



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BACHARELADO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA**

WAGNER DE ANDRADE CAROLINO

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MODOS DE AQUISIÇÃO SIM E MS/MS POR
DETECTOR *ION TRAP* PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA**

**FORTALEZA - CE
2018**

WAGNER DE ANDRADE CAROLINO

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MODOS DE AQUISIÇÃO SIM E MS/MS POR
DETECTOR *ION TRAP* PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA

Trabalho final apresentado para a disciplina
de Estágio de Iniciação em Pesquisa
Analítica do Curso de Química Bacharelado
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial de aprovação.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do
Nascimento.

FORTALEZA – CE
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C294e Carolino, Wagner de Andrade.

Estudo comparativo entre modos de aquisição de dados SIM e MS/MS por detector íon trap para determinação de agrotóxico em água / Wagner de Andrade Carolino. – 2019.

52 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

Coorientação: Prof. Dr. Vitor Paulo Andrade da Silva.

1. cromatografia gasosa. 2. íon trap. 3. agrotóxico. I. Título.

CDD540

WAGNER DE ANDRADE CAROLINO

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MODOS DE AQUISIÇÃO SIM E MS/MS POR
DETECTOR *ION TRAP* PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA

Monografia apresentada ao Curso de
Química Bacharelado da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial de
aprovação.

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento

Dr. Vítor Paulo Andrade da Silva

Ms. Crisiana de Andrade Nobre

RESUMO

Este estudo tem a finalidade analisar comparativamente modos de aquisição de dados SIM e MS/MS em um cromatógrafo a gás acoplado com detector *íon trap*, para identificação e quantificação de 14 agrotóxicos em amostra de água. Foi empregada a técnica de Microextração em Fase Sólida (SPME) nas análises. A análise comparativa deste estudo revela que o analisador de massa *íon trap* confere maior seletividade e melhor resolução à análise cromatográfica, bem como uma leitura mais livre de interferentes. A amostra real foi submetida a análise por meio de fortificação com os 14 agrotóxicos. De forma geral, o modo de aquisição MS/MS proporcionou resultados com maior exatidão, bem como significativo aumento da resolução dos picos e cromatogramas com menos interferentes.

Palavras-chave: cromatografia gasosa, *íon trap*, agrotóxico.

ABSTRACT

The purpose of this study is to analyze comparatively modes of acquisition of SIM and MS / MS data in a gas chromatograph coupled with ion trap detector, to identify and quantify 14 pesticides in a water sample. A Solid Phase Microextraction (SPME) technique was used in the analysis. The comparative analysis of this study reveals that the ion trap mass analyzer confers higher selectivity and better resolution to the chromatographic analysis, as well as more interference free readings. Actual sampling was subjected to fortification analysis with 14 pesticides. In general, the MS / MS acquisition mode gave results with higher accuracy, as well as significant increase in peak resolution and chromatograms with less interference.

Keywords: gas chromatograph, ion trap, pesticides

Índice de Figuras

Figura 1 - Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrômetro de massa.....	20
Figura 2 - Representação esquemática de um processo utilizando espectrômetro de massas.	21
Figura 3 - quadrupolo íon trap (visão transversal)	22
Figura 4 - Esquema do preparo dos pontos das curvas de calibração.	32
Figura 5 - Cromatogramas no modo SIM e MS/MS para os 14 agrotóxicos utilizados neste estudo.	38
Figura 6 - Curvas de calibração obtidas para os agrotóxicos em água ultrapura nos modos de aquisição SIM e MS/MS.....	43

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Agrotóxicos utilizados no estudo e características.	27
Tabela 2 - Relação entre as concentrações dos pontos das curvas de calibração, soluções de trabalho e soluções estoque mix.	31
Tabela 3 - Condições cromatográficas.	33
Tabela 4 – Fragmentos dos agrotóxicos utilizados para configuração do modo SIM.	36
Tabela 5 – Parâmetros de configuração MS/MS para a análise dos agrotóxicos.	37
Tabela 7- Porcentagem de variação entre as concentrações adicionadas e determinadas na amostra de água pelos modos SIM e MS/MS.	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. FUNDAMENTAÇÃO	12
2.1. Técnicas de extração	12
2.2. Parâmetros de otimização SPME	16
2.3. Contexto histórico (GC-MS)	17
2.4. Componentes do cromatógrafo a gás:.....	18
2.5. Espectrômetro de massa:	20
2.6. Analisador de massa <i>íon trap</i>	21
2.7. Monitoramento de Íons Seleccionados – SIM.....	23
2.8. Analisador de massa em sistema <i>tandem</i> – MS/MS	24
2.9. Avaliação e validação do método	24
2.10. Agrotóxicos escolhidos para estudo	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Lavagem das vidrarias e <i>vials</i>	29
4.2. Instrumentação	29
4.3. Soluções Padrão e Curva de Calibração	30
4.4. Condições cromatográficas.....	32
4.5. Extração por SPME	33
4.6. Análise em amostra real.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Parâmetros de configuração dos modos de aquisição SIM E MS/MS	35
5.2. Curvas de calibração para os modos SIM e MS/MS	42
5.3. Análise de amostra real de água.....	46
6. CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

A água sempre esteve em foco quando se trata de qualidade de vida. É essencial dispor de uma água “limpa” no sentido de ser isenta de agrotóxicos ou ter uma quantidade reduzida, dentro dos parâmetros legais e apropriada para o consumo humano.

O uso intenso ou incorreto dos pesticidas traz grandes problemas ao meio ambiente, exemplificados pela contaminação do solo, águas e atmosfera. Provoca o desequilíbrio biológico que direta ou indiretamente atingirá o ser humano. Nestas circunstâncias a degradação de recursos naturais pode ocorrer de forma irremediável. (JARDIM et. al., 2009; MENEZES FILHO, 2010).

A lei federal Nº 7.802/89 define agrotóxicos e afins como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas de ambientes urbanos, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

O Brasil, desde 2008, vem se destacando como um dos países com maior mercado consumidor de agrotóxicos no mundo. Desde então, o uso de agrotóxicos aumentou substancialmente. Até novembro de 2012 havia 422 ingredientes ativos permitidos para uso agrícola e domissanitário no país (ANVISA, 2012). Hoje esse número apresenta como 504 ingredientes permitidos contra 97 não permitidos (ANVISA, 2017).

O Ceará ocupa a 27^o posição do ranking de estados consumidores de agrotóxicos no país (BRASIL, 2016) e a oitava posição no número de notificações de casos de intoxicações por agrotóxicos (BRASIL, 2016). Desde 2012, estima-se que a taxa de consumo passou de 0,91 kg/ha para 7,29 kg/ha, enquanto a área plantada se manteve na ordem de 2 milhões de hectares. Esse perfil de consumo desproporcional à área plantada se deve, entre outros fatores, ao aumento da produtividade agrícola,

alcançado graças à introdução de novas tecnologias e ao melhor aproveitamento de insumos (CARNEIRO *et al*, 2015). Não existe um controle eficiente em relação ao consumo anual ou trimestral de agrotóxicos, onde está sendo usado, as implicações e em quais cultivos (COLARES, 2011; BRASIL, 2016).

Os detectores são os dispositivos que geram os sinais de resposta para os componentes da amostra separados na coluna, sendo escolhidos de acordo com as propriedades físicas e químicas dos analitos que serão analisados. Alguns detectores são capazes de responder a moléculas com diferentes grupos químicos, chamados de universais, enquanto outros respondem apenas a analitos de grupos funcionais ou estruturas específicas, e são denominados seletivos. Detectores seletivos apresentam maior intensidade do sinal analítico, ou seja, possuem uma maior sensibilidade.

O detector armadilha de íons (*íon trap*) utilizado neste estudo possui alta capacidade de resolução bem como elevada seletividade ao analisar amostras de agrotóxicos.

A Cromatografia Gasosa possui ampla aplicação por ser uma técnica versátil, com custo moderado, onde se podem obter elevada seletividade e sensibilidade através de diferentes tipos de detectores. A escolha do tipo de detector depende das características do analito e da sensibilidade requerida para a análise (NASCIMENTO, SD).

O detector armadilha de íons (*íon trap*) utilizado neste estudo possui alta capacidade de resolução bem como elevada seletividade ao analisar amostras de agrotóxicos.

Na aplicação de detectores de espectrometria de massas em cromatografia, seja gasosa CG/EM ou líquida CL/EM, existem diferentes modos de obtenção dos resultados da detecção dos compostos da amostra, segundo a forma de registro dos dados relativos aos fragmentos monitorados para a geração do cromatograma. Os modos de aquisição de dados utilizados neste estudo são: (*Selected Ion Monitoring* – SIM) e (Múltiplo Estágio – MSn).

2. FUNDAMENTAÇÃO

2.1. Técnicas de extração

Existem diversas técnicas de extração adequadas para diferentes tipos de analito e diferentes matrizes (RIDGWAY, 2007). As técnicas de extração se baseiam nas diferenças de propriedades físico-químicas como peso molecular, solubilidade e polaridade. Os pesticidas encontram-se distribuídos em muitas e diferentes classes com propriedades ácido-base bastante variáveis o que afeta a distribuição destes em diferentes solventes (partição).

É notável a presença de átomos de nitrogênio que podem sofrer protonação ou grupos carboxila na estrutura de alguns pesticidas o que torna o pH um fator importante. Pode ocorrer ainda a degradação de alguns pesticidas em valores altos ou baixos de pH. Espécies que contêm o grupo N-trihalometil (como captana ou folpet) devem ser extraídos em pH menor do que 4, porém pesticidas como o carbosulfan são sensíveis ao meio ácido (BRUZZONITI, 2014).

Várias técnicas multirresíduo foram desenvolvidas para a extração de pesticidas como o método proposto por Mills et. al. na década de 60 que foi desenvolvido nos 20 laboratórios da Food and Drug Administration (FDA), consistia numa extração em acetonitrila seguida pela adição de água e posteriormente a adição de solventes apolares, o método foi utilizado para determinar compostos organoclorados apolares em amostras não gordurosas. A aplicação de pesticidas mais polares requereu o desenvolvimento de outros métodos como o de Luke proposto em 1975 onde era promovida a extração em acetona seguida de uma partição com solventes apolares (éter de petróleo e diclorometano) adicionando cloreto de sódio na fase aquosa. Para refinar os resultados do método de Luke foi proposto promover a extração com acetato de etila com a adição posterior de sulfato de sódio, apesar ser desnecessário o uso de outros solventes já que o acetato de etila é imiscível com a água, a quantidade de co-extrativos apolares tornava necessária uma etapa de clean-up através de cromatografia de permeação em gel (GPC) tornando o preparo mais caro e longo (PRESTES, 2009).

Existem técnicas modernas empregadas na extração de componentes e limpeza da amostra. A seguir são listadas algumas delas (RIDGWAY, 2007):

- ✓ Dispersão de matriz em fase sólida (*Matrix solid phase dispersion – MSPD*): Mistura-se a amostra com uma matriz como o C-18 ligado a sílica, então promove-se a eluição com um pequeno volume de solvente. Utiliza-se menos solvente do que a extração líquido-líquido e elimina-se múltiplas etapas de extração. Comparável a SPE pode-se misturar a matriz com um sorvente e empacota-se uma mini coluna os analitos eluídos.
- ✓ Extração Soxhlet Exaustiva e não seletiva pode degradar compostos termicamente lábeis. Requer etapa de limpeza posterior
- ✓ .Extração por líquido pressurizado (*Pressurised liquid extraction – PLE* ou ainda *accelerated solvent extraction – ASE*). Aquecem-se amostra e solvente em uma cela fechada visando diminuir a viscosidade do solvente e aumentar a solubilidade dos analitos. Técnica de extração rápida mas deve ser otimizada (parâmetros como temperatura, polaridade do solvente). Uma desvantagem apontada é a dificuldade em empregá-la em métodos multiressíduos.
- ✓ Super-heated water extraction (SHWE). Utiliza água entre 100°C e o ponto crítico. Possui outras denominações como PHWE (*pressurised hot water extraction*). Não utiliza solventes orgânicos sendo uma forma de extração limpa.
- ✓ Extração em fluido supercrítico (SFE - *Super critical fluid extraction*). Requer CO₂ de alta pureza. O CO₂ é não inflamável e facilmente removido através da redução da pressão. A robustez do método é seu principal problema já que as condições da extração devem ser consistentes para serem reproduzíveis.
- ✓ Extração assistida por microondas (*Microwave-assisted extraction – MAE*). A amostra é imersa em frasco contendo o solvente é irradiada com microondas. Extração eficiente de amostras sólidas. Devem ser usados solventes polares e os compostos que se deseja extrair

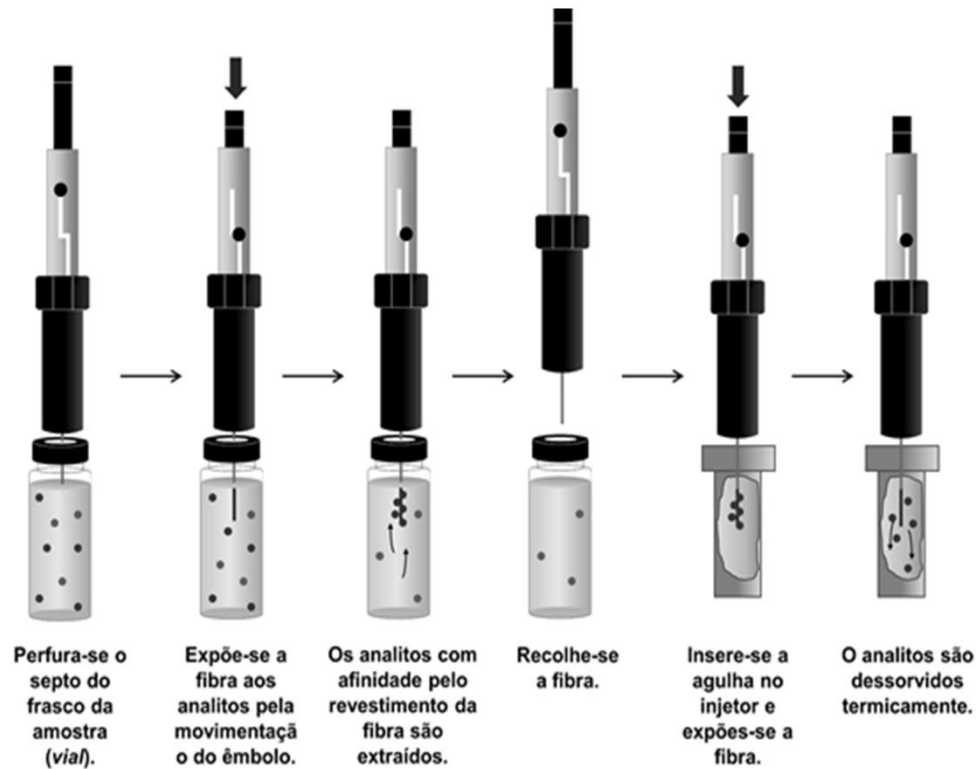
devem ser termicamente estáveis. Utiliza menos solvente e tempo menor de extração. Uma limitação é o fato de o solvente ter que absorver energia de microondas.

- ✓ Extração ultrassônica (*Ultrasonic extraction* – USE). Similar a MAE, porém utiliza um banho de ultrassom. Muitas extrações podem ser realizadas simultaneamente. Não é adequada para analitos voláteis. A presença de água diminui a eficiência da extração.
- ✓ Extração líquido-líquido. O método mais comum de extração. Baseia-se na solubilidade relativa de um analito em dois solventes imiscíveis. Em alguns casos pode ser necessário uso de sais ou centrifugação.
- ✓ Extração em fase sólida (*Solid phase extraction* – SPE). Fundamenta-se na Partição líquido-sólido, muitos materiais sorventes podem ser utilizados como C8 ou C18 ligados a sílica, florisil entre outros. Extensivamente utilizada para remover traços de compostos orgânicos de amostras líquidas ou soluções. Encontram-se comercialmente cartuchos prontos. Pode ocorrer competição entre os analitos e a matriz na retenção afetando a eficiência da extração e pode-se encontrar dificuldade com a reprodutibilidade.
- ✓ QuEChERS: considerado um método rápido (Quick), fácil (Easy), econômico (Cheap), efetivo (Effective), robusto (Rugged) e seguro (Safe). O procedimento baseia-se numa etapa de extração inicial monofásica, utilizando solvente acetonitrila, de uma porção de 10 g da amostra processada, seguida pela partição líquido-líquido dos pesticidas na presença de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio.
- ✓ Micro extração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction* – SPME). Primeiro ocorre a partição ou adsorção entre os analitos na matriz da amostra, um líquido ou uma camada de vapor acima do líquido (*headspace*), e a fase sólida. Em seguida ocorre a dessorção térmica ou por eluição dos adsorbatos no interior do instrumento analítico.

Este estudo promoveu a análise de agrotóxicos em água usando a técnica de extração por SPME, que confere simplicidade, eficiência e rapidez ao método. É uma técnica que realiza amostragem, extração, pré-concentração e introdução da amostra em uma única etapa e sem a necessidade do uso de solventes.

No ato da exposição da fibra na matriz da amostra, tende-se a estabelecer um equilíbrio dos analitos entre a matriz da amostra e a fibra. Os analitos sorvidos na fibra são posteriormente dessorvidos termicamente no interior do sistema injetor de um cromatógrafo a gás (SKOOG et al, 2000, BARRIONUEVO, 2001). A fibra fica protegida no interior de uma agulha só sendo exposta pela movimentação do êmbolo, em um instrumento chamado *holder*. Os analitos a serem extraídos ficam confinados em um recipiente chamado *vial*, cuja tampa possui um septo de silicone, onde é perfurado pela agulha do *holder*, expondo assim, a fibra de poliacrilato (PA). Os analitos são concentrados no revestimento polimérico da fibra (fase estacionaria) através de um equilíbrio de partição. Após um determinado tempo a fibra é retraída e a agulha retirada do *vial*. Logo após, a agulha é inserida no injetor do cromatógrafo a gás e sua fibra exposta novamente, onde os analitos serão dessorvidos em razão da alta temperatura sendo conduzidos pelo gás de arraste até a coluna cromatográfica. A figura 1 a seguir ilustra o procedimento supracitado:

Figura 1 - Etapas do processo de extração dos analitos por SPME em uma amostra e dessorção térmica em injetor de um cromatógrafo a gás.



(Fonte: NASCIMENTO, sd)

Como a SPME não utiliza solventes, há uma grande redução na geração de descartes e exposição ocupacional. É uma técnica simples, de fácil manuseio em relação a outras técnicas, e possui a vantagem da utilização de pequena quantidade de amostra, podendo ser aplicada a diversas áreas, tais como ambiental, farmacêutica, alimentícia, aromas, forense e toxicologia (VALENTE; AUGUSTO, 2000; KOMATSU; VAZ, 2004; GUADARRAMA et al, 2001).

2.2. Parâmetros de otimização SPME

É essencial escolher parâmetros adequados para obter uma extração eficiente da amostra. No SPME é fundamental escolher uma fase estacionária da fibra

que tenha afinidade pelo analito. Outro parâmetro importante é a otimização das condições de extração, tais como salinidade do meio, pH, temperatura e tempo de extração.

O efeito da salinidade afeta a força iônica podendo reduzir ou aumentar a solubilidade do analito na matriz amostral, de acordo com a polaridade do mesmo (CALDAS et al., 2011; HELENO et al., 2010).

O grau de ionização dos analitos dependem do pH da amostra, afetando sua solubilidade em água e, portanto, na sua partição ou adsorção na fibra.

A influência da temperatura na partição do analito entre a fase polimérica e a amostra pode ser descrita em termos cinéticos e termodinâmicos. Teoricamente, a quantidade extraída aumenta com a temperatura, devido à melhor transferência de massa (HELENO et al., 2010). Contudo, para processos exotérmicos, o aumento da temperatura diminui o valor do coeficiente de partição entre a fibra e o analito.

O tempo ótimo para a extração é definido como o tempo necessário para que o equilíbrio entre as fases seja estabelecido. O tempo requerido para o equilíbrio, quando a fibra é exposta na amostra, depende da espessura do filme líquido da fibra e do coeficiente de difusão do analito na fibra extrativa (DÓREA;GAUJAC;NAVICKIENE, 2009).

Um nível de agitação eficiente da amostra influencia diretamente nos fenômenos de transporte de massa entre a fibra e a amostra, logo diminui o tempo de extração.

2.3. Contexto histórico (GC-MS)

A baixa especificidade entre outros fatores, de técnicas espectrofotométricas e imunológicas na análise de resíduos de pesticidas tornam as técnicas cromatográficas preferidas para a detecção de resíduos de pesticidas em alimentos (MEIRA, 2015). Durante a segunda Guerra Mundial eram feitas análises de produtos refinados derivados do petróleo através de GC-MS. Em meados do início da década de 60 torna-se evidente a importância da espectrometria de massa – aliada a espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectroscopia na região do infravermelho – como

instrumento de trabalho na elucidação de estruturas desconhecidas e identificação de compostos sintetizados. Atribui-se a invenção da cromatografia gasosa a A. T. James e A. J. P. Martin em 1952 quando foi demonstrada a partição de analitos entre a fase móvel gás e uma fase estacionária líquida. Vale ressaltar que o pioneirismo na cromatografia dita gás-sólido é atribuído a Erika Cremer da Universidade de Innsbruck na Áustria. Apesar de ambas as técnicas exigirem que os componentes da amostra sejam volatilizados, a cromatografia gasosa trabalha com um fluxo de gás de arraste enquanto a espectrometria de massa opera em alto vácuo ($<10^{-5}$ Torr) evidenciando uma incompatibilidade das técnicas. Diversas abordagens baseadas na divisão do fluxo de saída do GC foram empregadas para “contornar a situação”.

Na década de 60 procurou-se maximizar a quantidade de analito direcionada ao espectrômetro de massa e minimizar a quantidade de gás de arraste, aliada a operação de espectrômetros de massa em uma maior escala.

Nos anos 70 ocorreu a introdução dos espectrômetros de massa de quadrupolo que além de mais baratos para produzir comparados aos de setor magnético, eram capazes de varrer uma faixa de massa de 10-1000 unidades de massa atômica em poucos segundos (HITES, 2016; JARDIM et. al. 2009).

2.4. Componentes do cromatógrafo a gás:

a) Suprimento de gás (ou gases) de arraste: A escolha do gás ou da mistura de gases utilizada geralmente está relacionada ao sistema de detecção em uso. Além de quimicamente inertes devem possuir alta pureza. Deve existir um mecanismo de controle da pressão ou da vazão do gás que nos equipamentos modernos são medidores eletrônicos.

b) Sistema de injeção da amostra: Em geral, utilizam-se micro seringas para injetar a amostra em um vaporizador através de um septo auto-selante de borracha ou silicone. As amostras deste estudo foram injetadas no modo *splitless*, ideal para análise de traços, pois toda a sua amostra é conduzida a coluna e, conseqüentemente, ao detector.

c) Coluna e fornos para coluna: Na coluna cromatográfica ocorrem os fenômenos de partição e separação dos analitos. Numa classificação genérica dividem-se as colunas utilizadas na CG em: empacotada e capilar (tubular aberta). Encontrando-as em diversos comprimentos e fases estacionárias adequadas a diferentes propósitos. Habitualmente a coluna encontra-se dentro de um forno termostatizado, pois a temperatura da coluna é uma variável importante influenciando na resolução e no tempo da corrida.

d) Sistema de detecção: Diversos sistemas de detecção podem estar acoplados a um cromatógrafo a gás, cada sistema possui indicações de uso características como o detector de condutividade térmica (DCT) ou thermal conductivity detector (TCD) que é universal porém tem sensibilidade baixa ou o detector de captura de elétrons (DCE) ou electron capture detector (ECD) que possui alta sensibilidade, porém é adequado apenas a compostos que possuam grupos funcionais eletronegativos na estrutura como os halogênios. (SKOOG, 2006). Detector de ionização de chama (*Flame Ionization Detector-FID*), Detector de Nitrogênio-Fósforo, Detector Fotométrico de Chama (*Flame Photometric Detector- FPD*), Detector de Fotoionização (*Photoionization Detector- PID*) e o Espectrômetro de Massa, detector utilizado deste estudo, dando ênfase ao analisador de massa *ion trap*.

Figura 1- Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrômetro de massa.

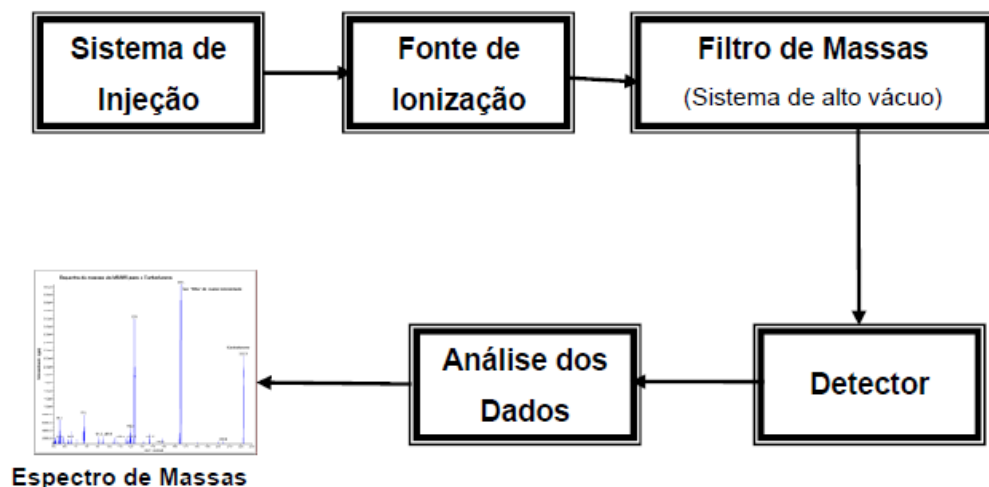


(Fonte: Autor, 2018).

2.5. Espectrômetro de massa:

Sistema de introdução, fonte de íons, analisador de massas, detector, processador de sinal e dispositivo de saída. Neste trabalho o detector de massa utilizado foi do tipo *íon trap* (armadilha de íons) e utilizou-se a ionização por impacto de elétrons. Um sistema de aprisionamento de íons pode ser composto por um eletrodo central de formato anelar e um par de eletrodos circulares convexos. Aplica-se uma tensão de radiofrequência variável no eletrodo anelar. Íons com uma razão massa/carga adequada circulam em órbitas estáveis, aumentando a radiofrequência desestabiliza-se íons mais leves provocando a colisão destes com o eletrodo anelar (SKOOG et. al. 2009).

Figura 2 - Representação esquemática de um processo utilizando espectrômetro de massas.



Fonte: Adaptado Lanças, 2013.

2.6. Analisador de massa *íon trap*

A função do analisador de massas é separar os íons formados na fonte de ionização, de acordo com suas respectivas razões massa-carga (m/z). Há uma série de analisadores de massa disponíveis atualmente, incluindo: quadrupolo (Q), armadilha de íons (*íon trap* - IT), tempo de voo (TOF – do inglês, *time of light*), setor Eletrostático (E) e setor Magnético (B), ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR – do inglês, *Fourier transform ion cyclotron resonance*).

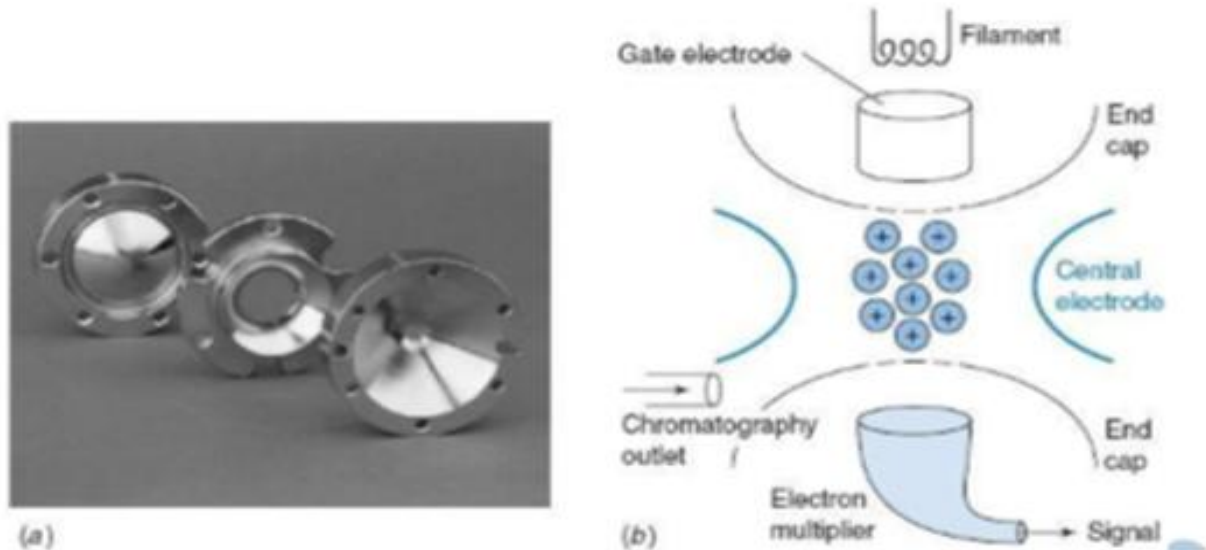
Os analisadores tipo quadrupolo, também conhecidos como quadrupolo de transmissão, são bastante populares em espectrometria de massas. São constituídos por quatro tubos cilíndricos metálicos paralelos, de 100-200 mm de comprimento, montados segundo os vértices de um quadrado. O quadrupolo funciona como um filtro, que permite que os fragmentos de diferentes valores de m/z cheguem com tempos diferentes ao detector (multiplicadora de elétrons) e, desta forma, possam ser diferenciados.

Introduzido comercialmente na década de 1980, o espectrômetro de massas de armadilha de íons (*íon trap*-IT) é considerado como uma versão mais moderna da tecnologia do quadrupolo. Wolfgang Paul e os colaboradores Hans Dehmelt e Hans Steinwedel foram laureados com o Prêmio Nobel de Física de 1989 pelo desenvolvimento da tecnologia deste analisador. Instrumentos comerciais equipados

com armadilha de íons (IT) são hoje muito comumente usados em aplicações nas áreas química, bioquímica e laboratórios forenses, podendo ser acoplados a cromatografia líquida ou gasosa (MARCH e TODD, 2005).

O analisador *íon trap* tem sua estrutura baseada em três eletrodos hiperbólicos denominados: *end caps*, sendo um superior (eletrodo de entrada) e outro inferior (eletrodo de saída), e, um eletrodo central anelar, configurando a “armadilha de íons” (trap).

Figura 3 - quadrupolo íon trap (visão transversal)



(Fonte: Neto, 2015).

Este analisador é responsável por criar trajetórias estáveis para os íons com determinadas razões m/z (ou intervalo de m/z), enquanto que os demais íons são removidos por colisão com as paredes ou por ejeção axial do *trap* devido à instabilidade de trajetórias. Ao contrário do quadrupolo, que age como um filtro de íons, o analisador armadilha de íons, é capaz de aprisionar íons por tempos relativamente longos e ejetá-los em sequência para o sistema detector.

Várias tensões são aplicadas aos eletrodos, o que resulta na formação de uma região estável no interior do eletrodo circular na qual os íons são capturados. O

potencial de radiofrequência (RF) do eletrodo anelar associado à uma voltagem AC e voltagem DC, produz um campo magnético dentro da armadilha, que mantém os íons em uma trajetória oscilante estável. O movimento exato dos íons é dependente das tensões aplicadas e das suas razões de m/z . Para a detecção dos íons do analito, os potenciais são alterados para desestabilizar os movimentos de determinados íons, resultando na ejeção destes através do end cap de saída. Os íons com razões estáveis são direcionados ao detector do instrumento para produzir o espectro de massas da molécula (MCNAIR; MILLER, 1997).

Os analisadores de armadilha de íons possuem design simples, custo moderado, possuem alta velocidade de varredura de razão m/z para as aplicações de CG/EM. Os espectros de massa gerados em espectrômetros equipados com analisador de armadilha de íons (*íon trap*) possuem frequentemente certas diferenças de perfil quando comparados aos obtidos com quadrupolo, tendo em vista que no *íon trap* os íons podem sofrer dissociações devido a colisões íon/molecular no interior do sistema (MCNAIR; MILLER, 1997).

O quadrupolo tradicional é rápido, pode gravar de 2 a 8 espectros por segundo e cobre uma faixa de até 4000 m/z com resolução de 0,3 m/z . Já o *íon trap* tem resolubilidade melhor (0,1 m/z) com capacidade de realizar leituras de fragmentos de até 20000 m/z , é cerca de 10 a 100 vezes mais sensível do que o quadrupolo comum.

2.7. Monitoramento de Íons Seleccionados – SIM

Neste modo de aquisição, o espectrômetro de massas é programado para monitorar somente a fragmentos com determinadas razões m/z , em determinadas “janelas” de tempo (canais) da corrida cromatográfica. Esta modalidade de aquisição proporciona grande melhoria na seletividade e sensibilidade do método, produzindo cromatogramas mais simples e picos cromatográficos com melhores razões sinal/ruído para o analito desejado (maior sensibilidade). A melhoria da sensibilidade de detecção no modo SIM está associada ao fato de o sistema do detector “dedicar” mais tempo na

coleta de dados relativos ao fragmento m/z selecionado (HÜBSCHMANN, 2009; HARRIS, 2012).

Antes de analisar as amostras reais, geralmente são realizados testes com corridas cromatográficas no modo varredura total (*Full Scan*) a fim de avaliar os fragmentos formados para cada analito para, em seguida, programar o método no modo SIM e realizar a análise das amostras.

2.8. Analisador de massa em sistema *tandem* – MS/MS

A espectrometria de massas na modalidade tandem, é uma configuração mais moderna dos analisadores de massa para espectrômetros de acoplados à cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida (CL). Esta modalidade é baseada no arranjo de mais de um analisador de massas no projeto do espectrômetro (EM) elevando significativamente o poder de confirmação da identidade de substâncias da amostra, aumentando a segurança das análises qualitativas (LANÇAS 2009).

A espectrometria de massas tandem (MS-MS) refere-se a espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas com dois estágios de analisadores em sequência (MS_1 e MS_2), formando a técnica CG-MS/MS. O primeiro estágio realiza a primeira fragmentação. Em seguida o íon de maior razão m/z é selecionado para então sofrer a segunda fragmentação conferindo assim maior seletividade e sensibilidade ao método, uma vez que interferentes podem eluir com mesmo tempo de retenção ou gerar fragmentos de massa semelhantes durante a primeira fragmentação, portanto a segunda fragmentação sanaria este possível equívoco.

2.9. Avaliação e validação do método

Validação, conforme definição da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, é a *confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos* (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005a)

A validação de um método deve garantir por meios experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA).

Algumas definições são encontradas para o termo validação, porém todas elas têm significados afins no que tange a garantia experimental que o método proposto atende a requisitos estipulados e que seus resultados são confiáveis, tornando-o importante para garantir qualidade analítica ao processo.

Apesar da disponibilidade de equipamentos modernos e sofisticados, existem fatores que podem alterar a execução de um método analítico, como por exemplo, a natureza e complexidade da amostra, natureza química dos analitos, condições de infraestrutura e operação do laboratório, fatores humanos como nível técnico insuficiente dos analistas podem afetar drasticamente a execução de um método analítico, invalidando os resultados da análise cromatográfica.

Alguns dos parâmetros de validação utilizados em análises cromatográficas são:

- Seletividade/Efeito matriz;
- Linearidade;
- Faixa de trabalho e faixa linear;
- Limite de Detecção (LD);
- Limite de Quantificação (LQ);

A seletividade dita o quanto o procedimento analítico determina o(s) analito(s) sem a interferência de outros componentes análogos. Técnicas como a Espectrometria de massas acoplada à cromatografia conseguem ser bastante seletivas (MAPA, 2011).

A linearidade mostra o quão o método produz resultados diretamente proporcionais com a concentração do analito dentro de uma faixa aplicável. Relaciona-se diretamente o sinal e a concentração do analito através de uma equação de reta no formato $y = ax + b$ onde se utilizam no mínimo cinco pontos para a criação da curva de calibração e subsequentemente a obtenção desta equação por regressão linear. Geram-se ainda os coeficientes: o angular “a” e o linear “b” além do coeficiente de

correlação “ r^2 ” que assume uma estimativa da qualidade da equação obtida. Quanto mais próximo r^2 esta do valor 1 menor é dispersão apresentada pelos pontos medidos. Para a extensão da faixa aplicável, diversas recomendações são encontradas, como a da IUPAC que aconselha a faixa de 0 – 150 % ou 50 – 150% do valor esperado além de especificar que os pontos da curva devem estar igualmente espaçados (RIBANI et. al., 2004). A faixa de trabalho é o intervalo de valores de concentração que geram uma resposta linear no instrumento.

As curvas de calibração podem ser elaboradas utilizando uma matriz branca fortificada com os padrões de calibração do analito, ou utilizando padrões de calibração do analito em um solvente quando atestado a ausência de efeito matriz (MAPA, 2011).

O limite de detecção (LD) mostra a menor concentração do analito que pode ser detectada. O procedimento para medir o sinal adquirido em amostras de baixas concentrações (porém concentrações conhecidas) do analito na matriz ou em um branco baseia-se na relação sinal ruído 3:1 que é em geral aceita como estimativa do LD (RIBANI et. al., 2004). O limite de quantificação (LQ) estima a menor concentração do analito que pode ser medida com confiabilidade pelo procedimento. O LQ considera um valor de concentração que produza uma relação sinal/ruído de 9:1. Ressalta-se que com o decréscimo dos níveis de concentração as estimativas de LQ tornam-se menos precisas (RIBANI et. al., 2004).

Um método robusto não deve ser afetado por pequenas variações de parâmetros cromatográficos ou durante as etapas de preparo de amostra, como pH, força iônica do extrato, impurezas do gás de arraste ou agitação. Métodos robustos não devem provocar alterações significativas de resultado quando o procedimento é executado por diferentes laboratórios. (RIBANI et. al., 2004)

2.10. Agrotóxicos escolhidos para estudo

Neste estudo foi realizado a análise de 14 agrotóxicos listados a seguir: molinato, trifluralina, atrazina, terbufós, parationa metílica, aldrin, clorpirifós, pendimentalina, clordano, DDE, dieldrin, DDD, DDT, permetrina. A Tabela 1 mostra dados importantes de cada um dos analitos estudados:

Tabela 1 – Agrotóxicos utilizados no estudo e características.

AGROTÓXICOS	VMP em água (µg/L)	Grupo	K _{ow}	pK _a	K _{oc}
Aldrin	0,03	Organoclorado	3,16E+06	-	17500
Atrazina	2	Triazina	5,01E+02	1,7	100
Clordano	0,2	organoclorado	6,03E+02	-	20000
Clorpirifós	30	organofosforado	5,01E+04	-	8151
DDD	1	organoclorado	-	-	-
DDE	1	organoclorado	3,24E+06	-	50000
DDT	1	organoclorado	8,13E+06	-	151000
Dieldrin	0,03	hidrocarboneto clorado	5,01E+03	-	1200
Molinato	6	tiocarbamato	7,24E+02	-	190
Parationa Metílica	9	organofosforado	1,00E+03	-	240
Pendimentalina	20	dinitroanilina	2,51E+05	2,8	17491
Permetrina	20	piretróide	1,26E+06	-	100000
Terbufós	1,2	organofosforado	3,24E+04	-	500
Trifluralina	20	dinitroanilina	1,86E+05		158000
Legenda: VMP: Valor Máximo Permitido em água; pKa: Potencia da Constante de Dissociação Ácida; Kow: Constante de Partição octanol/água; Koc: Constante de partição em relação ao carbono orgânico.					

(Fonte: IUPAC, 2018)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar comparativamente modos de aquisição de dados SIM e MS/MS de um *íon trap* para identificação de agrotóxicos em amostra de água utilizando Microextração em Fase Sólida (SPME).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros de validação do método: seletividade, linearidade, faixa de trabalho e relação sinal ruído;
- Elaboração das curvas de calibração dos 14 agrotóxicos;
- Analisar quantitativamente e qualitativamente a amostra de água real fortificada com agrotóxicos, bem como comparar dados cromatográficos obtidos pelos modos de aquisição SIM e MS/MS (*ion trap*).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos executados para a elaboração deste trabalho foram realizados no Laboratório de Química Instrumental (LQI) da Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC).

4.1. Lavagem das vidrarias e *vials*.

As vidrarias volumétricas foram lavadas com água e detergente neutro por duas vezes, enxaguadas 7 vezes com água e em seguida duas vezes com água destilada e 2 vezes com água ultrapura (Milli-Q®). Os *vials* foram lavados com água e detergente neutro, enxaguados três vezes com água e então duas vezes com água destilada. Em seguida foram transferidos para um béquer de 500 mL, adicionou-se água destilada na quantidade suficiente para submergi-los e aqueceu-se em chapa aquecedora até a fervura, mantendo-se por 10 min. Posteriormente, foram lavados com água ultrapura, rinsados com acetona e secos em estufa a 120°C por 30 min.

4.2. Instrumentação

Segue abaixo os seguintes materiais utilizados para execução do trabalho:

- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3®, Millipore (EUA);
- Coluna cromatográfica capilar OV-5 Bonded, 5%-fenil-95%-polidimetilsiloxano, com as dimensões de 30 m x 0,25 mm d.i. (diâmetro interno) e 0,25 µm de espessura de filme da fase estacionária;
- Cromatógrafo a Gás com detector *Íon Trap*, modelo ITQ 1100 - Thermo Fisher Scientific (EUA);
- Acetona e Metanol grau HPLC/UV-Vis (Vetec);
- Gás hélio (99,9999%) usado como gás de arraste;
- Micropipetador de 2-20µL, modelo Labmate (HTL);

- Micropipetador de 20-200 μ L, modelo Labmate (HTL);
- Micropipetador de 100-1000 μ L (EPPENDORF);
- Padrões de Agrotóxicos: trifluralina, atrazina, terbufós, parationa metílica, alacloro, aldrin, clorpirifós, metolacoloro, pendimentalina, clordano, DDE, dieldrin, DDD, DDT, cis-permetrina, trans-permetrina com pureza acima de 98% (Sigma ou Dr. Ehrenstorfer-GmbH);
- Vials de 40 mL com tampa de polipropileno e septo de PTFE/Silicone (Supelco);
- Vial de 2,0mL (Thermo);
- Fibras de Poliacrilato (PA);
- Chapa aquecedora com agitação.

4.3. Soluções Padrão e Curva de Calibração

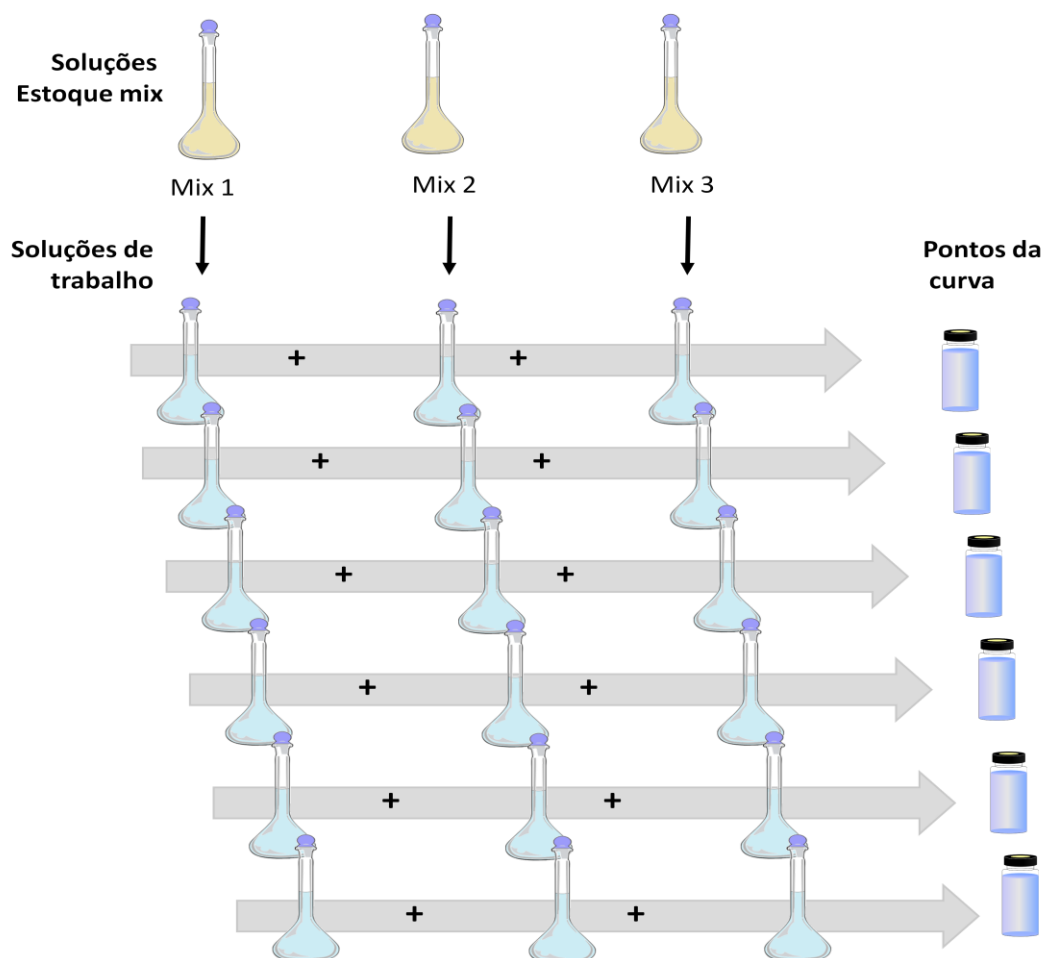
A curva de calibração, constituída de seis pontos, foi construída adicionando-se alíquotas adequadas dos padrões de agrotóxicos e 35 mL de água ultra pura em vials de 40 mL. Os agrotóxicos avaliados no estudo foram divididos em três grupos, de acordo com a proximidade dos valores de limite máximo permitido (LMP) em água. Para cada grupo foi preparada uma solução estoque mix, totalizando três soluções *mix* diferentes. De cada solução estoque *mix* foram preparadas seis soluções de trabalho, das quais eram utilizadas para o preparo dos seis pontos da curva de calibração. Assim, cada ponto da curva de calibração era composto por uma alíquota de cada um dos mix. Dessa forma, permitiu-se obter diferentes faixas de trabalho para os agrotóxicos. Na Tabela 2 podem-se observar os agrotóxicos utilizados na composição de cada solução estoque *mix*, as concentrações das soluções de trabalho e os respectivos pontos das curvas de calibração. Na Figura 4 pode-se observar um esquema do preparo dos pontos da curva de calibração.

Tabela 2 - Relação entre as concentrações dos pontos das curvas de calibração, soluções de trabalho e soluções estoque mix.

		Solução trabalho (mg L ⁻¹)	Concentração dos Pontos da Curva de Calibração (µg L ⁻¹)	Pontos da curva de calibração
MIX 1	Aldrin, dieldrin	0,018 mg L ⁻¹	0,01 µg L ⁻¹	Ponto 1
		0,175 mg L ⁻¹	0,10 µg L ⁻¹	Ponto 2
		0,438 mg L ⁻¹	0,25 µg L ⁻¹	Ponto 3
		0,875 mg L ⁻¹	0,50 µg L ⁻¹	Ponto 4
		1,750 mg L ⁻¹	1,00 µg L ⁻¹	Ponto 5
		2,625 mg L ⁻¹	1,50 µg L ⁻¹	Ponto 6
	Atrazina, Clordano, DDT, DDD, DDE, Terbufós	0,170 mg L ⁻¹	0,10 µg L ⁻¹	Ponto 1
		0,870 mg L ⁻¹	0,50 µg L ⁻¹	Ponto 2
		1,750 mg L ⁻¹	1,00 µg L ⁻¹	Ponto 3
		5,25 mg L ⁻¹	3,00 µg L ⁻¹	Ponto 4
		8,75 mg L ⁻¹	5,00 µg L ⁻¹	Ponto 5
		12,25 mg L ⁻¹	7,00 µg L ⁻¹	Ponto 6
MIX 2	molinato, parationa metílica	0,87 mg L ⁻¹	0,50 µg L ⁻¹	Ponto 1
		8,75 mg L ⁻¹	5,00 µg L ⁻¹	Ponto 2
		17,5 mg L ⁻¹	10,00 µg L ⁻¹	Ponto 3
		35,0 mg L ⁻¹	20,00 µg L ⁻¹	Ponto 4
		52,50 mg L ⁻¹	30,00 µg L ⁻¹	Ponto 5
		70,00 mg L ⁻¹	40,00 µg L ⁻¹	Ponto 6
MIX 3	clorpirifós, pedimentalina, permetrina, trifluralina	8,750 mg L ⁻¹	5,00 µg L ⁻¹	Ponto 1
		17,50 mg L ⁻¹	10,00 µg L ⁻¹	Ponto 2
		35,00 mg L ⁻¹	20,00 µg L ⁻¹	Ponto 3
		70,00 mg L ⁻¹	40,00 µg L ⁻¹	Ponto 4
		105,00 mg L ⁻¹	60,00 µg L ⁻¹	Ponto 5
		140,00 mg L ⁻¹	80,00 µg L ⁻¹	Ponto 6

(Fonte: Autor, 2018)

Figura 4 - Esquema do preparo dos pontos das curvas de calibração.



(Fonte: Autor, 2018).

4.4. Condições cromatográficas

Utilizou-se um cromatógrafo a gás Thermo Fisher-Scientific Trace GC Ultra acoplado a detector de armadilha de íons modelo ITQ 1100 e equipado com coluna capilar Equity-5 (5%-fenil-95%-polidimetilsiloxano), com 30 m x 0,25 mm d.i. (diâmetro interno) e 0,25 μm de espessura de filme (Supelco®). Na Tabela 3 estão listadas as condições cromatográficas utilizadas no estudo para os modos de aquisição SIM e MS/MS.

Tabela 3 - Condições cromatográficas.

Temperatura do injetor	260°C
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Gás de arraste	hélio 5.0 (99,999%)
Tempo de purga	3 min
Fluxo de purga	50 mL/min
Temperatura da fonte de íons	260°C
Modo de controle de fluxo	Velocidade linear
Fluxo total	1,2 ml/min
Programação de temperatura	Temperatura inicial de 60°C permanecendo por 1,0 min, em seguida na rampa a temperatura sobe a uma taxa de 15°C/min até 300°C, permanecendo nesta temperatura por 3,0 min.
T (°C)	

(Fonte: Autor, 2018).

4.5. Extração por SPME

Foram utilizados tubos de polipropileno com tampas rosqueada de capacidade de 40mL para preparar as soluções padrões do mix contendo 14 agrotóxicos com concentrações que variaram de acordo com a **Erro! Fonte de referência não encontrada..** As extrações foram executadas utilizando uma fibra de Poliacrilato (PA), com espessura de filme: 85 µm; tempo de exposição da fibra à amostra: 20 min; sob agitação constante realizada por uma barra magnética e com a amostra mantida a temperatura de 65°C.

4.6. Análise em amostra real

Foi coletada uma amostra de água em um poço profundo situado em uma residência localizada no bairro Parque Rio Branco/Fortaleza-CE. Foram retiradas alíquotas de 35 mL da amostra e acondicionadas em *vials*. Adicionaram-se os padrões dos agrotóxicos em estudo às alíquotas, formando então, soluções fortificadas. Em seguida as soluções fortificadas foram submetidas a extrações por SPME e análises no CG-ITQ nos modos de aquisição SIM e MS/MS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Parâmetros de configuração dos modos de aquisição SIM E MS/MS

O modo MSn (*íon trap*), também conhecido como MS/MS, oferece vantagens sobre o modo SIM em relação a seletividade e detectabilidade. No modo MSn obtêm-se maior seletividade que o modo SIM, pois permanecem no *trap* apenas o fragmento (íon precursor) selecionado para refragmentação, seguindo para o detector apenas os íons produto. Dessa maneira, o modo MS/MS é uma ferramenta muito útil na análise de matrizes complexas, que podem possuir outras moléculas que eluem no mesmo tempo de retenção do analito, que no modo SIM chegariam juntamente com os analitos ao detector, podendo ocasionar erros na identificação e quantificação do analito.

Além disso, o modo *íon trap* muitas vezes apresenta ganhos em sensibilidade em relação ao modo SIM, devido a fatores como a obtenção de maior relação sinal/ruído e menor interferência de outros componentes da amostra.

Os espectros de massa referentes a cada analito foram analisados para verificação do íon de maior intensidade (íon base), que foi selecionado para ser refragmentado. No modo MS/MS de análise, os fragmentos (íons produto) originados a partir do íon precursor são formados a partir da colisão que induz a dissociação das moléculas (CID – *collision induced dissociation*). A distribuição de m/z dos íons resultantes do processo CID depende das características do íon precursor e da quantidade de energia cinética translacional que será convertida em energia vibracional interna. A energia cinética translacional do íon precursor pode ser aumentada utilizando-se dois modos de excitação: ressonante e não-ressonante. O modo não-ressonante (0 a 100V) é resultado da interação da espécie iônica com um campo elétrico que aumenta a energia potencial do íon, aumentando sua energia translacional.

Uma porção da energia cinética é convertida em energia translacional ao sofrer colisões no *trap*. No modo ressonante (0 a 1V) um campo elétrico oscilante aplicado é orientado ao longo do eixo axial do trap, dando origem a uma componente axial de movimento no íon que é ressonantemente excitada, causando aumento da energia interna do íon.

No desenvolvimento do método GC-MS/MS é necessário determinar a energia de excitação adequada para que ocorra a quebra do fragmento selecionado, e obter ganhos em limite de detecção da técnica. Para isso, foi realizado um estudo para determinar a melhor energia de excitação para os 14 analitos. Esse estudo foi realizado utilizando energia de excitação 0,225 V e 0,3 V no modo não-ressonante. A determinação da melhor energia de excitação foi realizada através de consulta à literatura e análise comparativa da intensidade do sinal cromatográfico obtido referente a cada energia. A energia de excitação de 0,225 V no modo não-ressonante foi a que permitiu boa resposta para a maioria das moléculas em estudo, e por isso foi escolhida para o método GC-MS/MS.

Na

Tabela 4 estão listados os fragmentos dos agrotóxicos utilizados para configuração do modo SIM, e na Tabela 5 estão os parâmetros de configuração MS/MS para a análise dos agrotóxicos.

Tabela 4 – Fragmentos dos agrotóxicos utilizados para configuração do modo SIM.

Agrotóxico	T _R	Fragmentos			
Molinato	10,24	126	55	187	83
Trifluralina	11,27	264	306		290
Atrazina	11,87	200	215		
Terbufós	12,10	231	233		
Parationa Metílica	12,94	263	125	109	
Clorpirifós	13,58	199	197	97	314
Aldrin	13,62	66	263	79	
Pendimentalina	14,02	252	191	162	281
Clordano I	14,45	373	375	371	
Clordano II	14,64	373	375	371	
DDE	14,83	246	318	248	
Dieldrin	14,95	263	81	277	
DDD	15,38	235	237	165	
DDT	15,86	235	237	165	
Permetrina cis	17,65	183	165	184	
Permetrina trans	17,65	183	165	184	

(Fonte: Autor, 2018)

Tabela 5 – Parâmetros de configuração MS/MS para a análise dos agrotóxicos.

Agrotóxico	T _R	Íon Precursor (m/z)	Margem	Energia de colisão (volts)	Energia Max. De excitação (q)	Faixa (m/z)	Ion produto (m/z)	Ion quantificação
Molinato	10,24	126	2	3,00	0,3	45-136	98	83,108,70
Trifluralina	11,27	264	2	1,13	0,225	150-274	206	188,160,171
Atrazina	11,87	200	6	4,00	0,225	84-210	122	94,105,104
Terbufos	12,10	231	6	1,07	0,225	133-209	175	203,185,157
Parationa metílica	12,94	263	4	1,13	0,225	131-300	246	153,216
Aldrin	13,62	66	1	1,13	0,225	217-273	193	191,228,227,225
Clorpirifós	13,58	199	1	1,13	0,225	99-200	171	136,134
Pendimetalina	14,02	252	3	1,12	0,225	100-262	162	180,206
Clordano I	14,45	375	4	1,22	0,225	254-383	264	266,301,299
Clordano II	14,64	162	4	1,22	0,225	256-385	264	266,301,299
DDE	14,83	246	1	1,11	0,225	123-250	176	210,211,177
Dieldrin	14,95	277	1	1,11	0,225	197-287	193	191,228,227
DDD	15,38	235	1	1,13	0,225	117-250	165	199,200
DDT	15,86	235	2	1,23	0,225	156-245	165	199,200,166
Permetrina cis	17,65	183	3	1,06	0,225	143-193	168	165,153,155
Permetrina trans	17,65	183	3	1,06	0,225	143-193	168	165,153,152

(Fonte: Autor, 2018)

De acordo com a Figura 5 foi possível visualizar que o modo de aquisição de dados MSn apresenta ganhos significativos de resolução e diminuição do ruído em relação ao modo SIM. É perceptível picos mais estreitos que identificam melhor os agrotóxicos em estudo, pois os diferenciam de possíveis interferentes ou outros analitos que eluem com tempos de retenção semelhante. Portanto, através desses parâmetros otimizados foi possível obter um cromatograma mais “limpo” e uma análise qualitativa mais eficiente.

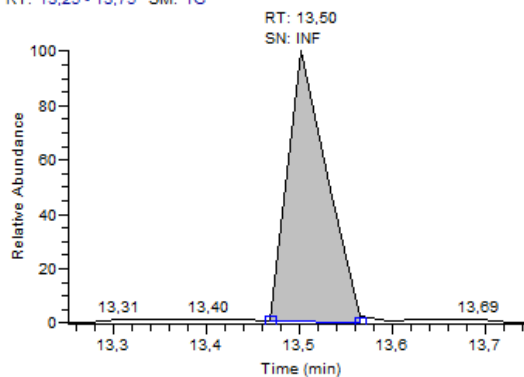
Figura 5 - Cromatogramas no modo SIM e MS/MS para os 14 agrotóxicos utilizados neste estudo.

SIM

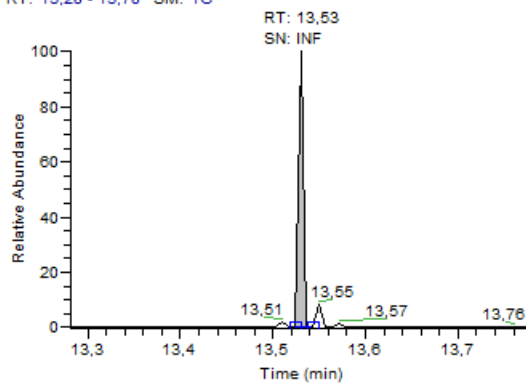
MS/MS

Aldrin

RT: 13,25 - 13,75 SM: 1G

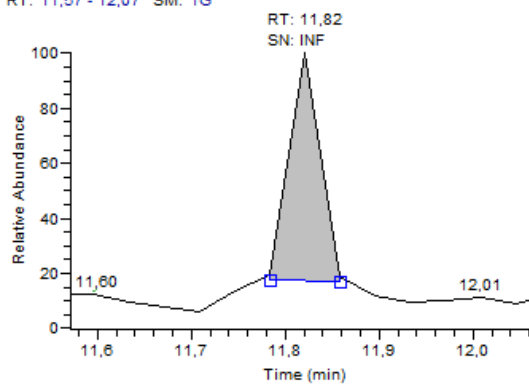


RT: 13,28 - 13,78 SM: 1G

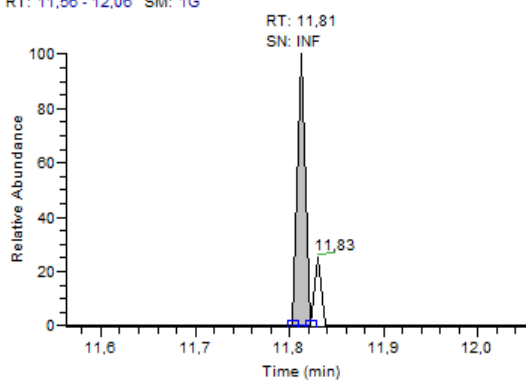


Atrazina

RT: 11,57 - 12,07 SM: 1G

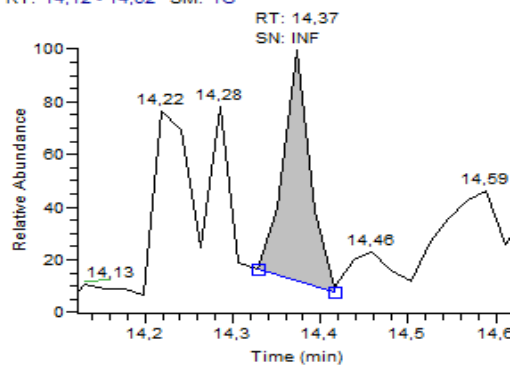


RT: 11,56 - 12,06 SM: 1G

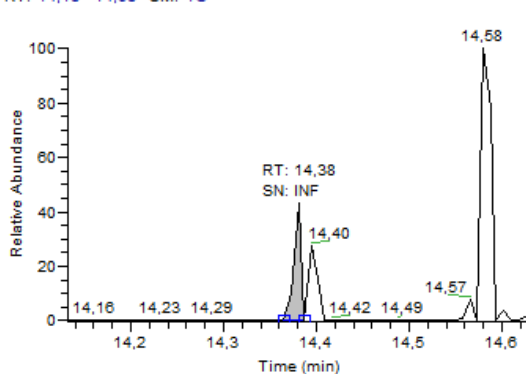


Clordano

RT: 14,12 - 14,62 SM: 1G

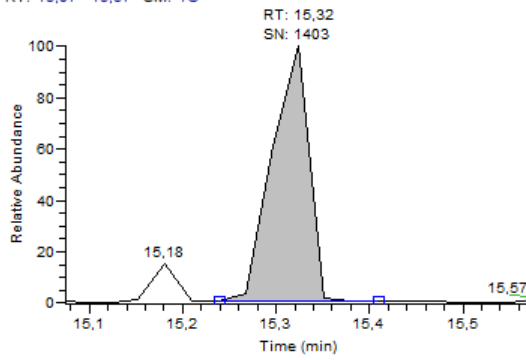


RT: 14,13 - 14,63 SM: 1G

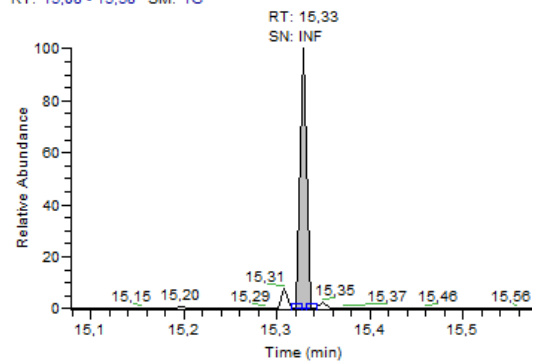


DDD

RT: 15,07 - 15,57 SM: 1G

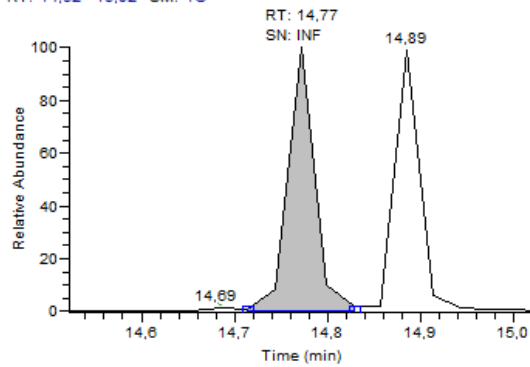


RT: 15,08 - 15,58 SM: 1G

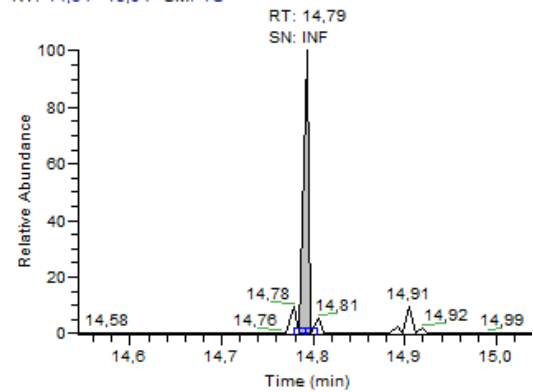


DDE

RT: 14,52 - 15,02 SM: 1G

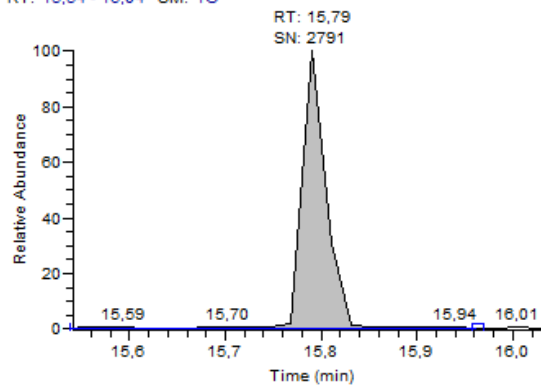


RT: 14,54 - 15,04 SM: 1G

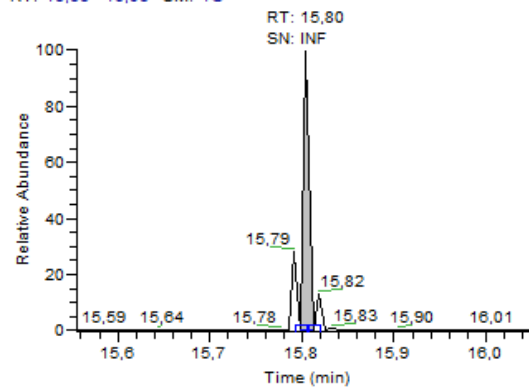


DDT

RT: 15,54 - 16,04 SM: 1G

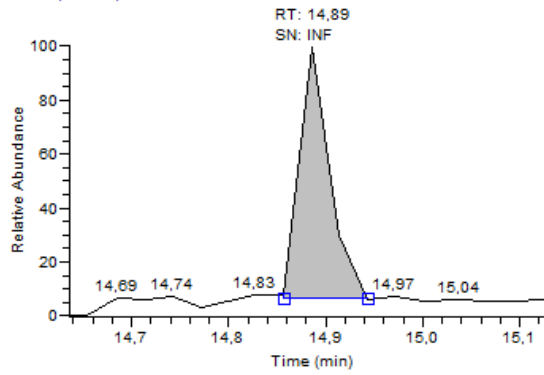


RT: 15,55 - 16,05 SM: 1G

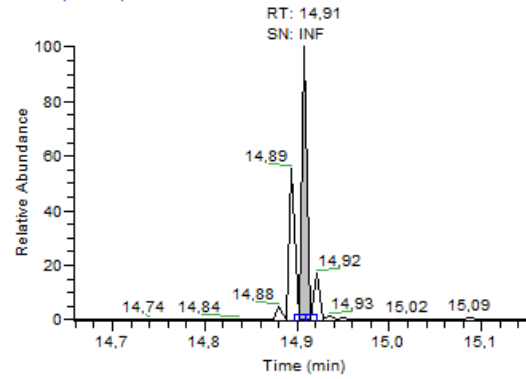


Dieldrin

RT: 14,64 - 15,14 SM: 1G

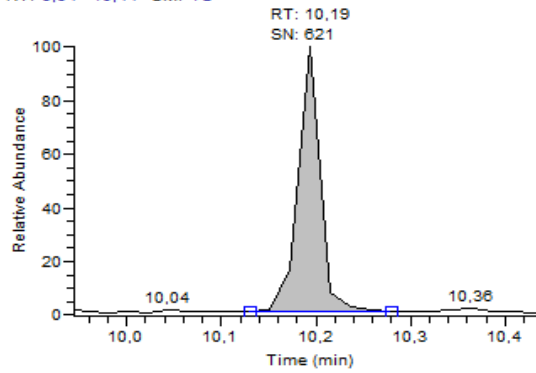


RT: 14,66 - 15,16 SM: 1G

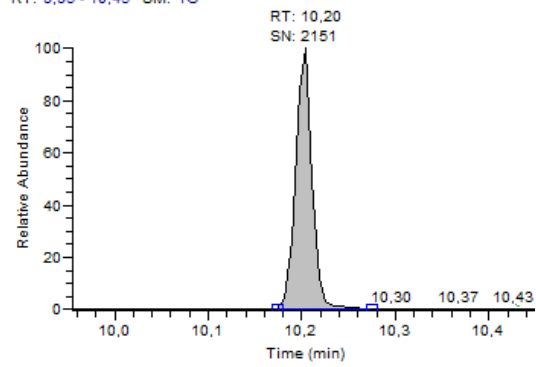


Molinato

RT: 9,94 - 10,44 SM: 1G

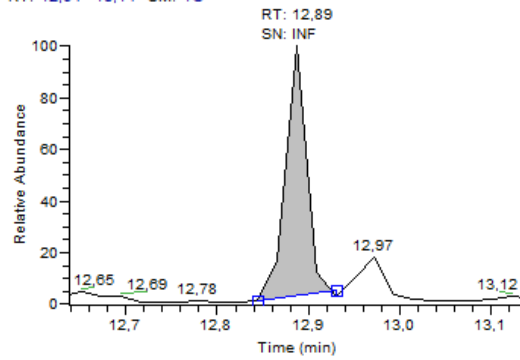


RT: 9,95 - 10,45 SM: 1G

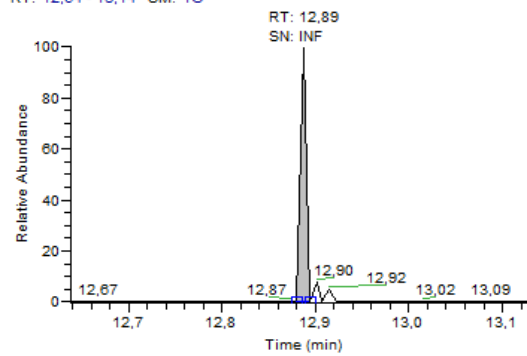


Parationa-metflica

RT: 12,64 - 13,14 SM: 1G

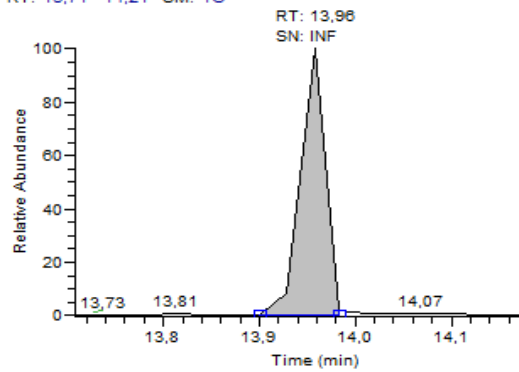


RT: 12,64 - 13,14 SM: 1G

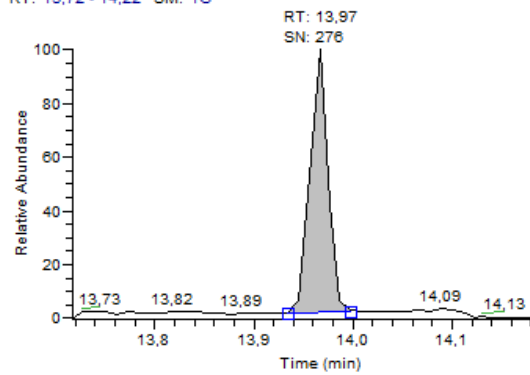


Pendimetalina

RT: 13,71 - 14,21 SM: 1G

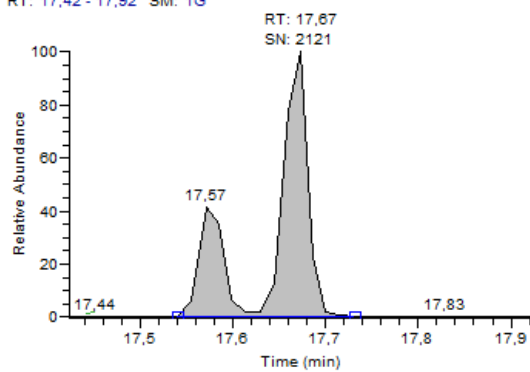


RT: 13,72 - 14,22 SM: 1G

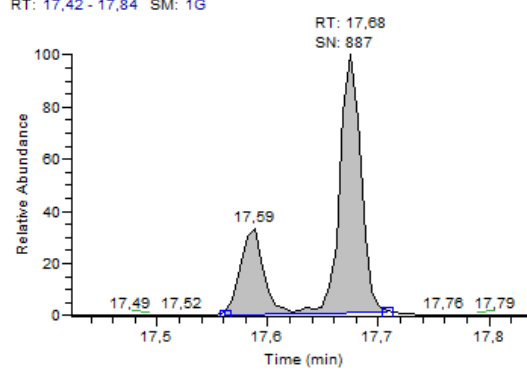


Permetrina (cis+trans)

RT: 17,42 - 17,92 SM: 1G

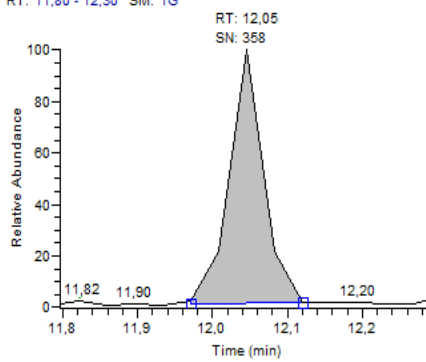


RT: 17,42 - 17,84 SM: 1G

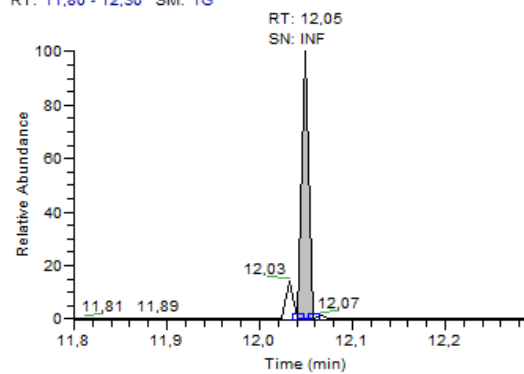


Terbufós

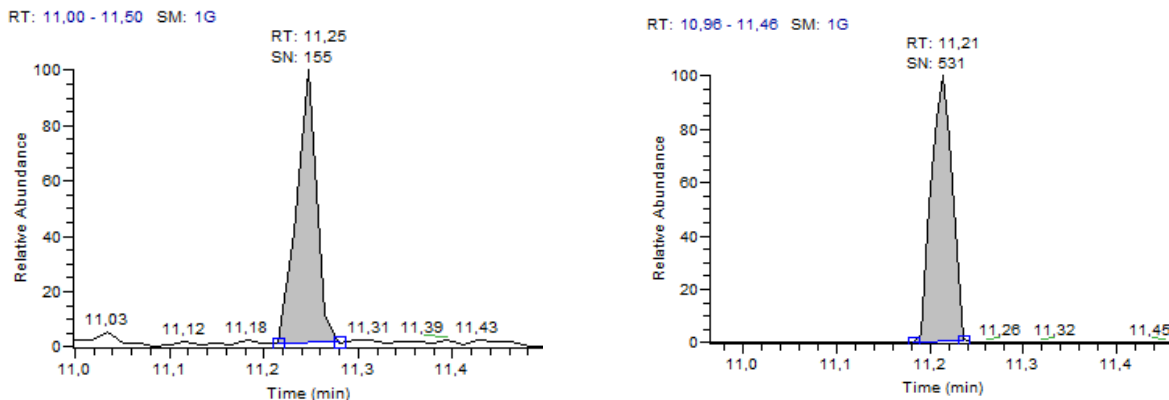
RT: 11,80 - 12,30 SM: 1G



RT: 11,80 - 12,30 SM: 1G



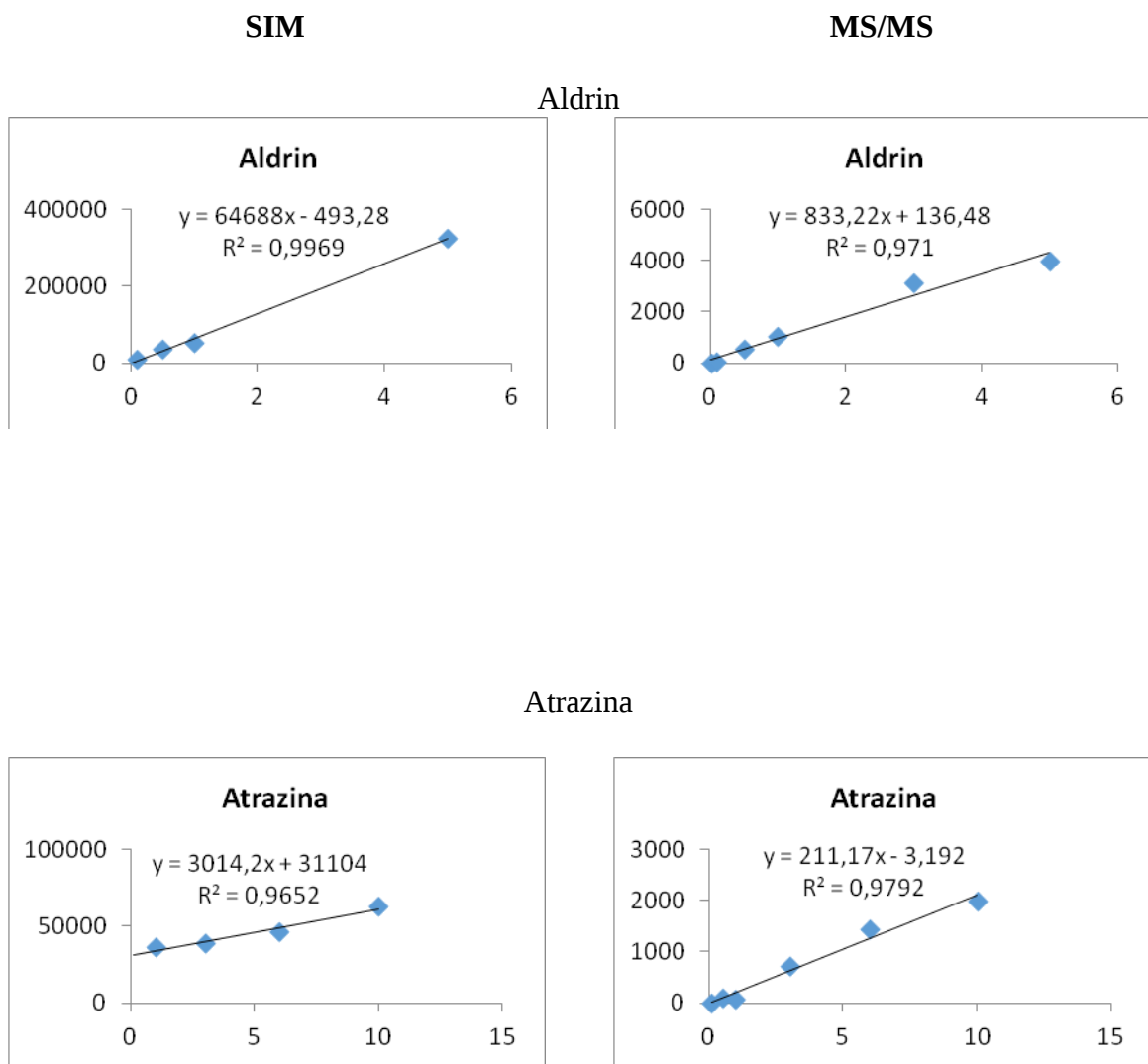
Trifluralina



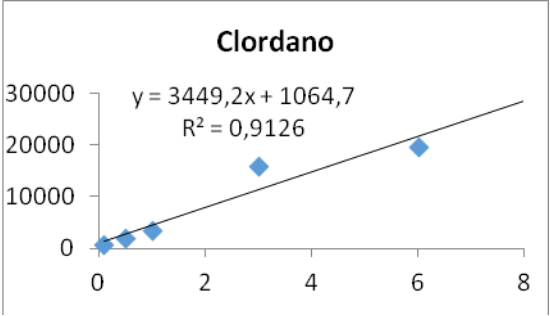
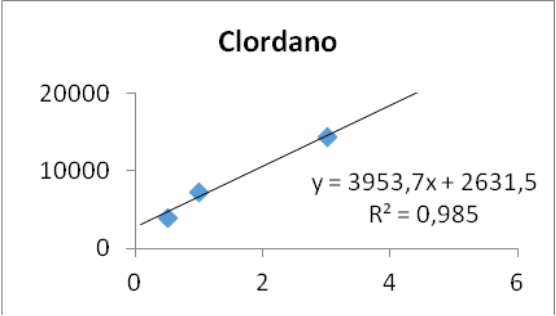
5.2. Curvas de calibração para os modos SIM e MS/MS

Na Figura 6 estão as curvas de calibração obtidas para os agrotóxicos em água ultra pura nos modos de aquisição SIM e MS/MS. Os pontos da curva foram obtidos pelo método do padrão externo, onde as soluções foram fortificadas com 3 mix contendo os agrotóxicos em estudo, cujas concentrações encontram-se na tabela 2. Ao fazer o estudo comparativo entre os modos de aquisição de dados SIM e MS-MS observou-se que somente os agrotóxicos Terbufós e Trifluralina apresentaram ganho de sensibilidade no modo MS-MS considerando como critério a inclinação da reta (coeficiente angular). Porém, a maior sensibilidade do modo MS-MS é evidenciada em todos os agrotóxicos em estudo quando considerado picos com melhor relação sinal/ruído e cromatogramas mais livre de interferentes.

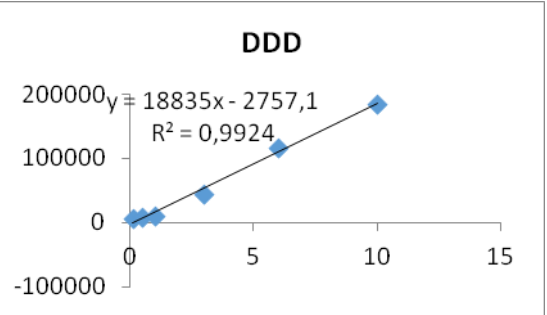
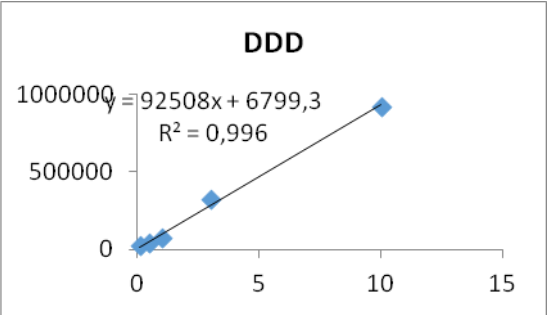
Figura 6 - Curvas de calibração obtidas para os agrotóxicos em água ultrapura nos modos de aquisição SIM e MS/MS.



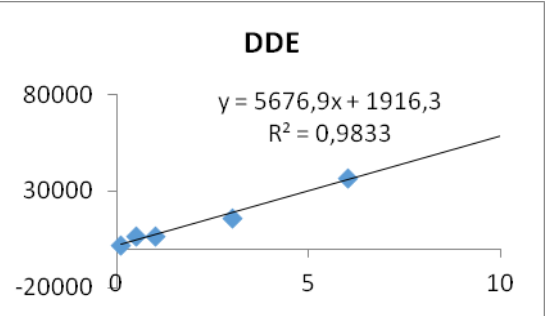
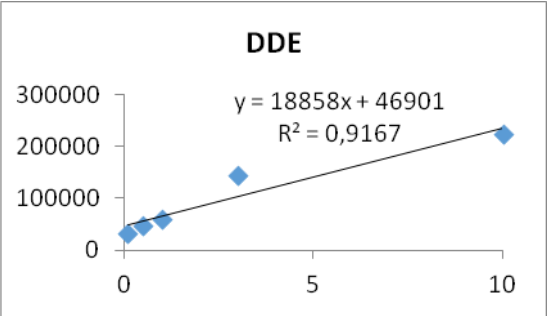
Clordano



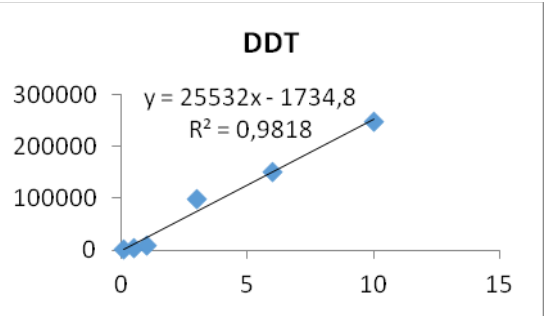
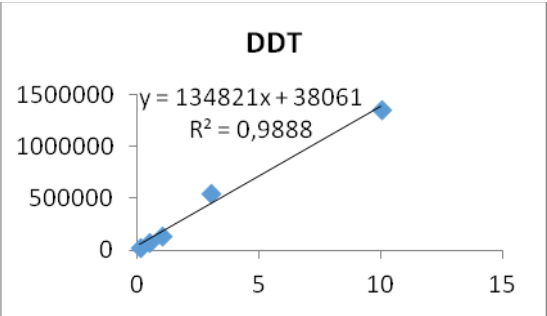
DDD



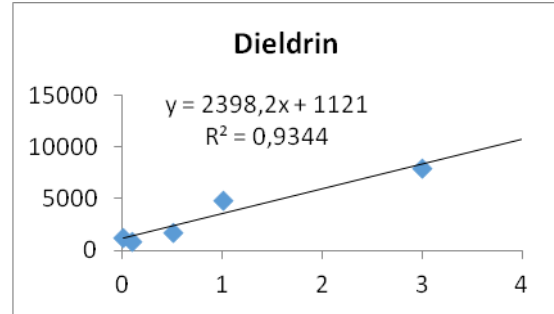
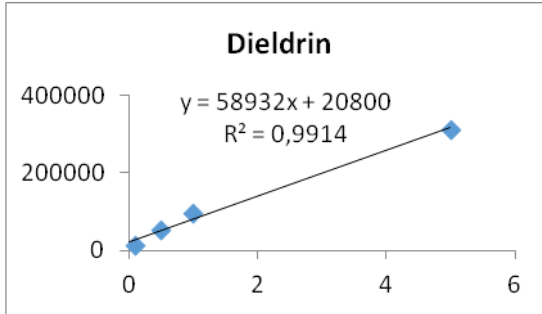
DDE



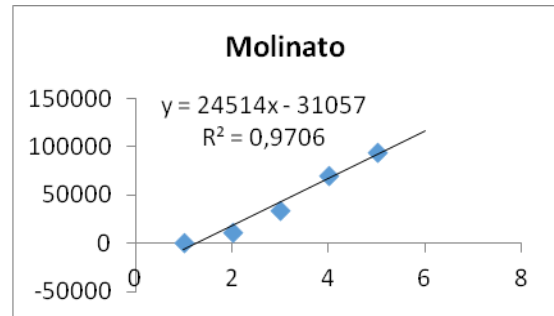
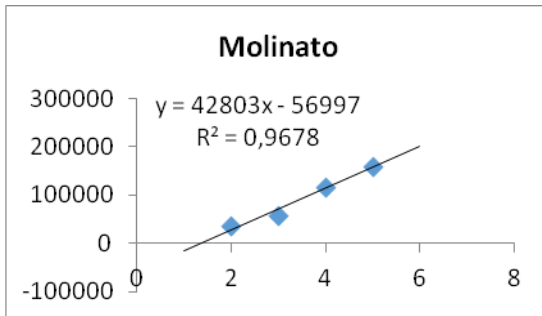
DDT



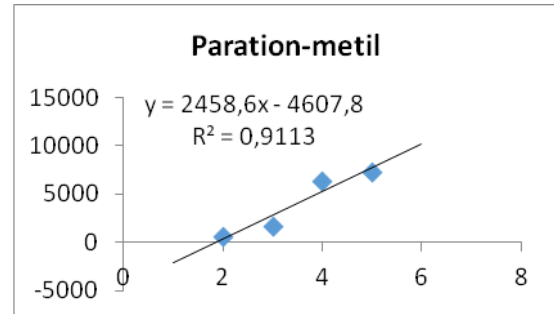
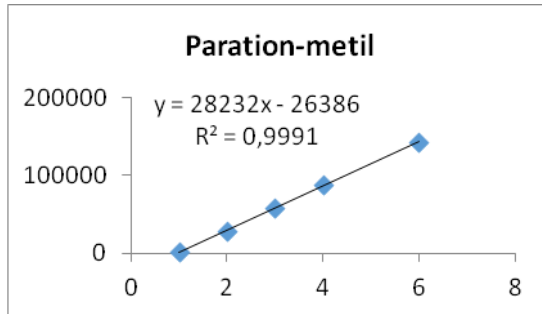
Dieldrin



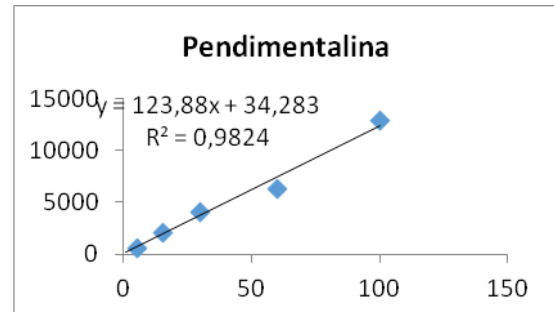
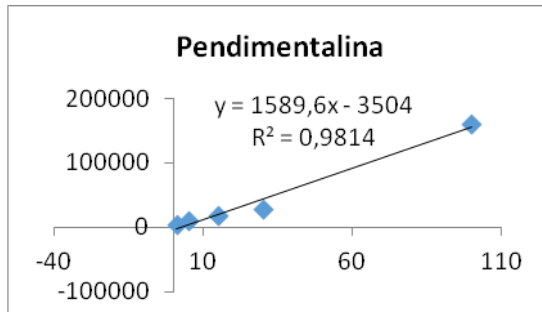
Molinato



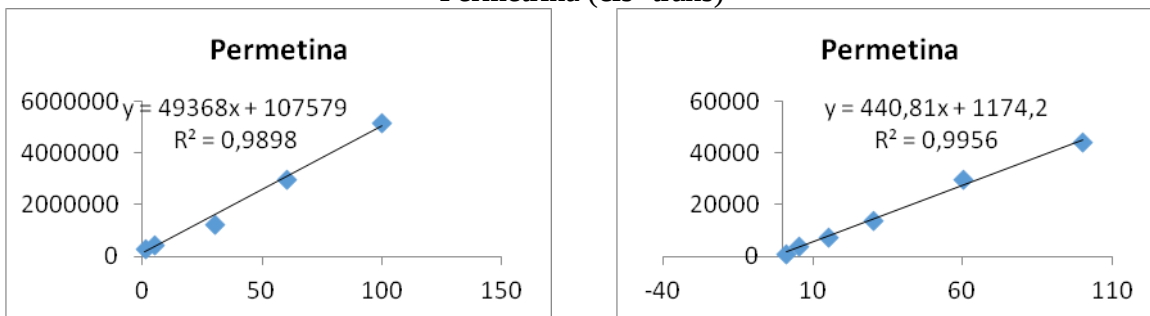
Parationa-metúlica



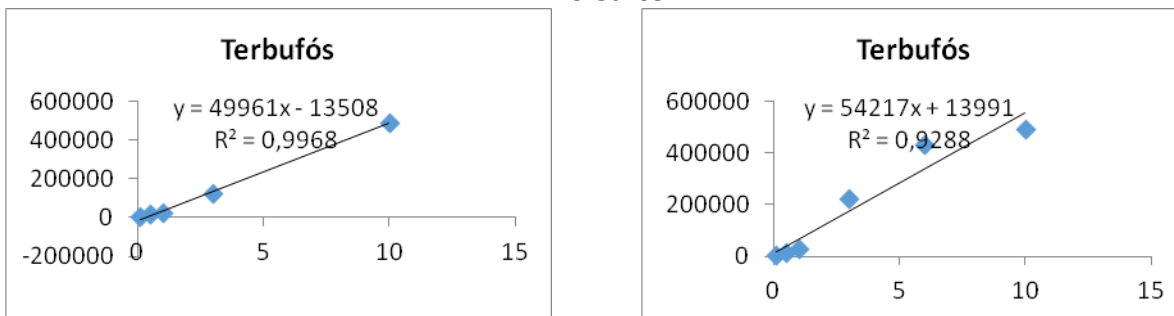
Pendimentalina



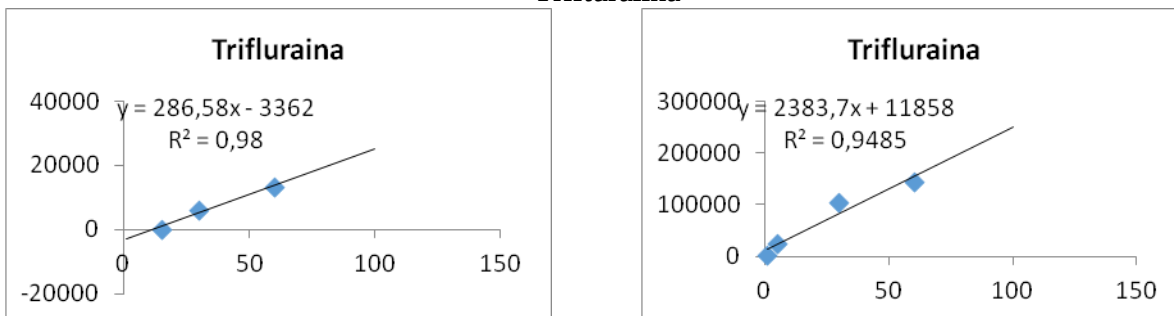
Permetrina (cis+trans)



Terbufós



Trifluralina



5.3. Análise de amostra real de água

Uma amostra de água de poço foi utilizada para avaliar o desempenho dos modos de aquisição de dados SIM e MS/MS. Para isso, a amostra foi fortificada com uma concentração conhecida dos agrotóxicos e em seguida submetida à determinação por SPME e utilizando os modos de aquisição SIM e MS/MS. Os resultados da

diferença de concentração entre os valores adicionados (fortificação) e os valores determinados na amostra podem ser vistos na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

7.

Tabela 6 - Porcentagem de variação entre as concentrações adicionadas e determinadas na amostra de água pelos modos SIM e MS/MS.

Agrotóxico	Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração determinada no modo SIM ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Diferença (%) entre Conc. Fortificada e Determinada – Modo SIM	Concentração determinada no modo MS/MS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Diferença (%) entre Conc. Fortificada e Determinada – Modo MS/MS
Aldrin	5,0	8,4	-68,3%	5,2	4%
Atrazina	6,0	4,8	20,5%	3,4	-44%
Clordano I	6,0	1,7	71,8%	2,3	-62%
Clordano II	6,0	2,6	56,5%	10,2	70%
Clorpirifós	60,0	116,0	-93,3%	67,1	12%
DDD	6,0	3,6	39,6%	7,1	18%
DDE	6,0	3,4	43,4%	5,4	-11%
DDT	6,0	5,4	10,1%	5,4	-10%
Dieldrin	3,0	0,8	71,8%	0,8	-72%
Molinato	30,0	17,3	42,2%	30,0	0%
Paration-metil	30,0	14,9	50,3%	27,7	-8%
Pendimentalina	60,0	78,1	-30,1%	92,8	55%
Permetrina	60,0	95,1	-58,5%	119,3	99%
Terbufós	6,0	2,0	66,9%	1,8	-70%
Trifluraina	60,0	62,1	-3,4%	15,6	-74%

(Fonte: Autor, 2018).

Alguns agrotóxicos como o clordano e a permetrina, por exemplo, apresentaram uma diferença percentual significativa no modo MS-MS ao determinar a concentração da amostra fortificada em relação a concentração adicionada. Este fato pode ser explicado pela possível coeluição do pico base com um pico de interferente. Portanto, a escolha de outro pico seria recomendado para sanar tais erros de quantificação.

6. CONCLUSÃO

Os cromatogramas obtidos pelo modo de aquisição MS/MS apresentaram melhor relação sinal/ruído em comparação ao modo SIM, além de melhor resolução.

As curvas analíticas apresentaram coeficiente de correlação $>0,90$, coerente com as recomendações do INMETRO, quanto às exigências de linearidade na validação de métodos analíticos.

A amostra de água do poço fortificada com soluções padrão de agrotóxicos apresentou uma análise quantitativa e qualitativa mais eficiente usando MS-MS, evidenciando um cromatograma com melhor seletividade e com menor interferência para este detector em relação ao SIM. Alguns parâmetros precisam ser reajustados a fim de obter-se resultados quantitativos mais satisfatórios para alguns agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; UFPR. **Seminário Mercado de Agrotóxicos e regulação**, Brasília, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR ISO/IEC 17025. Rio de Janeiro, 2005a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA). Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br>> Acesso em: agosto de 2018.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CARNEIRO, et al. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **Parte 1 -agrotóxicos, Segurança Alimentar Nutricional e Saúde. ABRASCO**, 2015.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A.; BARBOSA, P. G. A., SILVA, V. P. A.; **Cromatografia Gasosa: aspectos teóricos e práticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária.

RIDGWAY, Kathy; LALLJIE, Sam PD; SMITH, Roger M. **Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods**. Journal of Chromatography A, v. 1153, n. 1, p. 36-53, 2007.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v.27, p.771-780, n.5, 2004.

MEIRA, Ana Paula Gasques. Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 22, n. 2, p. 766777, 2015.

JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes et al. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global. **Química Nova**, v.32, n.4, p.996-1012, 2009.

HITES, Ronald A. **Development of gas chromatographic mass spectrometry**. *Analytical chemistry*, v. 88, n. 14, p. 6955-6961, 2016.

DÓREA, H. S; GAUJAC, A.; NAVICKIENE, S.; Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. **Scientia Plena**. v. 4, n. 7, 2009.

VALENTE, A. L. P.; A., F. **Microextração em fase sólida**. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n.4, p. 523-530, 2000.

HELENO, F. F.; LIMA, A. C.; AFONSO, R. J. C. F. COUTRIM, M. X. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por headspace e microextração em fase sólida. **Química Nova**. v.33, n.2, pp. 329-336, 2010.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic gas chromatography**, New York: John Wiley & Sons, 1998.

J. Cristale*, F. S. Silva, M. R. R. Marchi Disponível em:
<<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/25976/S0100-46702008000400009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 10 out. 2018

HARRIS, D.C. Quantitative chemical analysis, 8th ed. W. H. Freeman Company: New York, 2010, 891 p.

STEINIGER, David; BUTLER, Jessie; PHILIPS, Eric. Multi -residue Pesticide Analysis in Onion by a Modified QuEChERS Extraction and Ion Trap GC/MSn. **Thermo Scientific**, Austin, Usa, n. 10238, p.5-6, 2008. Anual.

STEINIGER, David; BUTLER, Jessie; PHILIPS, Eric. Multi -residue Pesticide Analysis in Rice by a Modified QuEChERS Extraction and Ion Trap GC/MSn. **Thermo Scientific**, Austin, Usa, n. 10239, p.5-6, 2009. Anual.