficiente. Posteriormente, as fases móveis foram estabelecidas em água + 5 mM de formiato de amônio + 0,1% de ácido fórmico (fase A) e metanol + 5 mM de formiato de amônio + 0,1% de ácido fórmico (fase B).

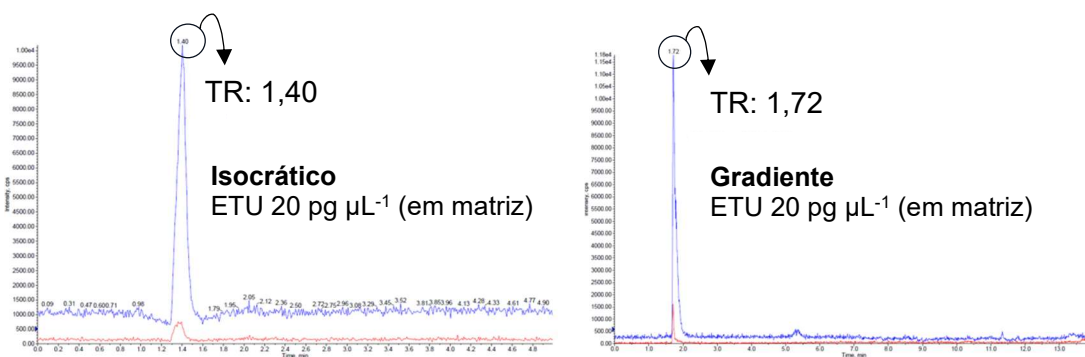


Figura 2.5 – Cromatogramas ESI+ de etilenotiureia 20 pg μL^{-1} em matriz (mistura de ervas secas) utilizando A: eluição isocrática e B: eluição por gradiente. Metanol foi usado como fase orgânica.

Baixa recuperação foi observada nos testes de recuperação (< 40%), o que foi superado após adição de 0,5 g de L-cisteína hidrocloreto monohidratada (Cys-HCl) à amostra, antes do procedimento de extração. A ETU pode se degradar em etilenoureia ou outros compostos durante a estocagem ou análise das amostras e Kobayashi et al. (1992) mostraram que quando Cys-HCl foi adicionada antes da análise das amostras (pepino, pera japonesa e batata), houve uma diminuição na taxa de degradação de ETU.

3.3 Validação dos métodos

Não foram observados interferentes na matriz “branca” no mesmo tempo de retenção dos íons monitorados, tanto para EBDC-dimetil, quanto para ETU, indicando a seletividade dos métodos.

O efeito matriz foi maior do que $\pm 20\%$ para todos os 8 níveis de concentração avaliados no método EBDC, com supressão de sinal em todos os níveis, exceto para o menor, onde um claro aumento de sinal foi observado (Figura 2.6). Portanto, curva em matriz pós-extração foi utilizada para quantificação do EBDC-dimetil. No método ETU, o efeito matriz chegou a -19% no maior nível (Figura 2.7), e apesar de menor do que 20% , decidiu-se fazer também curva em matriz

A avaliação da linearidade das curvas analíticas em matriz mostrou comportamento heteroscedástico para ambos os métodos ($C_{\text{calculado}} > C_{\text{tabelado};5;3}$) e as ponderações $1/x^2$ e $1/x$ foram selecionadas para quantificação de EBDC e ETU, respectivamente. O coeficiente de correlação (r) foi satisfatório para os métodos, com valores $\geq 0,99$ (INMETRO, 2020).

As Figuras 2.6 e 2.7 também mostram os resumos dos resultados dos parâmetros de recuperação, repetibilidade e precisão intermediária para os métodos EBDC e ETU, respectivamente. A recuperação ficou dentro da faixa de $70\text{--}120\%$ para todos os níveis avaliados (EBDC: $79\text{--}113\%$; ETU: $81\text{--}109\%$), e a repetibilidade e precisão intermediária menores do que 20% , com LOQ definido em $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ para ambos. O LOQ dos EBDC, expresso em CS_2 , foi de $0,02 \text{ mg kg}^{-1} \text{ CS}_2$. Sayed et al. (2022) obteve LOQ de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ para EBDC ou $0,03 \text{ mg kg}^{-1} \text{ CS}_2$ para camomila (erva seca) por UHPLC-MS/MS e até onde temos conhecimento, não há outros estudos na literatura de determinação específica de ditiocarbamatos em ervas vegetais. Método de determinação de ditiocarbamatos em erva-mate por GC-MS (em níveis de CS_2) foi validado por da Silva et al. (2022), com LOQ de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (extração com isooctano, cloreto de estanho II e ácido clorídrico).

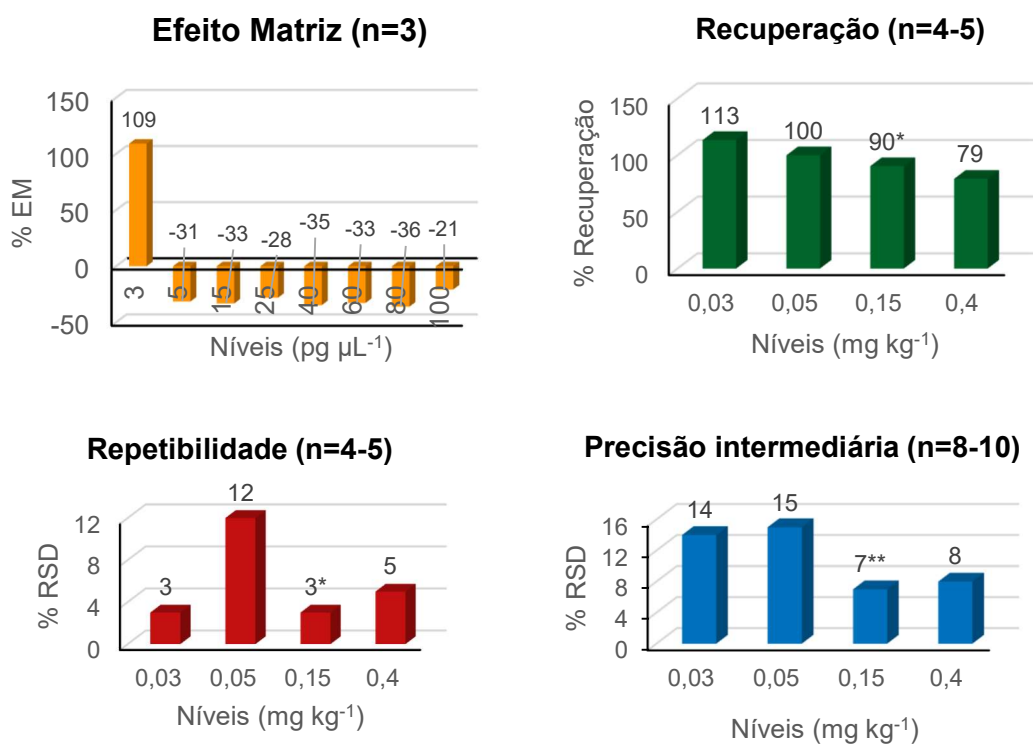


Figura 2.6 – Resumo dos dados de validação para ditiocarbamatos da subclasse EBDC em ervas vegetais secas por UHPLC-MS/MS. *n=4; **n=8

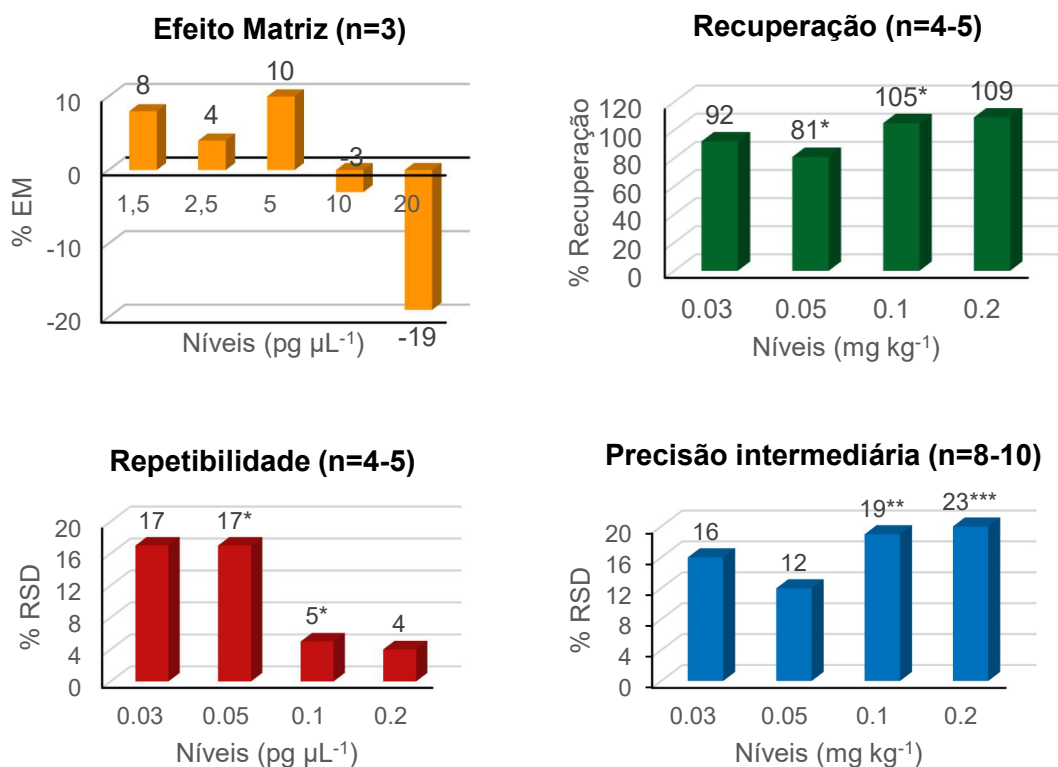


Figura 2.7 – Resumo dos dados de validação para ETU, produto de degradação dos EBDC, em ervas vegetais secas por UHPLC-MS/MS. *n=4; **n=8; ***n=9.

Métodos para determinação de compostos ditiocarbamatos em frutas e vegetais, matrizes menos complexas do que ervas secas, foram reportados na literatura. Hayama e Takada (2008) validaram um método para determinação de EBDC por LC-MS/MS em caqui, pera, morango, repolho, alface e espinafre, com LOQ de 0,0008 mg kg^{-1} para manebe (complexação e metilação com EDTA, L-cisteína e solução de dimetil sulfato em acetonitrila, extração com MgSO_4 e NaCl e clean-up com PSA). Al-Alam et al. (2017) desenvolveram um método de determinação de dazomet, metam-sódico, dimetilditiocarbamatos, EBDC e propinebe em vegetais, com LOQ variando entre 0,00013–0,00066 mg kg^{-1} . O método combinou técnicas de metilação por par-iônico, detecção por HPLC a 272 nm e espectrometria de absorção atômica (complexação, metilação e extração com EDTA, L-cisteína e iodometano em clorofórmio-hexano). Kakitani et al. (2017) validaram método para determinação de 10 ditiocarbamatos em cerveja, suco de fruta e amostras de malte por LC-MS/MS, com LOQ entre 0,00014–0,00697 mg kg^{-1} (conversão dos ditiocarbamatos em sais de sódio na presença de

bicarbonato de sódio e metilação com dimetil sulfato; extração por QuEChERS).

3.4 Análise de amostras

Os dois métodos validados foram aplicados na análise de 88 amostras de 33 tipos de ervas vegetais secas. Além disso, uma amostra adicional foi analisada para ETU e 14 amostras adicionais para EBDC, totalizando 103 amostras. A performance dos métodos foi avaliada por meio da inclusão de amostras controle fortificadas (controles de qualidade, QC) a cada sequência de amostras em 2 níveis diferentes e duas replicatas para cada nível (0,03 e 0,15 mg kg⁻¹ para EBDC; 0,03 e 0,1 mg kg⁻¹ para ETU). A recuperação das amostras QC foi de 80–110% para EBDC e variou entre 72–80% para o método ETU.

Das 103 amostras analisadas para EBDC, aproximadamente 22% (10 amostras) foram positivas, com concentrações variando entre traços e 1,05 mg kg⁻¹ de EBDC ou 0,59 mg kg⁻¹ de CS₂. As ervas com o maior número de amostras positivas foram ginkgo biloba (4 amostras) e chá verde (4 amostras). Os resultados das amostras positivas para EBDC estão mostrados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Resultados das amostras positivas para EBDC, analisadas por UHPLC-MS/MS

Amostra	EBDC (mg kg⁻¹)^a	CS₂ (mg kg⁻¹)^{a, b}
Alcachofra	0,22	0,13
Alcachofra	Traço	Traço
Alcachofra	Traço	Traço
Arnica	Traço	Traço
Arnica	Traço	Traço
Arnica	Traço	Traço
Camomila	0,06	0,03
Camomila	0,14	0,08
Camomila	Traço	Traço
Cavalinha	Traço	Traço
Cavalinha	0,09	0,05

Amostra	EBDC (mg kg⁻¹)^a	CS₂ (mg kg⁻¹)^{a, b}
Centella asiática	0,35	0,20
Chá verde	Traço	Traço
Chá verde	0,03	0,02
Chá verde	Traço	Traço
Chá verde	Traço	Traço
Chá verde + laranja amarga	Traço	Traço
Ginkgo biloba	0,07	0,04
Ginkgo biloba	0,04	0,02
Ginkgo biloba	Traço	Traço
Ginkgo biloba	1,05	0,59
Mulungu	Traço	Traço
Sene	0,03	0,02

a: Foram considerados como traços, amostras que apresentaram valores \geq LOD e $<$ LOQ (LOD = 1/3 LOQ); b: Concentrações de EBDC convertidas para CS₂.

Não foram detectados resíduos de ETU em nenhuma das amostras analisadas (Tabela S2.1).

Entre as culturas estudadas, mancozebe e metiram são registrados para uso somente em guaraná (mancozebe) e maracujá (mancozebe e metiram), com LMR de 3 mg kg⁻¹ de CS₂ (ditiocarbamatos) (ANVISA, 2023). A Farmacopeia Brasileira (FB) inclui uma lista contendo limites para 71 pesticidas em drogas vegetais (ANVISA, 2019c), incluindo para ditiocarbamatos, com limite máximo estabelecido em 2 mg kg⁻¹ de CS₂, valor 10 vezes maior do que o LOQ obtido para o método EBDC (0,02 mg kg⁻¹ de CS₂). Porém, ditiocarbamatos ou qualquer pesticida não deve ser aplicado se o objetivo é usar a cultura como planta medicinal ou no preparo de medicamento fitoterápico (ANVISA, 2019a). Além disso, nem todas as partes de determinadas espécies vegetais são autorizadas para o preparo de chás de acordo com a “Lista das partes de espécies vegetais autorizadas para o preparo de chás” da IN N° 159/2022.

O Codex Alimentarius estabeleceu LMR para 5 pesticidas em ervas, com níveis variando entre 0,01 (para abamectina) a 70 mg kg⁻¹ (para azoxistrobina), mas não inclui

ditiocarbamatos (CAC, 2023). A FB e a ANVISA não estabelecem limites de etilenotiourea em alimentos ou qualquer matriz. Na literatura, não foram encontrados outros estudos de análise de ETU em drogas vegetais.

No Brasil, ditiocarbamatos não têm registro para uso em nenhuma das ervas cujo resultado foi positivo para EBDC (ANVISA, 2023), portanto, os resultados indicam o uso indevido de pesticidas ou contaminação cruzada. EBDC foram encontrados na maioria das amostras em níveis traços (\geq LOD, $<$ LOQ), o que pode indicar contaminação proveniente de plantações próximas. As baixas concentrações encontradas de EBDC também podem justificar a não detecção de seu produto de degradação ETU, além do fato de que a etilenotiourea pode se degradar em etilenourea ou outros compostos também durante a estocagem (Kobayashi et al., 1992). A maior concentração de EBDC detectada foi de $0,59 \text{ mg kg}^{-1}$ de CS_2 , valor que não excedeu o limite aceitável de ditiocarbamatos para drogas vegetais de 2 mg kg^{-1} de CS_2 estabelecido na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019c).

O mancozebe é o terceiro pesticida mais vendido no Brasil de acordo com o último relatório sobre comercialização de pesticidas publicado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, IBAMA (IBAMA, 2023). Dentre os ditiocarbamatos, o mancozebe é registrado em um maior número de culturas de consumo humano (70), seguido do tiram (27, aplicação em sementes) e metiram (17). Sendo assim, embora não seja possível identificar pelo método desenvolvido qual EBDC foi aplicado na cultura, é provável que culturas tenham sido tratadas com mancozebe. Mozzaquatro et al., (2019) detectaram a presença de resíduos de ditiocarbamatos pelo método indireto (em níveis de CS_2) em 40% das amostras de folha fresca de maracujá analisadas e o processo de secagem das folhas, uma das etapas de produção da *Passiflora*, aumentou os níveis de CS_2 em até 60%.

3.5 Avaliação da exposição

A ingestão diária dos fungicidas EBDC pelo consumo de ervas vegetais foi estimada para as amostras positivas para pelo menos uma cultura. Para amostras com resultados não quantificáveis ($<$ LOQ), a concentração foi considerada como $\frac{1}{2}$ LOQ para o cálculo das médias das concentrações para cada erva. O cálculo da ingestão é feito

através da equação: (concentração do pesticida x consumo)/peso corpóreo (FAO, 2016; Caldas & van der Velde-Koerts, 2017). Nem todas as amostras apresentavam instruções de consumo no rótulo do produto, portanto, em uma abordagem conservadora, assumiu-se um consumo diário de 2 colheres de sopa (30 g) indicada em alguns rótulos para todas as ervas avaliadas. A estimativa da ingestão considerou o consumo da erva por uma pessoa pesando 60 kg. Os valores encontrados foram comparados com a Ingestão Diária Aceitável (IDA) para mancozebe e metiram ($0,03 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc}$; ANVISA, 2023)

Os resultados da avaliação de risco mostram que a ingestão dos EBDC encontrados nas amostras não representa potencial risco aos consumidores, representando menos de 1% da IDA (Tabela 2.3). Jardim et al. (2018b) realizaram avaliação de risco de ditiocarbamatos na população brasileira, assumindo que 93% do CS_2 detectado nas amostras de alimentos avaliadas eram provenientes do uso de mancozebe e metiram, e 7% do uso de propinebe. Nessa abordagem, a ingestão total representou menos de 7% da IDA dos EBDC, não representando risco aos consumidores. Os resultados do presente estudo confirmam esta conclusão, mesmo considerando a inclusão do consumo de ervas vegetais na dieta do brasileiro. Embora resíduos de EBDC tenham sido detectados em três amostras de arnica, o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira recomenda o uso externo dos produtos dessa planta (ANVISA, 2021). Portanto, as amostras não foram incluídas na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Avaliação de risco da exposição a EBDC pelo consumo de ervas vegetais.

Amostra	Concentração média, mg kg⁻¹ (n)	Ingestão diária, µg kg⁻¹ pc (%IDA^a)
Alcachofra	0,05 (3)	0,03 (0,1)
Camomila	0,04 (3)	0,02 (0,1)
Cavalinha	0,03 (2)	0,02 (0,09)
Centella asiática	0,2 (1)	0,1 (0,6)
Chá verde	0,01 (4)	0,006 (0,04)
Chá verde + laranja amarga	0,01 (1)	0,005 (0,03)
Ginkgo biloba	0,2 (4)	0,08 (0,5)
Mulungu	0,01 (1)	0,005 (0,03)
Sene	0,02 (1)	0,01 (0,06)

A: Ingestão Diária Aceitável. b: Peso corpóreo; c: Calculada a partir da média das concentrações obtidas para cada droga vegetal. Níveis traços foram considerados como ½ LOQ para o cálculo da média).

Resíduos de ETU não foram encontrados nas amostras avaliadas, mas é importante ressaltar que para avaliação de risco, o JMPR (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*), inclui o metabólito ETU na definição de resíduo, o qual é 7,5 vezes mais tóxico do que o mancozebe. Dessa forma, caso a ETU tivesse sido detectada nas amostras, seus resíduos deveriam ser expressos como "equivalentes de toxicidade do mancozebe", aplicando-se o fator de 7,5 (razão entre as IDAs do mancozebe e da ETU) às concentrações de ETU obtidas (FAO/WHO, 2014).

4. CONCLUSÃO

Métodos para determinação de etileno-bis-ditiocarbamatos e etilenotiourea em ervas vegetais secas foram satisfatoriamente validados por UHPLC-MS/MS utilizando uma amostra controle contendo 7 plantas diferentes (recuperação na faixa 70–120% e repetibilidade e precisão intermediária < 20%). Os métodos foram aplicados para análise de 103 amostras de ervas vegetais e a exposição aos EBDC pelo consumo das ervas com resultados positivos não indicou um risco para saúde. Até onde sabemos, esse é o primeiro trabalho que avaliou a presença de EBDC e ETU em amostras de ervas vegetais. A análise desses compostos é importante, visto que o mancozebe é o terceiro pesticida

mais comercializado no Brasil e a etilenotiourea, um de seus produtos de degradação, é a responsável por sua toxicidade crônica.

Ervas vegetais não estão incluídas nos programas de monitoramento de pesticidas no Brasil e os resultados desse trabalho reforçam a importância de se investigar esses produtos, conforme a recomendação da RDC 26/2014.

V. CONCLUSÕES FINAIS

Nesse trabalho, foram otimizados e validados dois métodos de determinação de pesticidas (multirresíduo e etileno-bis-ditiocarbamatos) e um método para determinação do metabólito dos EBDC, a etilenotioureia, por UHPLC-MS/MS.

O método de determinação multirresíduo foi validado para 65 pesticidas e 75 amostras de ervas vegetais secas foram analisadas. A avaliação de risco pelo consumo de ervas vegetais contendo pesticidas foi calculada para as amostras positivas.

Amostras adicionais foram coletadas e os métodos validados de determinação de etileno-bis-ditiocarbamatos e etilenotioureia foram aplicados para análise de 103 amostras. Resíduos de etilenotioureia não foram encontrados e a avaliação de risco foi calculada pelo consumo das ervas vegetais onde foram detectados resíduos de EBDC.

Dificuldades foram encontradas nesse estudo durante a otimização dos métodos EBDC e ETU, os quais, por fim, foram validados separadamente. Entretanto, entende-se que pode ser possível a junção dos dois métodos e sugere-se que essa possibilidade seja estudada em projetos futuros.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, M. S., Soliman, A. Sh., El-Gammal, H. A., Amer, M. E., & Attallah, E. R. (2017). Development and validation of a multiresidue method for the determination of 323 pesticide residues in dry herbs using QuEChERS method and LC-ESI-MS/MS. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 97(11), 1003–1023.
- Abhilash, P. C., & Singh, N. (2008). Multiple Residue Extraction for Organochlorine Pesticides in Medicinal Plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(6), 604–607.
- Akerele, O. (1993). Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *HerbalGram*, 28, 13-19. In: Junior, V. F. V; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M. (2005). Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, 28(3), 519–528.
- Al-Alam, J., Bom, L., Chbani, A., Fajloun, Z., & Millet, M. (2017). Analysis of Dithiocarbamate Fungicides in Vegetable Matrices Using HPLC-UV Followed by Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 55(4), 429-435.
- Almeida, A. M., Castel-Branco, M. M., & Falcão, A. C. (2002). Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B*, 774, 215–222
- Almeida, M. Z. (2011). Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea. In: *Plantas Mediciniais* [online]. 3rd ed. Salvador: EDUFBA, pp. 34-66. ISBN 978-85-232-1216-2. Available from SciELO Books.
- Alves, J. A. A. (2011). *Echinodorus grandiflorus* Chapéu-de-couro. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial. Plantas para o Futuro - Região Sul, pp. 608-614. Brasília – DF.
- Anastassiades, M., Lehotay, S., Štajnbaher D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for determination of pesticide residue in produce. *Journal of AOAC International*. 86(2), 412-431.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição. (2016). Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/publicacoes/memento-fitoterapico-da-farmacopeia-brasileira/view>>. Acesso em: 02/09/2023.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Análise de resíduos de pesticidas em fitoterápicos - perguntas e respostas. 3ª edição, 2019a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/medicamentos/fitoterapicos-dinamizados-e-especificos/informes/fitoterapicos/faq_agrotoxicos_fito_3ed_publicar_limpo.pdf>. Acesso em: 02/09/2023.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2019b. Programa de Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (PARA). Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>> Acesso em: 02/09/2023.

- ANVISA. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Farmacopeia Brasileira (6ª edição). (2019c). Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>. Acesso em: 26/09/2023.
- ANVISA. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2ª edição). (2021). Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/2021-fffb2-final-c-capa2.pdf>. Acesso em: 26/09/2023.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). (2022). VOTO Nº 237/2022/SEI/DIRE3/ANVISA. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/carbendazim-anvisa-concluiu-processo-de-reavaliacao-e-mantem-o-banimento/SEI_ANVISA1983902Voto.pdf> Acesso em: 02/09/2023
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), (2023a). Monografia de Agrotóxicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>> Acesso em: 02/09/2023.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). (2023b). Monografias excluídas. <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-excluidas-por-letra>>
- Aquino, A., Souza, M. R. R., Maciel, S. T. A., Alexandre, M. da R., & Navickiene, S. (2011). Multiclass MSPD method for pesticide determination in dehydrated *Hyptis pectinata* (sambacaitá) medicinal plant by GC-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(8), 1525–1530.
- Argenta, S. C., Argenta, A. C., Giacomelli, S. R., & Cezarotto, V. S. (2011). Plantas Medicinais: cultura popular versus ciência. *Revista Eletrônica Vivências*, 7(12), 51-60. Disponível em: <<https://www.ufpb.br/nepfh/contents/documentos/artigos/fitoterapia/plantas-medicinais-cultural-popular-versus-ciencia.pdf>> Acesso em: 02/09/2023.
- Aye, M. M., Aung, H. T., Sein, M. M., & Armijos, C. A. (2019). Review on the phytochemistry, medicinal properties and pharmacological activities of 15 selected myanmar medicinal plants. *Molecules*, Jan 15, 24(2):293.
- Besil, N., Pequeño, F., Alonzo, N., Hladki, R., Cesio, M. V., & Heinzen, H. (2017). Evaluation of different QuEChERS procedures for pesticide residues determination in *Calendula officinalis* (L) inflorescences. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 7, 143–148.
- Biziuk, M., & Stocka, J. (2015). Multiresidue Methods for Determination of Currently Used Pesticides in Fruits and Vegetables Using QuEChERS Technique. *International Journal of Environmental Science and Development*, 6(1), 18-22.
- Blasco, C., Font, G., & Picó, Y. (2004). Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1028, 267–276.
- Bolzoni, L., Sannino, A., & Bandini, M. (1993). Determination of ethylenethiourea and propylenethiourea in tomato products and in fruit purees. *Food Chemistry*, 47(3), 299–302.
- Bortolini, D. G., Windson Isidoro Haminiuk, C., Cristina Pedro, A., de Andrade Arruda Fernandes, I., & Maria Maciel, G. (2021). Processing, chemical signature and food

- industry applications of *Camellia sinensis* teas: An overview. *Food Chemistry*: X, 12, 100160.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological Reviews*, 24(2), 93-106.
- Braga, J. C. B., & Silva, L. R. (2021). Consumption of medicinal plants and herbal medicines in Brazil: consumer profile and its relationship with the COVID-19 pandemic. *Brazilian Journal of Health Review*, 4(1), 3831-3839.
- Brandão, M. G. L., Cosenza, G. P., Grael, C. F. F., Netto Junior, N. L., & Monte-Mór, R. L. M. (2009). Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2a), 478-487.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). (2011). Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. (2015a). MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Morus nigra* L. (AMOREIRA). Disponível em <<https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/2017/arquivos/MonografiaMorusnigra.pdf>> Acesso em: 02/09/2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. (2015b). MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Matricaria chamomilla* L. (= *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, CAMOMILA). Disponível em <<https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/2017/arquivos/MonografiaCamomila.pdf>> Acesso em: 02/09/2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2000). Resolução RDC N° 17, 24/02/2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, 25/02/2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2004). Resolução RDC N° 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, 18/03/2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2010). Resolução RDC N° 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 30/03/2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2014). Resolução RDC N° 26, de 13 de maio 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União, 13/05/2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2016) Resolução RDC N° 105, de 31 de agosto de 2016. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 26, de 13 de maio de 2014. Diário Oficial da União, 31/08/2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2017). Resolução RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, 24/07/2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2018). Resolução RDC N° 235, de 20 de junho de 2018. Dispõe sobre alterações e inclusões de controle de qualidade no registro e pós-registro de medicamentos

- dinamizados, fitoterápicos, específicos e produtos biológicos. Diário Oficial da União, 20/06/2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2022). INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN N° 159, DE 1° DE JULHO DE 2022. Estabelece as listas das partes de espécies vegetais autorizadas para o preparo de chás e para o uso como especiarias.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. (2006). Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC. Série B – Textos Básicos de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 92 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. (2020). Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME, 217p.
- BRASIL. Ministério de Saúde. Sistema de Vigilância Sanitária. (1995). Portaria N° 6 de 31 de janeiro de 1995. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária.
- BRASIL. Ministério de Saúde. Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia. (1967). Portaria n ° 22 de 30 de outubro de 1967. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas. Diário Oficial da União, 16 de novembro de 1967.
- Bruning, M. C. R., Mosegui, G. B. G., & Vianna, C. M. de M. (2012). A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. In *Ciência e Saúde Coletiva* (Vol. 17, Issue 10, pp. 2675–2685). FapUNIFESP (SciELO).
- Caldas, E. D. (2017). Introduction to Dietary Risk Assessment of Pesticides, Chapter 1. In: Ambrus A.; Hamilton D. *Food Safety Assessment of Pesticide Residues*. New Jersey: World Scientific.
- Caldas, E. D. (2019). Toxicological aspects of pesticides. In: VAZ JR., S. (org.). *Sustainable Agrochemistry: A Compendium of Technologies*. [S. l.]: Springer International Publishing. p. 197–230.
- Caldas, E. D., & Velde-Koerts, T. V. D. (2017). T. Dietary exposure and risk characterization for pesticide residues in food. In: A. Ambrus, & D. Hamilton (Eds.), *Food Safety Assessment of Pesticide Residues*. Chapter 6 (pp. 243–267). World Scientific Publishing Europe Ltd.
- Caldas, E. D., Conceição, M. H., Miranda, M. C. C., Souza, L. C. K. R., & Lima, J. F. (2001). Determination of Dithiocarbamate Fungicide Residues in Food by a Spectrophotometric Method Using a Vertical Disulfide Reaction System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4521-4525.
- Caldas, E. D., Machado, L. L. (2004). Cadmium, mercury and lead in medicinal plants in Brazil. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 599-603.
- Campos, M. P. O., Riechelmann, R., Martins, L. C., Hassan, B. J., Casa, F. B. A., & Giglio, A. D. (2011). Guarana (*Paullinia cupana*) Improves Fatigue in Breast Cancer Patients Undergoing Systemic Chemotherapy. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 17(6), 505–512. <https://doi.org/10.1089/acm.2010.0571>

- Cao, Y., Tang, H., Chen, D., & Li, L. (2015). A novel method based on MSPD for simultaneous determination of 16 pesticide residues in tea by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 998-999, 72–79.
- Capriotti A.L., Cavaliere C., Giansanti P., Gubbiotti R., Samperi R., & Laganà A. (2010). Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2521–2532.
- Carvalho, A. C. B., Perfeito, J. P. S., Costa e Silva, L. V., Ramalho, L. S., Marques, R. F. de O., & Silveira, D. (2011). Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(3), 467–473.
- Carvalho, P. H. V., Jesus, A.M.D, Prata, V. M., Bezerra, D. S. S., Romão, L. P.C., & Navickiene, S. (2010). Tropical peat as a versatile material for solid-phase extraction of pesticides from medicinal plant *Cordia salicifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(4), São Paulo.
- Castilhos, L. G., Oliveira, J. S., Adefegha, S. A., Manzoni, A. G., Passos, D. F., Assmann, C. E., Silveira, L. L., Trelles, K. B., Kronbauer, M., Doleski, P. H., Bremm, J. M., Braun, J., Abdalla, F. H., Gonçalves, J. F., Andrade, C. M., Cruz, I. B. M., Burger, M. E., & Leal, D. B. R. (2020). *Uncaria tomentosa* improves cognition, memory and learning in middle-aged rats. *Experimental Gerontology*, 138, 111016.
- Ceccarelli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C., & Giovannetti, M. (2010). Globe artichoke as a functional food. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3, 197–201.
- Chandrika, U. G., & Kumarab, P. A. A. S. P. (2015). Gotu Kola (*Centella asiatica*). *Advances in Food and Nutrition Research*, 125–157.
- Chen, L., Song, F., Liu, Z., Zheng, Z., Xing, J., & Liu, S. (2012). Multi-residue method for fast determination of pesticide residues in plants used in traditional Chinese medicine by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1225, 132–140.
- Chen, L., Yin, L., Song, F., Liu, Z., Zheng, Z., Xing, J., & Liu, S. (2013). Determination of pesticide residues in ginseng by dispersive liquid–liquid microextraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 917-918, 71–77.
- Chen, Y., Lopez, S., Hayward, D. G., Park, H. Y., Wong, J. W., Kim, S. S., Wan, J., Reddy, R. M., Quinn, D. J., Steiniger, D. (2016). Determination of Multiresidue Pesticides in Botanical Dietary Supplements Using Gas Chromatography–Triple-Quadrupole Mass Spectrometry (GC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 31, 6125–6132.
- Chung, S. W. C., & Wong, W. W. K. (2022). Chromatographic analysis of dithiocarbamate residues and their metabolites in foods employed in dietary exposure studies—a review, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 39:10, 1731-1743.
- Codex Alimentarius International Food Standards. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/commodities/en/>
- Costa, A. M., & Tupinambá, D. D. (2005). O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. (Eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 475-506.

- Costa, L. G. (2019). Toxic effects of pesticides. In: Casarett and Doull's *Toxicology. The Basic Science of Poisons*, 9ª edição (Klaassen C. D., editor. Ed.), pp. 1055–1106. New York: McGraw-Hill.
- Crnogorac, G., & Schwack, W. (2009). Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(1), 40-50.
- Cullen, T. E. (1964). Spectrophotometric determination of dithiocarbamates residues on Food Crops. *Analytical Chemistry*, 36, 221-224.
- da Silva, R. C., dos Santos, I. D., Neu, J. P., Wouters, R. D., Fontana, M. E. Z., Balbinot, P. D. R., Wagner, R., & Pizzutti, I. R. (2022). Commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) produced in South America: Determination of dithiocarbamate residues by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 394, 133513.
- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1402–1419.
- Dearfield, K. L. (1994). Ethylene thiourea (ETU). A review of the genetic toxicity studies. *Mutation Research*, v. 317, p. 111-132.
- Dhawan, K., Dhawan, S., & Chhabra, S. (2003). Attenuation of benzodiazepine dependence in mice by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linnaeus: A non-habit forming anxiolytic. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 215–222.
- Doble, M., & Kumar, A. (2005). Biodegradation of Pesticides. In *Biotreatment of Industrial Effluents* (pp. 89–100).
- Doerge, D. R., & Takazawa, R. S. (1990). Mechanism of thyroid peroxidase inhibition by ethylenethiourea. *Chemical Research in Toxicology*, 3, 98-101.
- Dreifuss, A. A., Bastos-Pereira, A. L., Fabossi, I. A., Lívero, F. A., Stolf, A. M., Alves de Souza, C. E., Gomes, L. de O., Constantin, R. P., Furman, A. E., Strapasson, R. L., Teixeira, S., Zampronio, A. R., Muscará, M. N., Stefanello, M. E., & Acco, A. (2013). *Uncaria tomentosa* exerts extensive anti-neoplastic effects against the Walker-256 tumour by modulating oxidative stress and not by alkaloid activity. *PLoS One*, 8(2):e54618.
- Dubey, J. K., Heberer, T., & Stan, H.-J. (1997). Determination of ethylenethiourea in food commodities by a two-step derivatization method and gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*, 765(1), 31–38.
- Edwards, H. G. M., Farwell, D. W., Oliveira, L. F. C. de, Alia, J.-M., Hyaric, M. L., & Ameidá, M. V. de. (2005). FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. *Analytica Chimica Acta*, 532(2), 177–186.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2009). Scientific opinion on risk assessment for a selected group of pesticides from the triazole group to test possible methodologies to assess cumulative effects from exposure through food from these pesticides on human health. EFSA panel on plant protection products and their residues (PPR Panel). Parma, Italy. *EFSA Journal*; 7 (9); 1167.
- Eicher, T. J. (2009). Toxic Encephalopathies I: Cortical and Mixed Encephalopathies. *Clinical Neurotoxicology*, 69–87.
- Eldin, S., & Dunford, A. (2001). *Fitoterapia: na atenção primária à saúde* (1ª edição). São Paulo: Editora Manole.

- English, B. A., & Webster, A. A. (2012). Acetylcholinesterase and its Inhibitors. *Primer on the Autonomic Nervous System*, 3ª edição, 631–633.
- EPA, 1992. Disponível em <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/ethylene-thiourea.pdf>>. Acesso em 01/09/2023.
- European Commission. (2023). EU - Pesticides database. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> Acesso em: 28/08/2023.
- European Pharmacopoeia. (2019). European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe (EDQM). ISBN: 978-92-871-8912-7
- FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). (1993). Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. Disponível em [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JM PR/Reports_1991-2006/Report1993.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JM_PR/Reports_1991-2006/Report1993.pdf). Acesso em 01/09/2023.
- FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO) (1986a) Pesticide residues in food. Report of the 1985 Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Plant Production and Protection Paper No. 68).
- FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO) (1986b) 1985 Evaluations of some pesticide residues in food, Part II - Toxicology, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO Plant Production and Protection Paper No. 72)
- FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). (2014). Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues. Disponível em <https://www.fao.org/3/i4245e/l4245E.pdf>. Acesso em 18/09/2023.
- FAO Food and Agricultural Organization. Plant Production and Protection. (2016). Paper 225.
- Figueredo, K. C., Guex, C. G., Reginato, F. Z., Haas da Silva, A. R., Cassanego, G. B., Lhamas, C. L., Boligon, A. A., Lopes, G. H. H., & de Freitas Bauermann, L. (2018). Safety assessment of *Morus nigra* L. leaves: Acute and subacute oral toxicity studies in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 224, 290–296.
- Freitas, D. V., Carvalho, C. R., Filho, F. J. N., & Astolfi-Filho, S. (2007). Karyotype with 210 chromosomes in guaraná (*Paullinia cupana* "Sorbilis"). *Journal of Plant Research*, 120(3), 399–404.
- Friedrichs, K., Winkeler, H. D., & Gerhards, P. (1995). Determination of Dithiocarbamate Residues in Foodstuff by Headspace Gas Chromatography and Flame Photometric Detection. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 201, 69-73.
- FSANZ (Food Standards Australia New Zealand). (2023). Schedule 20 Maximum residue limits. Disponível em: <https://www.legislation.gov.au/Series/F2015L00468> Acesso em: 28/08/2023.

- Fu, Y., Dou, X., Zhang, L., Qin, J., Yang, M., & Luo, J. (2019). A comprehensive analysis of 201 pesticides for different herbal species-ready application using gas chromatography–tandem mass spectrometry coupled with QuEChERS. *Journal of Chromatography B*, 1125, 121730.
- Garcinuño, R., Fernández-Hernando, P., & Cámara, C. (2004). Simultaneous determination of maneb and its main metabolites in tomatoes by liquid chromatography using diode array ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 225–229.
- Gasparotto, F. M., Palozi, R. A. C., da Silva, C. H. F., Pauli, K. B., Donadel, G., Lourenço, B. H. L. B., Nunes, B. C., Lívero, F. A. D. R., de Souza, L. M., Lourenço, E. L. B., Kassuya, C. A. L., & Gasparotto Junior, A. (2019). Antiatherosclerotic Properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli: From Antioxidant and Lipid-Lowering Effects to an Anti-Inflammatory Role. *Journal of Medicinal Food*, 22(9), 919-927.
- Ghani, S. B. A. (2014). Determination of multiclass pesticides in dry herbs using GC-ECD. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 9(3), 955–959.
- Gohil, K. J., Patel, J. A., & Gajjar, A. K. (2010). Pharmacological Review on *Centella asiatica*: A Potential Herbal Cure-all. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(5), 546–556.
- Gondo, T. T., Obuseng, V. C., Mmualefe, L. C., & Okatch, H. (2016). Employing Solid Phase Microextraction as Extraction Tool for Pesticide Residues in Traditional Medicinal Plants. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2890219.
- Gustafsson, K. H., & Fahlgren, C. H. (1983). Determination of dithiocarbamate fungicides in vegetable food stuffs by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(2), 461-463.
- Gustafsson, K. H., & Thompson, R. A. (1981). High-pressure liquid chromatographic determination of fungicidal dithiocarbamates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(4), 729-732.
- Hardin, B. D., Schuler, R. L., Burg, J. R., Booth, G. M., Hazelden, K. P., MacKenzie, K. M., Piccirillo, V. J., & Smith, K. N. (1987). Evaluation of 60 chemicals in a preliminary developmental toxicity test. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 7(1), 29-48.
- Harrington, P., Horner, J., Hird, S., Griffiths, T., & Reynolds, S. L. (1998). Modification of the Method for Measurement of Dithiocarbamate Residues as Carbon Disulfide in Fruit and Vegetables. *Central Science Laboratory*, 1-34.
- Hayama, T., & Takada, M. (2008). Simple and rapid method for the determination of ethylenebisdithiocarbamate fungicides in fruits and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 969–976.
- Heard, C. M., Johnson, S., Moss, G., & Thomas, C. P. (2006). In vitro transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of Guarana, *Paullinia Cupana*. *International Journal of Pharmaceutics*, 317(1), 26–31.
- Henman, A. R. (1982). Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): Ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. *Journal of Ethnopharmacology*, 6(3), 311–338.

- Hill, A. R. C. (1992). Headspace Methods for Dithiocarbamates. In: *Modern Methods for Pesticide Analysis. Emerging Strategies for Pesticide Analysis*, CRC Press Inc, 213-231.
- Hou, X., Lei, S., Guo, L., & Qiu, S. (2016). Optimization of a multi-residue method for 101 pesticides in green tea leaves using gas chromatography tandem mass spectrometry. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(4), 401–407.
- Hughes, M. F., Chan, M. P. L., Starr, J. M., Shafer, T. J., Scollon, E. J., & DeVito, M. J. (2012). Extrapolating Dose In Vitro to Dose In Vivo of a Neurotoxic Pyrethroid Pesticide Using Empirical Approaches and a PBPK Model. In: *Parameters for Pesticide QSAR and PBPK/PD Models for Human Risk Assessment*.
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373, 23-30.
- Hussain, F., Rana, Z., Shafique, H., Malik, A., & Hussain, Z. (2017). Phytopharmacological potential of different species of *Morus alba* and their bioactive phytochemicals: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(10), 950–956.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2001). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Ethylenethiourea. Volume 79, Lyon, IARC Press, pp. 659–701
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). (2023). Relatório de Comercialização de pesticidas. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos> Acesso em: 18/08/2023.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2020). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018. Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro, 2020.
- ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use). (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 2005.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, Revisão: 09. 2020.
- IPCS (International Program on Chemical Safety). Environmental health criteria 78 dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea and propylenethiourea: a general introduction. 1988. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc78.htm>>. Acesso em 12/03/2020.
- IPCS (International Program on Chemical Safety). (1993). Pesticide residues in food-1993 evaluations. Part II. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v93pr01.htm>>. Acesso em 12/03/2020.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety). (2009). Environmental Health Criteria 240 - Principles and methods for the Risk Assessment on Chemicals in Food. Chapter 2. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc240_index.htm>. Acesso em 01/09/2023.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety). (2004). Risk Assessment Terminology. Harmonization Project. WHO, Geneva, 2004. Disponível em

- <<http://www.inchem.org/documents/harmproj/harmproj/harmproj1.pdf>>. Acesso em 29/02/2020.
- IPCS/INCHEM (1993) Joint Meeting on Pesticide Residue — Monographs and evaluations. Ethylene thiourea
- Jacobs, B. P., & Browner, W. S. (2000). Ginkgo biloba: A living fossil. *The American Journal of Medicine*, 108(4), 341–342.
- Jacociunas, L. V., de Andrade, H. H. R., Lehmann, M., Pedersini, L. W., Ferraz, A. de B. F., da Silva, J., & Dihl, R. R. (2013). Protective activity of *Cynara scolymus* L. leaf extract against chemically induced complex genomic alterations in CHO cells. *Phytomedicine*, 20(12), 1131–1134.
- Jadhav, M., Thekkumpurath, A. S., Nakade, M., Gadgil, M., Oulkar, D., Arimboor, R., Ramakrishna, M., & Banerjee, K. (2017). Multiresidue method for targeted screening of pesticide residues in spice cardamom (*Elettaria cardamomum*) by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 100(3), 603–609.
- Jardim, A. N. O. (2012). Resíduos de pesticidas em alimento: validação de metodologia analítica, análise em frutas e avaliação da exposição da população brasileira pelo método probabilístico. (Tese de Doutorado, Universidade de Brasília).
- Jardim, A. N. O., & Caldas, E. D. (2009). Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Química Nova*, 32, 1898 - 1909.
- Jardim, A. N. O., & Caldas, E. D. (2012). Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. *Food Control*, 25, 607-616.
- Jardim, A. N. O., Brito A. P., van Donkersgoed, G., Boon P. E., & Caldas E. D. (2018a). Dietary cumulative acute risk assessment of organophosphorus, carbamates and pyrethroids insecticides for the Brazilian population. *Food and Chemical Toxicology*, Feb;112, 108-117.
- Jardim, A. N. O., Mello, D. C., Brito, P. B., van der Voet, H., Boon, P. E., & Caldas E. D. (2018b). Probabilistic dietary risk assessment of triazole and dithiocarbamate fungicides for the Brazilian population. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 118, 317-327.
- Jardim, A. N. O., Mello, D. C., Goes, F. C. S., Junior, E. F. F., & Caldas, E. D. (2014). Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC– μ ECD, GC–FPD and LC–MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment. *Food Chemistry*, 164, 195-204.
- Jardim, A. N. O., & Caldas, E. D. (2012). Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. *Food Control*, v. 25, p. 607-616.
- Jianren, Y., Yongquan, Z., Shuzhen, J., Zhengguo, W., & Fuzhen, Z. (1989). Gas Chromatographic Headspace Determination of Dithiocarbamate Fungicide Residues on Vegetables. *Scientia Agricultura Sinica*, 22, 76-80.
- Jnanasha, A. C., Kumar, A., & Lal, R. K. (2021). Hydrogel application improved growth and yield in Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.). *Industrial Crops and Products*, 174, 114175.
- Kakitani, A., Yoshioka, T., Nagatomi, Y., & Harayama, K. (2017). A rapid and sensitive analysis of dithiocarbamate fungicides using modified QuEChERS method and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pesticide Science*, 42(4), 145–150.

- Kanchi, S., Singh, P., & Bisetty, K. (2013). Dithiocarbamates as hazardous remediation agent: A critical review on progress in environmental chemistry for inorganic species studies of 20th century. *Arabian Journal of Chemistry*, 7, 11–25.
- Kazos, E. A., Stalikas, C. D., Nanos, C. G., & Konidari, C. N. (2007). Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. *Chemosphere*, 68, 2104–2110.
- Keppel, G. E. (1969). Modification of the carbon disulfide evolution method for dithiocarbamate residues. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 52, 162-167.
- Kim, K-H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 575, 525-535.
- Kobayashi, H., Nishida, M., & Matano, O. (1992) Effect of cysteine on the stability of ethylenebisthiourea and ethylenebis(dithiocarbamate) in crops during storage and / or analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (1): 76-80.
- Kolberg, D. I., Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2011). Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. *Food Chemistry*, 125(4), 1436–1442.
- Kosalec, I., Cvek, J., & Tomić, S. (2009). Contaminants of Medicinal Herbs and Herbal Products. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 60(4), 485–501.
- Lelli, D., Cortese, L., & Pedone, C. (2021). Use of plant-derived natural products in sleep disturbances. *Advances in experimental medicine and biology*, 1308, 217–224.
- Li, J., Gu, Y., Xue, J., Jin, H. Y., & Ma, S. (2017). Analysis and Risk Assessment of Pesticide Residues in a Chinese Herbal Medicine, *Lonicera japonica* Thunb. *Chromatographia*, 80(3), 503–512.
- Lim, L., & Bolstad, H. M. (2018). Organophosphate Insecticides: Neurodevelopmental Effects. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences.
- Liu, H., Kong, W., Gong, B., Miao, Q., Qi, Y., & Yang, M. (2015). Rapid analysis of multi-pesticides in *Morinda officinalis* by GC–ECD with accelerated solvent extraction assisted matrix solid phase dispersion and positive confirmation by GC–MS. *Journal of Chromatography B*, 974, 65–74.
- Liu, H., Kong, W., Qi, Y., Gong, B., Miao, Q., Wei, J., & Yang, M. (2014). Streamlined pretreatment and GC–FPD analysis of multi-pesticide residues in perennial *Morinda* roots: A tropical or subtropical plant. *Chemosphere*, 95, 33–40.
- López-Fernández, O., Rial-Otero, R., Cid, A., & Simal-Gándara, J. (2014). Combined determination and confirmation of ethylenethiourea and propylenethiourea residues in fruits at low levels of detection. *Food Chemistry*, 145, 1002–1010.
- López-Fernández, O., Rial-Otero, R., González-Barreiro, C., & Simal-Gándara, J. (2012). Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 134(1), 366-374.
- Lozano A., Rajski Ł., Belmonte-Valles N., Uclés A., Uclés S., Mezcua M., & Fernández-Alba A.R. (2012). Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: validation and pilot survey in real samples. *Journal of Chromatography A*, 1268, 109–122.

- Luanda, A., Ripanda, A., & Makangara, J. J. (2023). Therapeutic potential of *Equisetum arvense* L. for management of medical conditions. *Phytomedicine Plus*, 3(2), 100444.
- Machado, I., Gérez, N., Pistón, M., Heinzen, H., & Cesio, M. V. (2017). Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC–MS and LC–MS/TS using the same QuEChERS procedure. *Food Chemistry*, 227, 227–236.
- Maranghi, F., De Angelis, S., Tassinari, R., Chiarotti, F., Lorenzetti, S., Moracci, G., Marcocchia, D., Gilardi, E., Di Virgilio, A., Eusepi, A., Mantovani, A., & Olivieri, A. (2013). Reproductive toxicity and thyroid effects in Sprague Dawley rats exposed to low doses of ethylenethiourea. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 261–271.
- Marques, A. M., Provance, D. W., Kaplan, M. A. C., & Figueiredo, M. R. (2017). *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1032–1047.
- Martínez-Domínguez, G., Nieto-García, A. J., Romero-González, R., & Frenich, A. G. (2015). Application of QuEChERS based method for the determination of pesticides in nutraceutical products (*Camellia sinensis*) by liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 177, 182–190.
- Matisová, E., Chovancová, J., & Buzinkalová, T. (1984). Capillary gas chromatography of ethylenethiourea, a degradation product of ethylene-bis-dithiocarbamates. *Journal of Chromatography A*, 286, 331–337.
- Miao, Q., Kong, W., Yang, S., & Yang, M. (2013). Rapid analysis of multi-pesticide residues in lotus seeds by a modified QuEChERS-based extraction and GC–ECD. *Chemosphere*, 91(7), 955–962.
- Miller, J. N., & Ambrus, A. (2000). Chapter 9 –Statistics in calibration analysis. In *Manual on Basic Statistics, FAO/IAEA Training and Reference Centre for Food and Pesticide Control: Vienna, Australia* (pp. 1–18).
- Misturini, T. F., Lovato, F., & Tiuman, T. S. (2020). Qualidade de amostras de chás de camomila e erva-doce comercializadas no município de Toledo, Paraná. *Brazilian Journal of Food Research*, 11, 28–48.
- Monteiro, S. C., & Brandelli, C. L. C. (2017). *Farmacobotânica: aspectos teóricos e aplicação*. Porto Alegre: Artmed.
- Moretto, A. (2014). Pesticide Residues: Organophosphates and Carbamates. *Reference Module in Food Science*, 3, 19–22.
- Mozzaquatro, J. O., César, I. A., Pinheiro, A. E. B., & Caldas, E. D. (2022). Pesticide residues analysis in passion fruit and its processed products by LC-MS/MS and GC-MS/MS: Method validation, processing factors and dietary risk assessment. *Food Chemistry*, 375.
- Mozzaquatro, J. O., Mello, D. C., Oliveira, R. C. S., Rosa, R. C. C., Costa, A. M., & Caldas, E. D. (2019). Dithiocarbamate Residues in Fruits and Leaves of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) from Different Brazilian Regions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(9), 1834–1840.
- Mujawar, S., Utture, S. C., Fonseca, E., Matarrita, J., & Banerjee, K. (2014). Validation of a GC–MS method for the estimation of dithiocarbamate fungicide residues and safety evaluation of mancozeb in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 150, 175–181.

- Nascimento Filho, F. J. do, Garcia, T. B., Sousa, N. R., & Atroch, A. L. (2001). Recursos genéticos de guaraná. In: Sousa, N. R.; Souza, A. das G.C. de. (Ed.). Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental: conservação, pesquisa e utilização. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. Cap. 7.
- Oladeji, O. S., Adelowo, F. E., & Oluyori, A. P. (2021). The genus *Senna* (Fabaceae): A review on its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *South African Journal of Botany*, 138, 1–32.
- Oliveira, J. T., da Costa, F. M., da Silva, T. G., Simões, G. D., dos Santos, E. P., da Costa, P. Q., Andrezza, R., Schenkel, P. C., & Pieniz, S. (2023). Green tea and kombucha characterization: Phenolic composition, antioxidant capacity and enzymatic inhibition potential. *Food Chemistry*, 408, 135206.
- Oshiro, M. C., Miguel, M. D., Dias, J. D. F. G., Gomes, E. C., & Miguel, O. G. (2016). A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. *Vigilância Sanitária em Debate*, 4(4), 790/348.
- Pareja, L., Niell, S., Vryzas, Z., González, J., Cesio, M. V., Mourkidou, E. P., & Heinzen, H. (2015). Comparison and evaluation of two methods for the pesticide residue analysis of organophosphates in yerba mate. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(2), 98–104.
- Park, Y.-S., Abd El-Aty, A. M., Choi, J.-H., Cho, S.-K., Shin, D.-H., & Shim, J.-H. (2006). Pesticide multiresidue analysis in *Panax ginseng* (C. A. Meyer) by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection. *Biomedical Chromatography*, 21(1), 29–39.
- Patel, S. S. (2009). Morphology and pharmacology of *Passiflora edulis*: a review. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 3, 1-6.
- Pereira, S. S. T. (2013). Medicamentos fitoterápicos e drogas vegetais industrializados e oficializados pelo Ministério da Saúde no Brasil: regulamentação sanitária, abrangência e qualidade dos estudos pré-clínicos e clínicos (Tese de Doutorado, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca).
- Perz, R. C., Van Lishaut, H., & Schwack, W. (2000). CS2 Blinds in Brassica Crops: False Positive Results in the Dithiocarbamate Residue Analysis by the Acid Digestion Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 792–796.
- Petrovska, B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 1.
- Prasad, A., Mathur, A. K., & Mathur, A. (2019). Advances and emerging research trends for modulation of centelloside biosynthesis in *Centella asiatica* (L.) Urban- A review. *Industrial Crops and Products*, 141, 111768.
- Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2011). QuEChERS: possibilities and trends in sample preparation for multiresidue determination of pesticides in food. *Scientia Chromatographica*, 3(1), 51-64.
- Radunz, C. L., Okuyama, C. E., Branco-Barreiro, F. C. A., Pereira, R. M. S., & Diniz, S. N. (2020). Clinical randomized trial study of hearing aids effectiveness in association with *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on tinnitus improvement. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 86(6), 734–742.
- Rahman, S., Jamal, M. M., Parvin, A., Mahfuz-Al-Mamun, M., & Islam, M. R. (2012). Antidiabetic activity of *Centella asiatica* (L.) urbana in alloxan induced Type 1 diabetic model rats. *Journal of Bio-Science*, 19, 23-27.

- Ray, D. E., & Fry, J. R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(1), 174-193.
- Ridsdale, C. E. (1978). A revision of *Mitragyna* and *Uncaria* (Rubiaceae). *Blumea: Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 24(1), 43–100.
- Roberts, J. R., & Reigart, J. R. (2013). Chapter 5. Organophosphates. In *Recognition and Management of Pesticide Poisonings* (6th ed.). Washington, D.C.: Environmental Protection Agency. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-01/documents/rmpp_6thed_final_lowresopt.pdf. Acesso em 02/09/2023.
- Rocha, F. A. G. da, Araújo, M. F. F., Costa, N. D. L., & Silva, R. P. O. (2015). O Uso Terapêutico da Flora na História Mundial. *Holos*, 1, 49.
- Rodrigues, E. L., Marcelino, G., Silva, G. T., Figueiredo, P. S., Garcez, W. S., Corsino, J., Guimarães, R. de C. A., & Freitas, K. de C. F. (2019). Nutraceutical and Medicinal Potential of the *Morus* Species in Metabolic Dysfunctions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 301.
- Rodrigues, M. V. N., Magalhães, P. M., Reyes, F. G. R., & Rath, S. (2007). GC–MS determination of organochlorine pesticides in medicinal plants harvested in Brazil. *Toxicology Letters*, 164, S242.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2003). Passion Fruits. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 4368–4373.
- Royer, A., Ménand, M., Grimault, A., & Communal, P. Y. (2001). Determination of Dithiocarbamates in Plant Matrixes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2152–2158.
- Rutkowska, E., Łozowicka, B., & Kaczyński, P. (2018). Modification of Multiresidue QuEChERS Protocol to Minimize Matrix Effect and Improve Recoveries for Determination of Pesticide Residues in Dried Herbs Followed by GC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, 11, 709–724.
- SANTE. Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE 11212/2021). Directorate General for Health and Food Safety. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. 2021. Implemented by 01.01.2022
- Santos, J. S. (2016). Plantas Medicinais: Uma Ciência em Expansão. In J. S. Santos & C. C. O. F. Almeida (Eds.), *Das plantas medicinais à fitoterapia: uma ciência em expansão* (pp. 11-24). Brasília: Editora IFB.
- Santos, P. J., Ribeiro, L. C., Muller, A. L. H., Adaime, M. B., Zanella, R., & Prestes, O. D. (2019). QuEChERS extraction method for pesticide multiresidue determination in herbal medicines by GC-MS/MS. In: *XVII Latin American Symposium on Chromatography and Related Techniques/Brazilian Symposium on Chromatography/Workshop on Recent Advances in Sample Preparation, Aracaju, SE*. Book of Abstracts, 2019.
- Sayed, R., & Hussein, O. E. (2022). Method optimization and validation for the determination of mancozeb in chamomile by modified QuEChERS and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 111.
- Schimpl, F. C., Silva, J. F., Gonçalves, J. F. C., & Mazzafera, P. (2013). Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(1), 14–31.

- Schmidt, B., Christensen, H. B., Peterse, A., Sloth, J. J., & Poulsen, M. E. (2013). Method validation and analysis of nine dithiocarbamates in fruits and vegetables by LCMS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(7), 1287-1298.
- Shaban, N. S., Abdou, K. A., & Hassan, N. E.-H. Y. (2016). Impact of toxic heavy metals and pesticide residues in herbal products. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(1), 102–106.
- Shafer, T. J., Meyer, D. A., & Crofton, K. M. (2005). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives*, 113(2), 123-136.
- Shebbo, S., El Joumaa, M., Kawach, R., & Borjac, J. (2020). Hepatoprotective effect of *Matricaria chamomilla* aqueous extract against 1,2-Dimethylhydrazine-induced carcinogenic hepatic damage in mice. *Heliyon*, 6(6), e04082.
- Shinomiya, K., Inoue, T., Utsu, Y., Tokunaga, S., Masuoka, T., Ohmori, A., & Kamei, C. (2005). Hypnotic Activities of Chamomile and Passiflora Extracts in Sleep-Disturbed Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(5), 808–810.
- Shoham, S., Groll, A. H., Petraitis, V., & Walsh, T. J. (2017). Systemic Antifungal Agents. *Infectious Diseases*, 1333–1344.e4.
- Silva, F. M. R., Magalhaes, F. E. A., Batista, F. L. A., da Silva, L. M. R., Ricardo, N. M. P. S., Sabino, L. B. de S., & de Figueiredo, R. W. (2023). Microencapsulation of green tea (*Camellia sinensis*) phenolic extract: Physical-chemical characterization, antimicrobial and toxicological properties. *Food Chemistry Advances*, 3, 100360.
- Silva, N. C. S., Vitor, A. M., Bessa, D. H. S., & Barros, R. M. S. (2017). A Utilização de Plantas Medicinais e Fitoterápicos em Prol da Saúde. *Única Cadernos Acadêmicos*, 3(1).
- Silveira, I. M. S. C. da, & Ramires, J. C. L. (2014). O Uso de Plantas Medicinais na Área Urbana de Montes Claros-MG: Reflexões a Partir da População Atendida na Estratégia Saúde da Família do Bairro Morrinhos. *Revista Cerrados (UNIMONTES)*, 12, 181-198.
- Simões, C. L. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2003). *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento* (5ª ed.). Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: UFSC.
- Słowik-Borowiec, M. (2014). Validation of a QuEChERS-Based Gas Chromatographic Method for Multiresidue Pesticide Analysis in Fresh Peppermint Including Studies of Matrix Effects. *Food Analytical Methods*, 8(6), 1413–1424.
- Smith, N., & Atroch, A. L. (2010). Guaraná's Journey from Regional Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(3), 279–282.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, P. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., & Weiner, M. L. (2002). *Toxicology*. 171:03-59.
- Steiniger, D., Lu, G., Butler, J., Phillips, E., & Fintschenko, Y. (2010). Determination of multiresidue pesticides in green tea by using a modified QuEChERS extraction and Ion-Trap Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 93(4), 1169–1179.
- Stertz, S. C., & Freitas, R. J. S. (2003). Teor de dissulfeto de carbono em agrião d'água (*Nasturtium officinale* R. BE.) obtido pelos sistemas de cultivo orgânico, convencional e hidropônico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 13, 45-52.

- Stevens, J. T., & Breckenridge, C. B. (2001). Crop protection chemicals. In: *Hayes AW, ed. Principles and Methods of Toxicology*. Philadelphia, PA: Taylor & Francis, 565–648.
- Strada, C. L., Lima, K. C., Silva, V. C., Ribeiro, R. V., Dores, E. F. G. C., Dall'Oglio, E. L., Schmeda-Hirschmann, G., Carollo, C. A., Martins, D. T. O., Sousa, P. T. (2017). Isovitecin as marker and bioactive compound in the antinociceptive activity of the Brazilian crude drug extracts of *Echinodorus scaber* and *E. grandiflorus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(5), 619–626.
- Tadeo, J. L., Pérez, R. A., Albero, B., García-Valcárcel, A. I., & Sánchez-Brunete, C. (2012). Review of Sample Preparation Techniques for the Analysis of Pesticide Residues in Soil. *Journal of AOAC International*, 95(5), 1258–1271.
- Taha, S. M., & Gadalla, S. A. (2017). Development of an efficient method for multi-residue analysis of 160 pesticides in herbal plant by ethyl acetate hexane mixture with direct injection to GC-MS/MS. *Talanta*, 174, 767–779.
- Tappin, M. R. R., & Lucchetti, L. (2007). Sobre a Legislação de Registro de Fitoterápicos. *Revista Fitos*, 3(1), 12-14.
- Tomazzoni, M. I., & Negrelle, R. R. B. (2006). Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto & Contexto - Enfermagem*, 15(1), 115–121.
- Tong, H., Tong, Y., Xue, J., Liu, D., & Wu, X. (2013). Multi-residual Pesticide Monitoring in Commercial Chinese Herbal Medicines by Gas Chromatography–Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 7(1), 135–145.
- Vareli C. S., Silva R. C., De Kok A., Pizzutti I. R., Zanella R., Adaime M.B. (2007). Analytical Method Validation for Dithiocarbamate Residues Determination in soybeans, Comparing Flame Photometric and Mass Spectrometry Detections and the Influence of Cleanup. In: 1st Latin American Pesticide Residue Workshop (LAPRW). Santa Maria. Book of Abstracts 1st LAPRW.
- Verschoye, R. D., & Aldridge, W. N. (1980). Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Archives of Toxicology*, 45(4), 325–329.
- Wei, J.-C., Hu, J., Cao, J.-L., Wan, J.-B., He, C.-W., Hu, Y.-J., Hu, H., & Li, P. (2016). Sensitive Detection of Organophosphorus Pesticides in Medicinal Plants Using Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with Sweeping Micellar Electrokinetic Chromatography. *ACS Publications; American Chemical Society*, 64(4), 932–940.
- WHO (World Health Organization) (1998). Guidelines for the Appropriate Use of Herbal Medicines. WHO Regional Publications, Western Pacific Series. WHO Regional office for the Western Pacific, Manila. 3
- WHO (World Health Organization). (2007a). WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. 105p. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43510/9789241594448_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Accessed September 16 2022.
- WHO (World Health Organization). (2007b). Framework for the provision of scientific advice on food safety and nutrition. Geneva, Disponível em <<http://www.fao.org/3/a-a1296e.pdf>>. Acesso em 02/09/2023.
- Wu, P., Pengsi, W., Mengying G., Jian, X., & Xiaoli, W. (2020). Human health risk assessment of pesticide residues in honeysuckle samples from different planting bases in China. *Science of The Total Environment*, Volume 759, 142747.

- Xiao, J., Xu, X., Wang, F., Ma, J., Liao, M., Shi, Y., Fang, O., & Cao, H. (2019). Analysis of exposure to pesticide residues from Traditional Chinese Medicine. *Journal of Hazardous Materials*, 365, 857–867.
- Xing, L., Zhang, H., Qi, R., Tsao, R., & Mine, Y. (2019). Recent Advances in the Understanding of the Health Benefits and Molecular Mechanisms Associated with Green Tea Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(4), 1029–1043.
- Xu, Z., Yi, X., Shanshan, W., Xiaoxia, Z., Tao, T., Jianzhong, Y., Huiyu, Z., Shenggan, W., Chunrong, Z., & Xueping, Z. (2020). Pesticide multi-residues in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: Method validation, residue levels and dietary exposure risk assessment. *Food Chemistry*, 128490.
- Yang, H., Gong, P., Wang, J., Wang, D., Xue, X., & Yu, W. (2023). Determination of four ethylenebis dithiocarbamates in vegetables and fruits by UPLC-MS/MS. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 35(1), 79-85.
- Yun-cheng, X., Jie-li, Z., Yu, Z., Zhi-guang, H., & Yan-yu, S. (2004). Studies on Residue Determination of Dithiocarbamate Antimicrobial in *Panax ginseng* and Its Articles. *Journal of Jilin Agricultural University*, 26(2), 179-181.
- Zarn, J. A., Brüscheiler, B. J., & Schlatter, J. R. (2003). Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 111, 255-261.
- Zeraik, M. L., Pereira, C. A. M., Zuin, V. G., & Yariwake, J. H. (2010). Maracujá: um alimento funcional? *Rev. Bras. Farmacogn.*, 20, 459-471.
- Zhang, K., Wong, J. W., Yang, P., Tech, K., DiBenedetto, A. L., Lee, N. S., Hayward, D. G., Makovi, C. M., Krynitsky, A. J., Banerjee, K., Jao, L., Dasgupta, S., Smoker, M. S., Simonds, R., & Schreiber, A. (2011). Multiresidue Pesticide Analysis of Agricultural Commodities Using Acetonitrile Salt-Out Extraction, Dispersive Solid-Phase Sample Clean-Up, and High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7636–7646.
- Zhang, Q., Zhao, J. J., Xu, J., Feng, F., & Qu, W. (2015a). Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 48–80.
- Zhang, W., Yan, Y., Wu, Y., Yang, H., Zhu, P., Yan, F., Zhao, R., Tian, P., Wang, T., Fan, Q., & Su, Z. (2022). Medicinal herbs for the treatment of anxiety: A systematic review and network meta-analysis. *Pharmacological Research*, 179, 106204. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106204>.
- Zhang, Y., Zhang Z. H., Li, A. M. Wang, Y. F., Cheng, X. D., & Zhao, W. W. (2015b). Determination of mancozeb in *Schisandra chinensis* (Turcz.) bail. by methylation derived UPLC [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 54(12).
- Zhang, Z., Lu, Z., Fang, N., Hou, Z., Ren, W., Li, Y., & Lu, Z. (2021). Rapid Determination of 21 Chinese Domestically Registered Pesticides in Ginseng Using Cleanup Based on Zirconium-Oxide-Modified Silica and Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*.
- Zhou, L., Liu, X., Kang, S., Zhang, F., & Pan, C. (2013). A rapid determination method for ethylenethiourea in potato and cucumber by modified QuEChERS – High

- performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1355–1359.
- Zia-ur-Rehman, Gurgul, A., Youn, I., Maldonado, A., Wahid, F., Che, C.-T., & Khan, T. (2022). UHPLC-MS/MS-GNPS based phytochemical investigation of *Equisetum arvense* L. And evaluation of cytotoxicity against human melanoma and ovarian cancer cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(6), 103271.
- Zuin, V. G., Yariwake, J. H., & Lanças, F. M. (2003b). Analysis of pesticide residues in Brazilian medicinal plants: matrix solid phase dispersion versus conventional (European Pharmacopoeia) methods. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(2), 304–309.
- Zuin, V., Yariwake, J., & Bicchi, C. (2003a). Fast supercritical fluid extraction and high-resolution gas chromatography with electron-capture and flame photometric detection for multiresidue screening of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazil's medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 985(1-2), 159–166.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Capítulo 1. Pesticide residues in dry medicinal herbs for tea preparation by LC-MS/MS: method validation and analysis

Table S1.1 – Chromatographic and mass spectra parameters of the 66 pesticides analyzed by UHPLC-MS/MS Applied Biosystem®/MDS Sciex® 6500+ QTRAP

Pesticide	RT (min)	Precursor ion (m/z)	m/z	Product ion (m/z)	DP* (v)	CE* (v)	CXP* (v)
2,4-D	7.7	[M-H] ⁻	218.9	160.9;124.9	-50	-18;-38	-9;-7
Acephate	2.62	[M+H] ⁺	184	143;125	51	25;27	15
Acetamiprid	6.09	[M+H] ⁺	223	126; 99.1	66;56	27;47	14;15
Ametryn	8.7	[M+H] ⁺	228	186.1;96	86	25;33	10
Atrazine	8.3	[M+H] ⁺	216.1	174; 104.1	56	23;39	15
Azoxystrobin	8.94	[M+H] ⁺	404.1	372.1; 344.1	44	19;27	15
Boscalid	8.94	[M+H] ⁺	343	307;140	64	27	15
Buprofezin	10.3	[M+H] ⁺	306.2	201.1;116.2	36	17;21	15
Carbaryl	7.76	[M+H] ⁺	202.1	144.9;127.1	21	15;39	15
Carbendazim	4.9	[M+H] ⁺	192.2	160.2;132.1	46	27;41	15
Carbofuran	7.62	[M+NH ₄] ⁺	222.1	165.2;123	26	17;29	15
Carbofuran 3-OH	5.9	[M+NH ₄] ⁺	238.067	181.1;163.2	51	15;21	15;10
Chlorfenvinphos	9.75	[M+H] ⁺	358.9	155.1;99	44	17;39	15
Chlorpyriphos	10.21	[M+H] ⁺	350	198;96.9	46;31	25;41	15
Chlorpyriphos-methyl	9.8	[M+H] ⁺	324	125.1;292	46	25;19	15
Cyromazine	2	[M+H] ⁺	167.04	84.9;125.1	61	25	10;14

Pesticide	RT (min)	Precursor ion (m/z)	m/z	Product ion (m/z)	DP* (v)	CE* (v)	CXP* (v)
Diazinon	9.7	[M+H] ⁺	305.1	169.1;153.3	56	27	15
Dicrotophos	5.5	[M+H] ⁺	238.1	127.1;112	26;36	23;17	15
Difenoconazole	9.96	[M+H] ⁺	406.1	251.1;337	51	37;26	15
Dimethoate	5.8	[M+H] ⁺	230	199.1	31	13	15
Epoxiconazole	9.4	[M+H] ⁺	330.1	121;101.1	49	27;63	15
Ethion	10.29	[M+H] ⁺	385.1	199.1;143.1	36	13;30	15
Fenitrothion	9.06	[M+H] ⁺	278.1	125	101	29	15
Fenpropathrin	10.29	[M+H] ⁺	350.2	97;125.1	61	43;19	15
Fenpyroximate	10.73	[M+H] ⁺	422.214	135;107.1	101;56	41;75	16;15
Fenthion	9.58	[M+H] ⁺	279	246.9;169.1	41	19;23	15
Fipronil	9.3	[M-H] ⁻	434.898	329.8;249.9	-10	-22;-38	-17
Fluquinconazole	9.25	[M+H] ⁺	376	307.1;349	64;61	33;25	15
Flutriafol	8.27	[M+H] ⁺	302.087	69.9;109	66	47;43	8;4
Heptenophos	8.47	[M+H] ⁺	251	127;215.1	41	19;12	15
Imazalil	8.2	[M+H] ⁺	296.975	158.9;200.8	66	31;25	18;10
Imidacloprid	5.4	[M+H] ⁺	256.1	209;175	59	23;25	15
Linuron	8.8	[M+H] ⁺	248.984	160;182.1	71	25;23	16;8
Malaoxon	7.7	[M+H] ⁺	315	127.1;99	41	17;31	15
Malathion	9.05	[M+H] ⁺	330.963	285;127	21	11;17	16;14
Metalaxyl-M	8.6	[M+H] ⁺	280.07	220.2;248.1	66	19;15	4;16

Pesticide	RT (min)	Precursor ion (m/z)	m/z	Product ion (m/z)	DP* (v)	CE* (v)	CXP* (v)
Methamidophos	1.96	[M+H] ⁺	142	94;124.9	41;36	19	15
Methiocarb	8.38	[M+H] ⁺	226.1	169.2;121	51	13;23	15
Methomyl	4.54	[M+H] ⁺	163.1	88.1;106	51	13	15
Metribuzin	7.49	[M+H] ⁺	215.024	186.9;84.1	86	25;23	20;10
Monocrotophos	4.66	[M+H] ⁺	224.1	127;98	56	21;17	15
Myclobutanil	9.05	[M+H] ⁺	289.1	70.1;125.2	39	33;39	15
Omethoate	3.28	[M+H] ⁺	214	124.9;109	36;41	29;35	15
Methyl paraoxon	7.05	[M+H] ⁺	248	202;109.1	66;44	25;35	15
Pencycuron	9.9	[M+H] ⁺	329.038	89.4;90	91	89;91	10
Phenthoate	9.5	[M+H] ⁺	321	163.1;79	46	17;51	15
Pirimicarb	7.3	[M+H] ⁺	239.2	182.2;72.1	43;26	21;31	15
Pirimiphos-ethyl	10.03	[M+H] ⁺	334	198.1;182.1	31;51	29;31	15
Pirimiphos-methyl	9.85	[M+H] ⁺	306.1	164.1;108	61	29;43	15
Prochloraz	9.88	[M+H] ⁺	376	308.1;69.9	34	17;43	15
Profenofos	10.1	[M+H] ⁺	373	302.9;97	56	25;43	15
Propanil	8.7	[M+H] ⁺	218	162;127.1	62	21;37	10
Prothiofos	10.7	[M+H] ⁺	344.9	240.9;133	54;56	27;69	15
Pyraclostrobin	9.8	[M+H] ⁺	388.1	194;163	29;21	19;29	15
Pyrazophos	9.8	[M+H] ⁺	374.09	222.1;194	61;71	29;43	15
Pyridaphenthion	9.23	[M+H] ⁺	340.993	189.1;205	81	29	10

Pesticide	RT (min)	Precursor ion (m/z)	m/z	Product ion (m/z)	DP* (v)	CE* (v)	CXP* (v)
Quinalphos	9.59	[M+H] ⁺	299	163	36;31	29	15
Tebuconazole	9.6	[M+H] ⁺	308.1	70.1;125	41	39;51	15
Thiabendazole	5.7	[M+H] ⁺	202	175;131	76	35;45	16;14
Thiamethoxam	4.59	[M+H] ⁺	291.972	181.1;210	61	31;15	8;12
Thiobencarb	9.8	[M+H] ⁺	258.1	125;89	61;39	25;67	15
Thiophanate-methyl	7.4	[M+H] ⁺	342.971	150.9;311	66	25;15	16;8
Trichlorfon	5.7	[M+H] ⁺	256.859	109;220.9	86	23;15	12;6
Trifloxystrobin	9.99	[M+H] ⁺	409.1	186.1;206	39	23;21	15
Triazophos	9.19	[M+H] ⁺	313.995	162;119	66	25;47	14;12
Zoxamide	9.6	[M+H] ⁺	335.995	186.9;158.9	66	31;55	16;18

*DP: Declustering Potential; CE: Collision Energy; CXP: Collision Cell Exit Potential.

Table S1.2 – Matrix effect (%) determined by LC-MS/MS 4000QTRAP for 49 pesticides in nine selected dry medicinal herbs

Pesticide	Matrix Effect (%)								
	Boldo	Senna	“Espinheira Santa”	Chamomile	Artichoke	Guarana	Gotu kola	“Espinheira Santa”	Passion fruit
Acephate	-87.32	-69.70	-73.31	-71.01	-63.20	-52.47	-54.46	-62.20	-61.81
Aldicarb	-66.67	-39.97	-34.31	-54.38	-32.44	31.20	-12.01	-34.48	-13.94
Aldicarb sulfone	-77.96	-48.37	-70.29	-57.85	-68.74	-61.73	-42.51	-51.84	-46.73
Aldicarb sulfoxide	-90.15	-64.59	-85.79	-66.82	-75.42	-66.16	-51.95	-65.88	-58.56
Atrazine	-85.44	-74.14	-59.56	-84.42	-69.00	-0.06	-56.07	-40.51	-52.02
Azoxystrobin	-71.70	-37.79	-23.28	-66.09	-52.71	10.88	-36.06	-44.95	-23.27
Boscalid	-82.04	-45.09	-44.49	-73.03	-60.66	1.92	-49.36	-51.49	-28.93
Buprofezin	-90.33	-81.09	-40.01	-84.48	-60.55	-27.31	-68.14	-72.37	-36.56
Carbaryl	-78.81	-54.06	-37.07	-72.65	-53.90	19.74	-36.85	-48.43	-37.82
Carbendazim	-83.08	-59.46	-48.37	-74.58	-62.04	1.03	-49.74	-53.94	-39.53
Carbofuran	-90.31	-42.24	-35.12	-69.35	-60.06	21.66	-25.77	-36.35	-26.69
Carbofuran-3-OH	-71.71	-74.01	-59.09	-80.82	-81.47	-36.20	-66.33	-69.87	-75.82
Chlorpyrifos	-92.44	-85.11	-55.00	-86.66	-68.94	-23.73	-73.77	-73.04	-50.64
Chlorpyrifos methyl	-82.21	-71.53	-36.26	-84.58	-54.49	17.55	-66.39	-61.65	-43.32
Kresoxim-methyl	-82.75	-71.78	-22.89	-79.36	-55.99	19.73	-55.07	-58.13	-29.70

Pesticide	Matrix Effect (%)								
	Boldo	Senna	“Espinheira Santa”	Chamomile	Artichoke	Guarana	Gotu kola	“Espinheira Santa”	Passion fruit
Diazinon	-76.21	-44.39	-1.76	-68.32	-33.23	39.29	-27.40	-40.05	-1.28
Dicrotophos	-59.03	-27.01	-49.17	-45.93	-57.11	-16.72	-33.03	-35.61	-22.76
Difenoconazole	-85.67	-79.70	-44.44	-85.97	-55.37	-28.96	-69.07	-72.66	-49.80
Dimethoate	-88.85	-65.18	-59.88	-76.33	-74.62	0.26	-51.96	-57.68	-58.32
EPN	-93.86	-82.58	-62.14	-90.12	-70.86	-26.64	-83.32	-80.08	-59.09
Epoxiconazole	-66.12	-55.36	-15.21	-69.10	-47.05	1.41	-53.08	-43.50	-19.90
Ethion	-94.15	-87.64	-62.00	-91.17	-72.55	-39.56	-77.33	-81.03	-58.36
Ethoprophos	-74.23	-28.30	-4.37	-70.15	-49.97	59.40	-20.18	-26.87	6.19
Fenamiphos	-75.05	-48.90	-18.67	-65.38	-45.81	16.71	-45.17	-49.70	-16.48
Phenthoate	-85.34	-70.79	-36.44	-81.51	-52.66	20.69	-55.82	-57.13	-23.74
Fluquinconazole	-82.38	-56.22	-47.39	-83.63	-61.35	-16.19	-52.86	-58.95	-23.76
Heptenophos	-43.21	-22.83	-13.43	-53.75	-42.44	62.20	-16.00	-24.70	-7.33
Imidacloprid	-89.82	-68.77	-76.63	-73.28	-72.92	-9.41	-56.11	-65.03	-64.40
Malathion	-75.28	-40.46	-16.29	-69.34	-55.82	30.34	-46.02	-48.48	-23.52
Methamidophos	-85.26	-62.36	-67.15	-64.75	-58.28	-43.50	-49.47	-53.20	-57.18
Methidathion	-81.26	-54.64	-32.19	-87.83	-60.76	9.36	-43.13	-56.24	-31.88

Pesticide	Matrix Effect (%)								
	Boldo	Senna	“Espinheira Santa”	Chamomile	Artichoke	Guarana	Gotu kola	“Espinheira Santa”	Passion fruit
Methiocarb	-87.20	-57.38	-36.71	-86.62	-65.97	10.13	-46.32	-57.59	-33.91
Methomyl	-67.38	-36.19	-65.13	-54.95	-56.28	-41.16	-39.36	-39.56	-34.76
Myclobutanil	-77.04	-43.98	-36.48	-73.18	-53.27	-4.00	-38.46	-50.57	-20.95
Monocrotophos	-65.57	-38.30	-55.22	-51.08	-60.00	-45.42	-29.96	-42.49	-35.88
Omethoate	-89.02	-65.83	-80.68	-69.76	-70.54	-56.50	-53.82	-63.87	-60.34
Methyl paraoxon	-94.29	-40.29	-55.19	-94.95	-71.25	-4.03	-57.78	-47.10	-49.82
Pyraclostrobin	-87.45	-75.63	-30.09	-86.30	-58.87	0.61	-62.94	-73.06	-43.86
Pirimicarb	-81.77	-57.39	-47.10	-74.37	-63.29	16.99	-44.06	-49.81	-44.13
Pirimiphos-ethyl	-87.15	-73.31	-30.23	-79.50	-48.50	-11.51	-63.16	-64.56	-24.81
Pirimiphos-methyl	-82.06	-63.80	-20.05	-82.22	-45.62	18.46	-60.11	-58.64	-41.59
Prochloraz	-81.53	-71.67	-28.77	-80.22	-49.58	-17.08	-56.51	-70.24	-40.80
Profenofos	-87.40	-74.43	-32.43	-79.04	-50.80	-15.62	-62.60	-68.38	-35.89
Quinalphos	-82.65	-78.09	-34.68	-80.29	-62.26	9.06	-55.70	-64.54	-34.16
Tebuconazole	-79.51	-71.28	-36.26	-71.73	-54.81	-1.05	-56.04	-59.18	-28.61
Thiobencarb	-88.43	-69.31	-30.26	-82.25	-55.01	3.75	-56.46	-64.63	-30.26
Trichlorfon	-70.28	-40.67	-59.53	-59.38	-65.73	-30.42	-34.11	-25.84	-36.64

Table S1.3 – Matrix effect (%) of the control dry medicinal herb for the analysis of 66 pesticide by UHPLC-MS/MS (6500+QTRAP)

Pesticide	Levels*				
	1	2	3	4	5
	%ME	%ME	%ME	%ME	%ME
2.4-D	99.0	84.9	81.7	85.6	86.6
Acephate	-4.2	-4.5	-10.2	-13.4	-8.7
Acetamiprid	4.4	9.1	-9.4	8.6	-3.9
Ametryn	-36.0	-55.9	-55.1	-57.2	-53.5
Atrazine	-48.4	-59.2	-61.3	-64.1	-61.0
Azoxystrobin	-19.3	-45.9	-43.8	-47.7	-43.7
Boscalid	-37.4	-54.1	-57.0	-54.8	-52.2
Buprofezin	-35.8	-69.8	-72.1	-72.1	-66.6
Carbaryl	-58.3	-65.9	-61.9	-59.4	-57.1
Carbendazim	35.8	-10.3	-34.0	-25.1	-31.3
Carbofuran	-48.6	-61.2	-62.0	-64.6	-62.8
Carbofuran 3-OH	-59.8	-57.0	-60.2	-57.0	-57.1
Chlorfenvinphos	-16.2	-55.8	-53.1	-53.9	-48.5
Chlorpyriphos	9.1	-60.1	-65.6	-70.1	-62.1
Chlorpyriphos-methyl	14.5	-47.1	-55.6	-58.7	-49.4
Cyromazine	11.6	-19.7	-24.0	-26.0	-27.2
Diazinon	39.2	-31.3	-48.3	-47.7	-43.0
Dicrotophos	-22.0	-25.4	-29.7	-28.1	-25.9
Difenoconazole	-7.2	-53.3	-54.8	-56.4	-49.2
Dimethoate	-56.0	-58.8	-58.4	-59.3	-57.8
Epoxiconazole	5.9	-44.2	-39.7	-45.1	-43.0

Pesticide	Levels*				
	1	2	3	4	5
	%ME	%ME	%ME	%ME	%ME
Ethion	-38.5	-79.5	-80.4	-77.0	-73.1
Fenitrothion	-53.1	-73.5	-68.8	-72.0	-69.2
Fenpropathrin	25.0	-59.4	-64.4	-69.5	-63.4
Fenpyroximate	-43.4	-77.2	-78.5	-78.7	-72.1
Fenthion	-31.7	-72.1	-71.5	-74.0	-67.4
Fipronil	176.6	63.1	45.3	47.0	62.8
Fluquinconazole	14.2	-31.7	-45.1	-55.3	-52.5
Flutriafol	-33.6	-45.4	-46.0	-46.9	-43.5
Heptenophos	-25.4	-30.9	-39.0	-43.0	-40.1
Imazalil	47.2	-49.4	-47.5	-54.4	-53.1
Imidacloprid	4.1	-25.7	-28.3	-26.0	-28.2
Linuron	-24.0	-50.8	-53.9	-56.8	-53.0
Malaoxon	-20.1	-25.0	-28.0	-32.0	-32.1
Malathion	-32.7	-55.0	-52.4	-46.3	-40.9
Metalaxyl-M	-39.8	-45.2	-43.8	-45.3	-42.5
Methamidophos	-2.3	-6.6	-11.6	-12.3	-8.3
Methiocarb	-57.9	-55.7	-56.9	-55.4	-56.7
Methomyl	-7.6	-21.5	-26.3	-26.3	-27.3
Metribuzin	-52.6	-65.0	-67.4	-67.0	-61.2
Monocrotophos	-36.1	-41.6	-41.8	-41.5	-38.0
Myclobutanil	-21.8	-45.5	-46.9	-46.6	-43.1
Omethoate	-4.3	-12.3	-18.0	-20.4	-17.4

Pesticide	Levels*				
	1	2	3	4	5
	%ME	%ME	%ME	%ME	%ME
Methyl paraoxon	-44.0	-61.2	-60.2	-58.9	-57.8
Pencycuron	-35.9	-72.2	-72.9	-71.2	-67.9
Phenthoate	-4.8	-47.8	-58.9	-64.6	-51.5
Pirimicarb	-47.9	-52.0	-55.0	-54.8	-54.0
Pirimiphos-ethyl	-16.4	-64.6	-66.1	-67.8	-60.0
Pirimiphos-methyl	16.8	-49.9	-57.5	-59.4	-52.0
Prochloraz	-39.9	-67.0	-74.4	-64.3	-69.9
Profenofos	-8.8	-58.6	-62.5	-63.6	-58.4
Propanil	-24.4	-54.7	-57.2	-59.4	-57.5
Prothiofos	-48.8	-79.1	-83.7	-83.2	-76.8
Pyraclostrobin	-30.9	-68.6	-68.8	-68.1	-62.8
Pirazophos	27.7	-38.3	-38.4	-37.0	-29.1
Pyridaphenthion	-4.5	-40.9	-41.0	-44.7	-41.4
Quinalphos	53.1	-29.9	-41.8	-47.5	-40.6
Tebuconazole	-11.4	-43.2	-44.6	-43.1	-39.8
Thiabendazole	-59.7	-71.3	-71.1	-71.3	-71.3
Thiamethoxam	-50.5	-52.1	-51.6	-50.6	-46.9
Thiobencarb	-6.8	-59.1	-64.0	-65.8	-61.5
Thiophanate-methyl	-45.1	-77.2	-66.9	-72.3	-73.0
Triazophos	-31.8	-57.7	-57.9	-56.9	-54.0
Trichlorfon	-40.4	-40.4	-50.6	-56.7	-56.1
Trifloxystrobin	-33.2	-67.4	-69.1	-67.8	-63.5

Pesticide	Levels*				
	1	2	3	4	5
	%ME	%ME	%ME	%ME	%ME
Zoxamide	-20.0	-61.3	-61.6	-61.5	-56.7

*Levels 1 to 5: 5, 10, 20, 40, 80 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$, respectively, for 2,4-D, acephate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, ethion, fenitrothion, fenpyroximate, fenpropathrin, fenthion, phenthoate, flutriafol, heptenophos, linuron, malathion, methiocarb, metribuzin, myclobutanil, methyl paraoxon, prochloraz, propanil, prothiofos, quinalphos, thiamethoxam e trichlorfon, and 1, 3, 5, 7 and 15 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$, respectively, for the other analytes.

Table S1.4 – Validation data for the 66 pesticides analyzed by UHPLC-MS/MS (6500+QTRAP)

Pesticide	Recovery (n = 4 – 5)			Repeatability (n = 4 – 5)			Intermediate precision (n = 8 – 10)		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
2,4-D	27	33	32	15.7	7.1	7.9	16.0	11.7	6.8
Acephate	81	91	94	1.3	2.8	1.2	2.6	3.3	1.6
Acetamiprid	96	87	95	2.5	2.2	2.1	2.4	2.6	2.3
Ametryn	111	88	91	3.7	4.4	3.8	6.3	6.9	7.6
Atrazine	115	83	88	2.8	4.4	2.4	9.8	6.7	4.8
Azoxystrobin	99	87	92	3.0	3.0	0.8	3.5	4.7	3.3
Boscalid	110	96	98	3.6	4.5	5.3	13.4	6.2	7.2
Buprofezin	120	95	94	4.8	7.7	7.3	12.9	10.2	14.8
Carbaryl	88	100	105	3.7	4.0	3.6	4.5	5.3	6.1
Carbendazim	102	116	120	13.0	6.4	3.2	11.5	11.9	12.1
Carbofuran	115	99	105	0.8	2.5	2.6	1.8	4.5	3.8
Carbofuran 3-OH	108	94	95	3.2	2.5	1.9	5.3	1.9	1.9
Chlorfenvinphos	104	90	91	6.9	5.3	5.2	7.3	6.6	7.1
Chlorpyrifos	116	109	93	3.7	11.4	13.9	14.5	17.7	19.6
Chlorpyrifos-methyl	113	104	100	8.3	8.2	6.2	19.3	10.8	9.6
Cyromazine	109	64	60	2.8	4.8	1.1	10.8	3.6	3.4
Diazinon	92	88	95	4.5	1.3	4.8	7.6	7.7	6.4
Diclotophos	93	87	95	1.9	3.1	1.6	4.5	3.1	2.1
Difenoconazole	100	91	92	9.3	8.4	7.3	13.1	12.8	17.9
Dimethoate	96	89	95	1.9	3.2	1.1	3.0	2.9	1.0
Epoxiconazole	91	90	88	5.7	2.7	2.5	20.4	5.1	9.4
Ethion	107	118	101	8.9	13.6	12.1	35.8	15.0	28.5
Fenitrothion	99	97	97	6.7	2.9	5.2	14.1	11.5	12.5
Fenpropathrin	116	99	91	6.2	13.3	11.8	20.2	16.0	17.3

Pesticide	Recovery (n = 4 – 5)			Repeatability (n = 4 – 5)			Intermediate precision (n = 8 – 10)		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
Fenpyroximate*	125	108	93	4.0	14.8	14.6	47.8	32.5	53.2
Fenthion	90	93	86	8.5	7.2	8.8	15.6	13.2	14.2
Fipronil	97	78	89	4.7	5.3	3.2	21.1	13.5	9.7
Fluquinconazole	118	89	92	8.7	6.8	3.5	12.2	8.4	9.4
Flutriafol	90	98	98	2.3	3.1	1.8	3.6	3.9	1.9
Heptenophos	76	102	108	7.0	2.5	1.2	12.8	3.6	3.8
Imazalil	99	85	95	14.1	6.1	3.1	11.1	6.2	5.8
Imidacloprid	82	86	95	9.9	3.3	1.5	7.4	6.0	2.5
Linuron	84	95	98	5.9	3.8	2.2	8.7	6.3	4.3
Malaoxon	108	91	95	2.4	1.8	1.9	3.3	2.1	1.49
Malathion	90	101	97	8.3	4.1	7.4	12.8	4.4	9.8
Metalaxyl-M	101	90	97	2.0	3.2	0.6	1.70	2.4	1.7
Methamidophos	89	80	85	1.7	1.8	1.2	1.61	2.2	1.4
Methiocarb	93	97	99	1.4	5.2	1.9	4.22	5.5	3.0
Methomyl	98	88	94	2.6	1.8	2.0	2.7	2.6	2.0
Metribuzin	85	97	98	2.8	2.1	1.4	3.8	3.3	2.1
Monocrotophos	97	89	95	1.7	3.2	0.9	2.0	2.4	2.0
Myclobutanil	83	97	98	5.8	4.9	2.0	7.2	5.9	4.1
Omethoate	94	85	87	1.8	2.4	0.9	1.93	2.9	1.6
Methyl paraoxon	81	98	103	3.8	2.3	2.5	6.0	3.2	2.9
Pencycuron	107	95	89	17.9	8.8	9.0	20.8	11.6	19.7
Phenthoate	112	103	101	6.7	5.7	5.4	5.9	6.3	9.9
Pirimicarb	101	91	96	1.4	2.0	1.1	3.2	2.9	1.4
Pirimiphos-ethyl	123	92	92	1.9	7.5	6.5	12.1	11.4	14.0
Pirimiphos-methyl	112	92	96	5.3	3.3	6.9	12.9	7.3	10.5

Pesticide	Recovery (n = 4 – 5)			Repeatability (n = 4 – 5)			Intermediate precision (n = 8 – 10)		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
Prochloraz	107	100	94	9.0	7.7	11.1	14.0	11.4	16.5
Profenofos	120	90	94	7.7	5.7	6.7	10.1	10.4	12.7
Propanil	89	94	98	1.2	3.8	2.0	10.7	6.7	3.6
Prothiofos*	165	117	97	8.6	14.0	10.8	40.0	21.0	25.5
Pyraclostrobin	120	95	95	5.1	5.6	4.4	15.5	9.4	15.2
Pirazophos	119	92	88	11.4	4.0	5.2	11.8	8.6	11.8
Pyridaphenthion	103	89	94	1.4	2.3	2.5	4.29	4.8	4.7
Quinalphos	107	96	94	5.9	6.3	5.9	11.9	9.9	11.3
Tebuconazole	115	88	93	6.3	5.4	2.0	6.4	8.3	8.7
Thiabendazole	94	81	86	2.6	4.1	1.5	2.6	4.6	2.0
Thiamethoxam	84	95	104	1.9	4.0	1.8	6.4	2.9	4.3
Thiobencarb	100	91	95	10.8	3.9	4.3	19.6	7.8	10.5
Thiophanate-methyl	208	42	17	2.1	6.4	12.1	65.1	59.6	58.1
Triazophos	110	89	94	3.2	3.5	2.4	5.3	6.6	6.6
Trichlorfon	88	99	104	2.2	3.9	1.6	2.2	2.8	3.0
Trifloxystrobin	118	92	92	3.0	6.8	5.2	11.8	11.2	15.4
Zoxamide	111	91	93	1.9	5.0	5.3	13.0	8.8	11.1

Low, medium and high levels: 0.025, 0.100 and 0.400 mg kg⁻¹ for 2,4-D, acephate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, ethion, fenitrothion, fenpyroximate, fenprothrin, fenpyroximate, fenthion, phenthoate, flutriafol, heptenophos, linuron, malathion, methiocarb, metribuzin, myclobutanil, methyl paraoxon, prochloraz, profenofos, propanil, prothiofos, quinalphos, thiamethoxam and trichlorfon; 0.005, 0.025 e 0.075 mg kg⁻¹ for the other pesticides. * additional tests were done for fenpyroximate and prothiofos 0.05 mg kg⁻¹ level, giving recovery of 126 and 136%, respectively and 14.5 and 15.3% repeatability.

Table S1.5 – Results of pesticide analysis of 76 dry medicinal plant samples by UHPLC-MS/MS (6500+Qtrap)

Sample code	Sample, plant part (scientific name)	Pesticide	Concentration mg kg ⁻¹
54/20	Artichoke, leaf (<i>Cynara scolymus</i>)	nd	nd
88/20	Artichoke, leaf (<i>Cynara scolymus</i>)	nd	nd
93/20	Artichoke, leaf (<i>Cynara scolymus</i>)	nd	nd
50/20	Artichoke, leaf (<i>Cynara scolymus</i>)	Imazalil	0.018
		Methomyl	traces
49/20	Black mulberry, leaf (<i>Morus nigra</i>)	nd	nd
61/18	Black mulberry, leaf (<i>Morus nigra</i>)	Methomyl	traces
84/20	Angelica, leaf (<i>Angelica officinalis</i> L.)	Carbendazim	traces
11/19	Angelica, leaf (<i>Angelica officinalis</i> L.)	Zoxamide	0.006
74/20	Arnica-do-mato, leaf (<i>Solidago microglossa</i>)	nd	nd
83/20	Arnica-do-mato, leaf (<i>Solidago microglossa</i>)	Carbendazim	0.011
		Imidacloprid	0.006
		Linuron	traces
		Trifloxystrobin	0.005
91/20	Arnica, bark and leaf (<i>Arnica montana</i>)	Fenitrothion	0.486
		Imidacloprid	traces
		Trifloxystrobin	traces
92/20	Assa-peixe, leaf (<i>Vernonia polysphaera</i>)	nd	nd
51/20	Barbatimão, bark (<i>Stryphnodedron barbatiman</i>)	nd	nd
53/20	Boldo, leaf (<i>Boldus boldus</i>)	nd	nd
57/20	Boldo, leaf (<i>Peumus boldus</i>)	nd	nd
59/20	Boldo, leaf (<i>Boldus boldus</i>)	Quinalphos	0.034
82/20	Boldo, leaf (<i>Peumus boldus</i>)	nd	nd
95/20	Boldo, leaf (<i>Peumus boldus</i>)	nd	nd
64/20	Chamomile, flower (<i>Matricaria chamomilla</i>)	nd	nd
99/20	Chamomile, flower and aerial part (<i>Matricaria chamomilla</i>)	nd	nd
52/20	Chamomile, flower (<i>Matricaria recutita</i>)	Fenprothrin	0.042

Sample code	Sample, plant part (scientific name)	Pesticide	Concentration mg kg ⁻¹
		Imazalil	0.044
		Imidacloprid	0.014
		Linuron	0.463
		Pyraclostrobin	0.386
80/20	Chamomile, flower, leaf and stem (<i>Matricaria recutita</i>)	Acetamiprid	0.017
		Azoxystrobin	traces
		Carbendazim	1.60
		Fenpropathrin	0.198
		Malaoxon	0.006
		Malathion	0.255
		Metalaxyl-M	0.017
102/20	Canela de velho, leaf (<i>Miconia albicans</i>)	nd	nd
78/20	Canela de velho, leaf (<i>Miconia albicans</i>)	Methomyl	0.007
		Thiamethoxam	traces
48/20	Carqueja, leaf (<i>Baccharis trimera</i>)	nd	nd
68/20	Cáscara sagrada, bark (<i>Rhamnus purshiana</i>)	nd	nd
86/20	Cáscara sagrada, bark (<i>Rhamnus purshiana</i>)	Tebuconazole	0.004
58/18	Horse chestnut, seed (<i>Aesculus hippocastanum</i>)	nd	nd
60/20	Horsetail, leaf (<i>Equisetum</i>)	nd	nd
70/20	Horsetail, leaf (<i>Equisetum hyemale</i>)	Carbendazim	traces
104/20	Horsetail, aerial part (<i>Equisetum arvense</i> L)	nd	nd
89/20	Horsetail, aerial part (<i>Equitesum arvense</i>)	Tebuconazole	traces
62/18	Gotu kola, leaf (<i>Hydrocotyle asiatica</i>)	Pyraclostrobin	traces
87/20	Gotu kola, leaf (<i>Hydrocotyle asiatica</i>)	Acetamiprid	0.068
		Ametryn	traces
		Azoxystrobin	0.009
		Carbendazim	1.28
		Chlorpyrifos	0.075

Sample code	Sample, plant part (scientific name)	Pesticide	Concentration mg kg ⁻¹
		Difenoconazole	0.087
		Fenpropathrin	0.097
		Imidacloprid	0.035
		Profenofos	0.094
		Pyraclostrobin	0.221
		Tebuconazole	0.060
		Thiamethoxam	0.032
		Trifloxystrobin	0.010
		Triazophos	0.074
55/20	Green tea, leaf (<i>Camelia sinensis</i>)	nd	nd
90/20	Green tea, leaf (<i>Camelia sinensis</i>)	nd	nd
63/20	Green tea, leaf (<i>Camelia sinensis</i>)	Acetamiprid	0.067
		Buprofezin	0.006
		Carbendazimnd	0.005
		Imidacloprid	0.025
		Profenofos	0.031
		Triazophos	0.013
94/20	Green tea. leaf and stalk (<i>Camelia sinensis</i>)	Pirimiphos-methyl	0.005
60/18	Chapéu de couro. leaf (<i>Echinodorus macrophyllus</i>)	Zoxamide	0.025
47/20	Chapéu de couro, leaf (<i>Echinodorus macrophyllus</i>)	nd	nd
85/20	Chapéu de couro. leaf and stem (<i>Echinodorus macrophyllus</i>)	Zoxamide	0.029
275/18	Chlorella, algae (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)	nd	nd
98/20	Chlorella, algae (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)	nd	nd
13/19	Comfrey, leaf (<i>Symphytum officinale</i>)	Thiamethoxam	0.005
56/20	Espinheira santa, leaf (<i>Maytenus ilicifolia</i>)	nd	nd
76/20	Espinheira santa, leaf (<i>Maytenus ilicifolia</i>)	nd	nd
103/20	Espinheira santa, leaf (<i>Maytenus ilicifolia</i>)	nd	nd

Sample code	Sample, plant part (scientific name)	Pesticide	Concentration mg kg ⁻¹
12/19	Bladder wrack, leaf (<i>Fucus vesiculosus</i>)	nd	nd
75/20	Bladder wrack, leaf (<i>Fucus vesiculosus</i>)	nd	nd
66/20	Ginkgo, leaf (<i>Ginkgo biloba</i>)	Acetamiprid	0.005
		Carbendazim	0.102
		Imidacloprid	0.081
		Paraoxon-methyl	0.031
		Thiamethoxam	0.032
71/20	Ginkgo, leaf (<i>Ginkgo biloba</i>)	Acetamiprid	0.006
		Atrazine	traces
		Buprofezin	0.020
		Carbenazim	0.673
		Chlorpyrifos	0.032
		Difenoconazole	0.022
		Epoxiconazole	traces
		Fenpropathrin	traces
		Imidacloprid	0.051
		Pyraclostrobin	0.066
		Tebuconazole	0.041
		Thiamethoxam	0.026
274/18	Guarana, seed (<i>Paullinia cupana</i>)	nd	nd
97/20	Guarana, seed (<i>Paullinia cupana</i>)	nd	nd
61/20	Guarana, seed (<i>Paullinia cupana</i>)	Carbaryl	traces
77/20	Hibiscus, flower (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Carbaryl	traces
72/20	Hibiscus, flower (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>)	nd	nd
58/20	Peruvian maca, root (<i>Lepidium meyenii</i>)	nd	nd
05/19	Passion fruit, leaf (<i>Passiflora alata</i>)	nd	nd
100/20	Passion fruit, leaf and stem (<i>Passiflora incarnata</i>)	nd	nd
57/18	Muira puama, bark (<i>Ptychopetalum olacoides</i>)	nd	nd
79/20	Muira puama, bark (<i>Ptychopetalum olacoides</i>)	nd	nd

Sample code	Sample, plant part (scientific name)	Pesticide	Concentration mg kg ⁻¹
67/20	Mulungu, bark (<i>Erythrina velutina</i>)	nd	nd
106/20	Mulungu, bark (<i>Erythrina velutina</i>)	nd	nd
14/19	Myrcia, leaf (<i>Myrcia multiflora</i>)	nd	nd
46/20	Senna, leaf (<i>Cassia angustifolia</i>)	nd	nd
96/20	Senna, leaf (<i>Cassia angustifolia</i>)	nd	nd
101/20	Senna, leaf (<i>Senna alexandrina</i>)	nd	nd
65/20	Senna, leaf (<i>Cassia angustifolia</i>)	nd	nd
62/20	Senna, leaf (<i>Cassia acutifolia</i>)	nd	nd
105/20	Spirulina, algae (<i>Spirulina plantesis</i>)	nd	nd
276/18	Spirulina, algae (<i>Spirulina plantesis</i>)	nd	nd
108/20	Tribulus. fruit dry extract (<i>Tribulus terrestris</i>)	Acetamiprid	0.032
		Azoxystrobin	0.006
		Buprofezin	0.007
		Carbendazim	0.099
		Carbofuran	traces
		Difenoconazole	0.022
		Imidacloprid	0.017
		Metalaxyl-M	0.051
		Tebuconazole	0.029
Thiamethoxam	0.028		
273/18	Cat's claw. bark (<i>Uncaria tomentosa</i>)	nd	nd
107/20	Cat's claw. bark (<i>Uncaria tomentosa</i>)	Carbendazim	0.009
73/20	Cat's claw. bark (<i>Uncaria tomentosa</i>)	nd	nd

Traces: \geq LOD, $<$ LOQ; nd = not detected; LOQ: 0.100 mg kg⁻¹ for fenpyroximate and prothiofos; 0.025 for acephate, carbaryl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, ethion, fenitrothion, fenpropathrin, fenthion, flutriafol, heptenophos, linuron, malathion, methyl paraoxon, methiocarb, metribuzin, myclobutanil, phenthoate, prochloraz, propanil, quinalphos, thiamethoxam and trichlorfon; 0.005 mg kg⁻¹ for the other analytes. MRL established by the Brazilian Pharmacopoeia (ANVISA. 2019c): acephate (0.1 mg kg⁻¹), chlorfenvinphos (0.5 mg kg⁻¹), chlorpyrifos (0.2 mg kg⁻¹), chlorpyrifos-methyl (0.1 mg kg⁻¹), diazinon (0.5 mg kg⁻¹), sum of dimethoate and omethoate (0.1 mg kg⁻¹), ethion (2 mg kg⁻¹), fenitrothion (0.5 mg kg⁻¹), fenthion (0.05 mg kg⁻¹), sum of malathion and malaaxon (1 mg kg⁻¹), methamidophos (0.05 mg kg⁻¹), methidathion (0.2 mg kg⁻¹), monocrotophos (0.1 mg kg⁻¹), methyl paraoxon (0.5 mg kg⁻¹), pirimiphos-ethyl (0.05 mg kg⁻¹), pirimiphos-methyl (4 mg kg⁻¹), profenofos (0.1 mg kg⁻¹), prothiofos (0.05 mg kg⁻¹), quinalphos (0.05 mg kg⁻¹).

Capítulo 2. Determinação de etileno-bis-ditiocarbamatos e etilenotiourea em ervas vegetais por UHPLC-MS/MS

Tabela S2.1 – Resultados das análises de EBDC e ETU em 103 amostras de ervas vegetais

Código da amostra	Planta, parte da planta (nome científico)	EBDC (mg kg⁻¹)	CS₂ (mg kg⁻¹)	ETU
50/20	Alcachofra, folha (<i>Cynara scolymus</i>)	nd	-	nd
54/20	Alcachofra, folha (<i>Cynara scolymus</i>)	0,22	0,13	nd
88/20	Alcachofra, folha (<i>Cynara scolymus</i>)	0,02	0,01	nd
93/20	Alcachofra, folha (<i>Cynara scolymus</i>)	nd	-	nd
19/22	Alcachofra, folha (<i>Cynara scolymus</i>)	nd	-	nd
24/23	Alcachofra, folha (<i>Cynara scolymus</i>)	nd	-	não analisado
25/23	Alcachofra, folha (<i>Cynara scolymus</i>)	nd	-	não analisado
23/23	Alcachofra, folha (<i>Cynara scolymus</i>)	0,003	0,001	não analisado
49/20	Amora, folha (<i>Morus nigra</i>)	nd	-	nd
61/18	Amora, folha (<i>Morus nigra</i>)	nd	-	nd
11/19	Angélica, folha (<i>Angelica officinalis</i> L.)	nd	-	nd

Código da amostra	Planta, parte da planta (nome científico)	EBDC (mg kg⁻¹)	CS₂ (mg kg⁻¹)	ETU
84/20	Angélica, folha (<i>Angelica officinalis</i> L.)	nd	-	nd
83/20	Arnica, caule e folha (<i>Arnica montana</i>)	0,02	0,01	nd
91/20	Arnica, caule e folha (<i>Arnica montana</i>)	0,02	0,01	nd
26/23	Arnica, caule e folha (<i>Arnica montana</i>)	0,010	0,01	não analisado
74/20	Arnica-do-mato, folha (<i>Solidago microglossa</i>)	nd	-	nd
92/20	Assa-peixe, folha (<i>Vernonia polysphaera</i>)	nd	-	nd
51/20	Barbatimão, caule (<i>Stryphnodedron barbatiman</i>)	nd	-	nd
12/22	Boldo do Chile, folha (<i>Boldus boldus</i>)	nd	-	nd
57/20	Boldo do Chile, folha (<i>Boldus boldus</i>)	nd	-	nd
59/20	Boldo do Chile, folha (<i>Boldus boldus</i>)	nd	-	nd
82/20	Boldo do Chile, folha (<i>Peumus boldus</i>)	nd	-	nd
95/20	Boldo do Chile e, folha (<i>Peumus boldus</i>)	nd	-	nd

Código da amostra	Planta, parte da planta (nome científico)	EBDC (mg kg⁻¹)	CS₂ (mg kg⁻¹)	ETU
17/22	Boldo do Chile, folha (<i>Boldus boldus</i>)	nd	-	nd
23/22	Boldo do Chile, folha (<i>Boldus boldus</i>)	nd	-	nd
52/20	Camomila, flor (<i>Matricaria recutita</i>)	nd	-	nd
64/20	Camomila, flor (<i>Matricaria chamomilla</i>)	nd	-	nd
80/20	Camomila flor, folha e caule (<i>Matricaria recutita</i>)	0,06	0,03	nd
99/20	Camomila, flor e parte aérea (<i>Matricaria chamomilla</i>)	nd	-	nd
17/23	Camomila, flor e parte aérea (<i>Matricaria chamomilla</i>)	0,14	0,08	não analisado
18/23	Camomila, flor e parte aérea (<i>Matricaria chamomilla</i>)	0,008	0,004	não analisado
20/22	Camomila, flor e parte aérea (<i>Matricaria chamomilla</i>)	nd	-	nd
14/22	Camomila, flor e parte aérea (<i>Matricaria chamomilla</i>)	nd	-	nd
30/23	Camomila, flor e parte aérea	nd	-	não analisado

Código da amostra	Planta, parte da planta (nome científico)	EBDC (mg kg⁻¹)	CS₂ (mg kg⁻¹)	ETU
	<i>(Matricaria chamomilla)</i>			
102/20	Canela de velho, folha (<i>Miconia albicans</i>)	nd	-	nd
78/20	Canela de velho, folha (<i>Miconia albicans</i>)	nd	-	nd
48/20	Carqueja, folha (<i>Baccharis trimera</i>)	nd	-	nd
68/20	Cáscara sagrada, casca (<i>Rhamnus purshiana</i>)	nd	-	nd
25/22	Cáscara sagrada, casca (<i>Rhamnus purshiana</i>)	nd	-	nd
58/18	Castanha da Índia, semente (<i>Aesculus hippocastanum</i>)	nd	-	nd
104/20	Cavalinha	nd	-	nd
60/20	Cavalinha, folha (<i>Equisetum</i>)	0,02	0,01	nd
70/20	Cavalinha, folha (<i>Equisetum hyemale</i>)	nd	-	nd
89/20	Cavalinha, parte aérea (<i>Equitesum arvense</i>)	0,09	0,05	nd
19/23	Cavalinha, folha (<i>Equitesum arvense</i>)	nd	-	não analisado
20/23	Cavalinha, folha (<i>Equitesum arvense</i>)	nd	-	não analisado

Código da amostra	Planta, parte da planta (nome científico)	EBDC (mg kg⁻¹)	CS₂ (mg kg⁻¹)	ETU
87/20	Centella asiática, folha (<i>Hydrocotyle asiatica</i>)	0,35	0,20	nd
62/18	Centella asiática, folha (<i>Hydrocotyle asiatica</i>)	nd	-	nd
55/20	Chá verde, folha (<i>Camelia sinensis</i>)	nd	-	nd
63/20	Chá verde, folha (<i>Camelia sinensis</i>)	nd	0,01	nd
90/20	Chá verde, folha (<i>Camelia sinensis</i>)	0,02	0,01	nd
94/20	Chá verde, folha e talo (<i>Camelia sinensis</i>)	0,03	0,02	nd
22/23	Chá verde, folha (<i>Camelia sinensis</i>)	0,0027	0,001	não analisado
27/23	Chá verde, folha (<i>Camelia sinensis</i>)	0,009	0,01	não analisado
29/23	Chá verde + laranja amarga, folha + casca (<i>Camelia sinensis</i> e <i>Citrus aurantium</i>)	0,012	0,01	não analisado
47/20	Chapéu de couro, folha (<i>Echinodorus macrophyllus</i>)	nd	-	nd
85/20	Chapéu de couro, folha e caule (<i>Echinodorus macrophyllus</i>)	nd	-	nd
60/18	Chapéu de couro, folha (<i>Echinodorus macrophyllus</i>)	nd	-	nd

Código da amostra	Planta, parte da planta (nome científico)	EBDC (mg kg⁻¹)	CS₂ (mg kg⁻¹)	ETU
98/20	Clorela, alga (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)	nd	-	nd
275/18	Clorela, alga (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)	nd	-	nd
13/19	Confrei, folha (<i>Symphytum officinale</i>)	nd	-	nd
56/20	Espinheira santa, folha (<i>Maytenus ilicifolia</i>)	nd	-	nd
76/20	Espinheira santa, folha (<i>Maytenus ilicifolia</i>)	nd	-	nd
22/22	Espinheira santa, folha (<i>Maytenus ilicifolia</i>)	nd	-	nd
12/19	Fucus, folha (<i>Fucus vesiculosus</i>)	nd	-	nd
75/20	Fucus, folha (<i>Fucus vesiculosus</i>)	nd	-	nd
71/20	Ginkgo biloba, folha (<i>Ginkgo biloba</i>)	0,07	0,04	nd
02/21-	Ginkgo biloba, folha (<i>Ginkgo biloba</i>)	0,04	0,02	nd
21/23	Ginkgo biloba, folha (<i>Ginkgo biloba</i>)	0,02	0,01	não analisado
28/23	Ginkgo biloba, folha (<i>Ginkgo biloba</i>)	1,05	0,59	não analisado

Código da amostra	Planta, parte da planta (nome científico)	EBDC (mg kg⁻¹)	CS₂ (mg kg⁻¹)	ETU
61/20	Guaraná, semente (<i>Paullinia cupana</i>)	nd	-	nd
97/20	Guaraná, semente (<i>Paullinia cupana</i>)	nd	-	nd
274/18	Guaraná, semente (<i>Paullinia cupana</i>)	nd	-	nd
72/20	Hibisco, flor (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>)	nd	-	nd
77/20	Hibisco, flor (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	nd	-	nd
58/20	Maca peruana, raiz (<i>Lepidium meyenii</i>)	nd	-	nd
57/18	Marapuama, casca (<i>Ptychopetalum olacoides</i>)	nd	-	nd
79/20	Marapuama, casca (<i>Ptychopetalum olacoides</i>)	nd	-	nd
59/18	Moringa (orgânica), folha (<i>Moringa oleifera</i>)	nd	-	nd
67/20	Mulungu, casca (<i>Erythrina velutina</i>)	0,02	0,01	nd
106/20	Mulungu, casca (<i>Erythrina velutina</i>)	não analisado	-	nd
100/20	Maracujá, folha e caule (<i>Passiflora incarnata</i>)	nd	-	nd

Código da amostra	Planta, parte da planta (nome científico)	EBDC (mg kg⁻¹)	CS₂ (mg kg⁻¹)	ETU
05/19	Maracujá, folha (<i>Passiflora alata</i>)	nd	-	nd
14/19	Pedra ume, folha (<i>Myrcia multiflora</i>)	nd	-	nd
101/20	Sene, folha (<i>Senna alexandrina</i>)	nd	-	nd
46/20	Sene, folha (<i>Cassia angustifolia</i>)	nd	-	nd
62/20	Sene, folha (<i>Cassia angustifolia</i>)	nd	-	nd
65/20	Sene, folha (<i>Cassia angustifolia</i>)	0,03	0,02	nd
96/20	Sene, folha (<i>Cassia angustifolia</i>)	nd	-	nd
24/22	Sene, folha (<i>Cassia angustifolia</i>)	nd	-	nd
26/22	Sene, folha (<i>Senna alexandrina</i>)	nd	-	nd
28/22	Sene, folha (<i>Cassia angustifolia</i>)	nd	-	nd
21/22	Sene, folha (<i>Cassia angustifolia</i>)	nd	-	nd
13/22	Sene, folha (<i>Senna alexandrina</i>)	nd	-	nd
105/20	Espirulina, alga (<i>Spirulina plantesis</i>)	nd	-	nd

Código da amostra	Planta, parte da planta (nome científico)	EBDC (mg kg⁻¹)	CS₂ (mg kg⁻¹)	ETU
276/18	Espirulina, alga (<i>Spirulina plantesis</i>)	nd	-	nd
108/20	Tribulus terrestres, extrato seco do fruto (<i>Tribulus terrestris</i>)	nd	-	nd
18/22	Unha-de-gato, casca (<i>Uncaria tomentosa</i>)	nd	-	nd
11/22	Unha-de-gato, casca (<i>Uncaria tomentosa</i>)	nd	-	nd
273/18	Unha-de-gato, casca (<i>Uncaria tomentosa</i>)	nd	-	nd
107/20	Unha-de-gato, casca (<i>Uncaria tomentosa</i>)	nd	-	nd
45/20	Unha-de-gato, folha (<i>Uncaria tomentosa</i>)	nd	-	nd
73/20	Unha-de-gato, casca (<i>Uncaria tomentosa</i>)	nd	-	nd

nd: não detectado.