

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DE QUALIDADE DE  
PRODUTOS E SERVIÇOS VINCULADOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA.  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE  
AGROTÓXICOS EM MAÇÃS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM  
DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

Adherlene Vieira Gouvêa

Rio de Janeiro  
2011

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE  
AGROTÓXICOS EM MAÇÃS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM  
DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

Adherlene Vieira Gouvêa

Curso de Especialização em Controle da  
Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços  
Vinculados à Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade  
em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientadoras: Lucia Helena Pinto Bastos

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso

Rio de Janeiro

2011

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE  
AGROTÓXICOS EM MAÇÃS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM  
DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

Adherlene Vieira Gouvêa

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado em 17 / 01 / 2011.

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

André Luiz Mazzei Albert (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Msc. \_\_\_\_\_

Sérgio Alves da Silva (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Msc. \_\_\_\_\_

André Victor Sartori (INCQS/FIOCRUZ)

Orientadoras:

Prof<sup>a</sup>. Msc. \_\_\_\_\_

Lucia Helena Pinto Bastos

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso

Gouvêa, Adherlene Vieira

Validação de metodologia de análise de resíduos de agrotóxicos em maçãs por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas sequencial / Adherlene Vieira Gouvêa. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011.

xiii, 74 p., il., tab.

Trabalho de conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.

Orientadoras: Lucia Helena Pinto Bastos e Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso.

1. Agrotóxicos. 2. LC-MS/MS. I. Título

A pessoa mais importante da minha vida,  
que deu sentido a minha existência.

Fabio

“É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ...”

(Martin Luther King)

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por todos os ensinamentos.

Aos meus pais, Adherbal e Marlene, por todo amor, carinho e dedicação.

Aos meus irmãos, Ernani e Everardo, pelo exemplo de vida.

Ao meu esposo, Fabio, por toda a paciência, apoio, dedicação, carinho e amor.

À minha sogra, Marilda, por toda a atenção, dedicação e carinho em todos os momentos.

À tia, Dalila, por todos os ensinamentos, carinho e alegria.

Ao meu sogro, Jorge, por todos os ensinamentos de vida.

Aos meus cunhados, Daiana e Igor, pela amizade e pelos melhores momentos de alegria.

Aos avós, Neyde e Carlos, pela presença na minha vida, por todo o carinho e amizade.

À minha orientadora, Lucia, pelas horas de dedicação, aprendizado, paciência, carinho, amizade e principalmente pela confiança em mim depositada por todos esses sete anos de convivência.

À minha orientadora, Helena, pelos ensinamentos, orientação, apoio, paciência, dedicação, atenção e amizade.

Ao meu eterno professor, Armi, pela credibilidade e confiança depositada desde o início da minha vida profissional.

À minha amiga, Ana Paula, que nunca desistiu de acreditar em mim.

À minha amiga, Denise, que mesmo distante sempre esteve ao meu lado.

A toda equipe do laboratório de resíduos de agrotóxicos do INCQS, do passado e do presente, que compartilharam de dificuldades e alegrias durante essa jornada.

A toda equipe do laboratório de micotoxinas do INCQS que estão sempre juntos na luta, nos momentos mais difíceis.

A toda equipe do laboratório de resíduos de contaminantes orgânicos do INCQS, do passado e do presente, que compartilharam os melhores momentos de descontração.

A toda a turma da especialização, alunos e professores, que compartilharam o aprendizado e crescimento.

À minha nova amiga, Hilda, que conquistou toda a minha admiração.

Ao Alexandre pela ajuda na biblioteca sempre com atenção e carinho.

À Sinéa pela compreensão, orientação, paciência, dedicação e amizade.

À Kátia e Cida, pessoas fundamentais no processo de aprendizagem.

A todos que direta ou indiretamente estiveram presentes nesse momento da minha vida.



## RESUMO

O uso dos agrotóxicos para controle de pragas na produção agropecuária é cada vez mais intenso assim como o grande número de ingredientes ativos permitidos ao uso no Brasil e no mundo. Para cada agrotóxico é estabelecido o LMR vinculado ao uso das boas práticas agrícolas, no entanto, monitoramentos feitos pela ANVISA demonstram irregularidades quanto a esses resíduos, condição essa, que pode trazer riscos aos consumidores desses alimentos. A exposição da população à presença dessas substâncias nos alimentos é avaliada quanto à toxicidade crônica pela IDA, mensurada através dos resíduos nos alimentos e o seu consumo. A maçã é uma das frutas mais cultivadas do mundo e de grande consumo, principalmente por crianças e idosos. Avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos nessa fruta torna-se importante na avaliação do risco dessa população. As metodologias desenvolvidas para essa aplicação são as multirresiduais onde uma única análise é capaz de quantificar um grande número de substâncias. Dentre as técnicas analíticas recentes mais adequadas a esse tipo de aplicação está a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas/massas, pois é capaz de fornecer informações quantitativas da presença desses resíduos e características inequívocas de identificação dessas substâncias. Dentro desse contexto o presente trabalho foi o desenvolvimento, otimização de análise e validação de sete agrotóxicos (famoxadona, etrinfós, clorpirifós, clorpirifós metil, azinfós metil, dimetoato e fosmete) pela metodologia mini-Luke modificada com a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas/massas. Os parâmetros instrumentais foram otimizados e demonstraram ser adequados à implementação da técnica. Na validação foram estudados: a seletividade, linearidade da curva analítica, a exatidão, a repetitividade os limites de detecção e quantificação. Os resultados encontrados demonstraram a adequação da metodologia proposta e as etapas desenvolvidas representam um modelo a ser implementado no laboratório para desenvolvimento da metodologia proposta para cerca de duzentos agrotóxicos em diferentes matrizes de alimentos. O presente estudo foi o marco inicial para a utilização do equipamento LC-MS/MS adquirido pelo laboratório de resíduos de agrotóxicos do INCQS/FIOCRUZ em agosto de 2009.

## ABSTRACT

The use of pesticides to control pests in agricultural production has increased in the same way of large number of active ingredients allowed in Brazil and worldwide. For each pesticide MRL was established to the use of GFP. However, monitoring made by ANVISA show irregularities, a condition that can pose risks to consumers. The population's exposure to these substances present in foods is evaluated by IDA, for chronic toxicity, measured through residues in food and its consumption. Apple fruit is one of the most cultivated in the world and widely consumed, especially by children and elderly people. The methodologies developed for this application the multiresidue analysis is able to quantify large number of substances. Recent analytical techniques for this application is liquid chromatography mass/mass spectrometry, because it can provide quantitative information and identification about the residues of those substances. The present study was the development, validation and optimization analysis of seven pesticides (famoxadone, etrinfos, chlorpyrifos, chlorpyrifos methyl, azinphos methyl, dimethoate and phosmet) by methodology mini-Luke modified with liquid chromatography coupled to mass/mass spectrometry. Instrumental parameters were optimized and shown be adequate to implement the technique. In the validation study were evaluated: selectivity, linearity of calibration curve, accuracy, and repeatability. The results demonstrated the methodology was developed and represent a model to be implemented for about two hundred different pesticides in food matrices. The present study was the template for LC-MS/MS equipment acquired in the laboratory pesticide residues located in INCQS / FIOCRUZ in August 2009.

## LISTA DE SIGLAS

ANOVA – Análise de variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
API – Atmospheric pressure ionization  
C – Teste de Cochran  
CID – Collision induced fragmentation  
CLUE – Cromatografia líquida de ultra eficiência  
DL<sub>50</sub> – Dose letal capaz de matar 50% da população teste  
ESI – Electrospray ionization  
FDA – U.S. Food and Drug Administration  
FE – Fases estacionárias  
IA – Ingredientes ativos  
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis  
IDA – Ingestão diária aceitável  
LC – Liquid chromatography  
LC/MS – Liquid chromatography/ Mass Spectrometry  
LD – Limite de detecção  
LMR – Limite máximo de resíduo permitido  
LQ – Limite de quantificação  
m/z – Razão massa/carga  
MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MMQO – Método dos mínimos quadrados ordinários  
MRM – Multiple reaction monitoring  
MS – Ministério da Saúde  
NA – Agrotóxicos não autorizados  
PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos  
r – Coeficiente de Pearson  
R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação  
S/R – Relação sinal-ruído  
Tandem MS-MS/MS-(MS<sup>n</sup>) – espectrometria de massas sequencial  
TIC – Total ion chromatogram  
VWA – Food and Consumer Product Safety Authority

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos. ....	3
Tabela 2 - Classificação dos agrotóxicos selecionados para o estudo. ....	20
Tabela 3 - Características dos agrotóxicos selecionados para o estudo.....	21
Tabela 4 - Parâmetros para o estudo dos agrotóxicos selecionados.....	22
Tabela 5 - Padrões dos agrotóxicos selecionados para o estudo.....	24
Tabela 6 – Reagentes utilizados no estudo. ....	24
Tabela 7 - Concentração das soluções estoque e intermediárias 1, 2 e 3 dos agrotóxicos selecionados para o estudo. ....	25
Tabela 8 - Concentração das soluções intermediárias de 4 a 13 dos agrotóxicos selecionados para o estudo.....	26
Tabela 9 - Concentração das soluções intermediárias de 14 a 24 dos agrotóxicos selecionados para o estudo. ....	26
Tabela 10 - Condições operacionais do espectrômetro de massas/massas Quattro Premier XE™.....	27
Tabela 11 - Condições operacionais do cromatógrafo líquido Acquity UPLC™. ....	27
Tabela 12 – Outros equipamentos utilizados no estudo.....	27
Tabela 13 – Fortificação das amostras branco da polpa de maçã com os agrotóxicos selecionados para o estudo. ....	32
Tabela 14 - Condições analíticas de detecção e quantificação dos agrotóxicos selecionados para o estudo.....	35
Tabela 15 - Condições analíticas de identificação dos agrotóxicos selecionados para o estudo. ....	35
Tabela 16 – Condições analíticas de separação cromatográfica dos agrotóxicos selecionados para o estudo.....	37
Tabela 17 - Avaliação das curvas analíticas dos agrotóxicos selecionados para o estudo.....	40
Tabela 18 - Resultados dos estudos de precisão, exatidão, LD e LQ dos agrotóxicos selecionados para o estudo. ....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Percentual de amostras de maçã com resultados insatisfatórios no monitoramento do PARA no período de 2001 a 2009.....	6
Figura 2 - Fluxograma da metodologia mini-Luke. ....	8
Figura 3 - Representação geral do funcionamento de um espectrômetro de massas com fonte de ionização API. ....	11
Figura 4 - Representação geral da ionização por ESI <sup>+</sup> . ....	12
Figura 5 - Representação geral do funcionamento do quadrupolo.....	13
Figura 6 - Representação geral da espectrometria de massas sequencial com MRM.....	14
Figura 7 – Fluxograma da metodologia mini-Luke modificada. ....	30
Figura 8 – TIC da separação cromatográfica otimizada para os agrotóxicos selecionados para o estudo.....	37
Figura 9 – Método MRM desenvolvido e otimizado para os agrotóxicos do estudo. ....	38
Figura 10 – Representações gráficas das curvas analíticas dos agrotóxicos selecionados para o estudo.....	41
Figura 11 – Branco da polpa de maçã obtido na avaliação da seletividade da metodologia.....	42

## SUMÁRIO

1 – Introdução .....	1
1.1 – Classificação dos Agrotóxicos .....	1
1.2 – Toxicologia dos Agrotóxicos .....	2
1.2.1 – Toxicidade Aguda .....	3
1.2.2 – Toxicidade Crônica .....	3
1.3 – Legislação .....	3
1.4 – Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos .....	4
1.4.1 – Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Maçãs .....	5
1.5 – Metodologias de Análise .....	6
1.5.1 – Técnicas Analíticas .....	9
1.5.1.1 – Cromatografia Líquida (“Liquid Chromatography – LC”) e Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (“Liquid Chromatography/Mass Spectrometry – LC/MS”) .....	10
1.6 – Validação de metodologia .....	14
1.6.1 – Seletividade .....	14
1.6.2 – Faixa de Trabalho, Linearidade e Faixa Linear .....	15
1.6.3 – Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	16
1.6.4 – Exatidão – Recuperação .....	17
1.6.5 – Precisão – Repetitividade .....	17
1.7 – Parâmetros de Identificação e/ou Confirmação .....	18
1.8 – Justificativa do trabalho .....	20
2 – Objetivos .....	23
2.1 – Objetivo Geral .....	23
2.2 – Objetivos Específicos .....	23
3 – Materiais e Métodos .....	24
3.1 – Padrões de Agrotóxicos .....	24
3.2 – Reagentes e Soluções .....	24
3.3 – Instrumentação .....	26
3.4 – Gases .....	28
3.5 – Etapas do Trabalho .....	28
4 – Resultados e Discussão .....	34
4.1 – Seleção e otimização das transições dos íons .....	34

4.2 – Avaliação das curvas analíticas .....	40
4.3 – Seletividade do método .....	42
4.4 – Exatidão – tendência como recuperação e Precisão - Repetitividade.....	42
4.5 – Limites de detecção e quantificação .....	43
5 – Conclusão .....	44
Referências .....	45
Anexo 1 – Espectros de massas obtidos dos agrotóxicos avaliados no estudo com duas diferentes energias de colisão.	
Anexo 2 – Cromatogramas dos íons fragmentos selecionados como quantificador, qualificador e identificador para cada substância do estudo.	
Anexo 3 – Cromatogramas dos íons fragmentos para a avaliação do limite de quantificação para os agrotóxicos avaliados no estudo.	

## **1 – Introdução**

A agricultura brasileira tem se destacado com números cada vez mais expressivos, na produção, em área plantada, na exportação e na quantidade de tecnologias empregadas no campo (ANVISA, 2006). A utilização de agrotóxicos na agricultura tem um forte impacto socioeconômico, pois gera custos e benefícios à sociedade, afetando de forma diferente todos os atores sociais envolvidos (indústria química, trabalhadores, produtores rurais e consumidores) (VEIGA, 2007).

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo com um consumo de 700 mil toneladas gerando uma receita de US\$ 7 bilhões (ANVISA, 2009).

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

### **1.1 – Classificação dos Agrotóxicos**

Os agrotóxicos são classificados quanto ao tipo de praga ou erva daninha que controlam como: inseticidas, fungicidas, herbicidas, fumigantes, rodenticidas e/ou raticidas, moluscocidas, nematocidas, acaricidas, desfolhantes entre outras. O consumo no meio rural decresce da seguinte ordem, em relação aos mais utilizados: herbicidas > inseticidas > fungicidas (OLIVEIRA-SILVA et al, 2001).

Outra classificação se refere à composição química de cada agrotóxico que é bem diferenciada podendo ser agrupadas em quatro categorias principais: os organoclorados, os piretróides, os organofosforados e os carbamatos. Os agrotóxicos também podem ser divididos quanto ao modo de ação entre sistêmicos e de contato. Os sistêmicos quando aplicados circulam



através da seiva por todos os tecidos vegetais se distribuindo uniformemente e ampliando o tempo de ação. Os de contato agem externamente, no entanto, em boa parte são absorvidos penetrando no interior da planta através de suas porosidades (ANVISA, 2008).

## **1.2 – Toxicologia dos Agrotóxicos**

A toxicologia é o estudo dos efeitos tóxicos de substâncias como os agrotóxicos sobre os seres vivos (JARDIM, ANDRADE, QUEIROZ, 2009). A grande e crescente utilização dessas substâncias tem gerado uma série de preocupações no que se refere à contaminação dos alimentos e aos danos causados à saúde. Estudos têm detectado a presença de agrotóxicos em amostras de sangue humano, no leite materno e resíduos destes, presentes em alimentos consumidos pela população em geral (SIQUEIRA, KRUSE, 2008).

Resíduo é definido como substância ou mistura de substâncias remanescente ou existente em alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive, quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas, consideradas toxicológica e ambientalmente importantes (BRASIL, 2002).

É estabelecido também, para cada agrotóxico, o limite máximo de resíduo permitido – LMR, que corresponde a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim, oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes (em peso) do agrotóxico, afim ou seus resíduos por milhão de partes de alimento (em peso) (ppm ou mg/kg) (BRASIL, 2002).

Na literatura mundial, os agrotóxicos têm sido relacionados a diversos efeitos tóxicos à saúde. De acordo com a classe química à que pertencem e o tipo de exposição, os agrotóxicos podem causar desde dermatites até alguns tipos de cânceres (PERES, MOREIRA, 2007). Dentre outros principais efeitos tóxicos destacam-se a teratogenicidade, a desregulação endócrina, a neurotoxicidade, os efeitos adversos na reprodução humana e no sistema imunológico (KARABELAS et al, 2009).

### 1.2.1 – Toxicidade Aguda

Os agrotóxicos também são classificados, de acordo com a toxicidade aguda, em quatro classes toxicológicas, definidas principalmente pela dose letal capaz de matar 50% da população teste - DL<sub>50</sub> dos produtos formulados, que indicam o quanto determinado produto pode ser tóxico ao homem. A identificação é feita através de faixas coloridas impressas no rótulo das embalagens como definido na Tabela 1:

Tabela 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos.

<b>Classe</b>	<b>Toxicidade</b>	<b>Cor no Rótulo</b>
Classe I	extremamente tóxico	faixa vermelha
Classe II	altamente tóxico	faixa amarela
Classe III	medianamente tóxico	faixa azul
Classe IV	pouco ou muito pouco tóxico	faixa verde

(Fonte: STOPPELLI, MAGALHÃES, 2005).

### 1.2.2 – Toxicidade Crônica

A toxicidade crônica é expressa pela Ingestão Diária Aceitável - IDA. A IDA é definida como a quantidade diária segura para consumo que se pode ingerir por dia, durante toda a vida, sem que se sofra danos à saúde por essa ingestão. Essa quantidade máxima ingerida é calculada para cada agrotóxico considerando-se a massa corpórea de um indivíduo adulto com 60 Kg, no caso das crianças esse valor é superestimado.

As crianças são particularmente vulneráveis à exposição a agentes químicos presentes nos ambientes, por suas características fisiológicas. A probabilidade é maior de absorção já que ingerem maior quantidade de água e alimentos por unidade de peso corpóreo (MELLO-DA-SILVA, FRUCHTENGARTEN, 2005).

### 1.3 – Legislação

A Lei de Agrotóxicos e Afins nº 7.802, de 11 de julho de 1989, estabelece que os agrotóxicos somente podem ser utilizados no país se forem registrados em órgão federal competente, de acordo com as diretrizes e

exigências dos órgãos responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura (ANVISA, 2010). Os três órgãos envolvidos no registro de agrotóxicos: Ministério da Saúde – MS, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA e Ministério do Meio Ambiente, através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA têm suas competências estabelecidas no Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002 que regulamentou a lei de agrotóxicos. Dentre outras competências a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA na representação do MS é a responsável pela avaliação e classificação toxicológica dos agrotóxicos e, junto com o MAPA, pelo monitoramento dos resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem vegetal.

#### **1.4 – Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**

Com o objetivo de avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos a ANVISA, em 2001, iniciou um programa denominado Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos – PARA. No ano de 2009 foram monitoradas 20 culturas diferentes e 234 ingredientes ativos – IA, registrados, no entanto são permitidas 431 substâncias usadas como agrotóxicos e/ou domissanitários para as diferentes culturas. Com base nos resultados desse monitoramento, os principais problemas encontrados foram:

- 1 – presença de agrotóxicos em níveis acima do LMR;
- 2 – utilização de agrotóxicos não autorizados – NA para a cultura;
- 3 – presença de agrotóxicos em níveis acima do LMR e utilização de agrotóxicos não autorizados na mesma.

O uso abusivo dos agrotóxicos em desrespeito às indicações leva à presença de resíduos nos alimentos superiores àqueles estabelecidos na legislação expondo a população a possíveis agravos à saúde. Em relação à presença de agrotóxicos não autorizados para a cultura a exposição da população que consome esses alimentos contaminados é de maior gravidade visto que não existem estudos que possibilitem estabelecer, em âmbito nacional, limites de resíduos que representem segurança aos consumidores para esses produtos. Essa problemática pode ser separada em duas situações: a primeira se refere a presença de resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura mas com o ingrediente ativo com uso permitido em outras

culturas, e a segunda se refere a presença de resíduos de agrotóxico banido do Brasil ou que nunca foram registrados no país, essa é a situação de maior gravidade em relação a saúde.

#### **1.4.1 – Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Maçãs**

A maçã é um dos tipos de frutas mais cultivadas no mundo sendo a Ásia, com 60% de área cultivada o continente de maior produção (JARDIM, ANDRADE, QUEIROZ, 2009). No Brasil a produção cresceu mais de 6.000% de aproximadamente 14.000 t em 1977/1978 para 900.000 t em 2007/2008 (FERREIRA, 2008). A fruta possui indicação de consumo para pessoas com problemas no intestino, obesidade, reumatismo dentre outras doenças. A maçã crua com casca possui vitamina C, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6, folato total, vitamina B12 e vitamina A. (UNIFESP, 2011). Para o melhor aproveitamento das vitaminas a indicação de consumo é naturalmente com casca (JARDIM, ANDRADE, QUEIROZ, 2009).

Devido a grande importância da fruta o programa PARA vem monitorando os resíduos de agrotóxicos desde o início. O histórico das irregularidades encontradas nesse monitoramento no período de 2001 a 2009 encontra-se descrito na Figura 1 onde está descrito o percentual de amostras com resultados insatisfatórios. Esses resultados representam amostras que apresentaram níveis de resíduos de agrotóxicos acima dos LMR estabelecidos pela legislação e amostras que apresentaram resíduos não autorizados para a cultura.

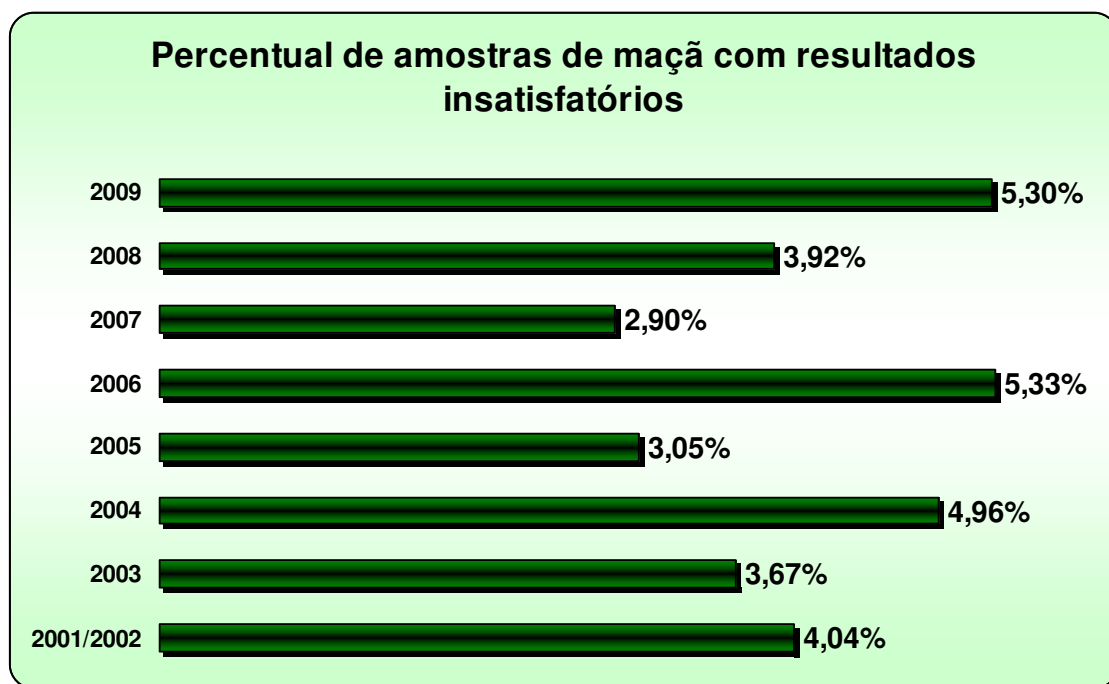


Figura 1 - Percentual de amostras de maçã com resultados insatisfatórios no monitoramento do PARA no período de 2001 a 2009.

(Fonte: ANVISA, 2008a).

Em 2008 nas amostras de maçã analisadas com resultados insatisfatórios, foi encontrada a metidationa acima do LMR e dois agrotóxicos não autorizados para o cultivo da maçã: o diclorvós e o triazofós.

Nas amostras analisadas, no período de 2009, os resultados insatisfatórios se referiam a presença de ditiocarbamatos, como CS<sub>2</sub>, e de metidationa acima do LMR. Presença de azinfós metílico, cipermetrina, fenitrotiona e lambda cialotrina também foram observadas sendo os agrotóxicos não autorizados para a maçã.

Os resultados do monitoramento ratificam a necessidade de realização da avaliação toxicológica e do estabelecimento de parâmetros de segurança relativos à utilização de agrotóxicos bem como de programas e ações de controle, cientificamente embasados e tecnicamente aplicáveis.

### 1.5 – Metodologias de Análise

As análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos são muito dispendiosas principalmente no que se refere à utilização de materiais de referência para a quantificação e identificação dessas substâncias, pois o número de agrotóxicos é elevado, correspondendo a aproximadamente

quatrocentos IA. Outro fator determinante para o custo dessa análise é a utilização de equipamentos sofisticados para atender a necessidade de resposta requerida e treinamento de técnicos especializados (SOBREIRA, ADISSI, 2003). Porém são os resultados dessas análises o referencial para se avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos que chegam à mesa do consumidor e, também, o subsídio às ações de vigilância no sentido de prevenir agravos à saúde da população pela exposição.

Considerando-se o número de agrotóxicos utilizados na prática agrícola os métodos de análise são empregados para determinação simultânea de substâncias de diferentes classes em apenas uma análise. Esses métodos são denominados “multirresíduos” (JARDIM, ANDRADE, QUEIROZ, 2009).

O primeiro método multirresíduo foi desenvolvido por Mills e colaboradores na década de 1960, nos laboratórios do “U.S. Food and Drug Administration – FDA” (MILLS et al apud PRESTES et al, 2009). O método baseia-se na extração com acetonitrila, água e partição com solventes apolares como éter de petróleo e hexano (PRESTES et al, 2009). Esse método é utilizado para a extração de compostos organoclorados de baixa polaridade em amostras não gordurosas.

Luke e colaboradores, em 1975, desenvolveram o método denominado “Luke” para agrotóxicos com características mais polares como os organofosforados (LUKE et al apud PRESTES et al, 2009). O método baseia-se na extração com acetona, partição com solventes apolares como éter de petróleo e diclorometano e com a adição de cloreto de sódio na fase aquosa. Uma modificação proposta por Krijgsman e colaboradores trocou o solvente acetona por acetato de etila e adicionou sulfato de sódio anidro, no entanto ocorre a co-extração de apolares como lipídios e ceras tornou-se necessária uma etapa posterior de limpeza do extrato utilizando cromatografia por permeação em gel (PRESTES et al, 2009). O método de extração denominado “mini- Luke”, uma miniaturização do método Luke, foi desenvolvido no Food and Consumer Product Safety Authority – VWA da Holanda. A Figura 2 representa um fluxograma dessa metodologia.

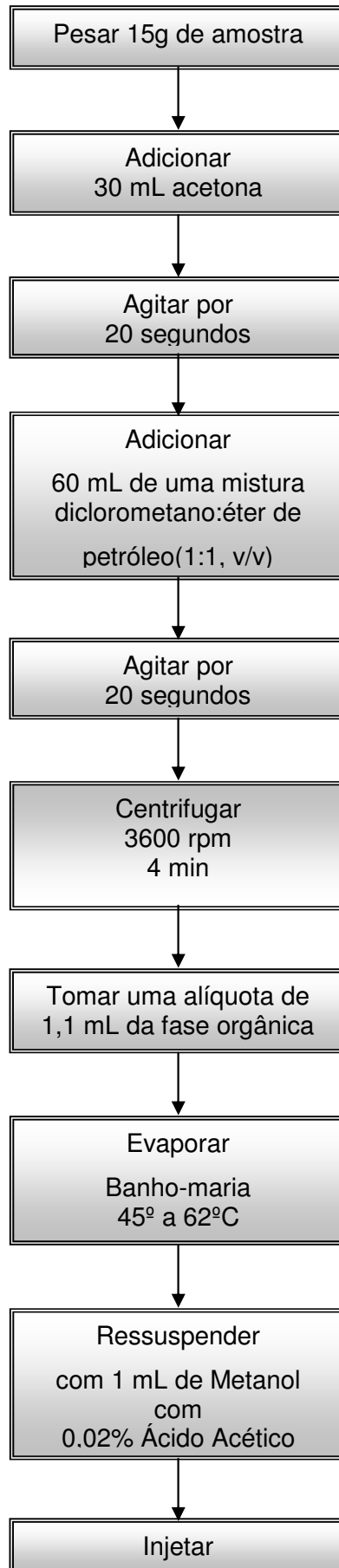


Figura 2 - Fluxograma da metodologia mini-Luke.

(Fonte: Adaptado HIEMSTRA, KOK, 2007).

Essa metodologia sofreu uma modificação, ainda no VWA, com a adição de sulfato de sódio anidro na extração com o objetivo de melhorar a recuperação de agrotóxicos com características polares como o metamidofós, ometoato, monocrotofós entre outros (PRESTES et al, 2009).

As modificações nas metodologias buscaram uma redução nas quantidades de solventes e quantidade de amostra utilizadas mantendo o propósito de uma metodologia multirresíduo. É propósito de uma metodologia a inclusão de um maior número de agrotóxicos em apenas uma análise, recuperações adequadas dos agrotóxicos próximas a 100% e remoção de interferentes da amostra.

### **1.5.1 – Técnicas Analíticas**

As técnicas cromatográficas estão entre as principais técnicas empregadas, especialmente em análises de substâncias presentes em matrizes complexas, como por exemplo, os alimentos.

Em virtude das diversas classes de agrotóxicos permitidos com diferentes características físico-químicas, várias técnicas analíticas vêm sendo desenvolvidas com uma maior velocidade de resposta e uma confiabilidade dos resultados analíticos com rastreabilidade. Os métodos cromatográficos são os mais utilizados por apresentarem alto grau de precisão e resposta. Agrotóxicos voláteis e estáveis termicamente podem ser determinados por cromatografia gasosa com detectores seletivos como por captura de elétrons, fotométrico de chama no modo fósforo-nitrogênio e seletivo de massas. No entanto, alguns agrotóxicos como exemplo das classes das carboxiamidas, quinazolininas, pirimidinas, tiazóis, carbamatos, neonicotinóides e morfolinas são não voláteis, termolábeis e polares e por isso a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é a técnica atualmente mais aplicável (STOPPELLI, MAGALHÃES, 2005).



### **1.5.1.1 – Cromatografia Líquida (“Liquid Chromatography – LC”) e Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (“Liquid Chromatography/Mass Spectrometry – LC/MS”)**

Na cromatografia líquida um solvente também denominado eluente ou fase móvel é impulsionado ou aspirado junto com a amostra por uma bomba de alta pressão para uma coluna com uma fase estacionária onde ocorre a separação das substâncias presentes na amostra introduzida. Após a separação o efluente da coluna é direcionado para um detector gerando um sinal devido à presença de analitos eluídos. Esse sinal gerado é captado por um software apropriado e tratado em um computador. O resultado final é um cromatograma que mostra a variação do sinal do detector em função do tempo de análise.

A cromatografia líquida foi definida na primeira década do século passado e desde então, muitos avanços foram alcançados e impulsionados pelo desenvolvimento contínuo de novas partículas de fases estacionárias – FE das colunas cromatográficas. O objetivo desse desenvolvimento é o aumento da seletividade, eficiência de separação, estabilidade química e mecânica. A diminuição do tamanho das partículas da FE das colunas foi a alternativa mais atrativa para a necessidade de análises mais rápidas. Recentemente com o uso de partículas menores que foi possível o desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência - CLUE que utiliza sistemas capazes de trabalhar a altas pressões (100 mPa ou 15000 psi). A vantagem de utilização de partículas menores é a manutenção da eficiência da coluna com a diminuição do comprimento. Colunas menores permitem separações mais rápidas. Outra vantagem da técnica é a economia de fase móvel e amostra (MALDANER, JARDIM, 2009).

O primeiro equipamento comercial desenvolvido com essa tecnologia foi da Waters Corporation denominado “ACQUITY™ ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY- UPLC™”.

Em cromatografia líquida o uso de detectores como o por índice de refração, por absorção no ultravioleta, por fluorescência entre outros permitem análises quantitativas dos componentes das misturas em concentrações baixas, no entanto, são detectores que apesar do avanço, fazem à identificação positiva dos picos cromatográficos com certas limitações. A solução desse

problema ocorreu com o acoplamento da cromatografia líquida e a espectrometria de massas (LANÇAS, 2009).

Nesse acoplamento as substâncias são separadas na cromatografia líquida, e o processo nos espectrômetros de massas se inicia com a ionização das moléculas seguido pela escolha e posterior detecção dos íons através das suas razões massa/carga ( $m/z$ ) (PIZZUTTI, 2006).

Na Figura 3 está ilustrado um esquema geral do funcionamento de um espectrômetro de massas com fonte de ionização à pressão atmosférica (“Atmospheric Pressure Ionization – API”).

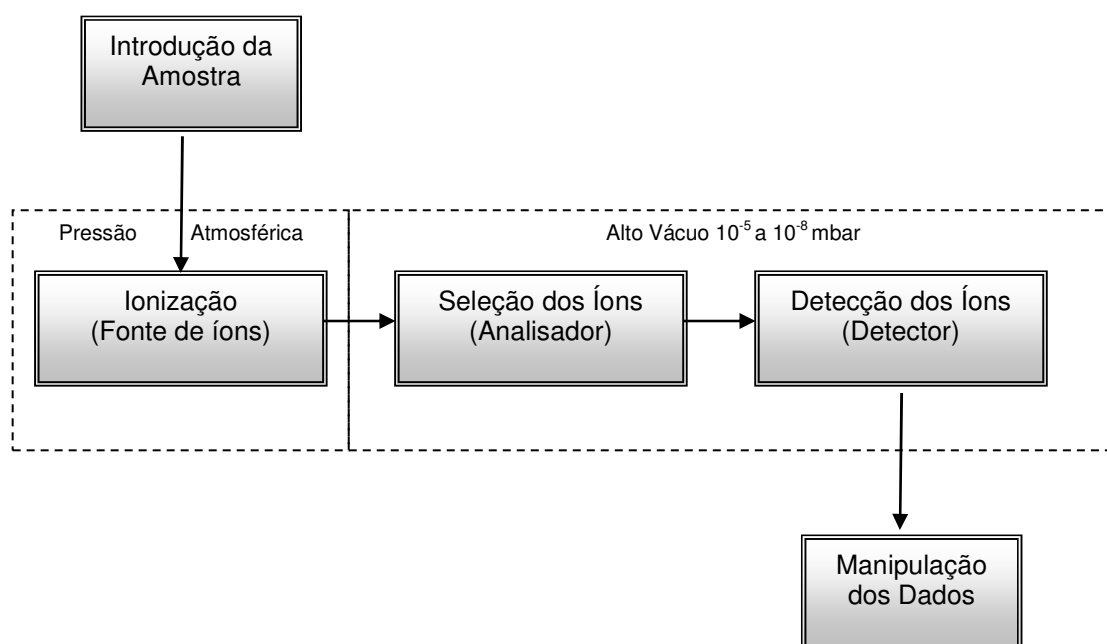


Figura 3 - Representação geral do funcionamento de um espectrômetro de massas com fonte de ionização API.

(Fonte: Adaptado de LANÇAS, 2009).

A forma de ionização mais empregada no acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas à pressão atmosférica é a “Electrospray” (“Electrospray Ionization – ESI”) (LANÇAS, 2009). Nessa forma de ionização, a amostra dissolvida na fase móvel é pressurizada em um capilar de aço inox circundado por um fluxo de gás nebulizador geralmente  $N_2$ . É aplicado uma diferença de potencial entre esse capilar e o cone de amostragem de 3000 a 5000 V sendo formado um aerossol à pressão atmosférica onde as gotículas formadas pelo solvente e pelos íons fluem para o espectrômetro de massas, ocorrendo a separação entre o solvente e os íons os

quais são atraídos para dentro do espectrômetro de massas pelo cone de amostragem.

O ESI pode ser operado no modo positivo (ESI<sup>+</sup>) ou negativo (ESI<sup>-</sup>) no modo positivo as gotículas que saem do “spray” terão carga positiva e no modo negativo carga negativa (LANÇAS, 2009).

Na Figura 4 está uma representação geral desse processo.

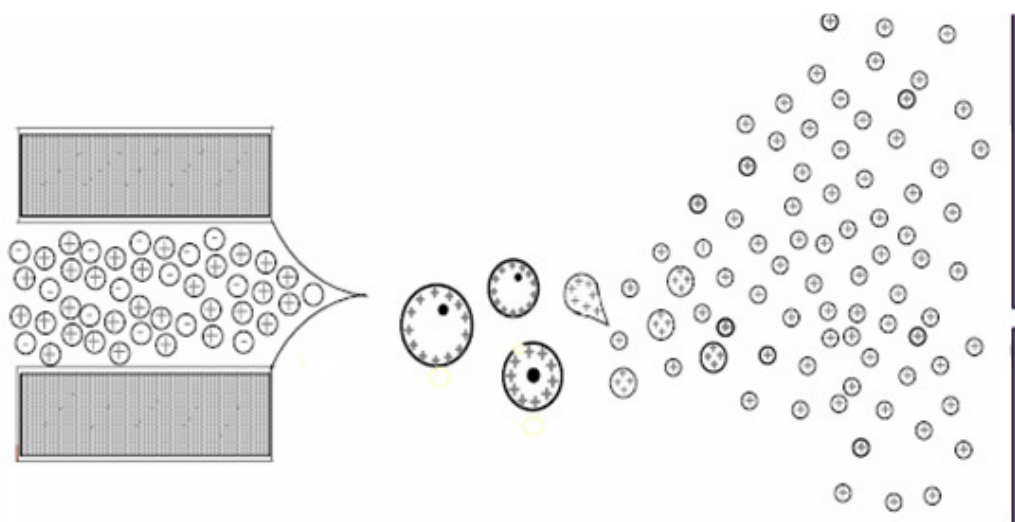


Figura 4 - Representação geral da ionização por ESI<sup>+</sup>.

(Fonte: Adaptado de IGLESIAS, 2009).

Os analisadores de massa separam os íons de acordo com a relação massa/carga ( $m/z$ ). O quadrupolo é um dos analisadores disponíveis mais comuns devido à sua simplicidade, preço baixo, linearidade de resposta, facilidade de entendimento e operação. O princípio de funcionamento do quadrupolo é baseado na aplicação de uma combinação de corrente contínua e radiofrequência. Os íons que apresentarem uma razão ( $m/z$ ) em ressonância com o campo aplicado irão passar pelas barras do quadrupolo e serão detectados. Os outros terão suas trajetórias instáveis, atingirão as barras e serão eliminados pela bomba de vácuo. Na figura 5 está uma representação geral desse processo (LANÇAS, 2009).

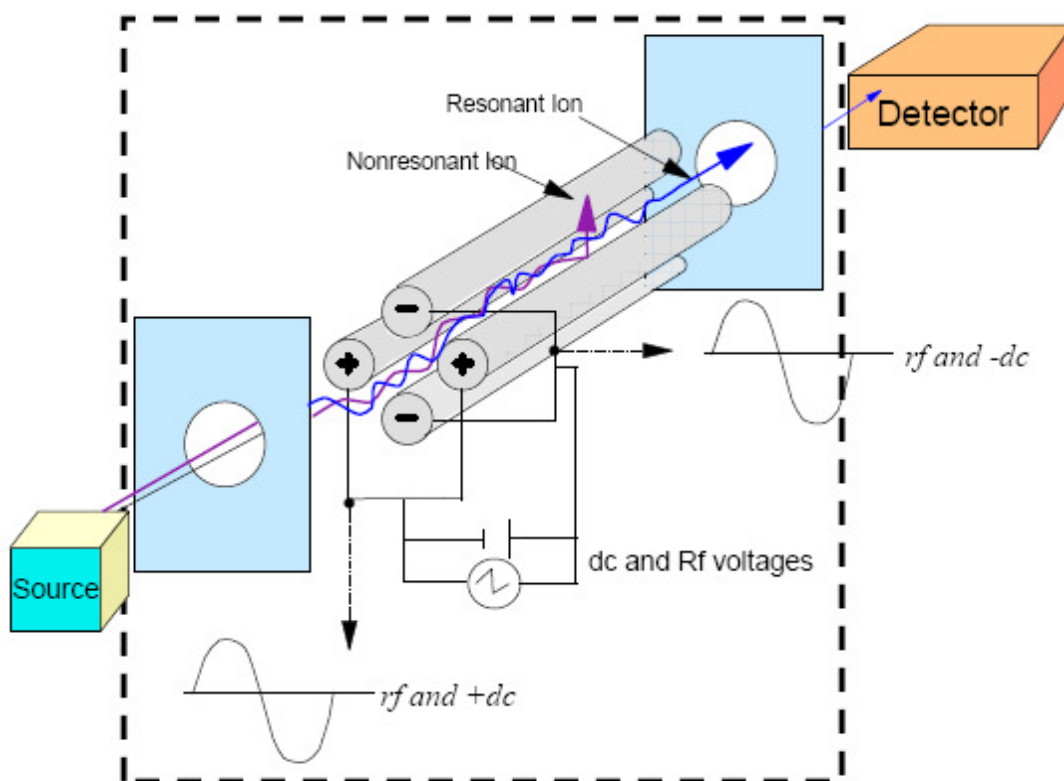


Figura 5 - Representação geral do funcionamento do quadrupolo.  
(Fonte: Adaptado de IGLESIAS, 2009).

A principal função dos detectores nos espectrômetros de massas é registrar a carga induzida ou a corrente produzida quando um íon atravessa uma superfície ou atinge uma superfície. O sinal produzido em um detector é um espectro de massas com o registro dos íons detectados em função da razão ( $m/z$ ) (LANÇAS, 2009).

O desenvolvimento e posterior aprimoramento das técnicas de cromatografia líquida e espectrometria de massas/massas representam um grande avanço da tecnologia e inovação na área da química analítica. Essa nova técnica é indicada e apropriada para a análise de resíduos de agrotóxicos devido a sua grande sensibilidade em relação às técnicas convencionais de cromatografia e de detecção, por ser também uma técnica rápida de análise com velocidades maiores de resposta e, principalmente, por fornecer a identidade das substâncias analisadas, ou seja, é também uma técnica de confirmação.

A técnica de espectrometria de massas sequencial ou “tandem MS” – “MS/MS” ou “MS<sup>n</sup>” representam um avanço no acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas. Uma das aplicações

dessa técnica envolve a formação dos íons, a seleção de um íon precursor, a fragmentação desse íon precursor por colisão (“Collision Induced Fragmentation – CID) a seleção de um ou mais íons fragmentos. Essa é a forma de análise denominada monitoramento de reações múltiplas (“Multiple Reaction Monitoring” - MRM). É uma análise de compostos alvos, onde cada um necessita de otimização de parâmetros.

Na Figura 6 é apresentada uma representação geral desse processo.

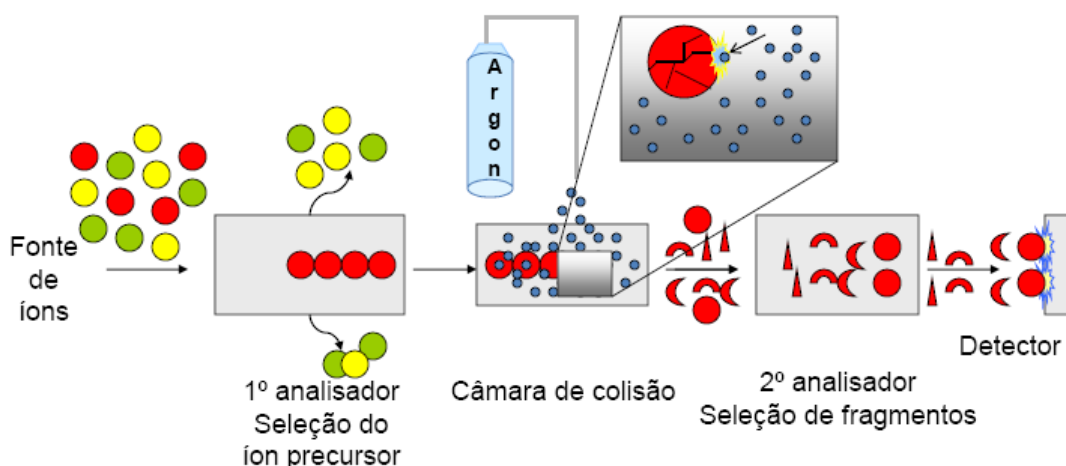


Figura 6 - Representação geral da espectrometria de massas sequencial com MRM.

(Fonte: Adaptado de IGLESIAS, 2009).

## 1.6 – Validação de metodologia

Validar é comprovar através do fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido serão atendidos (INMETRO, 2003). A validação de métodos compreende confirmar que os mesmos são adequados para o uso pretendido. Essa validação inclui métodos não normalizados, criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliações e modificações de métodos normalizados (INMETRO, 2010).

### 1.6.1 – Seletividade

A seletividade é a avaliação de compostos na matriz da amostra que podem interferir no desempenho da medição do analito de interesse. Essa interferência pode ser medida através da diminuição ou aumento do sinal

produzido pelo analito de interesse, podendo ser dependente da concentração. Os experimentos de avaliação de seletividade incluem ensaios com padrões ou materiais de referência e ensaios com amostras com e sem o analito de interesse (INMETRO, 2010).

A seletividade do método deve ser assegurada para não comprometer os outros parâmetros da validação a serem avaliados. O objetivo dessa etapa é verificar se os analitos de interesse do estudo estão presentes na amostra, a amostra isenta dos analitos de interesse é considerada adequada para utilização no processo de validação da metodologia.

### **1.6.2 – Faixa de Trabalho, Linearidade e Faixa Linear**

De acordo com o trabalho a ser desenvolvido uma faixa de concentração do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado deve ser definido sendo denominada faixa de trabalho. Essa faixa deve cobrir os níveis de concentração aos quais o ensaio será aplicado. Para um ensaio multirresíduos como no caso dos agrotóxicos, o valor mínimo da faixa de trabalho deve abranger no mínimo o menor LMR permitido para o grupo de substâncias estudadas e o valor máximo deve estar contemplado dentro da faixa de trabalho.

Para a quantificação do analito na amostra é necessário que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame (RIBANI et al, 2004). A linearidade é formulada como uma expressão matemática e determinada através das chamadas curvas analíticas pelo método dos mínimos quadrados ordinários – MMQO. Essa expressão é usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinada na amostra real e expressa como uma equação de regressão linear da curva analítica:

$$y = a + bx \text{ (Equação 1)}$$

onde:

$y$  = resposta medida (absorbância, altura do pico, área do pico, etc) variável dependente estimada pela equação de regressão linear;

$x$  = concentração conhecida do analito;

$a$  = estimativa da interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ ;

b = estimativa da inclinação da curva analítica (CARDOSO, 2008).

A correlação entre os valores numéricos de x e de y é representada pelo coeficiente de Pearson - r. 'R<sup>2</sup>' é o quadrado desse coeficiente e denominado de coeficiente de determinação. Esses coeficientes indicam o grau de ajuste dos dados à curva.

Os erros associados às medições devem ser avaliados no MMQO avaliando-se os resíduos decorrentes das medições. A homocedasticidade, isto é, a homogeneidade da variância dos resíduos pode ser determinada pelo teste de Cochran - C. Quando o C<sub>CALCULADO</sub> < C<sub>TABELADO</sub> (k níveis; n replicatas e α nível de significância) existe homogeneidade na variância dos resíduos da equação de regressão linear da curva analítica. A significância da regressão linear da curva analítica pode ser calculada pela realização da análise de variância - ANOVA teste F. Quando valor-p ≤ 0,05 existe relação linear entre as variáveis e a inclinação da equação de regressão da curva analítica não é nula. E quando valor-p > 0,05 não há indicação de que existe relação linear entre as variáveis e não tem sentido utilizar a regressão (CARDOSO, 2008).

A faixa de trabalho que possui uma resposta linear é denominada faixa linear.

### 1.6.3 – Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção - LD representa a menor concentração do analito que pode ser detectada. O limite de quantificação - LQ representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada.

Um dos métodos de determinação desses limites é o método da relação sinal-ruído (S/R) que aceita a estimativa de 3:1 (o sinal produzido é 3 vezes maior do que o ruído da linha de base). Nesse método é feita uma comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações dos analitos e uma amostra branca, isenta dos analitos de interesse, sendo estabelecida uma concentração mínima na qual o analito pode ser facilmente detectado ou quantificado. O cálculo pode ser feito pela equação 2 e 3:

$$LD = \frac{\text{concentração} \times 3 \times S}{\bar{X}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{\text{concentração} \times 10 \times S}{\bar{X}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde a concentração é a concentração que produziu um sinal 3 vezes maior do que o ruído da linha de base; S é a estimativa do desvio padrão dos sinais e  $\bar{X}$  é a média dos sinais (CARDOSO, 2008).

Os limites de detecção e quantificação adequados para a análise multirresíduos de agrotóxicos devem ter valores inferiores aos LMR das substâncias estudadas.

#### **1.6.4 – Exatidão – Recuperação**

A exatidão é o grau de concordância existente entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro, sendo avaliada numericamente através da tendência. Um dos processos utilizados para avaliação da tendência é a realização de ensaios de recuperação. A tendência é uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. A tendência pode ser expressa como a recuperação analítica definida como:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\bar{X}_{\text{experimental}}}{\bar{X}_{\text{teórica}}} \times 100 \text{ (Equação 4)}$$

Onde  $\bar{X}_{\text{experimental}}$  é a média das concentrações obtidas experimentalmente e  $\bar{X}_{\text{teórica}}$  é a média das concentrações teoricamente adicionadas (CARDOSO, 2008).

Os valores aceitáveis de recuperação são estabelecidos como 70-120% definidos pelo SANCO (2010).

#### **1.6.5 – Precisão – Repetitividade**

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em determinadas condições (RIBANI et al, 2004). A precisão pode ser expressa de três formas: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A precisão medida sob condições de repetitividade é avaliada pelo coeficiente de variação (CV(%)) e/ou estimativa do desvio padrão relativo (DPR(%)):

$$\text{DPR (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \text{ (Equação 5)}$$



Onde  $\bar{X}$  é a média das concentrações obtidas experimentalmente e S é a estimativa do desvio padrão das concentrações obtidas experimentalmente (CARDOSO, 2008).

As condições de repetitividade podem ser caracterizadas com: um mesmo procedimento de medição, um mesmo observador, um mesmo instrumento usado sob mesmas condições, um mesmo local e repetições no menor espaço de tempo possível (INMETRO, 2010).

Valores aceitáveis de DPR(%) ou CV(%)  $\leq 20\%$  são definidos pelo SANCO (2010).

Os estudos dos limites de detecção e quantificação, dos ensaios de recuperação para avaliação da exatidão e precisão são feitos através da adição da solução de interesse na amostra branca avaliada no estudo de seletividade antes do processo de extração, esse processo é denominado fortificação da amostra.

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

### **1.7 – Parâmetros de Identificação e/ou Confirmação**

A espectrometria de massas em conjunto com a separação cromatográfica é uma técnica analítica de grande importância para a identificação de substâncias presentes em uma amostra. Ela fornece o tempo de retenção, a relação massa/carga (m/z) e informações sobre a abundância dos íons da fragmentação das substâncias (SANCO, 2010).

A necessidade de otimização dos íons precursores com as maiores intensidades no processo e dos íons com relação massa/carga (m/z) maiores que 100 é definida para uma seleção adequada de íons para confirmação da identidade das substâncias (SANCO, 2010).

Também são definidos no SANCO (2010) os requisitos mínimos para a identificação dos resíduos de agrotóxicos nos alimentos de acordo com o tipo de espectrômetro de massas utilizado para análise. Para o espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo com monitoramento de reações múltiplas o requisito mínimo é a presença de dois ou mais íons fragmentos.

De acordo com o SANCO (2010), o aumento da confiança na identificação das substâncias é assegurado com outras evidências como a avaliação de um espectro de “full scan”, íons fragmentos com informações de massas exatas e no caso de MS/MS um terceiro íon fragmento.

## 1.8 – Justificativa do trabalho

Diante da situação nacional em relação ao grande uso dos agrotóxicos no Brasil e considerando-se que essas substâncias podem causar danos a saúde, torna-se importante o monitoramento dos seus resíduos em alimentos como proteção a saúde pública dos consumidores.

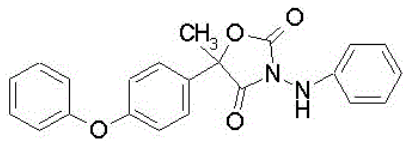
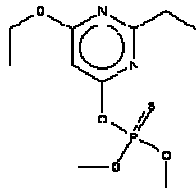
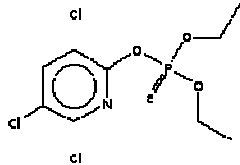
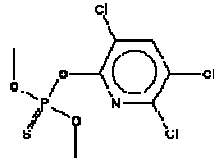
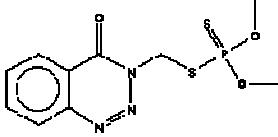
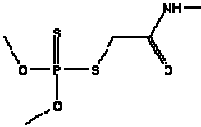
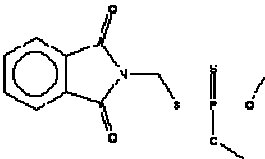
Neste contexto o presente trabalho foi desenvolvido dando início à utilização da técnica de análise de resíduos de agrotóxicos em maçãs por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. Foram selecionados sete agrotóxicos: famoxadona, etrinfós, clorpirifós, clorpirifós metil, azinfós metil, dimetoato e fosmete com padrões disponíveis no Setor de Resíduos de Agrotóxicos do Laboratório de Alimentos e Contaminantes do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS candidatos a serem utilizados na preparação de um ensaio de proficiência na matriz maçã para uso neste trabalho. Algumas características dessas substâncias estão relacionadas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Classificação dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Agrotóxico	Grupo Químico	Classe	Classificação Toxicológica	LMR (mg/kg) em Maçã	IDA (mg/kg peso corpóreo)
Famoxadona	Oxazolidinadiona	Fungicida	Classe III	0,05	0,006
Etrinfós	Organofosforado	Inseticida/Acaricida	Classe II	Não Autorizado	Não Determinado
Clorpirifós	Organofosforado	Inseticida/Formicida e Acaricida	Classe II	1,00	0,01
Clorpirifós Metil	Organofosforado	Inseticida	Não Permitido	Não Autorizado	Não Determinado
Azinfós Metil	Organofosforado	Inseticida/Acaricida	Não Permitido	Não Autorizado	Não Determinado
Dimetoato	Organofosforado	Inseticida/Acaricida	Classe II	2,00	0,002
Fosmete	Organofosforado	Inseticida/Acaricida	Classe II	1,00	0,01

(Fonte: ANVISA, 2010a).

Tabela 3 - Características dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Agrotóxico	Nº CAS	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural
Famoxadona	131807-57-3	$C_{22}H_{18}N_2O_4$	
Etrinifós	38260-54-7	$C_{10}H_{17}N_2O_4PS$	
Clorpirifós	2921-88-22	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	
Clorpirifós Metil	5598-13-0	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	
Azinifós Metil	86-50-0	$C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$	
Dimetoato	60-51-5	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	
Fosmete	732-11-6	$C_{11}H_{12}NO_4PS_2$	

(Fonte: ANVISA, 2010a ; NIST,2011).

Alguns dos parâmetros a serem estudados para os agrotóxicos selecionados para o estudo encontram-se descritos na Tabela 4 de acordo a literatura disponível de estudos avaliados.

Tabela 4 - Parâmetros para o estudo dos agrotóxicos selecionados

Agrotóxico	Transição MRM	Tipo de Transição	Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão (eV)	Fonte
Famoxadona	392>331	Quantificação	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	35	10	PIZZUTTI, 2006. HIEMSTRA & KOK, 2007.
	392>238	Confirmação			15	
	392>331	Quantificação	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	35	10	
	392>238	Confirmação			15	
Etrinfós	293>125 293>265,79*	Quantificação Confirmação	[M + H] <sup>+</sup>	*	*	BANERJEE et al, 2007.
Clorpirifós	350>198	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	35	15	HIEMSTRA & KOK, 2007.
	350>115	Confirmação			15	
Clorpirifós Metil	322>125	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	35	15	HIEMSTRA & KOK, 2007.
	322>143	Confirmação			15	
Azinfós Metil	318>160	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	14	8	LEANDRO et al, 2007
	318>261	Confirmação			8	
	318>160	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	35	10	PIZZUTTI, 2006.
	318>132	Confirmação			10	
	318>132	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	35	10	HIEMSTRA & KOK, 2007.
	318>160	Confirmação			10	
Dimetoato	230>125	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	13	20	LEANDRO et al, 2006
	230>171	Confirmação			15	
	230>125	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	17	20	LEANDRO et al, 2007
	230>199	Confirmação			10	
	230>171	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	35	15	PIZZUTTI, 2006.
	230>199	Confirmação			15	
	230>171	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	35	15	HIEMSTRA & KOK, 2007.
230>199	Confirmação		15			
Fosmete	318>133	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	35	35	HIEMSTRA & KOK, 2007.
	318>160	Confirmação			10	

\* O analisador utilizado pelo autor é do tipo "Íon Trap" com configurações diferentes do analisador do tipo quadrupolo.

## **2 – Objetivos**

### **2.1 – Objetivo Geral**

Validar a metodologia de análise de resíduos de agrotóxicos em maçãs pela técnica de cromatografia líquida acoplada ao sistema de detecção por espectrometria de massas sequencial.

### **2.2 – Objetivos Específicos**

➤ Estabelecer e otimizar as condições cromatográficas de separação por cromatografia líquida para os agrotóxicos: famoxadona, etrinfós, clorpirifós, clorpirifós metil, azinfós metil, dimetoato e fosmete.

➤ Estabelecer e otimizar as condições de detecção por espectrometria de massas sequencial dos agrotóxicos: famoxadona, etrinfós, clorpirifós, clorpirifós metil, azinfós metil, dimetoato e fosmete.

➤ Validar a metodologia do mini-Luke modificado para os agrotóxicos: famoxadona, etrinfós, clorpirifós, clorpirifós metil, azinfós metil, dimetoato e fosmete com análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial na matriz maçã.

### 3 – Materiais e Métodos

#### 3.1 – Padrões de Agrotóxicos

As substâncias selecionadas para o estudo foram: famoxadona, etrinfós, clorpirifós, clorpirifós metil, azinfós metil, dimetoato e fosmete. As informações dos padrões utilizados de cada substância encontram-se descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Padrões dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Agrotóxico	Fornecedor	Lote	Validade	Pureza (%)
Famoxadona	Dr. Ehernstorfer	70416	16/05/2011	98,5
Etrinfós	Dr. Ehernstorfer	80425	15/11/2008	46,5
Clorpirifós	Dr. Ehernstorfer	60110	01/01/2010	98,5
Clorpirifós Metil	Dr. Ehernstorfer	70403	15/05/2011	97,0
Azinfós Metil	Dr. Ehernstorfer	60421	08/05/2010	98,5
Dimetoato	Dr. Ehernstorfer	60725	26/09/2010	99,0
Fosmete	Dr. Ehernstorfer	80108	21/01/2012	98,5

#### 3.2 – Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados na análise encontram-se descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Reagentes utilizados no estudo.

Reagente	Grau	Fornecedor
Acetato de Etila	Resíduo	Tedia
Metanol	Cromatografia Líquida	Merck
Ácido Acético Glacial	Cromatografia Líquida	Merck
Acetona	Resíduo	Tedia
Diclorometano	Resíduo	Tedia
Éter de Petróleo	Resíduo	Sigma-Adrich
Água	Tipo I	-
Sulfato de Sódio Anidro	Para Traços	Merck
Formato de Amônio	Para Análise	Sigma-Adrich
Detergente Extran®	Alcalino	Merck

As soluções denominadas Soluções Estoque de concentração nominal  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de cada substância escolhida foram preparadas a partir dos padrões solubilizados em solvente acetato de etila.

As soluções denominadas Soluções Intermediárias 1 de concentração nominal  $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de cada substância escolhida foram preparadas a partir das Soluções Estoque solubilizadas em solvente metanol.

As soluções denominadas Soluções Intermediárias 2 de concentração nominal  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de cada substância escolhida foram preparadas a partir das Soluções Intermediárias anteriormente preparadas solubilizadas em solvente metanol:água na proporção 1:1.

A mistura das substâncias escolhidas denominada Solução Intermediária Mistura 3 de concentração nominal  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foi preparada partir das Soluções Estoque solubilizadas em solvente metanol com 0,1% de ácido acético grau resíduo.

A partir da mistura anteriormente preparada, dez Soluções Intermediárias (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13) de concentrações nominais de 2, 10, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e  $350 \text{ ng.mL}^{-1}$  respectivamente foram preparadas solubilizadas em solvente metanol com 0,02% de ácido acético, correspondendo a dez níveis da faixa de trabalho.

A partir das Soluções Intermediárias anteriormente preparadas, foram feitas dez Soluções Intermediárias (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23) de concentrações nominais de 1, 5, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150 e  $175 \text{ ng.mL}^{-1}$  respectivamente foram preparadas solubilizadas em solvente metanol com 0,02% de ácido acético: água na proporção 1:1.

E a partir da Solução Intermediária Mistura 3, uma Solução Intermediária 24 de concentração nominal de  $125 \text{ ng.mL}^{-1}$  foi preparada solubilizada em solvente metanol com 0,02% de ácido acético.

Nas Tabelas 7, 8 e 9 encontram-se as concentrações reais de todas as soluções preparadas.

Tabela 7 - Concentração das soluções estoque e intermediárias 1, 2 e 3 dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

<b>Agrotóxico</b>	<b>Solução Estoque <math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math></b>	<b>Solução Intermediárias 1 <math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math></b>	<b>Solução Intermediárias 2 <math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math></b>	<b>Solução Intermediária Mistura 3 <math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math></b>
Famoxadona	107,40	2,148	1,074	1,074
Etrinfós	105,10	2,102	1,051	1,051
Clorpirifós	120,90	2,418	1,209	1,209
Clorpirifós Metil	117,40	2,348	1,174	1,174
Azinfós Metil	105,70	2,114	1,057	1,057
Dimetoato	101,50	2,030	1,015	1,015
Fosmete	107,40	2,148	1,074	1,074



Tabela 8 - Concentração das soluções intermediárias de 4 a 13 dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Agrotóxico	Solução Intermediária Mistura ng.mL <sup>-1</sup>									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Famoxadona	2,68	10,74	26,86	53,70	107,40	161,10	214,80	268,50	295,36	322,20
Etrinós	2,62	10,52	26,28	52,56	105,10	157,66	210,20	262,76	289,02	315,30
Clorpirifós	3,02	12,10	30,22	60,46	120,90	181,36	241,80	302,26	332,48	362,70
Clorpirifós Metil	2,94	11,74	29,36	58,70	117,40	176,10	234,80	293,50	322,86	352,20
Azinós Metil	2,64	10,58	26,42	52,86	105,70	158,56	211,40	264,26	290,68	317,10
Dimetoato	2,54	10,16	25,38	50,76	101,50	152,26	203,00	253,76	279,12	304,50
Fosmete	2,68	10,74	26,86	53,70	107,40	161,10	214,80	268,50	295,36	322,20

Tabela 9 - Concentração das soluções intermediárias de 14 a 24 dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Agrotóxico	Solução Intermediária Mistura ng.mL <sup>-1</sup>										
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Famoxadona	1,34	5,37	13,43	26,85	53,70	80,55	107,40	134,25	147,68	161,10	128,90
Etrinós	1,31	5,26	13,14	26,28	52,55	78,83	105,10	131,38	144,51	157,65	126,10
Clorpirifós	1,51	6,05	15,11	30,23	60,45	90,68	120,90	151,13	166,24	181,35	145,10
Clorpirifós Metil	1,47	5,87	14,68	29,35	58,70	88,05	117,40	146,75	161,43	176,10	140,90
Azinós Metil	1,32	5,29	13,21	26,43	52,85	79,28	105,70	132,13	145,34	158,55	126,80
Dimetoato	1,27	5,08	12,69	25,38	50,75	76,13	101,50	126,88	139,56	152,25	121,80
Fosmete	1,34	5,37	13,43	26,85	53,70	80,55	107,40	134,25	147,68	161,10	128,90

Na eluição por gradiente as fases móveis utilizadas no estudo foram a Fase denominada A: Formato de Amônio  $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  e a Fase denominada B: Metanol.

### 3.3 – Instrumentação

O equipamento utilizado para a realização do estudo foi o cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Waters, USA) modelo ACQUITY UPLC<sup>TM</sup> equipado com um sistema binário de bombas, injetor automático, degaseificador, forno para a coluna. A coluna utilizada para a separação cromatográfica foi de fase reversa ACQUITY UPLC<sup>TM</sup> BEH C<sub>18</sub> com 1.7 µm de tamanho de partícula esférica, 2.1 mm de diâmetro interno e 100 mm de comprimento (Waters, USA). A pré-coluna utilizada foi a VanGuard<sup>TM</sup> BEH C<sub>18</sub> com 1.7 µm de tamanho de partícula esférica (Waters, USA). O detector acoplado foi o detector de massas/massas (Waters, USA) modelo Quattro Premier XE<sup>TM</sup> equipado com uma fonte de ionização ESI (Z-Spray<sup>TM</sup>) operando no modo positivo e estação de trabalho MassLynx<sup>TM</sup> Versão 4.1. As condições

operacionais do espectrômetro de massas/massas encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Condições operacionais do espectrômetro de massas/massas Quattro Premier XE™.

Parâmetro	Valor
Voltagem do Capilar (kV)	0,98
Temperatura da Fonte ESI <sup>+</sup> (°C)	120
Temperatura do Gás de Dessolvatação N <sub>2</sub> (°C)	400
Fluxo do Gás do Cone N <sub>2</sub> (l.h <sup>-1</sup> )	50
Fluxo do Gás de Dessolvatação N <sub>2</sub> (l.h <sup>-1</sup> )	800
Pressão do Gás de Colisão Argônio (mbar)	3,5 x 10 <sup>-3</sup>

As condições operacionais do cromatógrafo líquido encontram-se descritas na Tabela 11.

Tabela 11 - Condições operacionais do cromatógrafo líquido Acquity UPLC™.

Parâmetro	Valor
Volume de Injeção (µL)	5
Vazão da Fase Móvel Constante (mL.min <sup>-1</sup> )	0,3
Temperatura do Forno da Coluna Constante (°C)	50,0
Temperatura do Amostrador Constante (°C)	15,0
Tempo Total de Corrida (min)	15

Outros equipamentos utilizados para a realização do estudo encontram-se listados na Tabela 12.

Tabela 12 – Outros equipamentos utilizados no estudo.

Equipamento	Especificação	Fabricante	Modelo
Balança Analítica	Precisão 3 casas decimais	Sartorius AG	LP 620P
Balança Analítica	Precisão 5 casas decimais	Mettler Toledo	XP205
Banho Ultra-som	-	Branson Ultrasonics	2510RMTM
Liquidificador Industrial	-	Ametek	36BL55
Agitador	Ultra Turrax	IKA Works	T18 BASIC
Centrífuga	-	HIMAC	CF7D2
Unidade de Evaporação	Com fluxo de N <sub>2</sub>	Thermo Fisher Cientific	REACTI THERM III REACTI VAP III
Sistema de Purificação de Água por Osmose Reversa e Eletrodeionização	Tipo I	Gehaka	-

### 3.4 – Gases

Os gases utilizados para o estudo foram:

- Nitrogênio com pureza maior que 99,995%;
- Argônio com pureza maior que 99,999%.

### 3.5 – Etapas do Trabalho

Os parâmetros avaliados no processo de validação desse estudo foram: seletividade, faixa de trabalho, linearidade, faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão - recuperação e precisão - repetitividade. A seletividade nesse estudo foi avaliada analisando-se uma amostra de maçã adquirida em mercado local. Nesse estudo foram considerados valores adequados de  $R^2 \geq 0,95$  e  $r \geq 0,98$ . Para esse estudo a faixa de trabalho definida foi de 1, 5, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 175 ng.mL<sup>-1</sup> (concentrações nominais) sendo que a curva analítica foi avaliada nas seguintes concentrações nominais 25, 50, 75, 100 e 125 ng.mL<sup>-1</sup>. Os valores aceitáveis de DPR(%) ou CV(%)  $\leq 20\%$  para esse estudo foram definidos pelo SANCO (2010). Os limites de 70 a 120% de recuperação estão definidos pelo Codex (2010).

O presente trabalho foi desenvolvido nas seguintes etapas:

**1ª Etapa:** Foi feita a infusão das substâncias de interesse individuais na concentração nominal de 1 µg.mL<sup>-1</sup> para seleção dos seguintes parâmetros: íon precursor, voltagem do cone, íons fragmentos e energia de colisão.

**2ª Etapa:** Foi feita a injeção da mistura das substâncias de interesse na concentração nominal de 15 ng.mL<sup>-1</sup> para otimização da separação cromatográfica e separação dos grupos MRM.

**3ª Etapa:** Com as condições cromatográficas e de detecção por espectrometria de massas sequencial otimizadas as curva analíticas de concentrações nominais 25, 50, 75, 100 e 125 ng.mL<sup>-1</sup> foram injetadas seis vezes cada ponto e calculados os coeficientes de Pearson (r), os coeficientes de determinação

( $R^2$ ), os testes de Cochram (Homocedasticidade) e os testes F para a avaliação da linearidade da faixa de trabalho selecionada.

**4ª Etapa:** Após a avaliação da curva analítica em solvente obteve-se uma amostra isenta das substâncias de interesse da matriz maçã pela extração da polpa de maçã com a metodologia mini-Luke modificada. O fluxograma dessa metodologia encontra-se descrito na Figura 7.

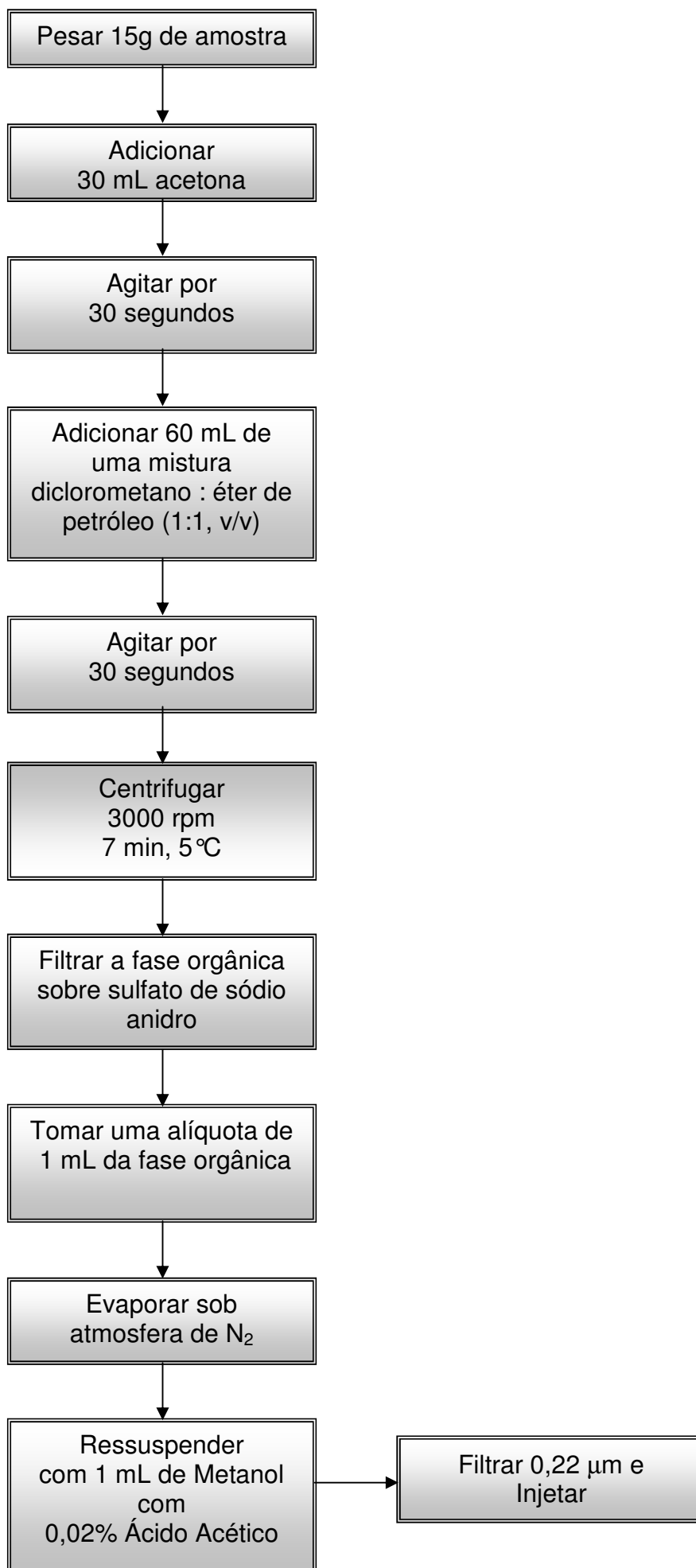


Figura 7 – Fluxograma da metodologia mini-Luke modificada.

Para o preparo da polpa de maçã foi adquirido 1 kg de maçã gala em mercado local, lavada com água e detergente Extran® alcalino na proporção 1:1, cortada em pedaços e processadas no liquidificador industrial até se obter uma polpa homogênea. Porções de 15g da polpa foram pesadas em 13 frascos, identificados com a numeração de 1 a 13 e reservados. Foi feita a extração do frasco 1 com metodologia mini-Luke modificada e avaliada a seletividade do método.

**5ª Etapa:** Para avaliação da tendência como recuperação – exatidão e da precisão – repetitividade os frascos 2 a 9 foram fortificados em dois diferentes níveis de concentração da mistura dos agrotóxicos em quatro replicatas distintas. Para a determinação do limite de detecção e do limite de quantificação os frasco 10 a 13 foram fortificados em um nível em quatro replicatas diferentes. Na Tabela 13 estão descritas as fortificações feitas.

Tabela 13 – Fortificação das amostras branco da polpa de maçã com os agrotóxicos selecionados para o estudo.

Substância	Frasco (nº)	Nível de Concentração da Fortificação (mg.kg <sup>-1</sup> )	Replicata nº	Massa da Polpa de Maçã (g)	Solução Adicionada (1 mL)	
Famoxadona	2	1º Nível	0,0682	1 <sup>a</sup>	15,739	3
	3	1º Nível	0,0698	2 <sup>a</sup>	15,388	3
	4	1º Nível	0,0714	3 <sup>a</sup>	15,034	3
	5	1º Nível	0,0714	4 <sup>a</sup>	15,037	3
	6	2º Nível	0,0070	1 <sup>a</sup>	15,291	20
	7	2º Nível	0,0069	2 <sup>a</sup>	15,555	20
	8	2º Nível	0,0070	3 <sup>a</sup>	15,362	20
	9	2º Nível	0,0069	4 <sup>a</sup>	15,597	20
	10	3º Nível	0,0086	1 <sup>a</sup>	15,066	24
	11	3º Nível	0,0085	2 <sup>a</sup>	15,142	24
	12	3º Nível	0,0085	3 <sup>a</sup>	15,118	24
	13	3º Nível	0,0083	4 <sup>a</sup>	15,449	24
	Etrinifós	2	1º Nível	0,0668	1 <sup>a</sup>	15,739
3		1º Nível	0,0683	2 <sup>a</sup>	15,388	3
4		1º Nível	0,0699	3 <sup>a</sup>	15,034	3
5		1º Nível	0,0699	4 <sup>a</sup>	15,037	3
6		2º Nível	0,0069	1 <sup>a</sup>	15,291	20
7		2º Nível	0,0068	2 <sup>a</sup>	15,555	20
8		2º Nível	0,0068	3 <sup>a</sup>	15,362	20
9		2º Nível	0,0067	4 <sup>a</sup>	15,597	20
10		3º Nível	0,0084	1 <sup>a</sup>	15,066	24
11		3º Nível	0,0083	2 <sup>a</sup>	15,142	24
12		3º Nível	0,0083	3 <sup>a</sup>	15,118	24
13		3º Nível	0,0082	4 <sup>a</sup>	15,449	24
Clorpirifós		2	1º Nível	0,0768	1 <sup>a</sup>	15,739
	3	1º Nível	0,0786	2 <sup>a</sup>	15,388	3
	4	1º Nível	0,0804	3 <sup>a</sup>	15,034	3
	5	1º Nível	0,0804	4 <sup>a</sup>	15,037	3
	6	2º Nível	0,0079	1 <sup>a</sup>	15,291	20
	7	2º Nível	0,0078	2 <sup>a</sup>	15,555	20
	8	2º Nível	0,0079	3 <sup>a</sup>	15,362	20
	9	2º Nível	0,0078	4 <sup>a</sup>	15,597	20
	10	3º Nível	0,0096	1 <sup>a</sup>	15,066	24
	11	3º Nível	0,0096	2 <sup>a</sup>	15,142	24
	12	3º Nível	0,0096	3 <sup>a</sup>	15,118	24
	13	3º Nível	0,0094	4 <sup>a</sup>	15,449	24
	Clorpirifós Metil	2	1º Nível	0,0746	1 <sup>a</sup>	15,739
3		1º Nível	0,0763	2 <sup>a</sup>	15,388	3
4		1º Nível	0,0781	3 <sup>a</sup>	15,034	3
5		1º Nível	0,0781	4 <sup>a</sup>	15,037	3
6		2º Nível	0,0077	1 <sup>a</sup>	15,291	20
7		2º Nível	0,0075	2 <sup>a</sup>	15,555	20
8		2º Nível	0,0076	3 <sup>a</sup>	15,362	20
9		2º Nível	0,0075	4 <sup>a</sup>	15,597	20
10		3º Nível	0,0094	1 <sup>a</sup>	15,066	24
11		3º Nível	0,0093	2 <sup>a</sup>	15,142	24
12		3º Nível	0,0093	3 <sup>a</sup>	15,118	24
13		3º Nível	0,0091	4 <sup>a</sup>	15,449	24

Substância	Frasco (nº)	Nível de Concentração da Fortificação (mg.kg <sup>-1</sup> )	Replicata nº	Massa da Polpa de Maçã (g)	Solução Adicionada (1 mL)	
Azinfós Metil	2	1º Nível	0,0672	1ª	15,739	3
	3	1º Nível	0,0687	2ª	15,388	3
	4	1º Nível	0,0703	3ª	15,034	3
	5	1º Nível	0,0703	4ª	15,037	3
	6	2º Nível	0,0069	1ª	15,291	20
	7	2º Nível	0,0068	2ª	15,555	20
	8	2º Nível	0,0069	3ª	15,362	20
	9	2º Nível	0,0068	4ª	15,597	20
	10	3º Nível	0,0084	1ª	15,066	24
	11	3º Nível	0,0084	2ª	15,142	24
	12	3º Nível	0,0084	3ª	15,118	24
	13	3º Nível	0,0082	4ª	15,449	24
	Dimetoato	2	1º Nível	0,0645	1ª	15,739
3		1º Nível	0,0660	2ª	15,388	3
4		1º Nível	0,0675	3ª	15,034	3
5		1º Nível	0,0675	4ª	15,037	3
6		2º Nível	0,0066	1ª	15,291	20
7		2º Nível	0,0065	2ª	15,555	20
8		2º Nível	0,0066	3ª	15,362	20
9		2º Nível	0,0065	4ª	15,597	20
10		3º Nível	0,0081	1ª	15,066	24
11		3º Nível	0,0080	2ª	15,142	24
12		3º Nível	0,0081	3ª	15,118	24
13		3º Nível	0,0079	4ª	15,449	24
Fosmete		2	1º Nível	0,0682	1ª	15,739
	3	1º Nível	0,0698	2ª	15,388	3
	4	1º Nível	0,0714	3ª	15,034	3
	5	1º Nível	0,0714	4ª	15,037	3
	6	2º Nível	0,0070	1ª	15,291	20
	7	2º Nível	0,0069	2ª	15,555	20
	8	2º Nível	0,0070	3ª	15,362	20
	9	2º Nível	0,0069	4ª	15,597	20
	10	3º Nível	0,0086	1ª	15,066	24
	11	3º Nível	0,0085	2ª	15,142	24
	12	3º Nível	0,0085	3ª	15,118	24
	13	3º Nível	0,0083	4ª	15,449	24



## 4 – Resultados e Discussão

### 4.1 – Seleção e otimização das transições dos íons

A partir dos íons precursores selecionados nos trabalhos consultados descritos na tabela 4 foram otimizadas as voltagens adequadas do cone para se obter um sinal com intensidade máxima para cada íon. A otimização da voltagem adequada do cone para cada íon possibilitou uma maior seletividade e sensibilidade ao método. Quanto menor a quantidade de íons interferentes e maior a quantidade de íons de interesse maior a seletividade e sensibilidade respectivamente.

Foram feitas as fragmentações dos íons precursores otimizados. Para a seleção dos íons fragmentos adequados, para a confirmação da identidade das substâncias, foi realizada a fragmentação em mais de uma energia de colisão com o objetivo de se obter um maior número de íons fragmentos.

Os espectros de massas obtidos para duas energias de colisão diferentes estão relacionados no Anexo 1.

Os íons fragmentos foram selecionados segundo os seguintes critérios: a citação nos trabalhos consultados descritos na tabela 4, os íons com as maiores intensidades no processo e os íons com relação massa/carga ( $m/z$ ) maiores que 100. Esses dois últimos critérios são recomendações definidas no SANCO (2010) para uma seleção adequada de íons para confirmação da identidade das substâncias.

Para a quantificação de cada agrotóxico do estudo foi otimizado um íon fragmento de maior intensidade e, para a confirmação da identidade dessa substância um outro íon. A seleção e otimização de dois íons fragmentos, um de quantificação e um de qualificação no presente estudo atendem ao requisito mínimo definido no SANCO (2010).

Um terceiro íon fragmento foi selecionado e otimizado para a famoxadona, o etrinfós, o clorpirifós metil, o azinfós metil e dimetoato. Para os agrotóxicos clorpirifós e fosmete não foi possível a otimização de mais de dois íons fragmentos.

No Anexo 2 estão relacionados os cromatogramas dos íons fragmentos selecionados como quantificador, qualificador e identificador para cada substância do estudo.

As condições analíticas de detecção, quantificação e identificação definidas no estudo encontram-se relacionadas na Tabela 14 e 15.

Tabela 14 - Condições analíticas de detecção e quantificação dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Agrotóxico	Transição MRM	Tipo de Transição	Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão (eV)
Famoxadona	392,0>331,0	Quantificação	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	15	10
	392,0>238,0	Qualificação			20
Etrinfós	292,9>124,9	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	35	25
	292,9>264,9	Qualificação			17
Clorpirifós	350,0>96,8	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	20	33
	350,0>197,8	Qualificação			25
Clorpirifós Metil	322,0>124,8	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	25	25
	322,0>289,8	Qualificação			20
Azinfós Metil	318,0>159,9	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	15	9
	318,0>131,9	Qualificação			17
Dimetoato	230,0>198,8	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	20	10
	230,0>124,8	Qualificação			25
Fosmete	318,0>132,8	Quantificação	[M + H] <sup>+</sup>	20	35
	318,0>159,9	Qualificação			20

Tabela 15 - Condições analíticas de identificação dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Agrotóxico	Transição MRM	Tipo de Transição	Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão (eV)
Famoxadona	392,0>195,0	Identificação 1	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	15	30
Etrinfós	292,9>108,8	Identificação 1	[M + H] <sup>+</sup>	35	30
Clorpirifós	Não Otimizado	-	-	-	-
Clorpirifós Metil	322,0>78,9	Identificação 1	[M + H] <sup>+</sup>	25	35
Azinfós Metil	318,0>124,8	Identificação 1	[M + H] <sup>+</sup>	15	20
Dimetoato	230,0>170,7	Identificação 1	[M + H] <sup>+</sup>	20	15
Fosmete	Não Otimizado	-	-	-	-

O terceiro íon fragmento selecionado para a famoxadona, o etrinfós, o clorpirifós metil, o azinfós metil e dimetoato são evidências especificadas no SANCO (2010) para o aumento da confiança de identificação dessas substâncias.

Avaliando-se o cromatograma obtido do clorpirifós metil das transições dos íons qualificador e identificador aparecem também em outro tempo de retenção. Essa evidência experimental sugere a presença de uma transição de um íon comum à fragmentação de outras substâncias presentes, no entanto,

esse resultado não inviabiliza a utilização desse íon como identificador pois os tempos de retenção são diferentes.

As transições dos íons qualificadores e identificadores selecionados para o dimetoato, etrínfós e famoxadona se encontram no mesmo tempo de retenção e não aparecem no restante da corrida cromatográfica indicando a especificidade da seleção.

Nas condições de cone e colisão da transição do azinfós metil aparece a transição do fosmete. Mas nas condições de cone e colisão do fosmete não aparece a transição do azinfós metil. Com esse resultado observa-se a dificuldade de se analisar substâncias diferentes que possuem íons fragmentos iguais e características semelhantes que impedem uma separação adequada. No entanto, para o azinfós metil foi possível a seleção e otimização de uma terceira transição de um íon fragmento para confirmação da presença dessa substância.

Com a injeção da mistura das substâncias de interesse na concentração nominal de  $15 \text{ ng.mL}^{-1}$  as condições analíticas de separação cromatográfica foram otimizadas e encontram-se relacionadas na Tabela 16. Na Figura 8 está representado o cromatograma total dos íons (“Total Ion Chromatogram –TIC”) com a separação cromatográfica otimizada. Na Figura 9 está representado o método MRM desenvolvido com a separação dos respectivos grupos.

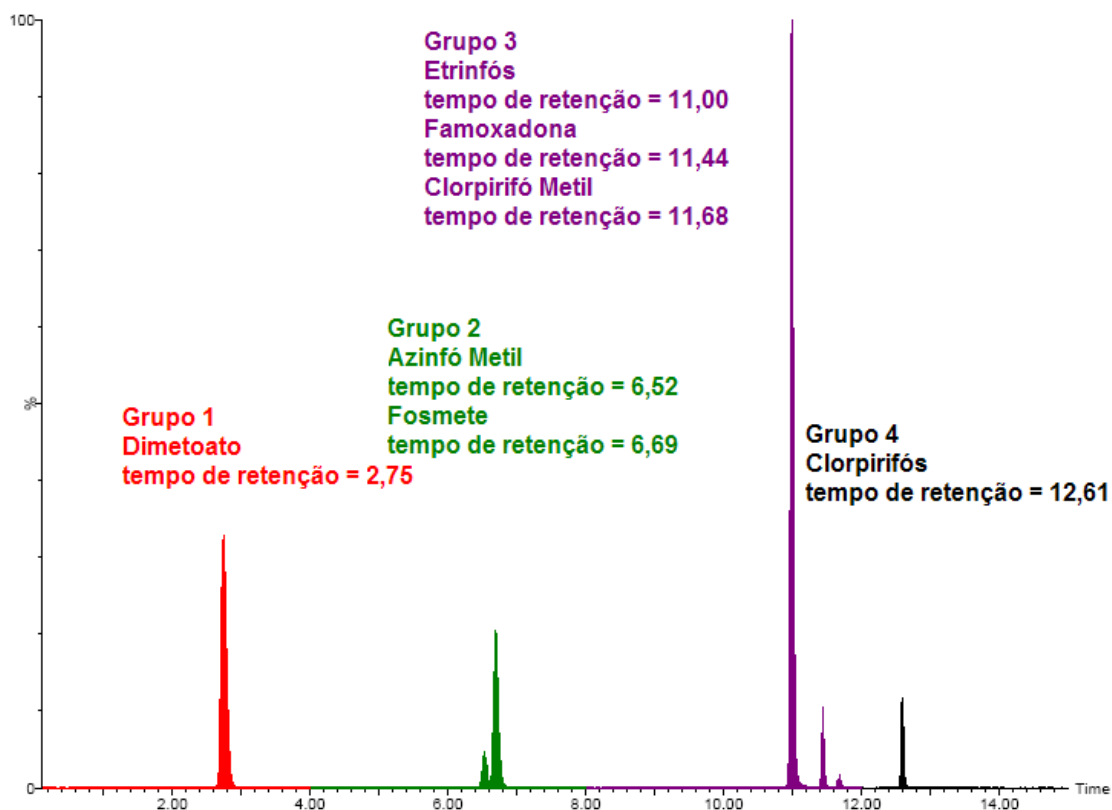


Figura 8 – TIC da separação cromatográfica otimizada para os agrotóxicos selecionados para o estudo.

Tabela 16 – Condições analíticas de separação cromatográfica dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Tempo Inicial	Fluxo (mL.min <sup>-1</sup> )	Percentual de Fase A (%)	Percentual de Fase B (%)
2,00	0,3	70	30
2,50	0,3	50	50
8,00	0,3	45	65
12,0	0,3	10	90
13,0	0,3	10	90
15,0	0,3	70	30

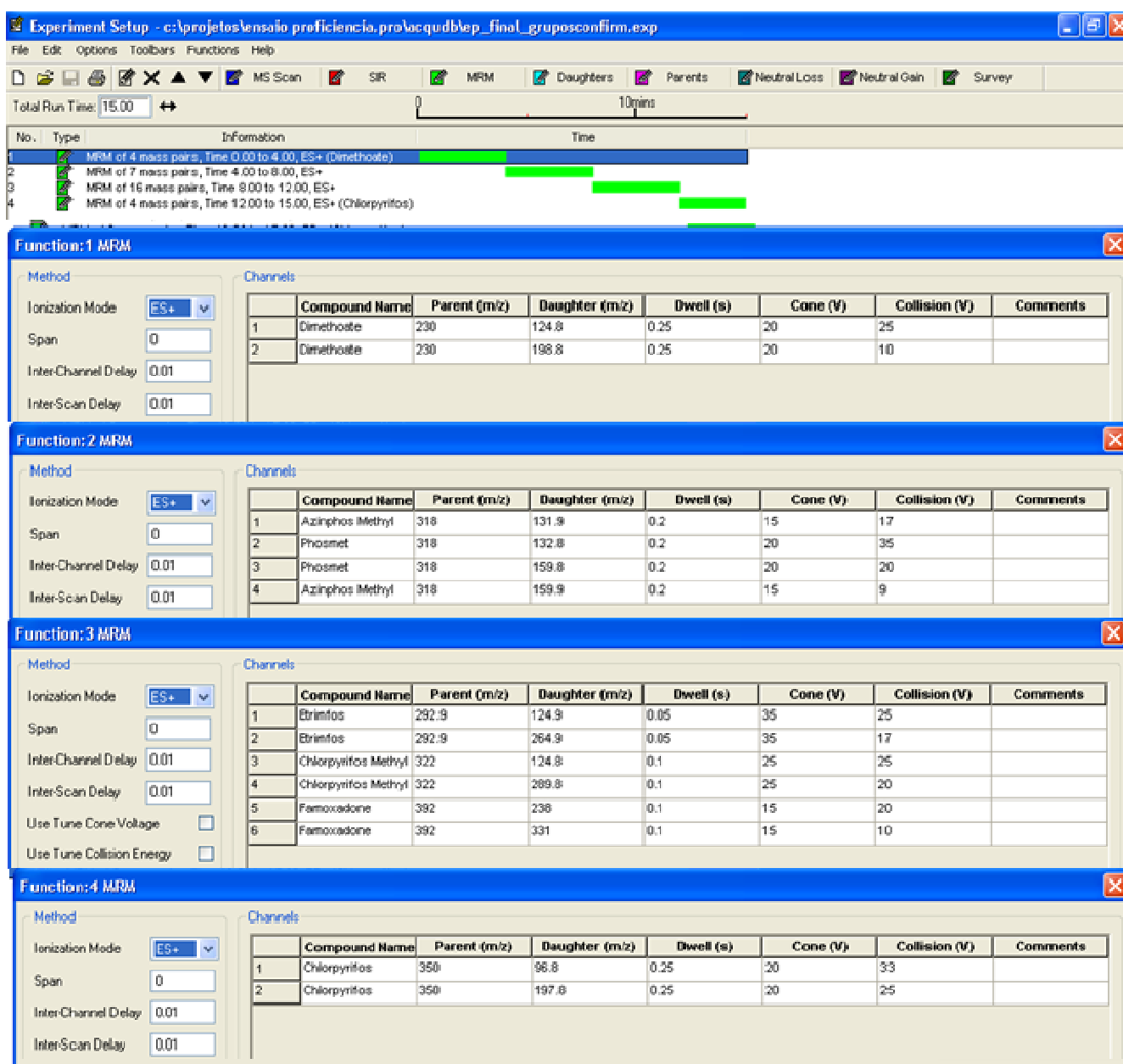


Figura 9 – Método MRM desenvolvido e otimizado para os agrotóxicos do estudo.

Na técnica de detecção por espectrometria de massas sequencial com monitoramento MRM a coeluição das substâncias não interfere no poder de identificação delas para a maioria dos casos, no entanto, diminui a sensibilidade visto que o espectrômetro de massas está monitorando a presença de íons que não pertencem à fragmentação da substância. A recomendação é de que dependendo da quantidade de substâncias que se pretende analisar, essas sejam separadas cromatograficamente dentro de um maior número possível e, a quantidade de íons analisados por grupo de MRM, não seja maior que 32 para as especificações do equipamento utilizado pois

uma distribuição adequada no tempo da corrida cromatográfica aliada a uma separação de grupos MRM irá aumentar a sensibilidade da técnica utilizada.

## 4.2 – Avaliação das curvas analíticas

Os resultados da avaliação das curvas analíticas encontram-se na Tabela 17 e suas representações gráficas das curvas analíticas na Figura 10.

Tabela 17 - Avaliação das curvas analíticas dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Substância	Equação de Regressão Linear	R <sup>2</sup>	r	Homogeneidade da Variância dos Resíduos	Significância da Regressão
Famoxadona	$y = 582,81x + 1235,86$	0,9949	0,9974	Homocedástico	Significativa
Etrinfós	$y = 7784,09x + 49054,11$	0,9908	0,9954	Homocedástico	Significativa
Clorpirifós	$y = 1969,32x + 10880,89$	0,9887	0,9943	Homocedástico	Significativa
Clorpirifós Metil	$y = 414,49x + 2594,67$	0,8599	0,9273	Homocedástico	Significativa
Azinfós Metil	$y = 1211,44x + 14097,01$	0,9566	0,9781	Heterocedástico	Significativa
Dimetoato	$y = 3779,45x + 16563,99$	0,9924	0,9962	Heterocedástico	Significativa
Fosmete	$y = 6073,28x + 44516,55$	0,9880	0,9940	Heterocedástico	Significativa

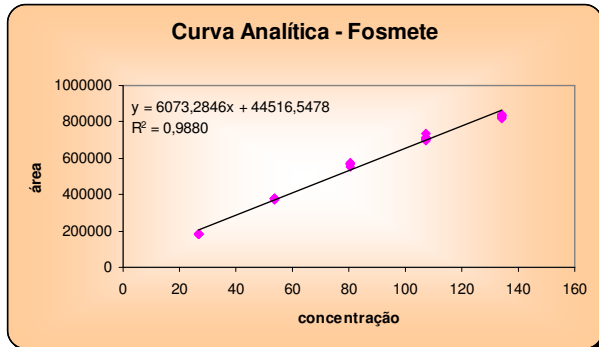
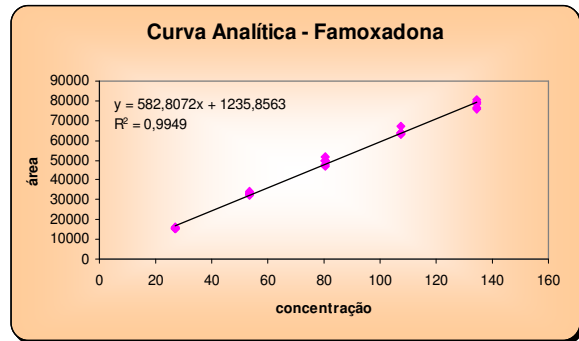
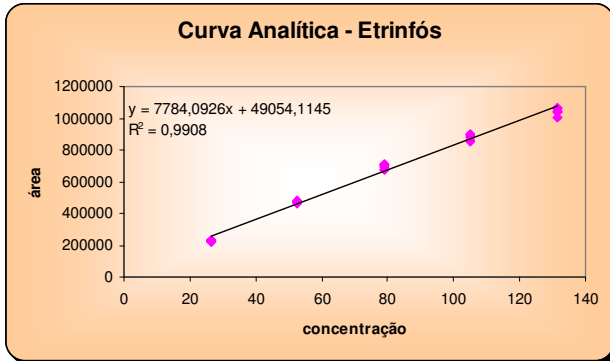
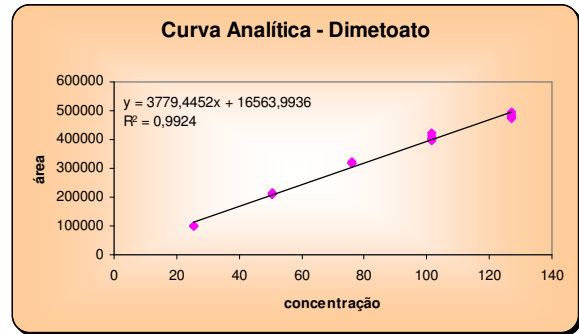
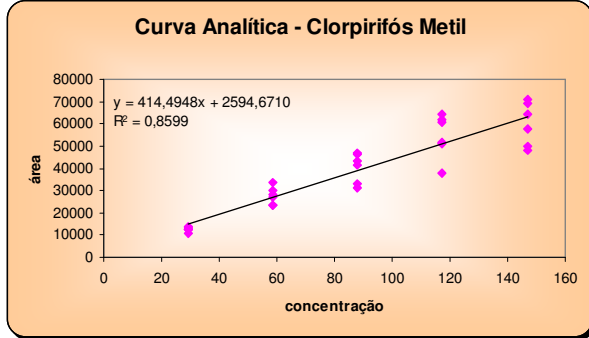
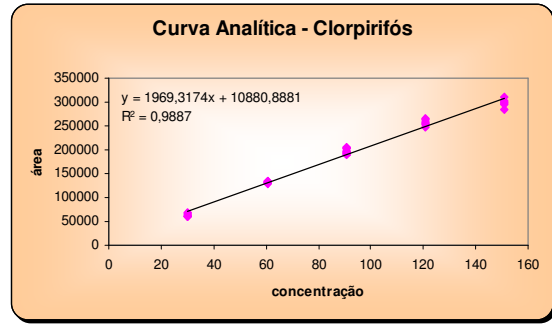
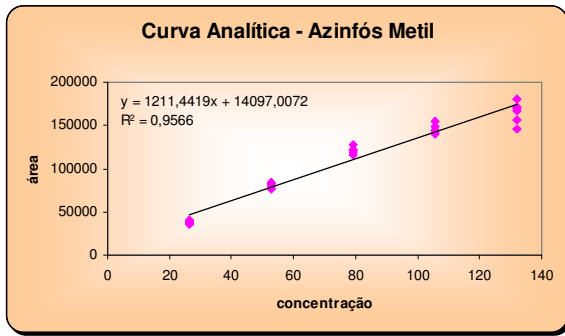


Figura 10 – Representações gráficas das curvas analíticas dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Na avaliação feita das curvas analíticas foram observados valores de  $R^2$  e  $r$  insatisfatórios apenas para o clorpirifós metil. Em relação à homogeneidade das variâncias dos resíduos o dimetoato, o fosmete e o azinfós metil apresentaram heterocedasticidade. No entanto, todos os agrotóxicos tiveram a avaliação da regressão significativa.



### 4.3 – Seletividade do método

A seletividade do método foi avaliada com a extração do frasco 1 pela metodologia mini-Luke modificada. A Figura 11 representa o TIC obtido da análise desse frasco 1. A amostra foi considerada adequada para o uso na validação da metodologia devido à ausência de interferentes da matriz na seleção dos íons fragmentos para cada substância estudada.

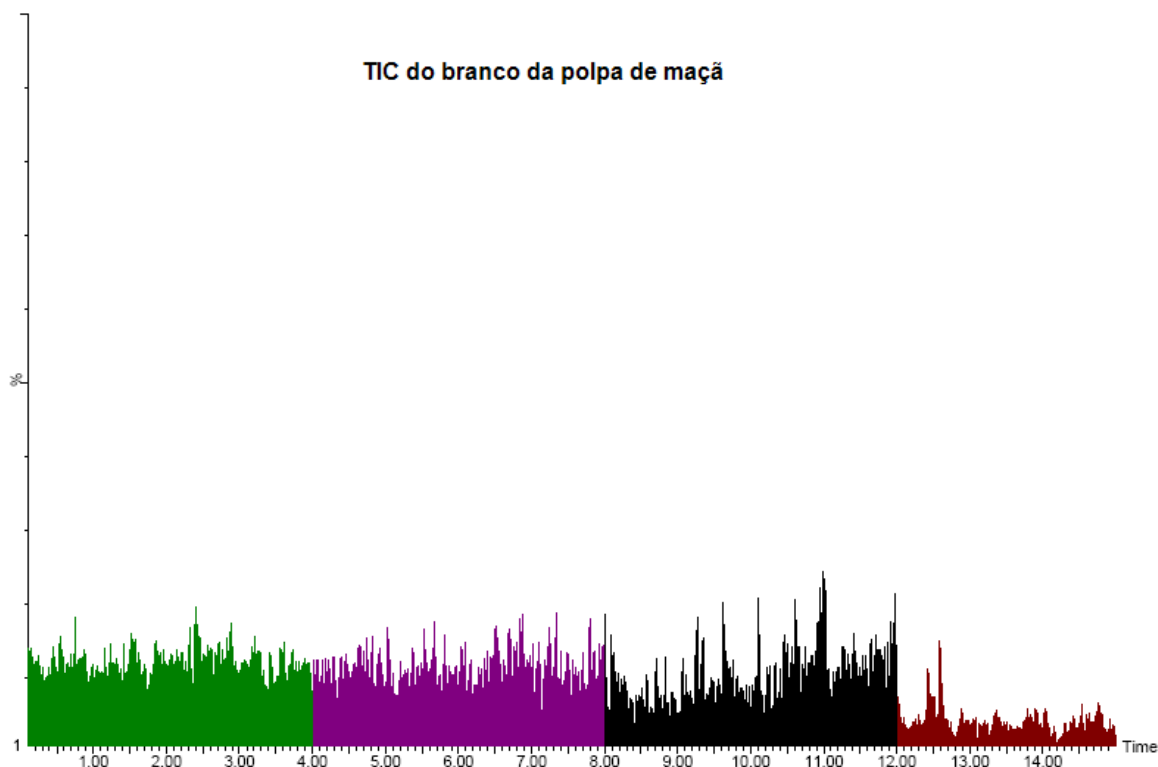


Figura 11 – Branco da polpa de maçã obtido na avaliação da seletividade da metodologia.

### 4.4 – Exatidão – tendência como recuperação e Precisão - Repetitividade

Na avaliação da exatidão e precisão com os ensaios de recuperação os resultados foram satisfatórios para todos os agrotóxicos analisados com exceção do clorpirifós. Os resultados das recuperações encontradas foram dentro dos limites de 70 a 120% definidos pelo Codex (2010). E a precisão medida sob condições de repetitividade avaliada pelo coeficiente de variação (CV(%)) e/ou estimativa do desvio padrão relativo (DPR(%)) também foram dentro do limite de 20% (SANCO, 2010).

#### 4.5 – Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação encontrados para as fortificações feitas foram adequados para as substâncias estudadas, abaixo dos LMR.

Na Tabela 18 encontram-se os resultados das etapas de validação da metodologia.

Tabela 18 - Resultados dos estudos de precisão, exatidão, LD e LQ dos agrotóxicos selecionados para o estudo.

Substância	Limite de Detecção (mg.kg <sup>-1</sup> )	Limite de Quantificação (mg.kg <sup>-1</sup> )	Precisão Repetitividade CV (%)	Exatidão Recuperação (%)
Famoxadona	0,00119	0,00859	3	90
Etrinfós	0,00061	0,00841	6	102
Clorpirifós	0,00099	0,00967	11	64
Clorpirifós Metil	0,00344	0,00939	6	78
Azinfós Metil	0,00212	0,00845	5	91
Dimetoato	0,00064	0,00812	11	87
Fosmete	0,00260	0,00859	7	89

Para comprovação da capacidade de quantificação dessas substâncias próximas ao limite de quantificação calculado foi feita a fortificação das amostras dos frascos 10 a 13. Com os resultados obtidos foi observada a capacidade de quantificação da metodologia validada nos limites especificados.

No Anexo 3 encontram-se os cromatogramas dessa etapa do trabalho.

A metodologia com os resultados encontrados foi considerada validada para a famoxadona, etrinfós, dimetoato, fosmete e azinfós metil. Em relação ao clorpirifós metil para a comprovação da validação da metodologia outra faixa de trabalho deverá ser estudada. Para os agrotóxicos dimetoato, fosmete e azinfós metil, onde as avaliações das curvas analíticas foram heterocedásticas, tornou-se necessário a utilização de um fator de ponderação para o cálculo das amostras a serem avaliadas. Para o agrotóxico clorpirifós outra faixa de concentração para a fortificação deverá ser estudada para a adequação dos limites de recuperação de 70 a 120% definidos pelo Codex (2010). As

dificuldades encontradas na separação do azinfós metil com o fosmete não influenciaram na análise quantitativa dessas substâncias visto que as recuperações encontradas foram adequadas para os níveis avaliados.

## **5 – Conclusão**

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

Nesse desafio as metodologias de análise adequadas são as multirresiduais que englobam a quantificação desses agrotóxicos em apenas uma análise.

Informações de identificação, quantificação e confirmação da presença dos resíduos dessas substâncias são importantes para avaliação do risco real pelo qual a população consumidora está exposta.

No presente contexto o desenvolvimento e otimização dos parâmetros da técnica analítica selecionada para o presente estudo demonstraram ser adequados para a metodologia proposta dentro dos padrões internacionais de qualidade. Os requisitos mínimos de validação analítica foram alcançados e as etapas realizadas representam um modelo a ser implementado no laboratório para desenvolvimento da metodologia proposta para cerca de duzentos diferentes agrotóxicos em matrizes de alimentos.

O início do trabalho com a técnica analítica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial desenvolvido no estudo foi o marco inicial para a utilização do equipamento adquirido no laboratório de resíduos de agrotóxicos do INCQS/FIOCRUZ em agosto de 2009.

## Referências

ANVISA. **Agrotóxicos: Agência discute o controle de resíduos no Senado.** 25 nov. 2009. Disponível em:  
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia#>>.  
Acesso em: 06 jan. 2010.

ANVISA. **Monografias Autorizadas.** Disponível em:  
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>>.  
Acesso em: 01 jan. 2010a.

ANVISA. **Nota Técnica para Divulgação dos Resultados do PARA de 2008.** Brasília, 15 de abril de 2008. Disponível em:  
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>>.  
Acesso em: 06 jan. 2010.

ANVISA. **Relatório de Atividades de 2001-2007 Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA).** Brasília, 16 de junho de 2008a. Disponível em:  
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>>.  
Acesso em: 06 jan. 2010.

ANVISA. **Relatório de Atividades de 2009 Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA).** Brasília, 22 de junho de 2010. Disponível em:  
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>>.  
Acesso em: 23 jun. 2010.

ANVISA. Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v.40, n.2, p.361-363. 2006.

BANERJEE, K. et al. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1173, p.98-109. 2007.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 jan. 2002.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 jul. 1989.

CARDOSO, M. H. W. M. **Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. 191 p. (Tese Doutorado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Pesticide Residues in Food. Methods of analysis and sampling**. 2ed., Roma, 2000, v.2A, part 1.

SANCO. European Commission. **Method Validation and Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis in Food and Feed**. Document No. SANCO/10684/2009, p. 53, 2010. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf)>. Acesso em: 01 jan. 2010.

FERREIRA, P. **Agronegócio: Yes, nós temos maçãs**. Revista Inovação em Pauta, n. 5, p. 43-47, 2008. Disponível em: <[http://www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao5/inovacao\\_em\\_pauta\\_5\\_pag43a47\\_macas.pdf](http://www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao5/inovacao_em_pauta_5_pag43a47_macas.pdf)>. Acesso em: 01 mai. 2009.

HIEMSTRA, M.; KOK, A. D. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1154, p.3-25. 2007.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Em abril, o IBGE, prevê safra recorde para 2010**. 06 mai. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias>>. Acesso em: 13 mar. 2010.

IGLESIAS, A. H.; Introdução à Espectrometria de Massas. [S. l.]: Waters Corporation, 2009. 221p. Apresentação em power-point.

INMETRO, **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**, DOQ-CGCRE-008, 2010.

INMETRO, **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. D. A.; QUEIROZ, S. C. D. N. D. Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v.32, n.4, p.996-1012. 2009.

KARABELAS, A. J. et al. Impact of european legislation o marketed pesticides - a view from the standpoint of health impact assessment studies. **Environment International**, v.35, p.1096-1107. 2009.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida (LC)/ Espectrometria de Massas: A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente "compatíveis"? **Scientia Chromatographica**, v.1, n.2, p.35-61. 2009.

LEANDRO, C. C. et al. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1103, p.94-101. 2006.

LEANDRO, C. C. et al. Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in foods by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching. **Journal of Chromatography A**, v.1144, p.161-169. 2007.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O Estado da Arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, p.214-222. 2009.

MELLO-DA-SILVA, C. A.; FRUCHTENGARTEN, L. Riscos químicos ambientais à saúde da criança. **Jornal de Pediatria**, v.81, n.5 sup, p.s205-s211. 2005.

NIST. **Base de Dados de Referência Padrão do NIST Número 69 – NIST Livro de Química na Web**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 03 jan. 2011.

OLIVEIRA-SILVA, J. J. et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.35, n.2, p.130-135. 2001.

PEREZ, F.; MOREIRA, J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.23, n.sup 4, p.s612-s621. 2007.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de Métodos Multirresíduos de Extração e Desenvolvimento de Método de Purificação por GPC para Análise de Resíduos de Pesticidas em Soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS.** Santa Maria: UFSM, 2006. 329 p. (Tese Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas Programa de Pós-Graduação em Química, Santa Maria.

PORTAL BRASIL. **Valor da produção agrícola deve crescer 3,2% em 2010.** 12 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias>>. Acesso em: 13 mar. 2010.

PRESTES, O. D., et al. QUECHERS - Um método moderno de preparo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1620-1634. 2009.

RIBANI, M. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780. 2004.

SIQUEIRA, S. L. D.; KRUSE, M. H. L. Agrotóxicos e Saúde Humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.42, n.3, p.584-590. 2008.

SOBREIRA, A. E. G.; ADISSI, P. J. Agrotóxicos: falsas premissas e debates. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.8, n.4, p.985-990. 2003.

STOPPELLI, I. M. D. B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e Segurança Alimentar: A Questão dos Agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.10, n.sup, p. 91-100. 2005.

UNIFESP, **Base de Dados de Nutrientes.** Disponível em: <<http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/nutri.php?id=198>>. Acesso em: 03 jan 2011.

VEIGA, M. M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**.v. 12, n. 1, p. 145-152, 2007.

WATERS CORPORATION. **ACQUITY UPLC System - Quick Start Guide.** Revision D, 2004 – 2008.

WATERS CORPORATION. **MASSLYNX 4.1 - Getting Started Guide**. Revision A, 2005.

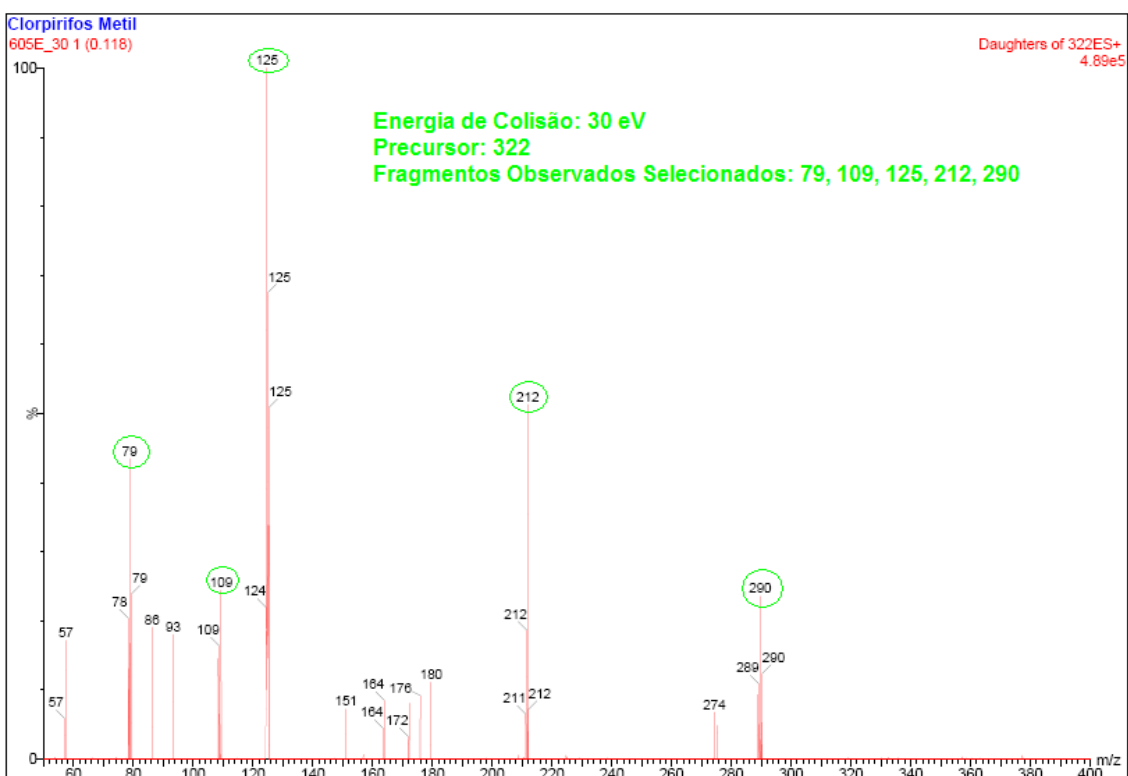
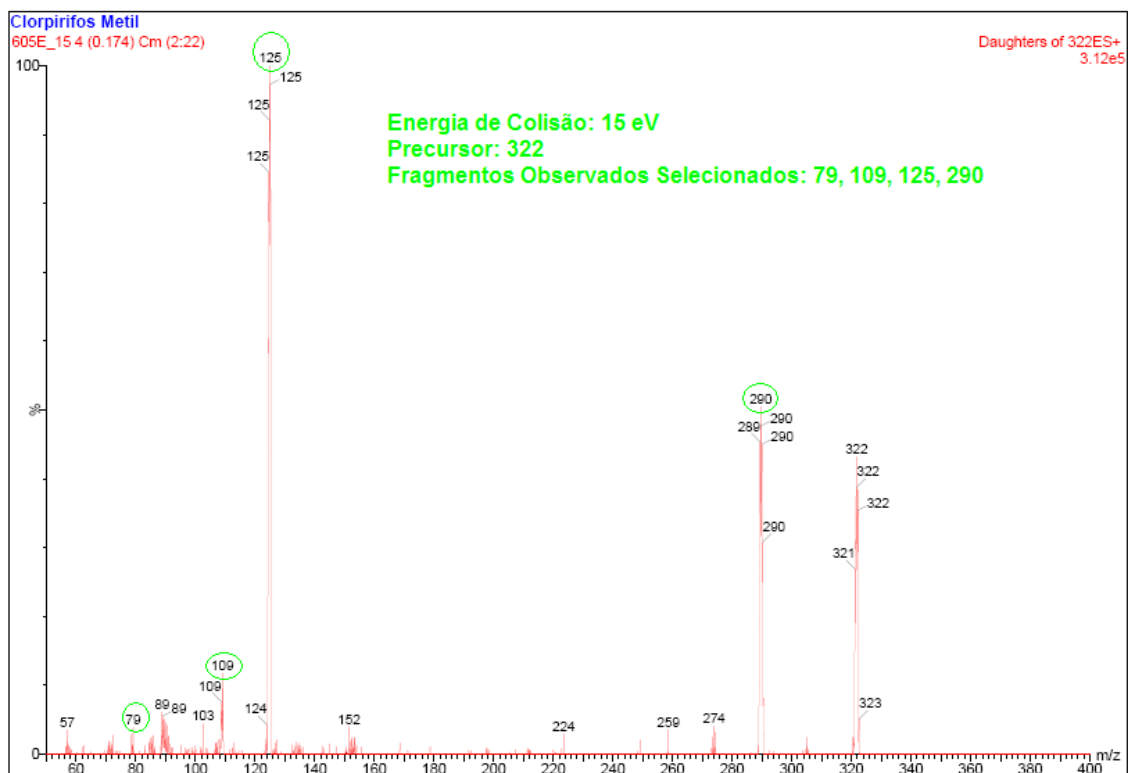
WATERS CORPORATION. Operator's Guide. 2004-2008. 532 p.

WATERS CORPORATION. **WATERS MICROMASS Quattro Premier XE Mass Spectrometer - Operator's Guide**. Revision B, 2005.

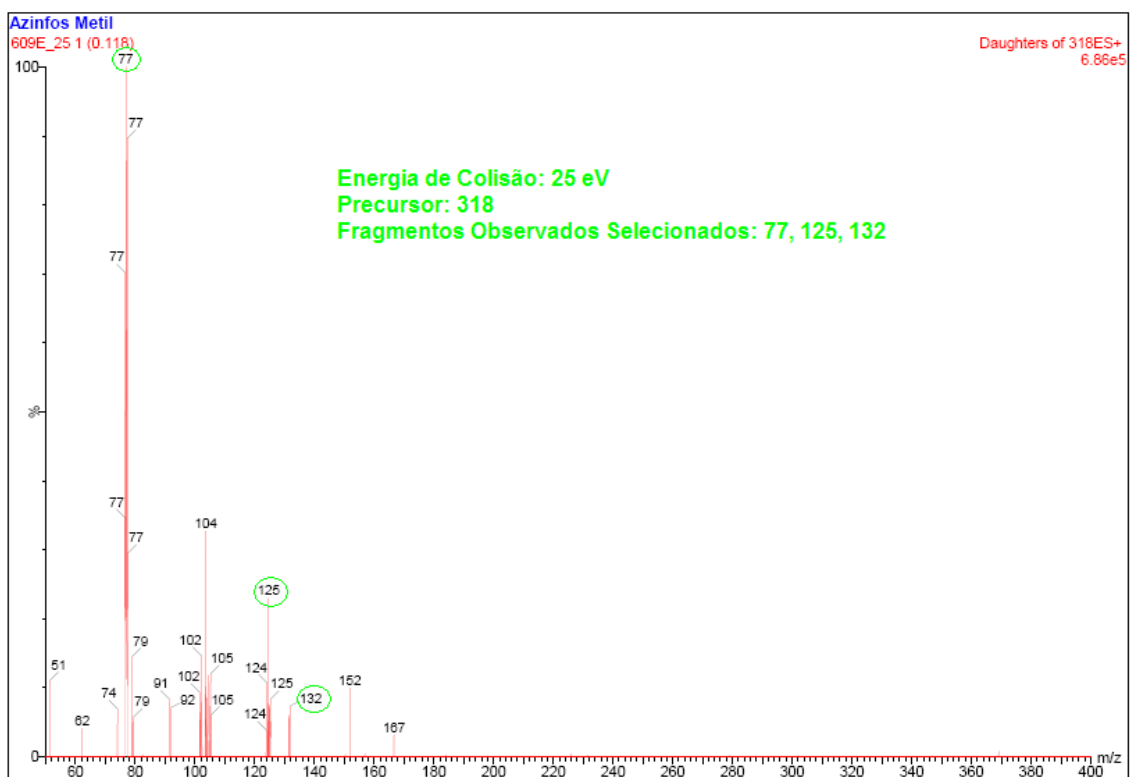
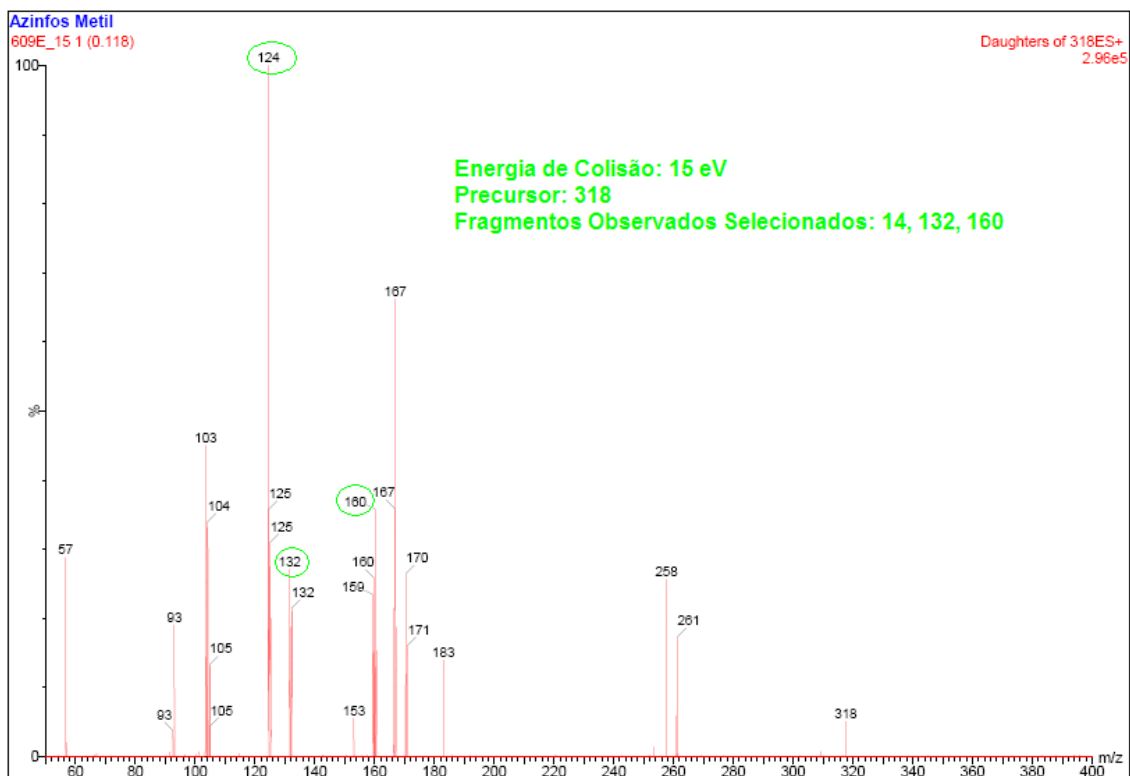


**Anexo 1 – Espectros de massas obtidos dos agrotóxicos avaliados no estudo com duas diferentes energias de colisão.**

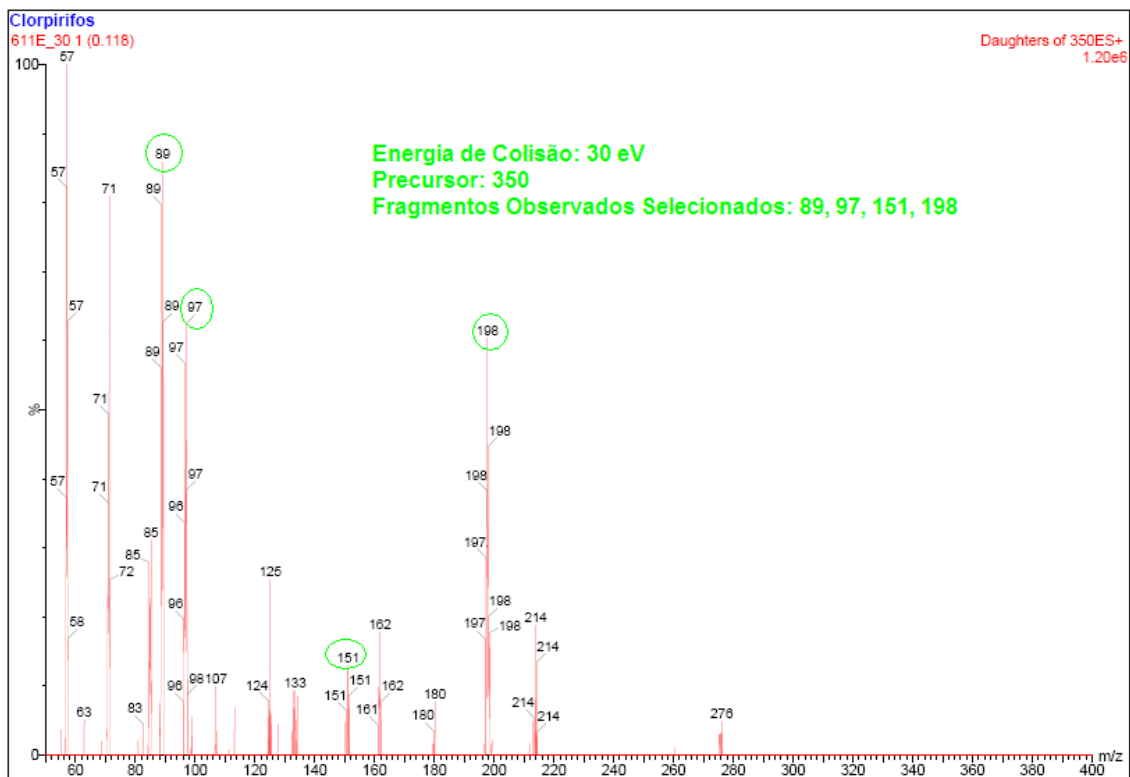
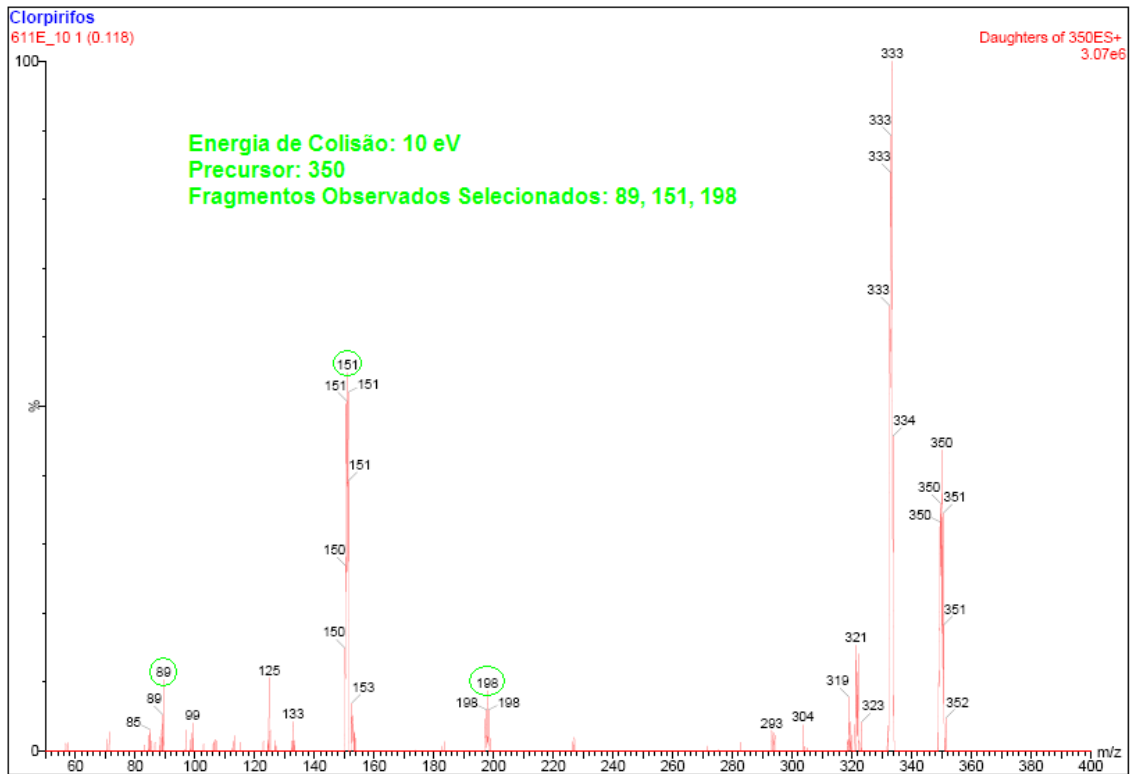
**Espectros de massas obtidos do clorpirifós metil com energias de colisão de 15 e 30 eV, respectivamente.**



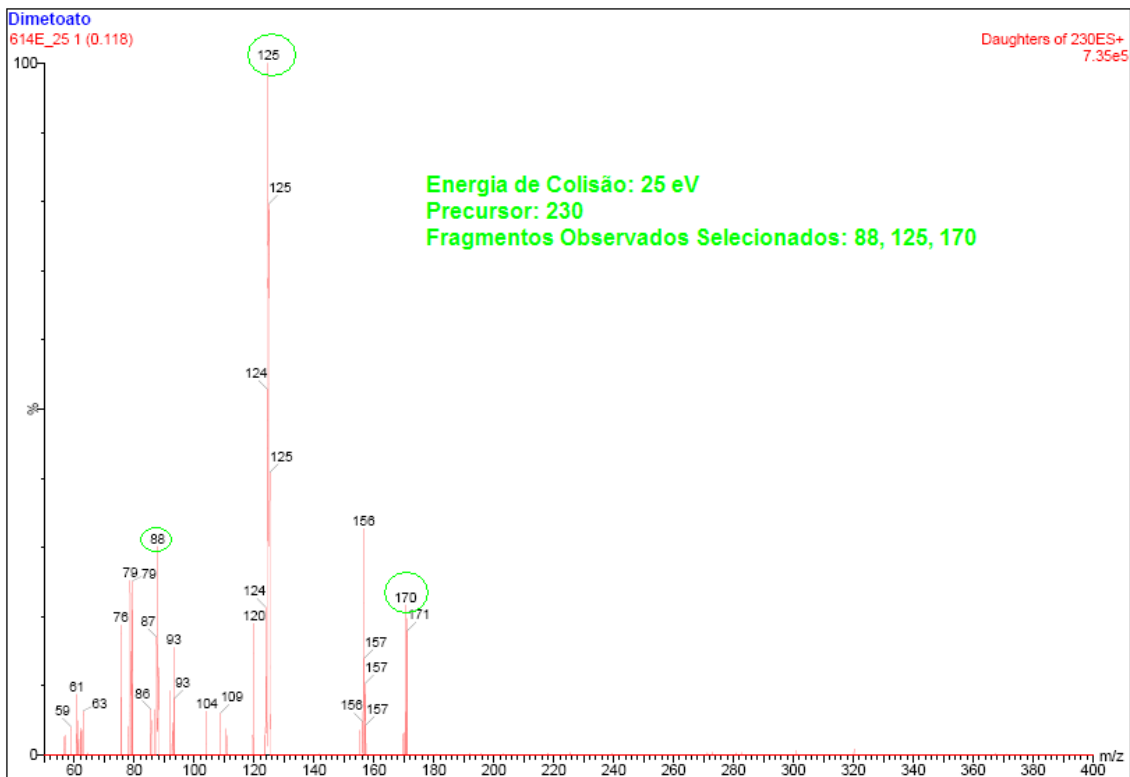
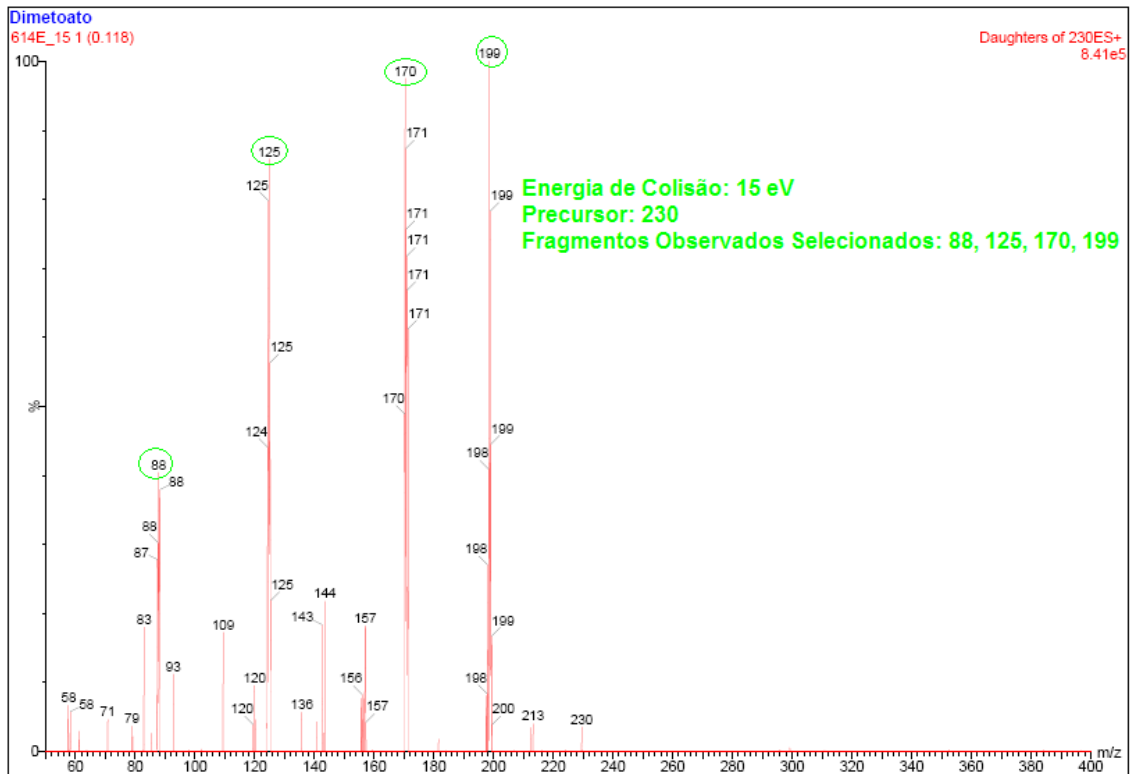
**Espectros de massas obtidos do azinfós metil com energias de colisão de 15 e 25 eV, respectivamente.**



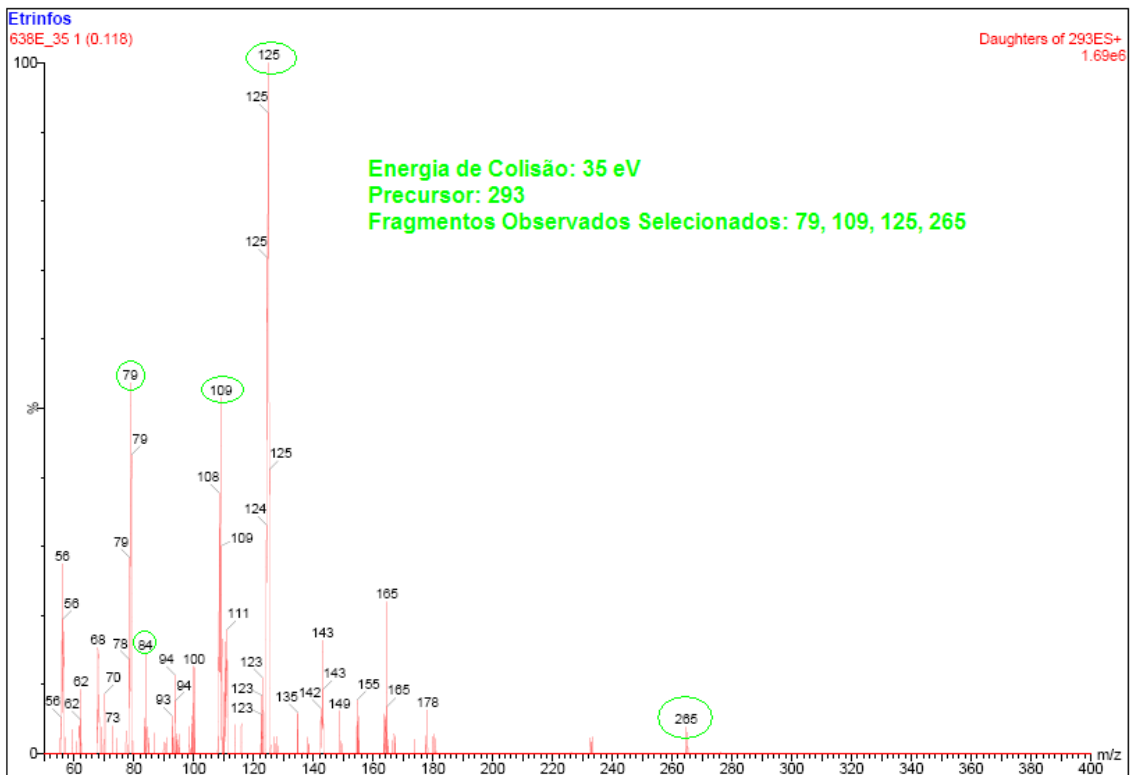
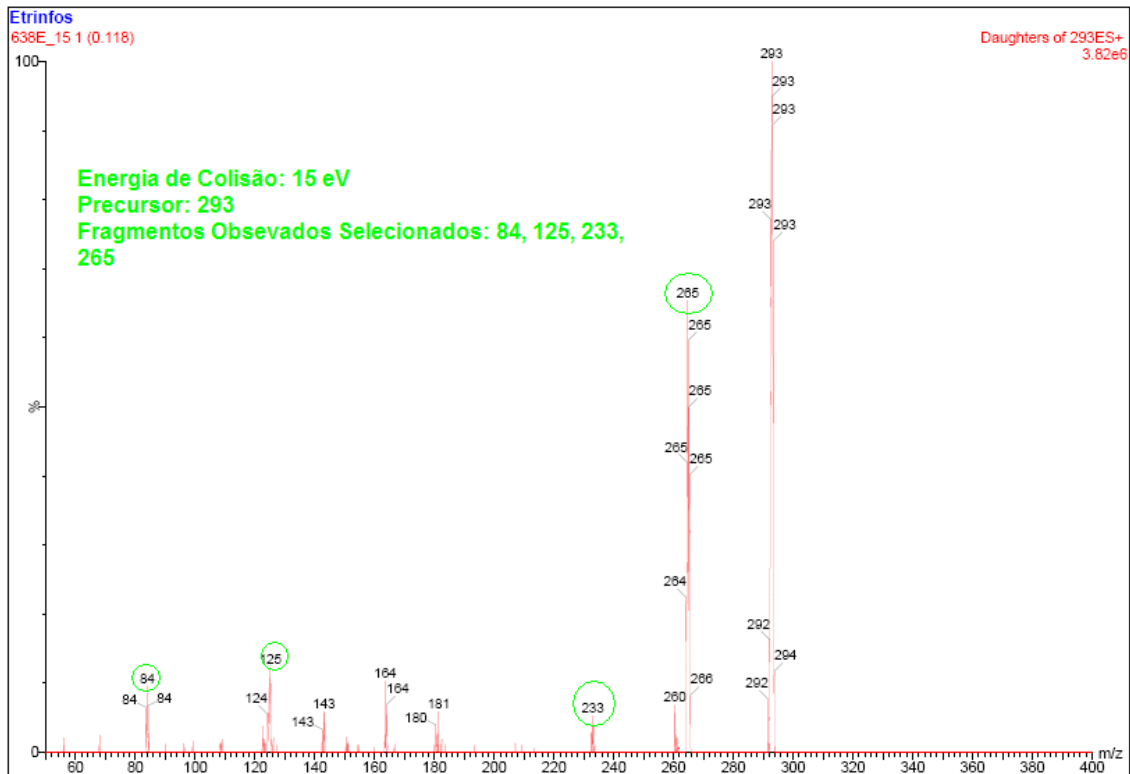
**Espectros de massas obtidos do clorpirifós com energias de colisão de 10 e 30 eV, respectivamente.**



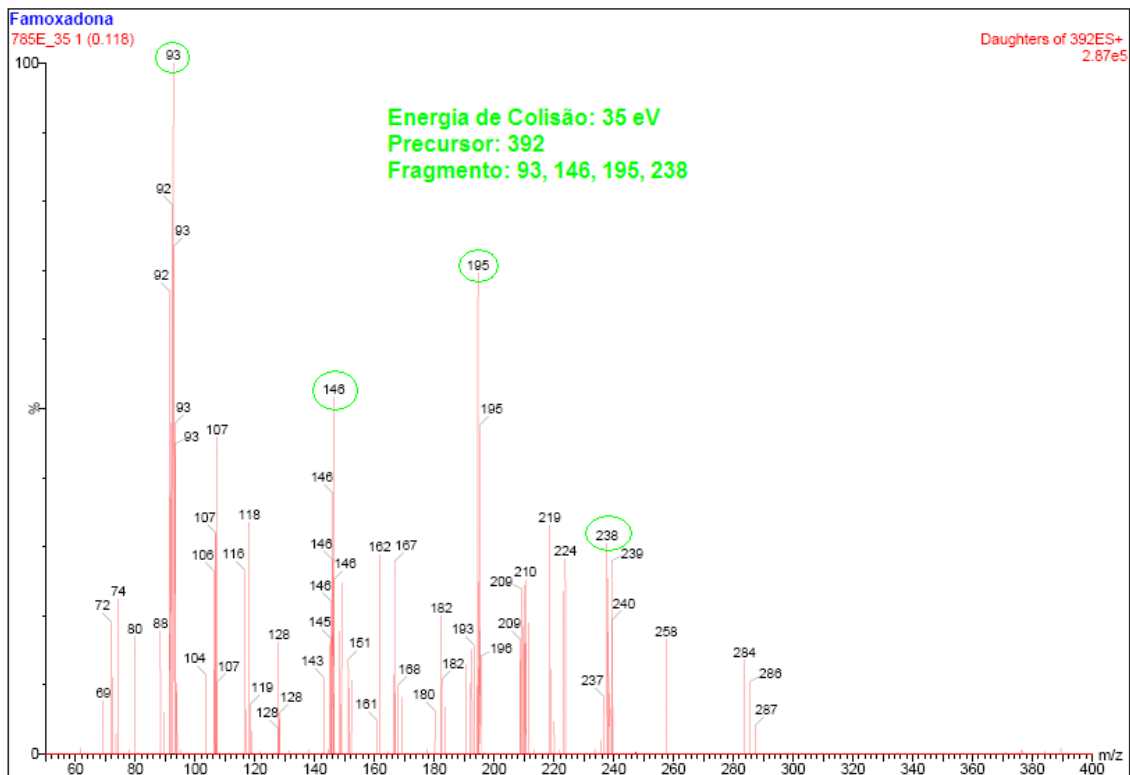
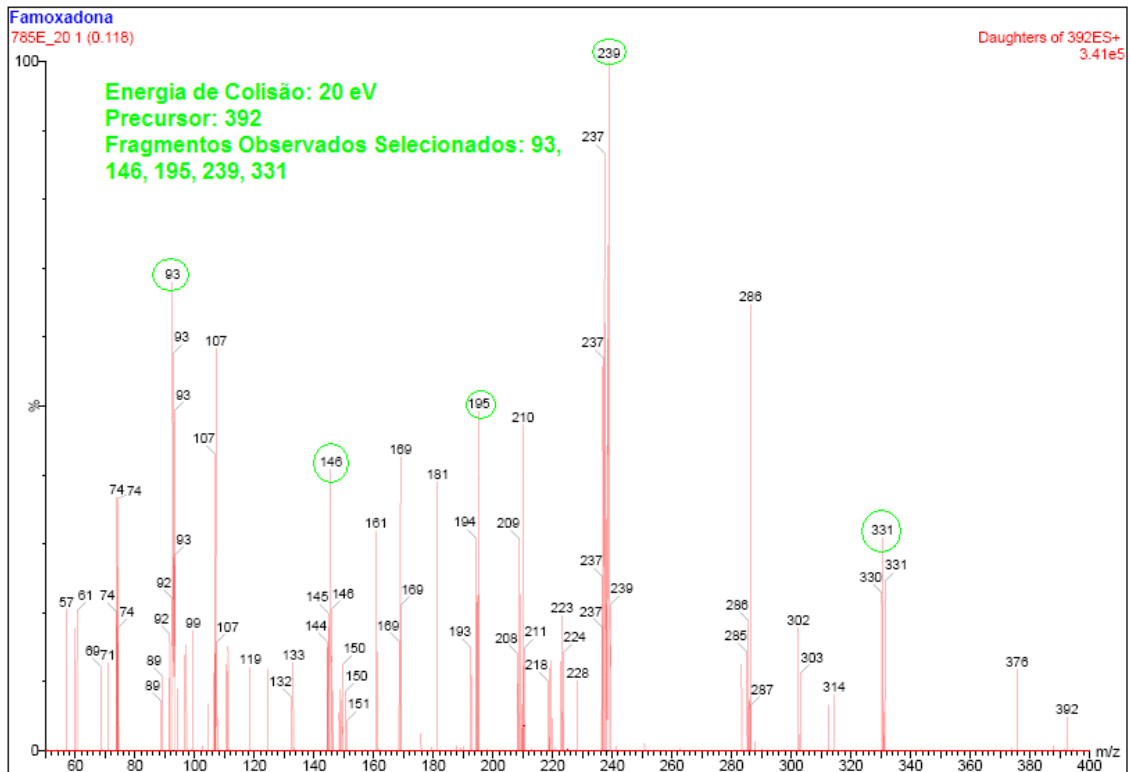
**Espectros de massas obtidos do dimetoato com energias de colisão de 15 e 25 eV, respectivamente.**



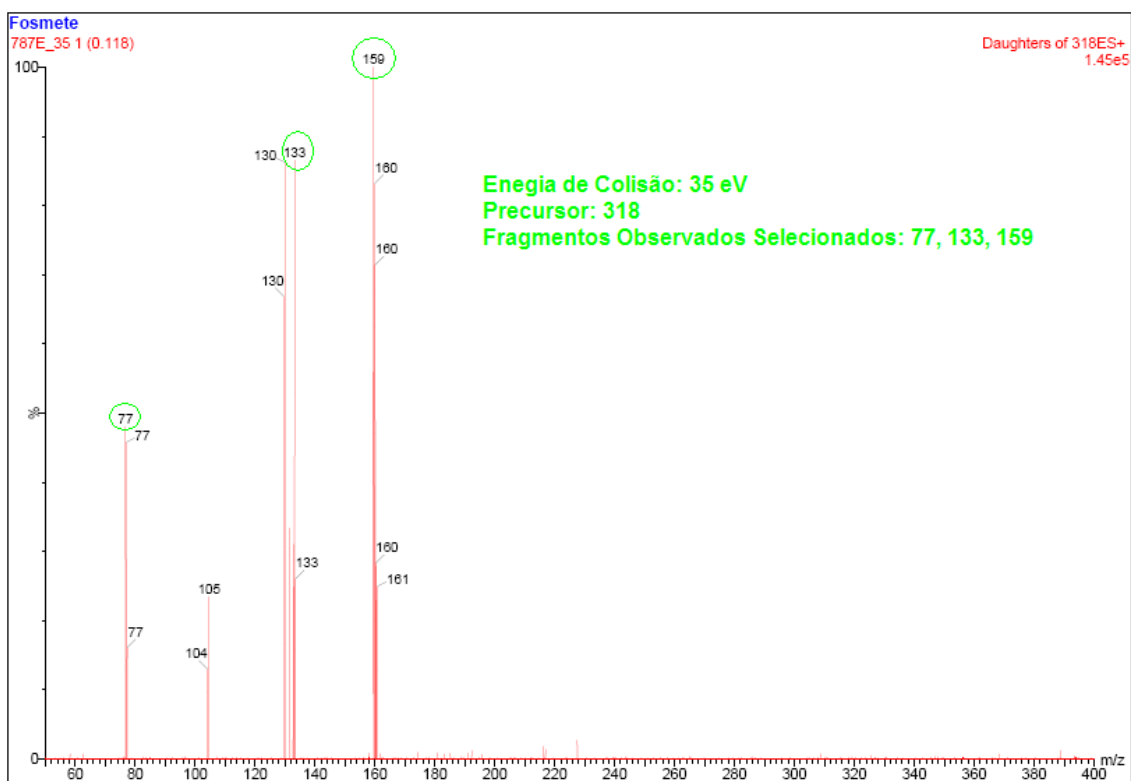
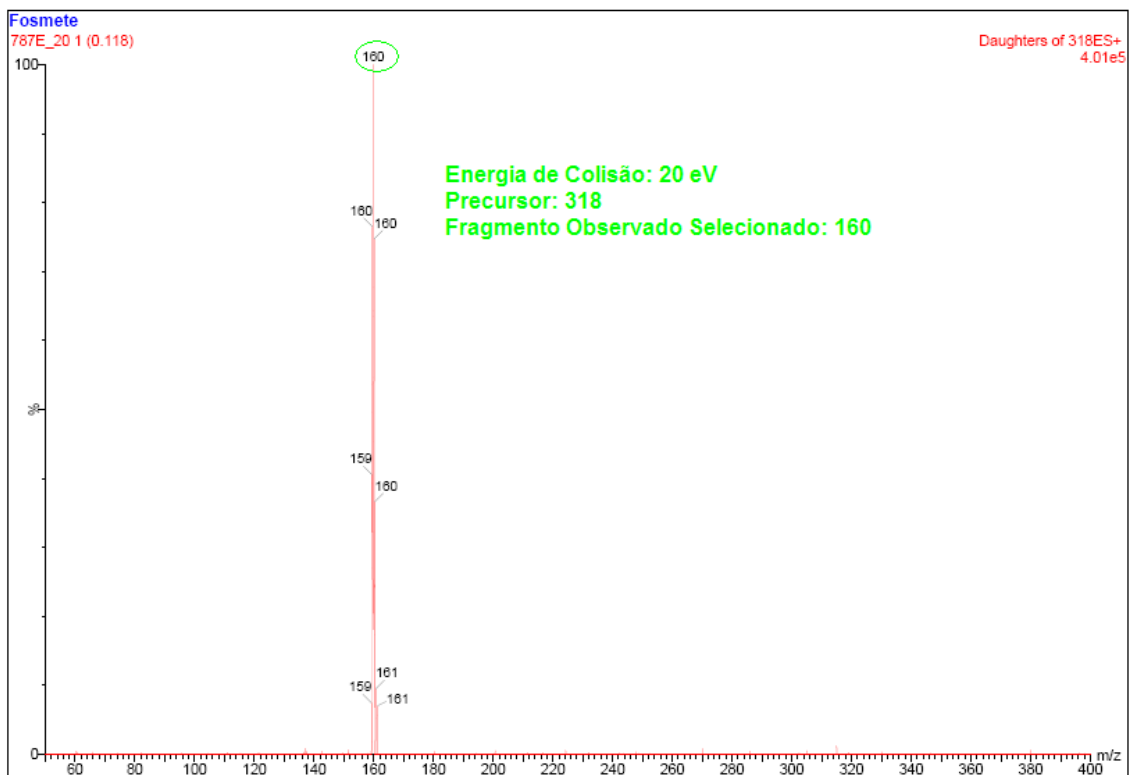
**Espectros de massas obtidos do etrinfós com energias de colisão de 15 e 35 eV, respectivamente.**



**Espectros de massas obtidos da famoxadona com energias de colisão de 20 e 35 eV, respectivamente.**

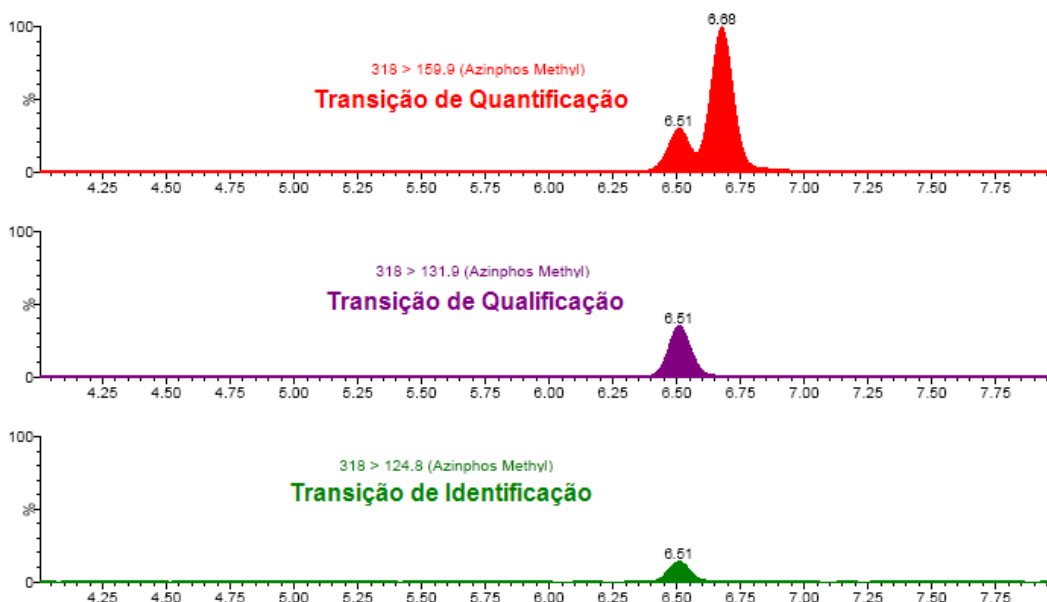


**Espectros de massas obtidos da fosmete com energias de colisão de 20 e 35 eV, respectivamente.**

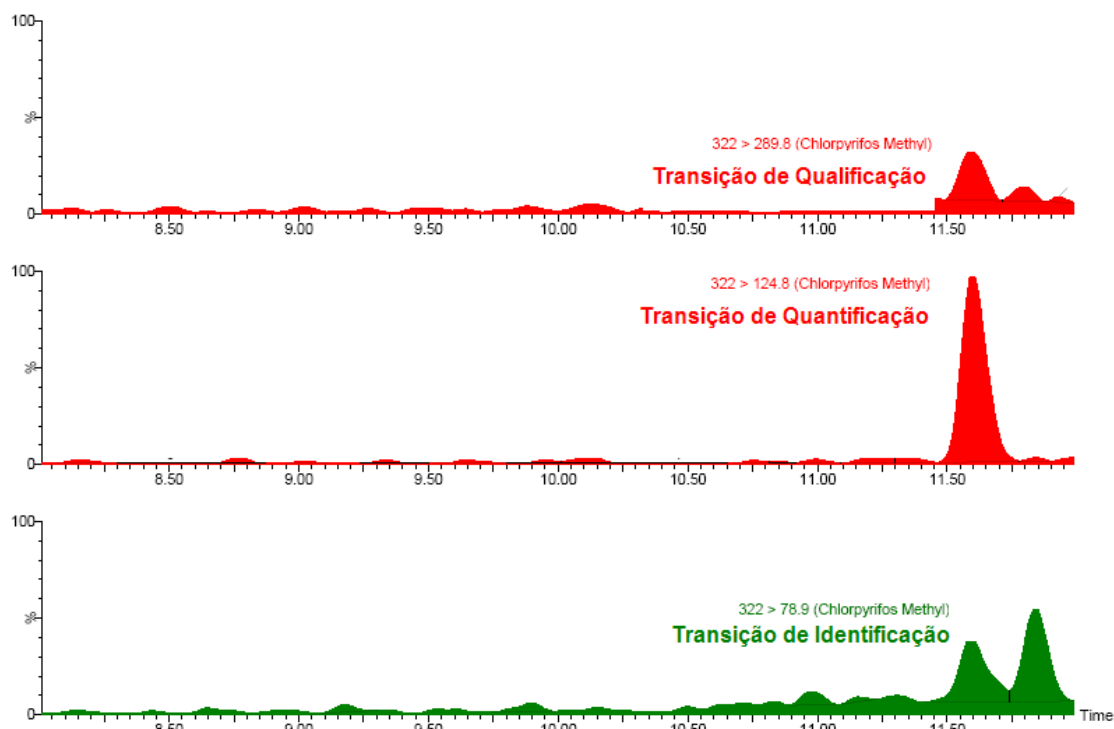


**Anexo 2 - Cromatogramas dos íons fragmentos selecionados como quantificador, qualificador e identificador para cada substância do estudo.**

**Transições do azinfós metil.**

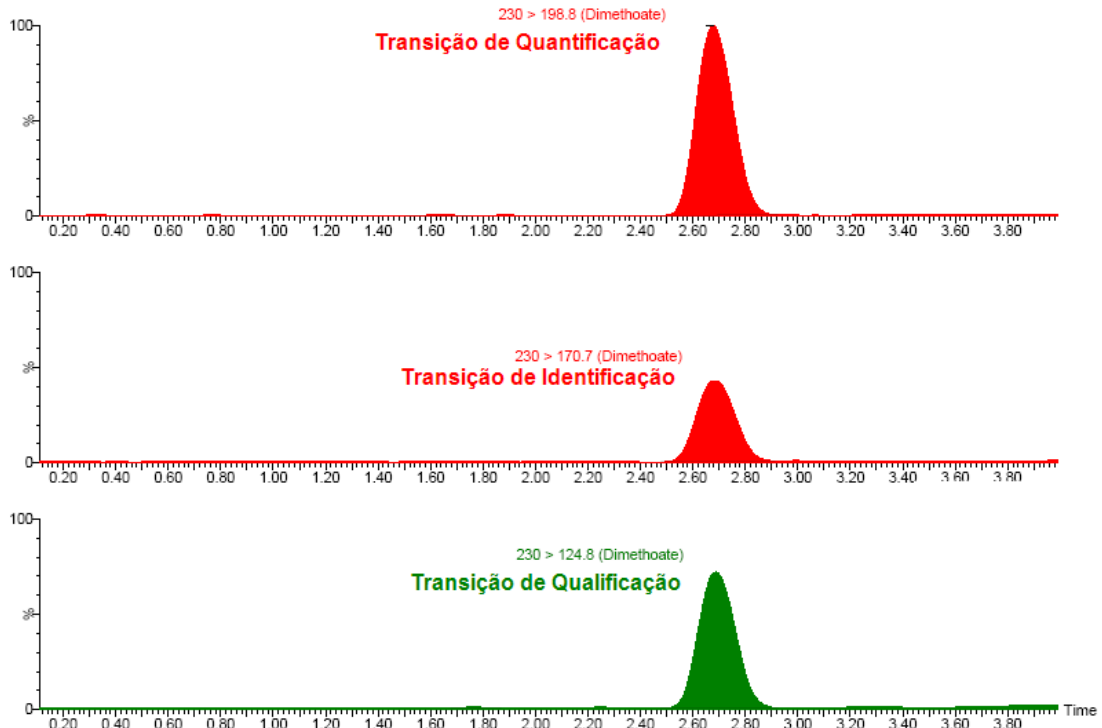


**Transições do clorpirifós metil.**

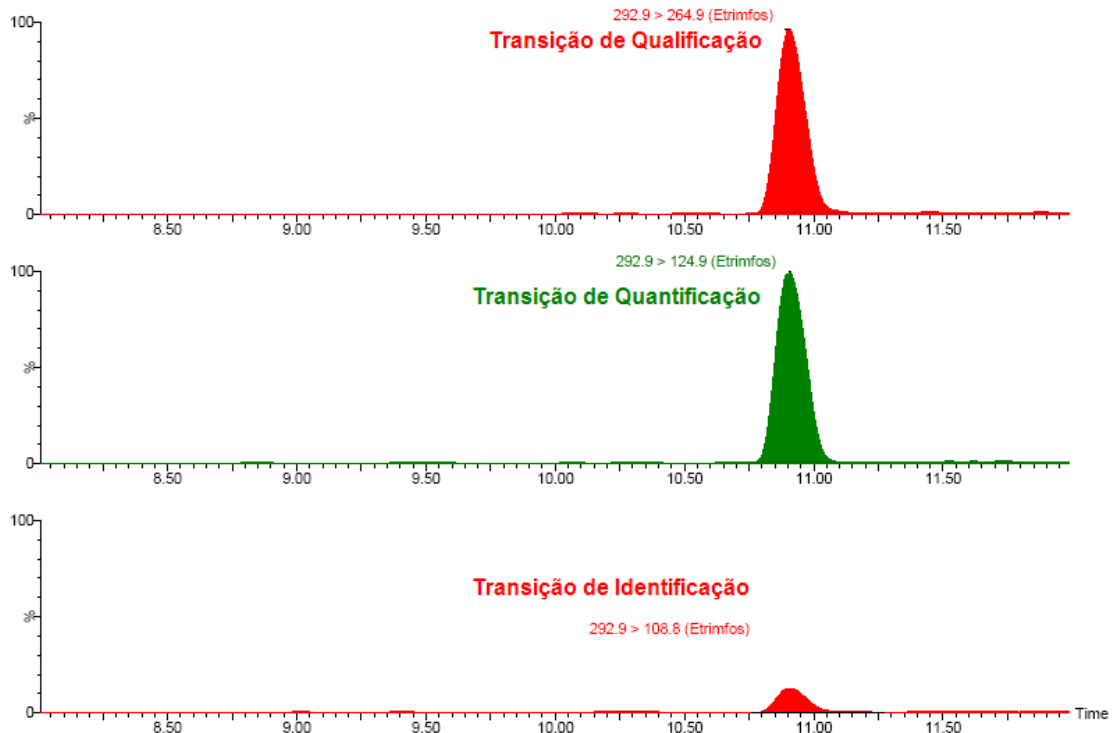




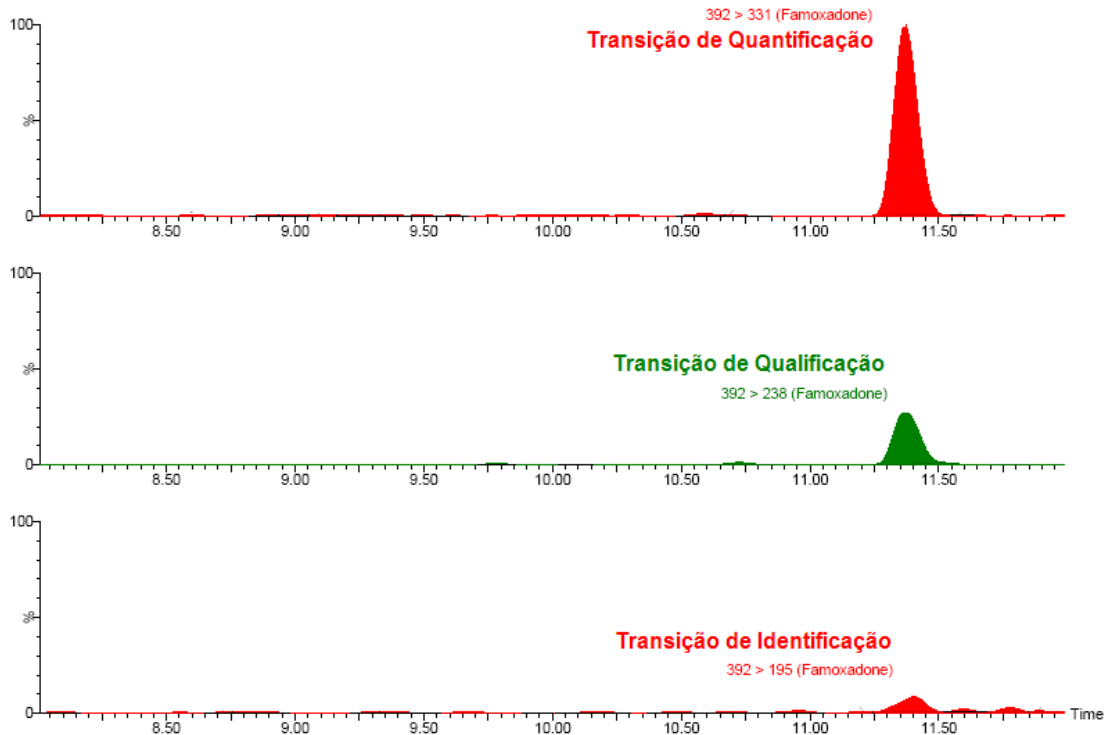
## Transições do dimetoato.



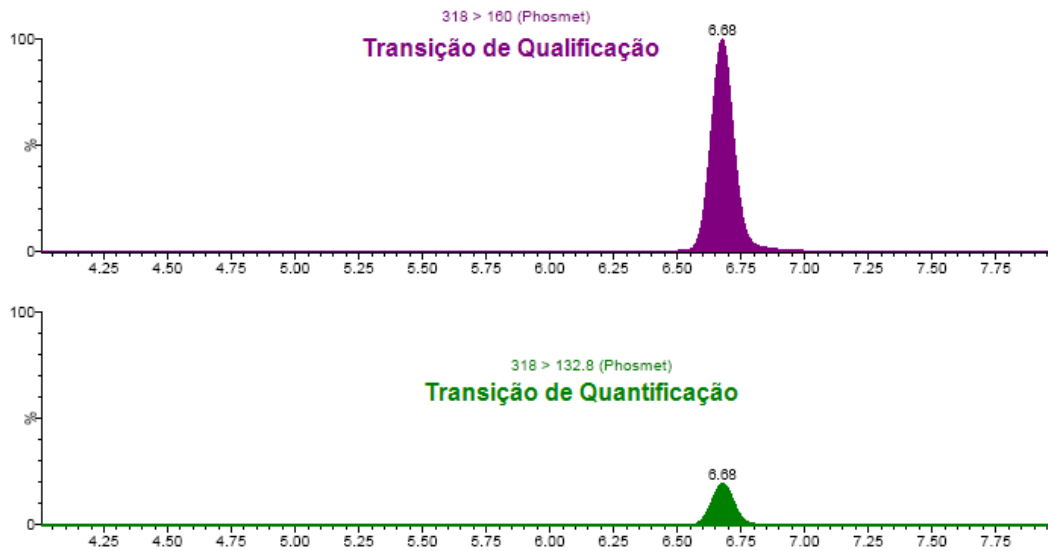
## Transições do etrimfos.



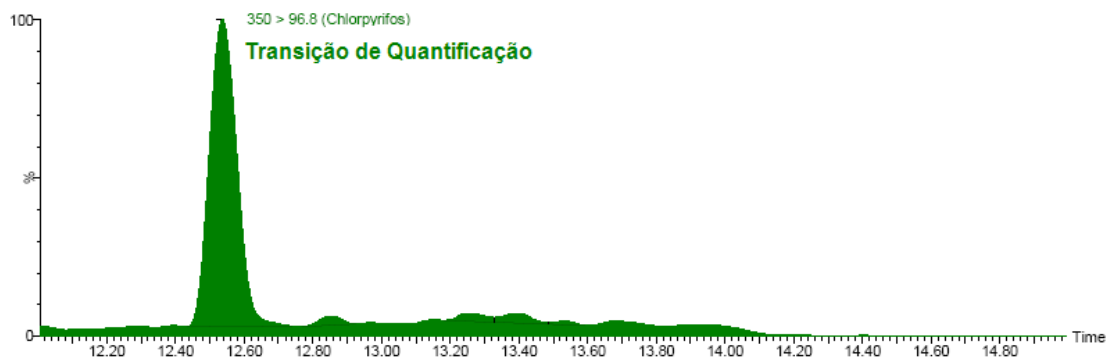
## Transições da famoxadona.



## Transições do fosmete.

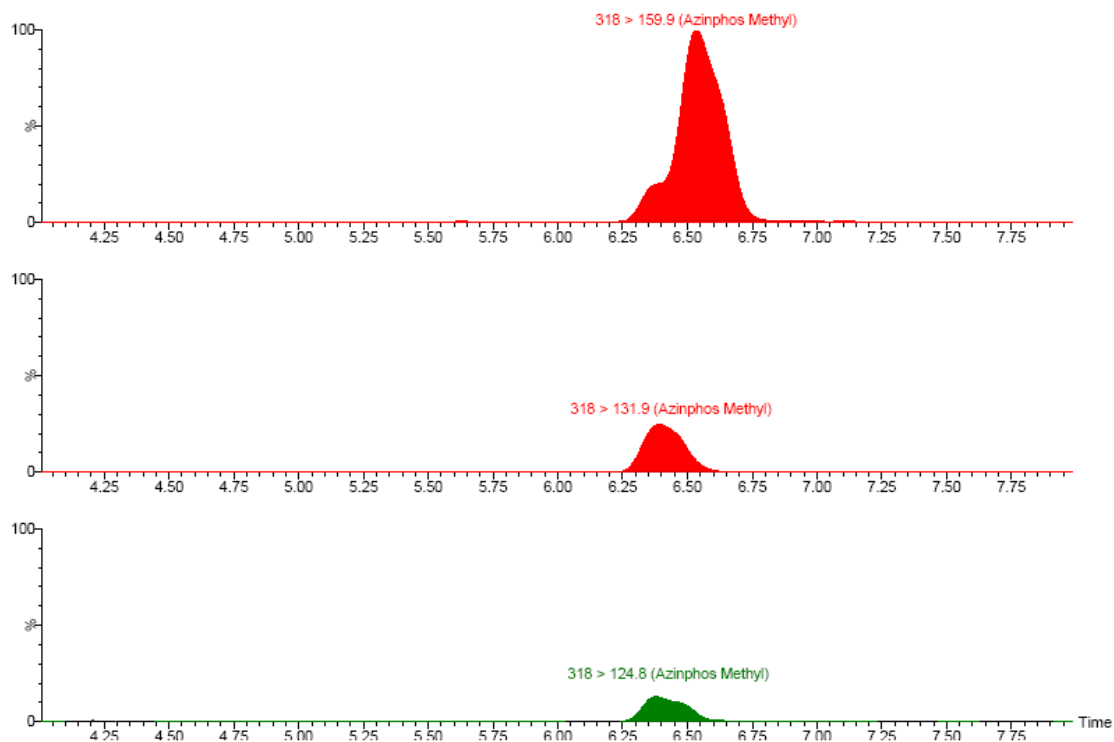


## Transições do clorpirifós.

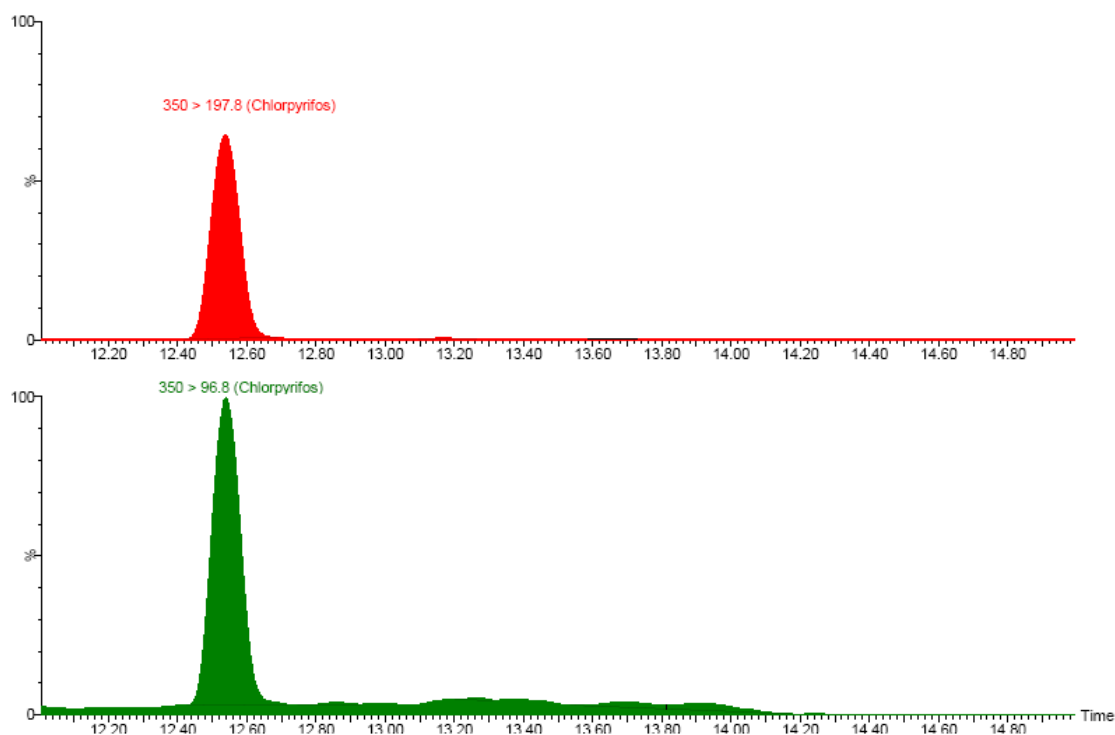


**Anexo 3 – Cromatogramas dos íons fragmentos para a avaliação do limite de quantificação para os agrotóxicos avaliados no estudo.**

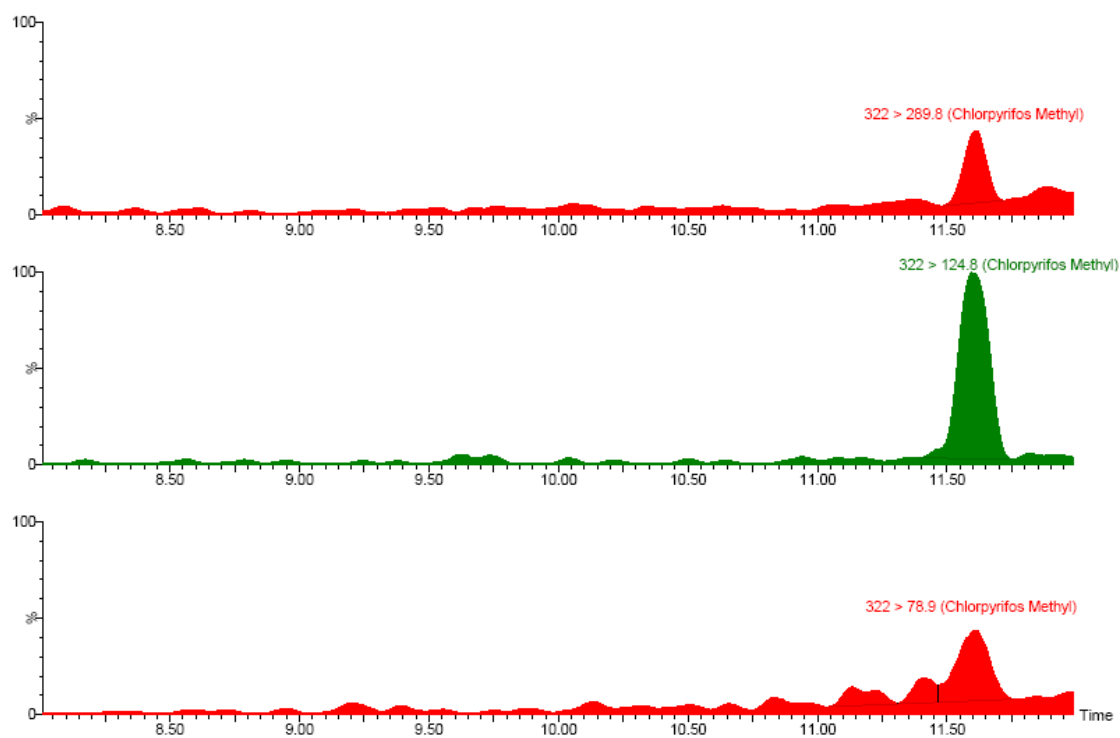
**Cromatogramas dos íons fragmentos para a avaliação do limite de quantificação do azinphos metil.**



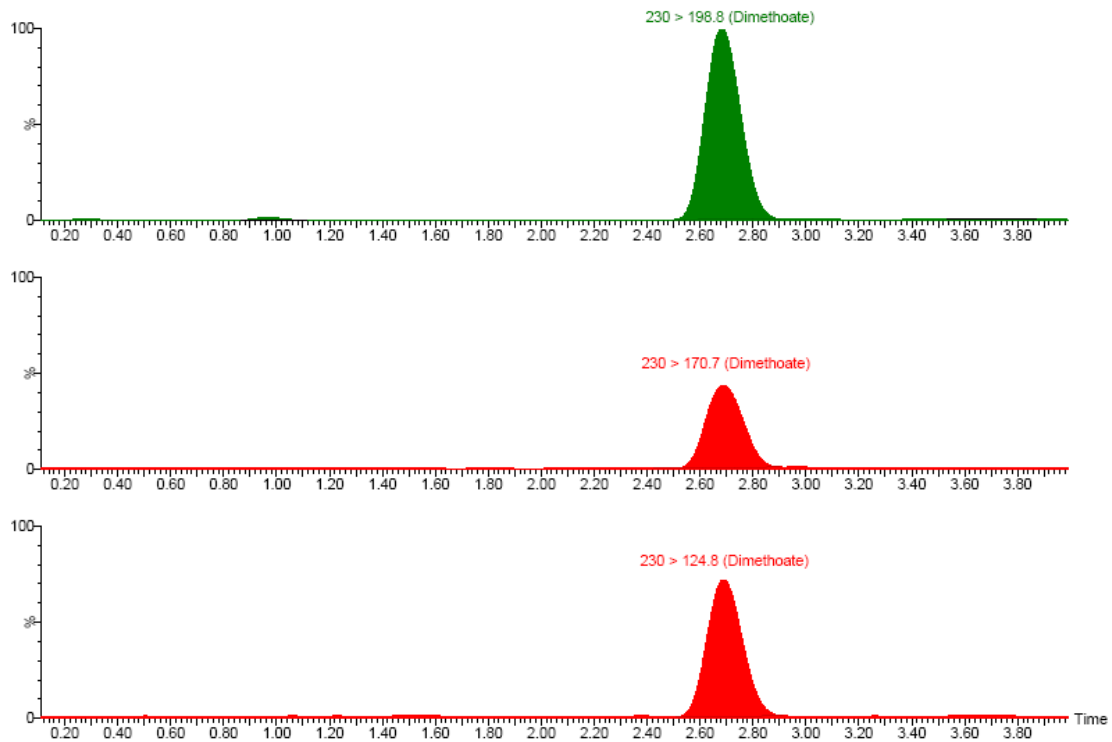
## Cromatogramas dos íons fragmentos para a avaliação do limite quantificação do clorpirifós.



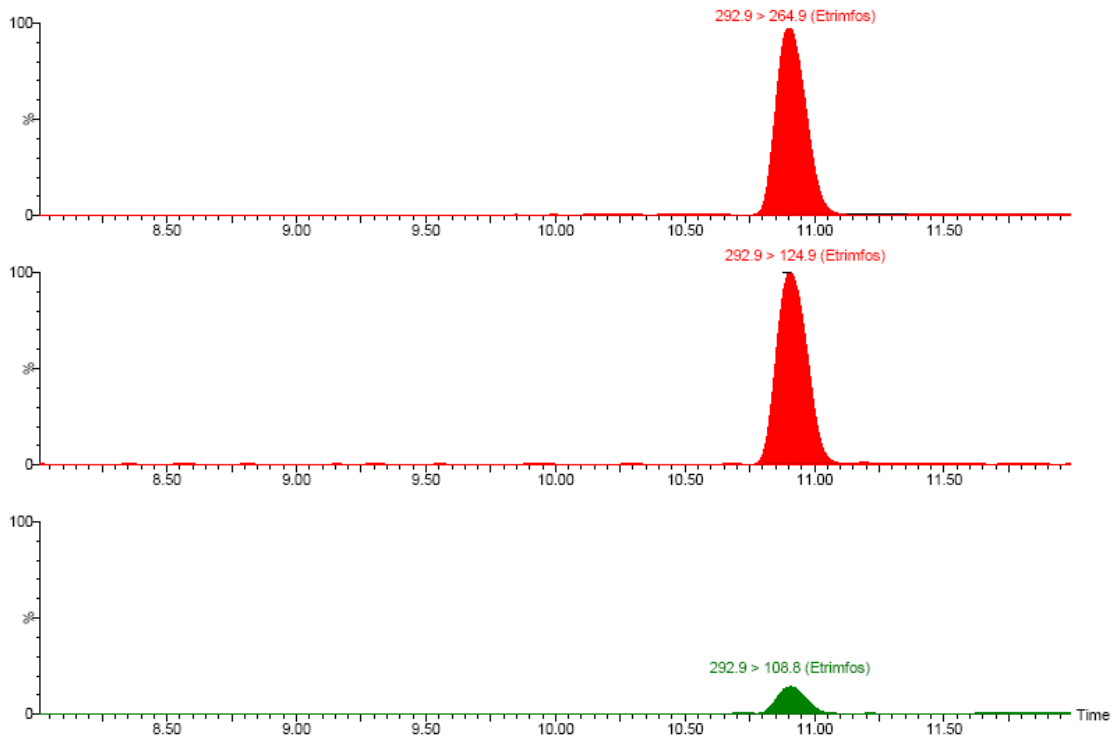
## Cromatogramas dos íons fragmentos para a avaliação do limite quantificação do clorpirifós metil.



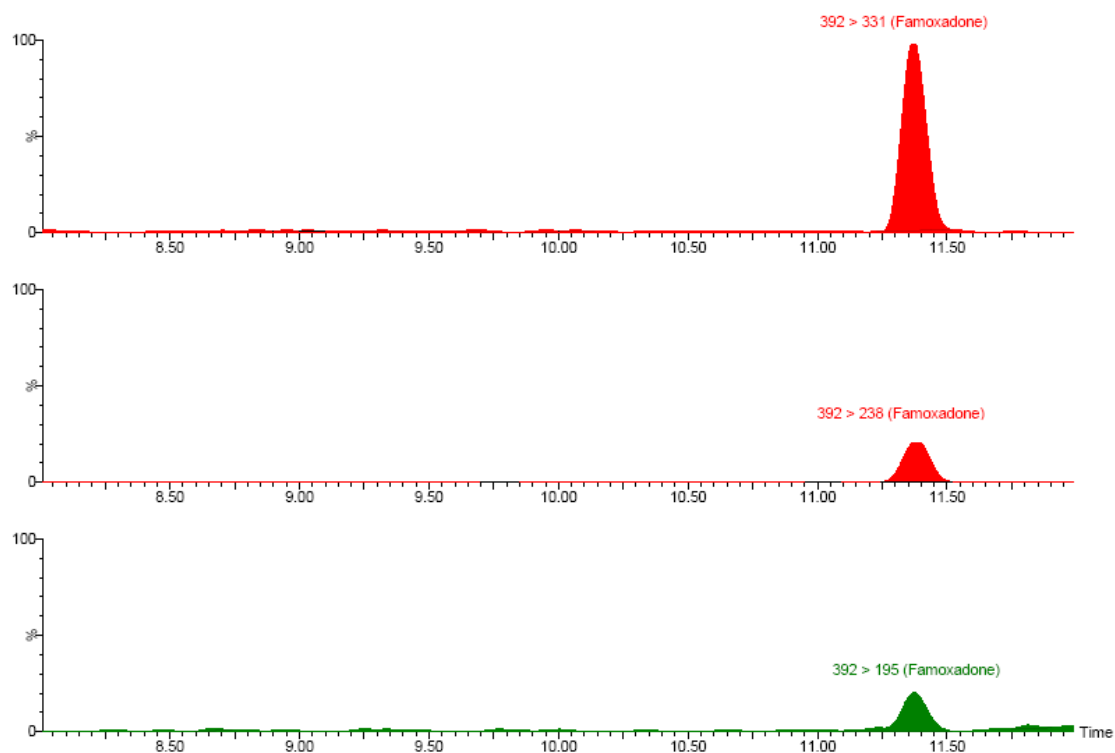
## Cromatogramas dos íons fragmentos para a avaliação do limite quantificação do dimetoato.



## Cromatogramas dos íons fragmentos para a avaliação do limite quantificação do etrimfós.



## Cromatogramas dos íons fragmentos para a avaliação do limite quantificação da famoxadona.



## Cromatogramas dos íons fragmentos para a avaliação do limite quantificação do fosmete.

