



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO – QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RENATA DE OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO DAS FONTES DE IONIZAÇÃO ESI E APCI EM
SISTEMA LC-MS/MS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE
AGROTÓXICO EM HORTALIÇAS**

FORTALEZA

2020

RENATA DE OLIVEIRA SILVA

ESTUDO COMPARATIVO DAS FONTES DE IONIZAÇÃO ESI E APCI EM SISTEMA
LC-MS/MS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICO
EM HORTALIÇAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento

FORTALEZA

2020

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)

- S583e Silva, Renata de Oliveira.
Estudo comparativo das fontes de ionização esi e apci em sistema lc - ms/ms para validação de método multirresíduo de agrotóxico em hortaliças / Renata de Oliveira Silva. – 2020.
134 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.
1. Agrotóxicos. 2. Cromatografia Líquida. 3. QuEChERS. 4. Espectrometria de Massas. I. Título.
CDD 540
-

RENATA DE OLIVEIRA SILVA

ESTUDO COMPARATIVO DAS FONTES DE IONIZAÇÃO ESI E APCI EM SISTEMA
LC-MS/MS PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICO
EM HORTALIÇAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em: ___ / ___ / ___.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Dávila de Souza Zampieri
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Helena Becker
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Selene Maia de Morais
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus, pela vida.

Ao meu filho Bernardo, meu maior e melhor projeto de vida.

Ao meu esposo Ítalo, pelo companheirismo, amor e suporte emocional.

Aos meus pais, pelo exemplo de força e fé.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre renovar minhas forças e abençoar minhas conquistas.

Aos meus pais (Vera e Osvaldo) pelo amor, segurança, renúncia e, principalmente pelos valores e princípios que me ensinaram.

Ao meu filho Bernardo a quem tanto amo, que mesmo sem entender, foi minha maior fonte de energia e motivação para conclusão deste trabalho

Ao meu marido Ítalo, pelo amor, compreensão, paciência e por não medir esforços em me ajudar, sendo meu maior motivador. Você foi fundamental para que eu seguisse em frente diante das dificuldades.

Aos meus irmãos e em especial as minhas irmãs e minhas melhores amigas (Rosângela, Hosana, Rosilene, Terezinha e Jane). Obrigada por acreditarem e torcerem por mim. Pelo orgulho que sei que vocês têm, assim como eu tenho muita admiração e orgulho de vocês.

Ao meu orientador Prof^o Dr^o Ronaldo Ferreira Nascimento, pelo qual tenho imensa admiração e orgulho por ter sido sua orientanda. Obrigada por acreditar, confiar e persistir nessa jornada, sempre nos ensinando a transformar as dificuldades em oportunidade de crescimento e aprendizado.

A Prof^a Dr^a Selene M. de Moraes que prontamente aceitou participar da minha banca de defesa. Obrigada pelas contribuições.

A Prof^a Dr^a Daniele Oliveira e a Prof^a Dr^a Davila Zampieri pelas contribuições no exame de qualificação, como também a participação e banca de defesa. Tenho certeza das valiosas contribuições para melhoria do meu trabalho.

A Prof^a Dr^a Helena Becker por me dar a primeira oportunidade de trabalhar com pesquisa científica e pelos ensinamentos de vida pessoal e profissional. Muito obrigada por tudo.

A Prof^a Dr^a Maria Aparecida L. Milhome em que pude conviver no período do mestrado e foi minha grande motivadora em seguir o doutorado. Obrigada pela amizade, carinho e por todas as contribuições no desenvolvimento deste trabalho, como também pelos conselhos e orientações prestadas.

A minha eterna gratidão a todos da equipe do laboratório de Química Instrumental da Fundação Núcleo de Tecnologia - LQI/NUTEC (Crisiana, Rubens, Vitor, Cleidiane, Denilson, João Felipe, Paula Luciana, Nayara, Raquel, Thiago e Luiza) por não medir esforços para que esse trabalho fosse concluído, pois sem o apoio de vocês eu não teria conseguido concluir meu trabalho.

A minha amiga Marília Gabriela pelo desenvolvimento em conjunto do nosso trabalho, pela troca de aflições e experiências, pelo incentivo nas horas difíceis e duvidosas e principalmente

pela confiança que pudemos ter em todos os momentos. Sua companhia foi imprescindível em todo esse processo, sendo sempre confortante e motivador ter alguém passando pela mesma situação e podermos nos ajudar. Nossa fé e orações foram nossa fortaleza.

Às minhas amigas “Luluzinhas”, Crisiana, Débora, Keyve e Luanna, por todos os nossos preciosos momentos vividos, a amizade de vocês me faz feliz e sei que é para a vida toda.

A amiga, Socorro Pinheiro, pelo exemplo de superação, agradeço o apoio incondicional e a incansável torcida.

Às amigas em que pude conviver nos últimos meses, Isabel e Mairlane, como também meu amigo Hiago, que sempre me ajudaram desde o início do doutorado, vocês são anjos enviados por Deus na minha vida. Muito obrigada por toda ajuda.

Aos amigos e colegas do LAT (Laboratório de Análises de Traços), que já concluíram seus trabalhos e os atuais, agradeço pelas dicas, discussões bem como aprendizados e dos momentos agradáveis de estudo.

A Universidade Federal do Ceará, por meio do Programa de Pós Graduação em Química pela oportunidade de realização do presente trabalho.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, em breve estarás fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

RESUMO

A contaminação por agrotóxicos é um tema que vem despertando atenção, uma vez que o uso descontrolado no campo pode levar à presença de resíduos desses compostos nos alimentos, representando um risco à saúde humana. Os agrotóxicos são utilizados na agricultura com o objetivo de evitar prejuízos causados por uma variedade de espécies animais e vegetais. Atualmente, as técnicas mais sensíveis empregadas na análise de agrotóxicos são a cromatografia gasosa e líquida acopladas à espectrometria de massas (GC-MS, LC-MS). Essas técnicas apresentam elevados desempenhos analíticos, mas requerem laboriosas etapas de preparo de amostra antes da análise instrumental. Diante disso, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos analíticos para determinar resíduos de agrotóxicos em alimentos. O presente trabalho envolve o desenvolvimento, otimização e validação de um método analítico para determinação simultânea de 17 agrotóxicos em amostras de hortaliças comercializadas no município Fortaleza – Ceará usando LC-MS/MS. O objetivo principal é comparar a eficiência de duas fontes de ionização à pressão atmosférica (API), em um sistema LC-MS/MS: Ionização por Eletrospray (ESI) e Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI), avaliando a sensibilidade e o efeito matriz dos compostos em estudo. O método QuEChERS-Citrato foi usado no preparo do extrato da matriz, isenta de agrotóxicos, para construção das curvas analíticas por superposição na matriz. Foram avaliadas as figuras de mérito como seletividade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), linearidade e exatidão, através de ensaios de recuperação do método. As curvas analíticas foram validadas estatisticamente, e apresentaram uma boa linearidade em ambas as fontes, com coeficientes de determinação acima de 0,99, estando de acordo com as normas adotadas pela ANVISA e pelo MAPA. Os valores de LD variaram de 0,05 a 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LQ de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a fonte ESI, e de 0,25 a 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LQ 0,75 a 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a fonte APCI. Os ensaios de exatidão e precisão foram avaliados em três níveis de concentração (2, 10 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$). A maioria dos compostos apresentou bons resultados de recuperação do método, atendendo às recomendações das normas adotadas para o presente estudo. A técnica ESI apresentou uma melhor resposta em termos de sensibilidade, na qual mostrou menores limites de detecção. O estudo de efeito matriz demonstrou que a fonte APCI apresenta maiores vantagens na maioria dos agrotóxicos analisados. Com isso, o método foi aplicado em 15 amostras divididas entre as matrizes em estudo do presente trabalho. Dentre as 15 amostras analisadas, o acefato foi encontrado em 7 (3 amostras de repolho e 4 amostras de brócolis). Também foi encontrado o ingrediente ativo clorpirifós em amostra de repolho, que não tem uso autorizado para esta

cultura, bem como os agrotóxicos dimetoato, malation, profenofós e propiconazol, porém estes se encontraram abaixo dos limites de quantificação do método.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Cromatografia Líquida. QuEChERS. Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

Pesticide contamination is a topic that has attracted attention, since uncontrolled use in the field can lead to the presence of residues of these compounds in food, which can represent a risk to human health. Pesticides are compounds used in agriculture in order to avoid damage caused by a variety of animal and plant species. Generally, the most sensitive techniques are used in the analysis of pesticides, such as gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS, LC-MS). Both techniques present high analytical performances, but requires laborious stages of sample preparation before instrumental analysis. Therefore, it is essential to develop analytical methods for determining pesticides residues in food. This work involves the development, optimization and validation of an analytical method for simultaneous determination of 17 pesticides in samples of vegetables sold in Fortaleza – Ceará using LC-MS/MS. The main objective is to compare the efficiency of two ionization sources at atmospheric pressure (API) in an LC-MS/MS system: Electrospray Ionization (ESI) and Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), evaluating the sensitivity and matrix effect of the compounds under study. The QuEChERS - Citrate method was used to prepare the matrix extract, pesticides-free, to construct the analytical curves by matrix-matched calibration. Figures of merit such as selectivity, Limit of Detection (LOD), Limit of Quantification (LOQ), linearity and accuracy were evaluated through the recovery tests of the method. The analytical curves were statistically validated, presenting a good linearity in both sources, with coefficients of determination above 0.99, according to the guidelines established by ANVISA and MAPA. Limit of Detection (LOD) values ranged from 0.05 to 0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$ and Limit of Quantification (LOQ) ranged from 0.1 to 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ in ESI source; and ranged from 0.25 to 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ for LOQ, and 0.75 to 2.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for LOD, in APCI source. Accuracy and precision were evaluated at three concentration levels (2, 10 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Most of the compounds presented good results in the recovery of the method, meeting the recommendations of the standards adopted for the present study. The ESI technique presented a better response in terms of sensitivity, showing lower detection limits. The results of the matrix effect study demonstrated that the APCI source has advantages for most of the pesticides investigated. Thus, the method was applied to 15 samples divided among the matrices under study in the present work. Among the samples analyzed, acephate was found in 7 (3 samples of cabbage and 4 samples of broccoli). Chlorpyrifos was also found in a cabbage sample, although it has no authorized use for this crop, as well as the pesticides

dimethoate, malathion, profenofos and propiconazole, but these were below the limits of quantification of the method.

Keywords: Pesticides. Liquid Chromatography. QuEChERS. Mass Spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Comercialização de agrotóxicos por unidade da Federação	31
Figura 2	– Esquema geral de um espectrômetro de massas	38
Figura 3	– Representação do processo de ionização por Eletrospray – ESI	41
Figura 4	– Dois mecanismos propostos para formação de íons gasosos no processo de ionização por Eletrospray	42
Figura 5	– Representação do processo de ionização química à pressão atmosférica APCI	43
Figura 6	– Representação de um sistema quadrupolo simples	50
Figura 7	– Representação de sistema do tipo triplo quadrupolo	51
Figura 8	– Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas Thermo Scientific, modelo TSQ Quantum Access, LQI/NUTEC	70
Figura 9	– Fluxograma da marcha analítica do método QuEChERS-Citrato	73
Figura 10	– Representação gráfica da formação dos fragmentos com suas respectivas energias de colisão e o espectro de massas do agrotóxico Diazinon na fonte ESI	79
Figura 11	– Representação gráfica da formação dos fragmentos com suas respectivas energias de colisão e o espectro de massas do agrotóxico Clorpirifós na fonte ESI	80
Figura 12	– Representação gráfica da formação dos fragmentos com suas respectivas energias de colisão e o espectro de massas do agrotóxico aldicarbe na fonte ESI	81
Figura 13	– Representação gráfica da formação dos fragmentos com suas respectivas energias de colisão e o espectro de massas do agrotóxico aldicarbe na fonte APCI	82
Figura 14	– Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS para os compostos no modo SRM de uma solução analítica de 100 µL-1 preparada no extrato branco de brócolis	83
Figura 15	– Cromatograma de monitoramento de reação selecionada (SRM) do azinfos -	85

metil no extrato de repolho em branco e amostra dopada usando ESI	
Figura 16 – Cromatograma de monitoramento de reação selecionada (SRM) do azinfos- metil no extrato de repolho em branco e amostra dopada usando APCI	86
Figura 17 – Gráficos da sensibilidade dos compostos comparando as fontes ESI e APCI .	87
Figura 18 – Gráficos de resíduos para o composto ametrina nas fontes ESI e APCI	90
Figura 19 – Representação gráfica do Efeito Matriz dos agrotóxicos na ESI	97
Figura 20 – Representação gráfica do Efeito Matriz na APCI	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos agrotóxicos de acordo com sua toxicidade	28
Tabela 2 – Análise de resíduos de agrotóxicos empregando LC-ESI-MS/MS e LC-APCI-MS/MS em amostras de alimentos no período de 2015-2019	46
Tabela 3 – Informações das propriedades Físico-Químicas, Classe, Grupo Químico, Classificação toxicológica e Fórmula molecular de cada agrotóxico em estudo	67
Tabela 4 – Gradiente usado na separação do Sistema Cromatográfico	71
Tabela 5 – Resultados da otimização das condições de fragmentação para determinação dos compostos estudados com ionização por ESI(+) e APCI(+)	78
Tabela 6 – Dados dos parâmetros das curvas analíticas, linearidade e testes estatísticos para a fonte ESI	91
Tabela 7 – Dados dos parâmetros das curvas analíticas, linearidade e testes estatísticos para a fonte APCI	93
Tabela 8 – Valores dos Limites de Detecção e Quantificação com respectivos valores de LMRs	98
Tabela 9 – Dados da literatura de LD e LQ em diferentes hortaliças utilizando LC-MS/MS	99
Tabela 10 – Resultados do estudo da recuperação para as matrizes: couve-flor, repolho e brócolis, utilizando a fonte ESI	101
Tabela 11 – Resultados do estudo da recuperação para as matrizes: couve-flor, repolho e brócolis, utilizando a fonte APCI	102
Tabela 12 – Resultados das amostras analisadas de repolho, couve-flor e brócolis expressa em $\mu\text{kg-1}$	103
Tabela 13 – Dados referentes aos agrotóxicos com maior número de detecção irregulares do PARA-2015	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês, <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
API	Ionização à Pressão Atmosférica (do inglês, <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>)
APOI	Associação dos Produtores Orgânicos da Ibiapaba
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
BPA	Boas Práticas Agrícolas
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
GCB	Carbono Grafitizado (do inglês, <i>Graphitized Carbon Black</i>)
GHS	Sistema de Classificação Globalmente Unificado (do inglês, <i>Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ICH	Conferência Internacional em Harmonização (do inglês, <i>International Conference on Harmonization</i>)
IDA	Ingestão Diária Aceitável
ISO	Organização Internacional de Normatização (do inglês, <i>International Organization for Standardization</i>)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série (do inglês, <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry tandem</i>)
LMR	Limite Máximo de Resíduo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

MMQP	Método dos Mínimos Quadrados Ponderados
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PSA	Amina Primária e Secundária (do inglês, <i>primary secondary amine</i>)
PIB	Produto Interno Bruto
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
SESA	Secretaria de Saúde do Estado do Ceará
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Hortaliças	20
3.1.1	<i>A importância do consumo de hortaliças</i>	21
3.1.2	<i>Horticultura no Ceará e o uso de agrotóxico</i>	23
3.2	Agrotóxicos	24
3.2.1	<i>Definição e um breve histórico</i>	24
3.2.2	<i>Toxicidade e classificação dos agrotóxicos</i>	27
3.2.3	<i>O uso de agrotóxicos no Brasil: Contexto atual</i>	30
3.3	Métodos para determinação de Agrotóxicos em Alimentos – QuEChERS ..	34
3.4	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas – LC-MS/MS	37
3.4.1	<i>Sistema de injeção da amostra</i>	38
3.4.2	<i>Fontes de Ionização (FI)</i>	39
3.4.2.1	<i>Ionização por Eletronebulização – ESI</i>	40
3.4.2.2	<i>Ionização Química à Pressão Atmosférica</i>	42
3.4.3	<i>Analísadores de Massa</i>	49
3.4.3.1	<i>Sistema Quadrupolo</i>	49
3.4.3.2	<i>Analísador de Massas Triplo Quadrupolo – QqQ</i>	50
3.4.3.3	<i>Analísadores Ion – Trap</i>	52
3.4.3.4	<i>Analísadores de Tempo de Voo (Time-of-Flight – TOF)</i>	52
3.4.3.5	<i>Analísador Orbitrap</i>	53
3.5	Validação de Método	54
3.5.1	<i>Seletividade</i>	55
3.5.2	<i>Linearidade</i>	55
3.5.3	<i>Efeito Matriz</i>	58
3.5.4	<i>Limite de Detecção</i>	59
3.5.5	<i>Limite de Quantificação</i>	60
3.5.6	<i>Exatidão (Recuperação)</i>	60
3.5.7	<i>Precisão</i>	62

3.5.7.1	<i>Repetibilidade</i>	63
3.5.7.2	<i>Precisão Intermediária</i>	64
3.5.7.3	<i>Reprodutibilidade</i>	64
4	MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1	Instrumentação e acessórios	65
4.2	Reagentes e consumíveis	65
4.3	Agrotóxicos e preparo das soluções analíticas	66
4.4	Otimização do sistema cromatográfico LC – MS/MS	69
4.4.1	<i>Condições do sistema de detecção de massas – Interfaces ESI e APCI</i>	70
4.4.2	<i>Preparo da fase móvel para o sistema cromatográfico</i>	71
4.5	Preparo de amostras: couve-flor, repolho e brócolis – extrato pelo método QuEChERS – citrato	71
4.6	Validação do método	73
4.6.1	<i>Seletividade</i>	73
4.6.2	<i>Linearidade / Faixa de trabalho</i>	74
4.6.3	<i>Efeito Matriz</i>	75
4.6.4	<i>Limite de Quantificação e Limite de Detecção</i>	75
4.6.5	<i>Precisão</i>	75
4.6.6	<i>Exatidão</i>	75
4.6.7	<i>Aplicação do método</i>	76
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
5.1	Otimização dos parâmetros para ionização e fragmentação dos íons monitorados e detectados no MS/MS	77
5.2	Otimização das condições cromatográficas	83
5.3	Validação do método	85
5.3.1	<i>Seletividade</i>	85
5.3.2	<i>Sensibilidade</i>	86
5.3.3	<i>Linearidade</i>	89
5.3.4	<i>Efeito Matriz</i>	95
5.3.5	<i>Limite de Detecção Limite de Quantificação</i>	97
5.3.6	<i>Exatidão (Recuperação)/Precisão</i>	100
5.4	Aplicação do método	103
6	CONCLUSÃO	105

REFERÊNCIAS	107
APÊNDICE A – ESPECTRO DE MASSAS DOS AGROTÓXICOS OBTIDOS NA FONTE ESI	118
APÊNDICE B – ESPECTRO DE MASSAS DOS AGROTÓXICOS OBTIDOS NA FONTE APCI	127
APÊNDICE C – DADOS DA LINEARIDADE E TESTES ESTATÍSTICOS DE AMBAS AS FONTES ESI E APCI UTILIZANDO A FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 2,0 A 200,0 PPB	130

1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola brasileira é de grande importância para o crescimento e desenvolvimento da economia nacional. A fruticultura e a olericultura (cultivo de verduras e legumes) são atividades econômicas geradoras de alimentos, riquezas e renda. A busca por mais ofertas de alimentos vem crescendo e os produtos hortícolas acompanham o crescimento dessa demanda, diante do aumento populacional (PEREIRA e PEREIRA, 2016; PUIATTTI, 2019).

O Brasil é um dos maiores produtores de alimento do mundo, ocupando a quarta posição de maior exportador, ficando atrás apenas da União Europeia, EUA e China. Dispomos de vários recursos, principalmente climáticos, que favorecem a vasta produção de alimentos (AGRICULTURA, 2016; BRASIL, 2018). Segundo informações do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), a olericultura está em expansão no país, onde se destacam os estados do Rio Grande do Norte e Ceará (SEBRAE, 2018).

Na Serra da Ibiapaba, um dos principais centros produtores de frutas e hortaliças no Ceará, a agricultura caracteriza-se pela presença de agricultores familiares, os quais têm sido muito importantes para a economia cearense. O agronegócio de hortaliças tem possibilitado a geração de grande número de empregos devido à elevada exigência de mão-de-obra, desde a semeadura até a comercialização, mostrando uma inquestionável contribuição ao desenvolvimento do estado (ALENCAR *et al.*, 2013; GOMES, 2015).

O mercado de hortaliças vem se estruturando em diversos segmentos. Nesse aspecto, além dos tradicionais produtos *in natura*, a indústria de processamento vem ampliando a oferta de produtos ao consumidor, alguns exemplos são vegetais conservados, gelados ou congelados, desidratados e liofilizados, como também hortaliças minimamente processadas (MARTINS *et al.*, 2013; LOUZADA *et al.*, 2015).

A demanda cada vez maior de alimentos produzidos trouxe consigo a justificativa para a utilização de produtos químicos no controle de organismos que afetam essa produção (BRITO *et al.*, 2003; JOBIM *et al.*, 2006; SOARES e PORTO, 2012). Essa elevada eficiência produtiva na agricultura tem observado diversos impactos ambientais e sociais, dentre eles, está o uso de agrotóxicos, amplamente utilizados em todo o Brasil (SANTANA, MOURA e NOGUEIRA, 2013).

Os agrotóxicos são substâncias largamente utilizadas com o propósito de prevenir, destruir ou controlar pragas que atingem as áreas de cultivo agrícola (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012). O intenso e desordenado uso de agrotóxicos tem ocasionado consequências graves para saúde humana como também riscos de degradação do meio rural. Isso devido, na maioria das vezes, ao uso inadequado e excessivo dos produtores, que dispõem de recursos humanos pouco treinados (PIGNATI *et al*, 2017). Uma vez aplicados, os agrotóxicos exercem a função de controle específico, mas excedem esta função quando dispersados no meio ambiente com difícil controle dos danos (ANVISA; UFPR, 2012). Nesse cenário, a segurança alimentar está ameaçada e a questão do uso dos agrotóxicos torna-se um problema de saúde pública e ambiental (PIGNATI *et al*, 2017). O Brasil dispõe de legislação acerca dos agrotóxicos, entretanto, não há uma efetiva fiscalização quanto ao uso uma vez que, os produtores geralmente não seguem as boas práticas agrícolas (BPA). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio do seu Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), monitora sistematicamente para verificar se os limites máximos de resíduos (LMR) vêm sendo respeitados na produção de alimentos. Na prática, o nível de resíduo de agrotóxico no alimento não deve ultrapassar o LMR quando o produtor segue as indicações de uso contidas no rótulo do produto ou as boas práticas agrícolas (BPA). Os consumidores de alimentos, se ingerirem resíduos acima do LMR permitidos, podem estar sob risco de exposição crônica a agrotóxicos.

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos vem assumindo grande importância para o alcance à segurança alimentar dos consumidores, de modo que, cada vez mais, a população é conscientizada sobre os efeitos prejudiciais e riscos através de alimentos contaminados.

Ao longo dos últimos anos tem-se observado o desenvolvimento de técnicas e métodos para o preparo de amostra, em análise de resíduos de agrotóxicos. Um exemplo é método multirresíduos QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), sendo que suas modificações passaram a ser amplamente aplicados pelos laboratórios em diversos países (ANASTASSIADES *et al*, 2003; PRESTES, *et al*, 2011).

A Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry – LC/MS*) é uma das técnicas analítica mais desenvolvida, difundida e empregada para fins qualitativos e, principalmente, quantitativos em aplicações científicas e industriais (STACHNIUK e FORNAL, 2016). A LC é muito efetiva na separação dos analitos, enquanto a MS permite sua identificação e/ou confirmação em nível traços (LANÇAS, 2013). Desde a década de 1970, várias interfaces de LC-MS/MS

foram desenvolvidas, mas foi somente após o lançamento das fontes de Ionização à Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization – API*), como exemplo a Ionização por Eletronebulização (*Electrospray Ionization – ESI*) e a Ionização Química à Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI*), que a LC-MS tornou-se uma alternativa robusta (DONATO *et al*, 2012; NASCIMENTO *et al*, 2017; SILVA *et al*, 2019).

O desenvolvimento de métodos analíticos vem contribuindo para o fortalecimento na busca de novas investigações de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Portanto, este estudo torna-se relevante devido à contribuição de trabalhos que trazem novas informações e conhecimento no que diz respeito à realidade decontaminação de produtos alimentícios por resíduos de agrotóxicos no estado do Ceará.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho consiste em comparar o comportamento de agrotóxicos utilizando as fontes ESI e APCI na aplicação das matrizes brócolis, couve-flor e repolho, através da validação de metodologia para análise multirresíduos de agrotóxicos, utilizando o método de extração QuEChERS e a técnica LC-MS/MS.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimização das informações espectrométricas através da injeção individual de cada padrão de agrotóxico diretamente na fonte (ESI) e (APCI) do espectrômetro de massas;
- Comparar as performances analíticas em termos de sensibilidade das técnicas ESI-MS/MS e APCI-MS/MS através da detecção de 17 agrotóxicos em amostras de repolho, brócolis e couve-flor;
- Validar os 17 compostos segundo parâmetros preconizados pelo MAPA, ANVISA, através das figuras de mérito: seletividade, efeito matriz, linearidade, exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária);
- Aplicar o método desenvolvido e validado em amostras comercializadas na cidade de Fortaleza e região metropolitana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Hortaliças

Segundo a Resolução nº 12, de 1978, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), hortaliça é uma planta herbácea da qual uma ou mais partes são utilizadas como alimento na sua forma natural. Apresentam em sua maioria, características bem definidas, a saber: consistência tenra (não lenhosa), ciclo biológico curto, exigência de tratos culturais intensivos, cultivo em áreas menores (em relação às grandes culturas) e utilização na alimentação humana ainda enquanto cruas, sem exigir prévio preparo industrial. São vegetais de alto valor nutritivo, que promovem crescimento, fornecem energia, aumentam a resistência às doenças e regulam o bom funcionamento dos órgãos humanos.

A produção de hortaliças ou olericultura é uma das atividades agrícolas de maior intensidade no uso da terra e seus recursos (PUIATTI, 2019). Diferentemente de atividades extensivas, a olericultura é uma atividade agrícola em que o agricultor planta o ano todo, ou seja, em todas as estações do ano. A olericultura no Brasil de hoje é uma atividade de grande importância social, econômica, industrial e alimentar (SEBRAE, 2018). O mercado varejista e atacadista de hortaliças tem buscado aprimorar-se aos novos hábitos e formas de consumo de seus consumidores buscando redução de custos, mas nunca perdendo o foco de se alcançar maiores lucros. As empresas são conhecedoras da importância de compreender a preferência do consumidor, a fim de obter maior sucesso de venda (PINHEIRO *et al.*, 2011; PEREIRA e PEREIRA, 2016, PUIATTI, 2019).

As hortaliças são grupo de plantas que apresentam uma variedade de formas, tamanhos, cores e sabores. À medida que o mercado se torna mais exigente, as hortaliças podem ser subdivididas de várias maneiras e também serem destinadas a diferentes segmentos (FILGUEIRA, 2000; PEREIRA e PEREIRA, 2016). São também denominadas por cultura olerácea e popularmente conhecidas como verduras e legumes (SEBRAE, 2018).

Devido à grande quantidade de espécies envolvidas e as particularidades de cada cultura, existem várias classificações baseadas nas características comuns. Uma classificação que atualmente vem sendo utilizada pelo Sistema Nacional de Centrais de Abastecimento engloba a produção de: Hortaliças tuberosas - são aquelas cujas partes utilizáveis desenvolvem-se dentro do solo, compreendendo: tubérculos (batatinha, cará), rizomas (inhame), bulbos (cebola, alho) e raízes tuberosas (cenoura, beterraba, batata-doce, mandioquinha-salsa); Hortaliças herbáceas - aquelas cujas partes aproveitáveis situam-se

acima do solo, sendo tenras e suculentas: folhas (alface, taioba, repolho, espinafre), talos e hastes (asparago, funcho, aipo), flores e inflorescências (couve-flor, brócolis, alcachofra); Hortaliças-fruto - utiliza-se o fruto, verde ou maduro, todo ou em parte: melancia, pimentão, quiabo, ervilha, tomate, jiló, berinjela, abóbora (REGO, 2015; *apud* PENTEADO, 2000).

Outra forma de classificação muito utilizada no meio técnico-científico é o parentesco botânico das plantas que tem como a vantagem de se basear em características muito estáveis. Assim, enquanto os métodos culturais utilizados, ou as partes aproveitáveis na alimentação podem variar de uma região para outra, conforme imposições econômicas ou por simples tradição regional, as características botânicas são invariáveis. Esse tipo de classificação baseia-se no parentesco e nas semelhanças entre elas, utilizando-se os órgãos vegetativos e reprodutivos. Para tanto, utiliza-se três unidades taxonômicas: a Família Botânica - que é a reunião dos gêneros botânicos afins; o Gênero Botânico - que é o agrupamento de espécies afins; a Espécie Botânica - que é a unidade taxonômica básica, englobando indivíduos vegetais muito semelhantes entre si(EMBRAPA, 2012).

Um bom exemplo é o da espécie botânica *Brassica oleracea* que é composta por várias espécies com destaque para o repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), a couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), o brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica*) e a couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*).

3.1.1 A importância do consumo de hortaliças

Hoje em dia muito se fala sobre a importância de manter uma alimentação saudável, incluindo o consumo variado de frutas e verduras. Muito mais do que saciar o apetite, os alimentos também são necessários para o nosso organismo. Cada um possui uma função específica para a manutenção do bom funcionamento do corpo, por isso uma dieta balanceada e diversificada tende a ser mais vantajosa por disponibilizar uma gama maior de nutrientes (EMBRAPA, 2012).

As hortaliças desempenham papel fundamental na alimentação, pois são capazes de suprir as necessidades cotidianas do organismo humano em relação aos sais minerais, principalmente: cálcio, fósforo e ferro; vitaminas A, do complexo B e C; fibras e outros nutrientes essenciais para o bom desenvolvimento e funcionamento do organismo. Consideradas alimentos reguladores, as hortaliças são fundamentais para fazer o organismo funcionar de maneira adequada e harmônica. Os benefícios destes alimentos estão cada vez mais comprovados por pesquisas científicas. A ingestão diária de hortaliças, cruas ou cozidas,

com outros alimentos, favorece a boa nutrição diária e a manutenção da saúde. As hortaliças podem ser consumidas como saladas, ensopados, guisados, condimentos etc. (WHO, 2002; SILVA, 2011; PEREIRA e PEREIRA, 2016).

Frutas e hortaliças são ricas em vitaminas, minerais e fibras, e devem estar presentes todos os dias nas refeições, pois contribuem para uma boa saúde e protegem contra o aparecimento de várias doenças. Devido à complexa rede de nutrientes destes alimentos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incentivado em todo mundo campanhas de estímulo ao consumo de frutas e hortaliças. A OMS recomenda o consumo mínimo diário de 400g destes alimentos. Por esta razão, é muito importante que seu consumo seja motivado desde a primeira infância para que os bons hábitos alimentares se instalem e perpetuem até a idade adulta. O consumo adequado de hortaliças previne doenças causadas pela má nutrição e é muito mais econômico que o tratamento com o uso de medicamentos (WHO, 2002; EMBRAPA, 2012).

Entretanto, a maioria das pessoas ingere uma quantidade menor de verduras e frutas daquela quantidade recomendada, mesmo sabendo que uma ingestão considerada adequada desses alimentos traz benefícios à saúde, controle das calorias e a manutenção do peso e do corpo em boa forma (SILVA, 2011). Diversos problemas de saúde comumente enfrentados, como a obesidade, o colesterol ruim, o diabetes, a má circulação, os problemas de pressão arterial, os problemas renais, entre outros, são consequências dos péssimos hábitos alimentares com predominância de alimentos industrializados, que normalmente possuem altos teores de gorduras e sal, baixa qualidade nutricional e pouca diversidade. Problemas que atingem as crianças podem ser prevenidos ou diminuídos com uma alimentação adequada e balanceada, o que pode ser obtido incluindo as hortaliças com suas diversidades e riquezas nutricionais ao cardápio diário (WHO, 2002; SILVA, 2011; EMBRAPA, 2012).

Nos últimos anos, a população brasileira tem se defrontado com uma situação paradoxal. Por um lado, campanhas de conscientização em prol de uma alimentação balanceada e saudável com incentivo ao consumo de frutas e hortaliças. Por outro lado, a insegurança alimentar, devido à produção dessas hortaliças se caracterizarem pelo uso abusivo de insumos, particularmente, de adubos e agrotóxicos, ocasionando consequências danosas para a qualidade dos alimentos e do meio ambiente. Portanto, fica evidente a importância de trabalhos de pesquisa voltados para determinação de agrotóxicos nesses alimentos, pois além do aspecto científico, existem também questões de saúde humana e de preocupação ambiental envolvidas.

3.1.2 Horticultura no Ceará e o uso de agrotóxico

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas e um grande consumidor de agrotóxicos, representando aproximadamente 84% de todo o volume utilizado na América Latina e correspondendo a 20% do total utilizado no mundo (PIGNATI *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018; NAVA, 2019).

O agronegócio de hortaliças é um ramo da economia agrícola que possibilita a geração de grande número de empregos, sobretudo no setor primário, devido à elevada exigência de mão-de-obra desde a semeadura até a comercialização. O estado do Ceará apresenta aproximadamente 90% de sua área situada no semiárido, e o restante, em ambientes úmidos (EMBRAPA, 2019).

A Serra da Ibiapaba é a maior região produtora de hortaliças no Ceará, oriundas principalmente de cultivos efetuados por pequenos produtores. A agricultura desenvolvida na região segue o modelo convencional de produção, onde o sistema produtivo é altamente dependente de insumos externos, contando com uso de adubos químicos e uso de agrotóxicos em quantidades abusivas (ALENCAR *et al.*, 2013; GOMES, 2015). O consumo de hortaliças com agrotóxicos é um grave problema de saúde pública, pois tanto são utilizados produtos não autorizados como também há relatos de alguns agricultores, em que não é observado o período de carência entre a aplicação do produto e a colheita para venda (AUGUSTO, 2002; GOMES, 2015).

É sabido que os danos dos agrotóxicos atingem o meio ambiente, a população que mora próximo às áreas de cultivo, mas, sobretudo, atingem os trabalhadores rurais. Um estudo realizado entre o período de 2007 a 2011 evidenciou que 97% dos trabalhadores do agronegócio e da agricultura familiar estudados estavam expostos a agrotóxicos, distribuídos entre herbicidas, inseticidas e fungicidas (RIGOTTO *et al.*, 2011).

Com isso a agricultura orgânica vem ganhando destaque devido ao crescente interesse e consequência a uma grande exigência por parte dos consumidores por alimentos mais saudáveis, que sejam produzidos em um sistema que respeite o meio ambiente. Devido a isso, no ano de 2011, na região da Serra da Ibiapaba teve a Associação dos Produtores Orgânicos da Ibiapaba (APOI) fundada com um grupo de agricultores que tinham experiência com agricultura orgânica. Atualmente a APOI, localiza-se no município de São Benedito e é gerenciada por um conselho formado pelos próprios produtores e sua produção é vendida para supermercados em Fortaleza e região metropolitana. Todos os produtos recebem selo de

certificação e os custos são divididos entre os produtores de maneira proporcional à produção (GOMES, 2015).

Mesmo com o crescimento de produção e consumo destes alimentos orgânicos, ainda existe a ideia de que praticamente todo o alimento contém agrotóxicos. Por isso, devido à inexistência de dados oficiais para a região da Serra da Ibiapaba, faz-se necessário um monitoramento de resíduos de agrotóxicos dos alimentos ali produzidos, tanto na agricultura convencional quanto na agroecológica. A carência destes dados em todo o estado do Ceará é uma realidade ainda preocupante e a obtenção de tais dados através do monitoramento, visa garantir que estes alimentos estejam dentro dos limites considerados seguros para a saúde pública, além de, no caso da agricultura orgânica, gerar um maior valor agregado do produto e fortalecer este modelo de cultivo.

A escolha das hortaliças em estudo foi que segundo pesquisa da ANVISA, com 20 espécies de plantas, incluindo frutas e hortaliças no Brasil das 3.130 amostras coletadas em 2009, 29% apresentaram resultados insatisfatórios, ou seja, com resíduos de agrotóxicos, especialmente, os não autorizados para a cultura. Dentre as hortaliças brássicas, a couve e o repolho foram as mais contaminadas por agrotóxicos, apresentando 44,2% e 20,5% das amostras coletadas com resíduos de agrotóxicos.

3.2 Agrotóxicos

3.2.1 Definição e um breve histórico

O termo adequado do emprego de produtos químicos na agricultura é defendido por alguns autores como agroquímicos, embora outros autores utilizem amplamente que a forma correta é o termo “defensivos agrícolas”, pelo fato destes produtos defenderem a planta do ataque das pragas agrícolas. Em caso desses insumos serem utilizados de forma intensiva, inadequada e abusiva emprega-se, portanto, o termo veneno. Entretanto, demasiadamente se encontra na literatura o emprego desse produto como agrotóxicos, sendo deste modo considerado no Brasil o termo mais adequado (GARP, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2011; BRAIBANTE e ZAPPE, 2012). O termo “agrotóxico” ao invés de “defensivo agrícola” passou a ser utilizado no Brasil para denominar os venenos agrícolas após grande mobilização da sociedade civil organizada (REBELO, 2006; BOMBARDI, 2017).

Há inúmeras denominações e definições na literatura quanto aos agrotóxicos. Dentre as definições, a legislação brasileira, Lei Federal Nº 7.802/89, estabelece os 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” (BRASIL, 2002).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO), junto com a Organização Mundial da Saúde (OMS), agrotóxicos são quaisquer substâncias ou misturas destinadas à prevenção, destruição ou controle de qualquer tipo de praga, incluindo vetores de doenças humanas e de animais, espécies indesejáveis de plantas ou animais que possam interferir na produção, processamento, transporte ou comercialização de alimentos, *commodities*, madeira e seus derivados e substâncias administradas aos animais para o controle de parasitas. O termo também inclui substâncias destinadas ao uso como reguladores de crescimento em plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes preventivos na queda de frutos e substâncias aplicadas às culturas antes ou após a colheita para proteger os produtos da deterioração durante o armazenamento e o transporte (FAO, WHO, 2013).

A Portaria nº 03 de janeiro de 1992, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define resíduo de agrotóxico como “substância ou mistura de substâncias remanescentes ou existentes em alimentos ou no meio ambiente, decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive quaisquer derivados específicos, tais como: produtos de degradação, metabólitos, produtos de reações e impurezas, consideradas tóxicas e ambientalmente importantes”; e também Ingestão Diária Aceitável (IDA) como a “quantidade máxima que, se ingerida diariamente durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos atuais. É expressa em miligramas (mg) do agrotóxico por quilograma (kg) de peso corpóreo (mg/kg p.c.)”.

Historicamente, a humanidade combate agentes nocivos à agricultura. Há mais de dois mil anos, os agricultores utilizavam substâncias que preveniam os danos causados por pragas, sendo uma das primeiras o enxofre. Posteriormente, utilizavam outras substâncias tóxicas como o arsênio, mercúrio, chumbo, como também começaram a empregar o sulfato de nicotina que era extraído das folhas do tabaco (OSHITA e JARDIM, 2012; BUSZEWSKI *et al.*, 2019).

Um marco importante para a indústria química foi a descoberta da atividade inseticida do 1,1,1-tricloro-2,2-di(*p*-clorofenil) etano, conhecido como DDT, um composto

sintético da classe dos organoclorados. Este inseticida foi muito utilizado durante a II Guerra Mundial, para combater piolhos que infestavam tropas norte-americanas na Europa, como também passou a ser utilizado em larga escala nas atividades agrícolas em todo mundo (BRANCO,2003; GUILHERME, 2000; BRAIBANTE, ZAPPE, 2012; HASSAN *et al.*, 2019; PAVLIKOVA *et al.*, 2019). Mais tarde tornou-se evidente que esse produto, pela sua característica de persistência e toxicidade, traria efeitos prejudiciais aos organismos para os quais não se destinavam inclusive aos seres humanos (FLORES *et al.*, 2004; EGWU *et al.*, 2019).

O DDT, como todos os demais organoclorados, foi banido, tendo em vista seus efeitos nocivos baseados na neurotoxicidade, no aumento de câncer de mama em mulheres, em alterações causadas pelos efeitos estrogênicos, além dos problemas ambientais, como rápida absorção e bioconcentração nos organismos, redução da capacidade reprodutiva das aves e estabilidade alta à decomposição ou à degradação ambiental (JARDIM, ANDRADE e QUEIROZ, 2009; OSHITA e JARDIM, 2012). A busca por agrotóxicos menos persistentes ao meio ambiente promoveu o desenvolvimento e uso dos organofosforados e carbamatos (MIDIO e SILVA, 1995).

Assim, após o final da II Guerra Mundial, a partir da década de 50 quando se iniciou a chamada “Revolução Verde”, com a mecanização rural, irrigação e uso de fertilizantes e agrotóxicos, bem como a seleção de sementes mais produtivas, cresceu três vezes a produção de grãos em países desenvolvidos. Com isso, foi possível observarem profundas mudanças no processo tradicional da produção agrícola, bem como nos impactos dessa atividade sobre o ambiente e a saúde humana. Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agentes químicos, foram disponibilizadas aos agricultores aumentando a produtividade através do controle de doenças e proteção contra insetos e outras pragas (RIBAS e MATSUMURA, 2009; MILHOME, 2011; BORSOI, 2015). Entretanto, essa facilidade de acesso às novas tecnologias não teve o amparo necessário para a qualificação dos trabalhadores, sobretudo em países em desenvolvimento, expondo as comunidades rurais a um conjunto de riscos, dos quais muitos ainda desconhecidos, gerados pelo uso extensivo de diversas substâncias químicas perigosas (MILHOME, 2011).

O agronegócio brasileiro é fundamental para a economia do país, pois se destaca como setor que mais contribui para o fortalecimento da economia, respondendo cerca de 1/4 do Produto Interno Bruto (PIB) que tem dado grande contribuição às exportações. O Brasil conta com 388 milhões de hectares de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade. Segundo os dados do Ministério da Agricultura, as exportações de produtos agrícolas do país

passaram de US\$ 27 bilhões em 2007 para US\$ 71,50 bilhões em 2016 (AGRICULTURA, 2016; MAPA, 2018). O grande desafio do agronegócio brasileiro é por um lado aumentar competitividade brasileira no comércio internacional dos produtos agrícolas, sobretudo com o estímulo às cadeias produtivas e ao aumento do valor agregado dos produtos brasileiros; e, por outro, consolidar a imagem do Brasil como fornecedor de produtos seguros, de alta qualidade, e produzidos de forma sustentável (MAPA, 2017).

Seguindo essa tendência da expansão agrícola, o mercado nacional de agrotóxicos também se manteve em crescente produtividade. Contudo, este aumento de uso de agrotóxicos está relacionado à elevação do número de casos de intoxicações agudas e/ou crônicas em seres humanos, além da contaminação ambiental (GALT, 2008; RIGOTTO *et al.*, 2014; BOMBARDI, 2017).

A exposição aos agrotóxicos e os impactos que estes podem causar tornaram-se um relevante problema ambiental e de saúde pública, diante do uso intenso e difuso destes produtos no Brasil (RIGOTTO, 2011).

3.2.2 Toxicidade e classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados de diferentes maneiras e uma das formas mais comuns é ao tipo de praga em que destinam sua ação. Dentro desta classificação estão três principais categorias que são os mais utilizados na agricultura: inseticidas, usados no controle de insetos, suas larvas e formigas; fungicidas para o combate de fungos; e herbicidas que são usados no combate a ervas daninhas (BRANCO, 2003; BAIRD, 2006; BRAIBANTE, ZAPPE, 2012; MELO *et al.*, 2019). No mercado nacional, conforme dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG), os herbicidas representam 60% do total de agrotóxicos comercializados, enquanto os fungicidas respondem por 15%, inseticidas 15% e demais categorias por 10% (SINDIVEG, 2017).

Na classificação por estrutura química, os agrotóxicos se agrupam em classes de substâncias cujo princípio ativo é formado por estruturas moleculares semelhantes. Dentre os grupos de agrotóxicos existentes, os compostos orgânicos constituem a classe mais importante, e são divididos em sintéticos e naturais. Dos compostos orgânicos sintéticos, alguns representantes importantes são: organofosforados, triazóis, piretróides e triazinas (SANCHES *et al.*, 2003; CHUNG & CHEN, 2011; TADEO, ALBERO & PEREZ, 2019).

Agrotóxicos organofosforados são considerados os compostos mais tóxicos com uso autorizado na agricultura e com maior incidência nos alimentos no Brasil. Possuem ação neurotóxica, que inibem a enzima acetilcolinesterase causando desde dor de cabeça, náuseas,

taquicardia e fraqueza muscular (BRASIL, 2016; OUERTANI, ATRACHE e HAMIDA, 2016, ZHOU, 2016). Os fungicidas triazóis podem causar efeitos de malformação crânio facial e hepatotoxicidade (ZARN *et al.*, 2003). As triazinas são consideradas levemente tóxicas para humanos, onde o contato pode ser oral, dermatológico e por inalação. Os sintomas de envenenamento incluem dores abdominais, diarréia e vômitos, irritação nos olhos, irritação nas membranas das mucosas e erupções na pele.

Outra forma de classificação dos agrotóxicos é quanto a sua toxicidade em função da dose letal mediana(DL50), que dependendo da toxicidade do agrotóxico, a cor e/ou numeração nos rótulos das embalagens podem variar (tabela 1).

Tabela 1: Classificação dos agrotóxicos de acordo com sua toxicidade

	CATEGORIA 1	CATEGORIA 2	CATEGORIA 3	CATEGORIA 4	CATEGORIA 5	NÃO CLASSIFICADO
	EXTREMAMENTE TÓXICO	ALTAMENTE TÓXICO	MODERADAMENTE TÓXICO	POUCO TÓXICO	IMPROVÁVEL DE CAUSAR DANO AGUDO	NÃO CLASSIFICADO
PICTOGRAMA					Sem Símbolo	Sem Símbolo
PALAVRA DE ADVERTÊNCIA	PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	SEM ADVERTÊNCIA
CLASSE DE PERIGO						-
Oral	Fatal se Ingerido	Fatal se Ingerido	Tóxico se Ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmica	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatória	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
COR DA FAIXA	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Azul	Azul	Verde

Fonte: Adaptado GHS/ANVISA, 2019

Em setembro de 2019, a ANVISA anunciou um novo marco regulatório que reformula e atualiza os critérios de avaliação e classificação toxicológica de risco de agrotóxicos no Brasil. Essas mudanças foram propostas com base nos padrões do Sistema de Classificação Globalmente Unificado (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS*). De responsabilidade da Organização das Nações Unidas (ONU), o GHS foi proposto pela primeira vez em 1992, na Eco 92. A partir de 2008, a comunidade europeia adotou esse padrão para classificação, rotulagem e embalagem de

substâncias e produtos. Atualmente, 53 países já adotaram os padrões do GHS e 12 países têm sua implementação parcial (ANVISA, 2019).

A proposta é trazer maior segurança para o mercado consumidor de modo a aumentar e facilitar a identificação do perigo ao uso, indicando em cada categoria informações de danos em caso de contato com a boca (oral), pele (dérmico) e nariz (inalatória) (ANVISA, 2019). Com as novas regras, foram ampliadas para 6, as categorias de classificação toxicológica, diferente das 4 classificações utilizadas anteriormente. Segundo Renato Porto, diretor de autorização e registros sanitários da Anvisa, com a nova rotulagem é possível comunicar melhor os perigos ao agricultor, que é o público vulnerável as substâncias, pois é quem trabalha e manipula os produtos. Para ele, um dos pontos importantes a ser ressaltado é a necessidade da clareza das informações colocadas no rótulo.

As novas regras anunciadas pela Anvisa sobre classificação de agrotóxicos parecem, à primeira vista, apenas uma adaptação a um padrão internacional. Mas, na prática, especialistas acreditam que a medida vai colocar sob risco ainda maior a saúde de quem lida diretamente com a aplicação dos agrotóxicos. Isso porque a principal alteração do Marco Regulatório acontece na hora de classificar os produtos mais perigosos, ou seja, das classes: “altamente tóxicos” e “extremamente tóxicos”. Se antes os que causavam problemas como úlceras, lesões severas na pele e na córnea causando até cegueira entravam nessas categorias, agora só vão fazer parte delas os que apresentarem risco de morte por ingestão ou contato. Essa decisão camufla o real perigo que essas substâncias oferecem à sociedade, principalmente ao prejudicar a saúde dos trabalhadores que aplicam os agrotóxicos.

Portanto, dos 2.300 agrotóxicos registrados no Brasil, a Anvisa fará reclassificação de aproximadamente 1.950 (85%) produtos. Assim, mais de 500 dos 800 produtos agrotóxicos hoje considerados altamente tóxicos vão passar para as classes menos perigosas, o que deve aumentar a produção e o consumo desse tipo de pesticida. Além disso, eles terão menos alertas no rótulo, ou seja, perdem a tarja vermelha e a caveira, que chamavam atenção sobre o risco mesmo para agricultores de baixa escolaridade (APWR, 2019; GREENPEACE, 2017).

Em 2014, foi registrada no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) a maior incidência de notificação de intoxicações por agrotóxicos no Brasil: 6,26 casos para cada 100 mil habitantes. Entre 2007 e 2017, foram notificados 84.206 casos. Apesar de se observar melhoria no processo de notificação, sabe-se que a subnotificação ainda é expressiva no Brasil e no mundo, em especial nos casos de intoxicação crônica, o que dificulta o dimensionamento do problema no país, além de invisibilizar os custos desses

atendimentos para o SUS, já que pode haver manifestações clínicas diversas (MAPA, 2017). Ressalta-se a necessidade de os poderes públicos das esferas federal, estadual e municipal somarem esforços para a adoção de medidas articuladas de vigilância e assistência em saúde, que promovam a melhoria e o aprimoramento dos serviços para identificação, diagnóstico, tratamento, reabilitação e notificação dos casos de intoxicação por agrotóxicos.

3.2.3 O uso de agrotóxicos no Brasil: Contexto atual

O aumento considerável no volume de agrotóxicos utilizados tem trazido uma série de transtornos e modificações para o ambiente, tanto pela contaminação das comunidades de seres vivos que o compõe, quanto pela sua acumulação nos segmentos bióticos e abióticos do ecossistema (biota, água, ar, solo, alimentos etc.) (FERREIRA *et al.*, 2006 *apud* BORDOI *et al.*, 2014).

O uso de agrotóxicos está entre os principais instrumentos do atual modelo de desenvolvimento da agricultura brasileira, basicamente centrado em ganhos e produtividade (IBGE, 2010). Porém, uso intensivo está associado aos agravos à saúde da população, tanto dos consumidores dos alimentos quanto dos trabalhadores que lidam diretamente com os produtos, à contaminação de alimentos e à degradação do meio ambiente. Verifica-se que a exposição humana e ambiental a esses produtos cresce em importância com o aumento das vendas e consumo (IBGE, 2010).

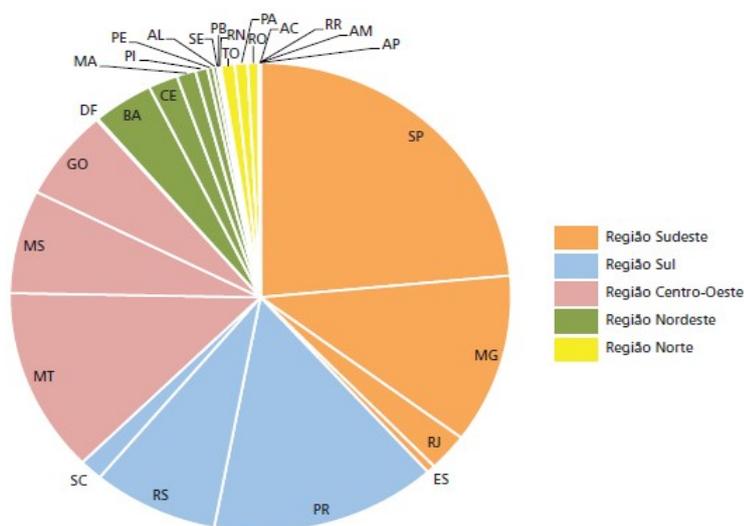
Neste contexto, verifica-se que com o rápido crescimento da população e a necessidade cada vez maior de explorar terras levaram muitos agricultores de subsistência a cultivarem em terras de baixa qualidade e praticarem técnicas ecologicamente impróprias, aumentando a demanda por matéria prima, transformando a agricultura de subsistência em grandes monoculturas, proporcionando conseqüentemente um desequilíbrio natural das várias formas de vida, tais como: insetos, fungos e ácaros, os quais até hoje causam prejuízos às culturas agrícolas (NASCIMENTO, 2013).

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 vem aumentando substancialmente. Até novembro de 2012 havia 422 ingredientes ativos permitidos para uso agrícola e domissanitário no país (ANVISA, 2012). Em 2017 estes números subiram para 471 ingredientes permitidos contra 97 não permitidos (ANVISA, 2017). Somado a isso, no ano de 2019 o governo federal já liberou 290 produtos para o mercado. Desses produtos liberados 41% são considerados extremamente ou altamente tóxicos e 32% são proibidos na União Europeia (APRW, 2019; GREENPEACE, 2019; ANVISA, 2019).

Com relação à comercialização de agrotóxicos no país, em números absolutos, destacaram-se os estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais e Rio Grande do Sul como os maiores comercializadores.

O Ceará ocupa a décima posição (Figura 2) do ranking de estados consumidores de agrotóxicos no país (MAPA, 2012; BRASIL, 2018) 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 dois 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 estão sendo usadas, as implicações e em quais cultivos (COLARES, 2011; BRASIL, 2016). Esta situação se reflete em danos à saúde e ao ambiente, com repercussões de curto, médio e longo prazo (RIGOTTO, 2014).

Figura 1: Comercialização de agrotóxicos por unidade da Federação



Fonte: Brasil, 2018

A Chapada do Apodi, junto com a Serra da Ibiapaba e Cariri são as três regiões do Ceará onde o uso de agrotóxicos é mais intenso. Isso porque a agricultura irrigada, em especial a fruticultura e a horticultura, é bastante desenvolvida nestas regiões (MILHOME *et al*, 2009; MILHOME *et al*, 2015; NOGUEIRA, 2017). Segundo a Agência de Defesa Agropecuária (ADAGRI), desde 2013 a fiscalização contra o uso abusivo destes contaminantes vem ocorrendo em todo o estado. Porém, a situação encontrada na Chapada do

Apodi ainda é preocupante no que se refere à saúde da população rural quanto ao uso de agrotóxicos (RIGOTTO *et al.*, 2013; CARNEIRO *et al.*, 2015). Esta região se destaca pela grande produção agrícola e diversidade de culturas, como o cultivo de abacaxi, melão, milho e mamão, dentre outros (IPECE, 2016; MILHOME *et al.*, 2009). O cultivo nessa área também é caracterizado por ser destinado ao mercado de exportação, além de ser constituído por assentamentos de pequenos produtores (IPECE, 2016).

Diante disso, a agricultura convencional vem sofrendo impactos com o uso intensivo de agrotóxicos que provocaram um aumento expressivo na produção agrícola. Mas, ao longo desses anos, ficaram evidentes os problemas como perda da fertilidade do solo, erosão, perda da biodiversidade, contaminação dos alimentos, contaminação das águas, intoxicações crônicas e agudas dos trabalhadores rurais, aparecimento de pragas resistentes aos agrotóxicos, novas pragas e até mesmo alimentos sem sabor (RIGOTTO *et al.*, 2013; GOMES, 2015).

Com isso os agrotóxicos tornaram-se um problema em termos ambientais e de saúde humana, principalmente, se a aplicação for indiscriminada. Na saúde, eles podem atingir os aplicadores dos produtos, membros da comunidade e os consumidores de alimentos contaminados com resíduos causando efeitos adversos à saúde humana (RIGOTTO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2013). Basicamente, os agrotóxicos são usados na agricultura com os objetivos de obter grandes produções com altas produtividades e boa qualidade dos produtos com redução dos trabalhos. Sem dúvida, esses objetivos foram alcançados nessas últimas décadas (FERRER e THRUMAN, 2007; LESUER, KNITTL e GARTNER, 2008). No entanto, o uso indiscriminado, sem critérios e sem conhecimento aprofundado de sua ação e efeitos, trouxe e está trazendo problemas muito sérios ao meio ambiente e conseqüentemente à qualidade de vida do ser humano (SILVA, 2015; PATEL, RAWTANI e AGRAWAL, 2019).

Nos últimos anos, vários trabalhos na literatura têm citado o desenvolvimento de métodos para avaliar a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Carneiro e colaboradores (2013) analisaram 128 agrotóxicos em 10 espécies diferentes de bananas comercializadas no estado de Minas Gerais, Brasil. Os resultados mostraram presença de resíduos dos compostos (azoxistrobina, carbendazim, boscalida, tebuconazol e imidacloprido) em quatro amostras. Oshita (2013) analisou doze amostras de morango comercializados na região de Campinas, SP. Das doze amostras analisadas, nove apresentaram a presença de pelo menos um dos agrotóxicos, como: acefato, azoxistrobina, imidacloprido, procloraz, tebuconazol ou tiametoxan, sendo que o carbendazim apresentou concentração maior que o LMR estabelecido pela ANVISA. Guedes e colaboradores (2016) determinaram 21

agrotóxicos em amostra de goiaba comercializada na cidade de Fortaleza (Ce). Do total de amostras analisadas, 87% apresentaram algum resíduo de agrotóxico, dentre eles o propacloro, clorpirifós, clorobenzilato e trifoxistribina. Munôz e colaboradores (2017) determinaram 42 agrotóxicos de diferentes classes em amostras de “goji berry” comercializadas na região de Santa Maria (RS). Das dezesseis amostras analisadas treze apresentaram resíduos de um ou mais agrotóxicos presente no método, dentre eles: carbendazim, clorpirifós, dimetoato, propanocarbe e tebuconazol.

Portanto, há uma preocupação crescente com relação à presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, devido aos possíveis efeitos adversos à saúde dos seres humanos se expostos por longos períodos, especialmente em crianças que consomem maiores porções de frutas e hortaliças em relação à massa corporal quando comparados aos adultos e são mais susceptíveis às substâncias químicas tóxicas por estarem nos estágios iniciais de desenvolvimento (QUEIROZ *et al* 2011; HOLME *et al*, 2016).

Para garantir a segurança da população quanto ao consumo de alimentos, agências governamentais do mundo todo vêm realizando um controle quanto à presença desses contaminantes.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Pesticidas (PARA), para monitorar os níveis de pesticidas em produtos agrícolas, onde limita as quantidades e estabelece limites máximos de resíduos (LMR) para pesticidas, a fim de garantir a qualidade de alimentos ingeridos. Contudo, o LMR nem sempre pode ser utilizado como parâmetro de qualidade dos alimentos, pois observa-se uma falta de consenso entre os limites estabelecidos pelas legislações de diferentes países. No Brasil, o LMR permitido para o inseticida clorpirifós em bananas é de 0,01 mg/kg, porém, na União Europeia, este limite é 4,0 mg/kg, um valor extremamente maior (GOMES *et al.*, 2020). Um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado pelos agrotóxicos, segundo análise de amostras coletadas em todos os 26 estados do Brasil, realizada pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) (ANVISA, 2015).

No estudo realizado pelo Programa de Análise de agrotóxicos em Alimentos (PARA) entre os períodos de 2013 a 2015, foi demonstrado que de 12.051 amostras de 25 alimentos de origem vegetal analisadas de 27 estados do Brasil, 2.371 (19,7%) apresentaram resultado insatisfatório. Além disso, 2.211 dessas amostras mostraram ingredientes ativos que estão em processo de reavaliação toxicológica, não sendo autorizados para cultura. Dentre os

agrotóxicos com maior número de irregularidades encontrados na análise está o acefato e clorpirifós que estão no presente trabalho (ANVISA 2015).

Sendo assim o monitoramento de agrotóxicos nos alimentos é de fundamental importância para a preservação da saúde da população. Métodos multirresíduos para análises de agrotóxicos em alimentos têm como objetivo analisar muitos agrotóxicos, pertencentes a diferentes classes, em uma única etapa de extração e que seja eficaz na análise de diferentes matrizes.

3.3 Métodos para determinação de Agrotóxicos em Alimentos – QuEChERS

O interesse na investigação de resíduos de agrotóxicos em frutas e verduras conduziu ao desenvolvimento de vários métodos multirresíduo como maneira mais econômica para realizar estas análises (SILVA *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2014; MORENO *et al.*, 2015; LOZOWICKA *et al.*, 2016). Devido aos baixos níveis de detecção exigidos pelas agências reguladoras e à natureza complexa das matrizes em que os analitos estão presentes, uma eficiente preparação de amostra, detecção em nível de traços e identificação, são aspectos importantes para a elaboração de um método analítico (PRESTES *et al.*, 2011; SOBHANZADEH, 2012; ORSO *et al.*, 2015; GUEDES *et al.*, 2016; MONTIEL-LEÓN *et al.*, 2019).

Visando superar as dificuldades na quantificação dos agrotóxicos, no sentido de melhorar a análise, vários trabalhos têm sido realizados no desenvolvimento de novos métodos de extração. Entre esses, destaca-se o método que foi desenvolvido entre os anos de 2000 e 2002, sendo publicado pela primeira vez em 2003 por Anastassiades e colaboradores, denominado QuEChERS. Esta nomenclatura é o acrônimo dos termos em inglês: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe* (Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto e Seguro) que designa o método em uma forma simples, eficiente e de baixo custo para extrair e limpar os resíduos de pesticidas de vários tipos de matrizes complexas. Apesar de ser um método relativamente novo, comparado aos métodos de extrações tradicionais, o QuEChERS tem sido amplamente aceito pela comunidade internacional de analistas de resíduos de pesticidas, uma vez que muitos trabalhos têm sido publicados empregando sua forma original ou com variações (LEHOTAY *et al.*, 2005; PAYA *et al.*, 2007; BIZIUK, 2011; ARIENZO, CATALDO; FERRARA, 2013; RAHMAN *et al.*, 2013; SOLIVEN *et al.*, 2019; NARENDERAN, *et al.*, 2019).

O método QuEChERS original envolve uma extração inicial de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila, seguida de uma etapa de partição líquido-líquido formada pela adição de MgSO_4 anidro, que tem a função de remover o excesso de água da amostra; e mais 1 g de NaCl, para ajuste da força iônica. A remoção de água residual e limpeza (*clean-up*) são realizadas simultaneamente, usando um procedimento rápido chamado de extração dispersiva em fase sólida (dispersive solid-phase extraction–DSPE), em que 150 mg de MgSO_4 anidro e 25 mg de sorvente amina primária secundária (PSA – composto por grupos etilenodiamina-N-propil ligados à sílica) são misturados com 1 mL do extrato acetonitrila. O PSA tem a função de remover açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos presentes na matriz (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

As características físico-químicas dos agrotóxicos são consideravelmente diferentes, uma vez que podem apresentar caráter ácido, básico ou neutro. Estes compostos podem conter em sua estrutura, halogêneos, fósforo, enxofre ou nitrogênio, os quais possuem uma grande relevância no método de detecção destes compostos (JARDIM *et al.*, 2012; BLANKSON *et al.*, 2016; GRIMALT & DEHOUCK, 2016). Além disso, alguns agrotóxicos são voláteis, outros não, e esta grande diversidade causa sérios problemas no desenvolvimento de um método “universal” para análise de resíduos destes compostos (RAJSKI *et al.*, 2013; CARNEIRO *et al.*, 2013; ZHOHG *et al.*, 2016).

O método original foi modificado para ampliar o alcance tanto de pesticidas, como de matrizes. De grande importância foi a introdução de tamponamento com adição de sais para melhorar a recuperação de analitos dependentes de pH. Lehotay; Mastovska & Lightfield (2005) introduziram o tampão acetato que é possível atingir um valor de pH ente 5,5 e 6 para todas as amostras. Portanto o método QuEChERS e suas modificações passaram a ser aplicados amplamente pelos laboratórios em vários países.

Lehotay, Mastovska & Yun (2005) desenvolveram uma metodologia para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos gordurosos (leite, ovos e abacate) a partir do método QuEChERS, empregando acetonitrila com 1% de ácido acético como solvente de extração e em seguida *clean up* usando 50 mg de C_{18} e 150 mg de MgSO_4 . Os extratos foram analisados por GC-MS e LC-MS e apresentaram resultados de recuperação entre 0 e 271% e limites de quantificação menores que 10 ng g^{-1} . Em 2010, os mesmos autores realizaram estudos e compararam diferentes versões do método QuEChERS em diferentes matrizes de frutas e legumes. As três versões (QuEChERS original, QuEChERS acetato tamponado e QuEChERS citrato) foram comparados com base na recuperação de 32

agrotóxicos representativos, que obtiveram recuperações em média de 98% com %CV de 10%.

Kanrsa e colaboradores, (2013) aplicaram o método QuEChERS modificado para a determinação de resíduo de carbaril em amostras de hortaliças (pepino e repolho) e feijão. Wang e colaboradores (2013) determinaram 51 resíduos de agrotóxicos comparando os métodos, QuEChERS original e QuEChERS acetato em amostras de tomate, feijão, brócolis e cenoura. A versão QuEChERS acetato usando a combinação de C₁₈ e PSA na etapa de limpeza, obteve-se excelentes resultados de recuperação. Blankson e colaboradores (2016) usando o método de extração QuEChERS modificado, validou e determinou 21 agrotóxicos entre as classes de organofosforados e piretróides em amostras de berinjela, pimenta e quiabo. Hou, Zhao e Liu (2016) validaram uma metodologia utilizando o QuEChERS modificado, para determinar clorotanol em amostra de couve. Diógenes (2016) validou e determinou sete pesticidas das classes dos carbamatos, organofosforados e neonicotinóides em amostras de alface, utilizando o QuEChERS modificado. Farina e colaboradores (2017) utilizando o método QuEChERS, validaram uma metodologia para determinação de 15 pesticidas multiclases em amostras de vegetais folhosos dentre eles, alface, couve-flor, brócolis e repolho. Alcântara e colaboradores (2019) desenvolveram uma revisão bibliográfica sobre análises de diferentes classes de agrotóxicos em frutas utilizando QuEChERS como metodologia de preparação de amostras. As recentes melhorias no QuEChERS permitem minimizar a instabilidade dos pesticidas devido ao pH da matriz e obter extratos mais limpos. Outra aplicação do método QuEChERS foi implementada por Narendran e colaboradores (2019), na qual este trabalho foi desenvolvido uma metodologia de superfície de resposta multivariada integrada ao método de extração QuEChERS modificado para a avaliação de agrotóxicos organofosforados em repolho, couve-flor, cenoura, brócolis e alface. De modo análogo aos trabalhos anteriores, Guo e colaboradores (2019) realizaram análise multirresíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas ricos em polifenóis usando um método QuEChERS modificado e posterior diluição. A exemplo dos autores precedentes, os pesquisadores López e colaboradores (2019), utilizaram um método QuEChERS modificado para extração, para análise seletiva de multirresíduos em 14 agrotóxicos altamente polares em matrizes de alimentos usando cromatografia líquida de interação hidrofílica e espectrometria de massa. Todos estes trabalhos citados obtiveram recuperações satisfatórias, apresentando valores entre 70 a 120%.

3.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas - LC/MS

A Cromatografia Líquida (LC – *Liquid Chromatography*) é uma técnica de separação consagrada e bem estabelecida, que possibilita a determinação de moléculas termolábeis e não voláteis, diferentemente da Cromatografia Gasosa (GC - do inglês – *Gas Chromatography*) (PACHECO *et al.*, 2015; COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; FERNÁNDEZ-ALBA, 2005). É uma técnica versátil e com grande faixa de aplicação, já que diferentes combinações entre as fases móvel e estacionária podem ser feitas (THONL *et al.*, 2002; CHIARADIA *et al.*, 2008;). A separação pode ser efetuada mantendo-se a composição da fase móvel constante durante toda a análise cromatográfica, que é denominada modo isocrático (KMELLÁR *et al.*, 2011). Quando necessária a utilização de solventes de diferentes polaridades e porcentagens destes em misturas, denomina-se como modo gradiente, tendo como vantagens análises mais rápidas, melhores separações e maior simetria nos picos. (CHIARADIA *et al.*, 2008; STACHNIUK e FORNAL, 2016; THAMMANA, 2016).

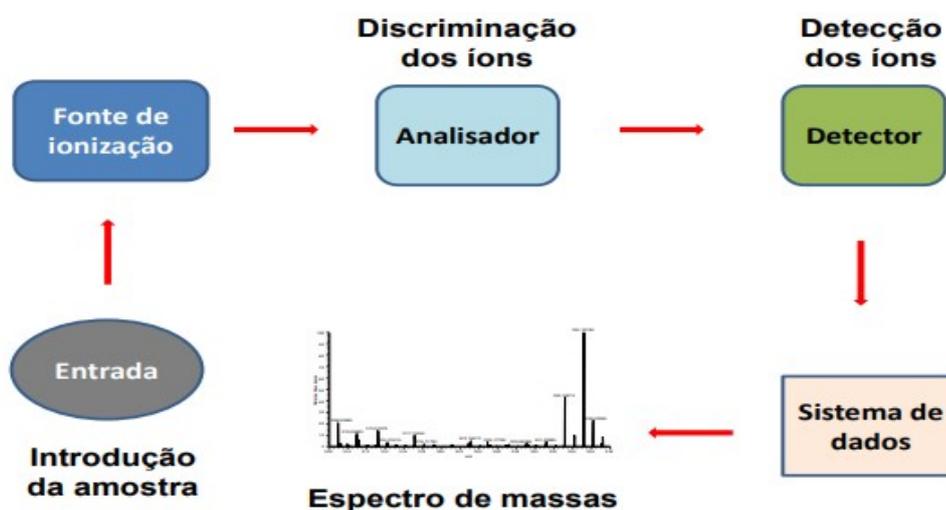
O acoplamento da cromatografia líquida com o espectrômetro de massas possibilita combinar as vantagens de unir um sistema de separação indiscutivelmente robusto e eficiente (alta seletividade e eficiência de separação) com um sistema que fornece o espectro de massas (obtenção de informação estrutural e da massa molar), possibilitando a identificação inequívoca dos analitos presentes na amostra (tempo de retenção e espectro de massas) (CHIARADIA *et al.*, 2008; LANÇAS, 2009; THURMAN *et al.*, 2013). A potencialidade do acoplamento da LC e MS havia sido reconhecida há várias décadas, porém, incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo inviabilizavam a junção das duas técnicas (PRESTES *et al.*, 2009; LANÇAS, 2013).

Existem diversos tipos de espectrômetros de massas, cada qual com suas vantagens e limitações (LANÇAS, 2009; NASCIMENTO, 2017). Porém, todos apresentam os mesmos componentes básicos: sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador/separador de massas, detector e registrador. Além disso, como será colocado posteriormente, alguns equipamentos apresentam dois analisadores de massas separados por uma câmara de colisão. Um esquema da estrutura básica de um espectrômetro de massas é mostrado na Figura 2.

O sistema de injeção da amostra se dá de forma direta na fonte ou através do acoplamento com a Cromatografia Gasosa ou Líquida. Na fonte de íons, os componentes de uma amostra são convertidos em íons positivos ou negativos os quais são imediatamente

acelerados em direção ao analisador de massas. A função do analisador de massas é separar tais íons de acordo com a razão entre a sua massa e sua carga elétrica, m/z (REBELO, 2014; CHIARADIA *et al.*, 2008; LANÇAS, 2009). Os espectrômetros de massas podem ser classificados em várias categorias dependendo da natureza do analisador de massas. Finalmente, um detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados e armazenados na memória de um computador e mostrado em uma tela (LANÇAS, 2013, NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Figura 2: Esquema geral de um espectrômetro de massas



Fonte: Adaptado de Lanças, 2009.

3.4.1 Sistema de injeção da amostra

Em virtude do caráter universal da espectrometria de massas (MS – *Mass Spectrometry*), sua versatilidade se destaca pelos diferentes tipos de sistemas de inserção de amostras, que podem ser sólidas, líquidas ou até mesmo gasosas. Com isso, o sistema de introdução pode variar desde uma simples bomba de seringa a sistemas de Cromatografia Gasosa (GC do inglês – *Gás Chromatography*), HPLC (do inglês – *High Performance Liquid Chromatography*), (UPLC do inglês - *Ultra Performance Liquid Chromatography*), Eletroforese Capilar (CE do inglês - *Capillary Electrophoresis*) e Cromatografia de Fluido Supercrítico (SFC).

3.4.2 Fontes de Ionização (FI)

O processo de detecção por MS inicia com a ionização dos compostos alvo. Uma energia é aplicada de acordo com o agente de ionização e transferida direta ou indiretamente à amostra para promoção da ionização do composto. Como existem inúmeros tipos de amostras e espécies químicas, diferentes estratégias de ionização têm sido desenvolvidas para adaptar o sistema a cada situação (PICÓ e BLASCO, 2007; CHIARADIA *et al.*, 2008; LANÇAS, 2013).

As fontes de ionização foram desenvolvidas com o intuito de resolver a incompatibilidade entre as vazões empregadas no sistema cromatográfico. Elas auxiliam na remoção do solvente e na interface entre a coluna cromatográfica e o espectrômetro de massas. Estas fontes facilitam na transferência da amostra que elui da coluna cromatográfica para a fase gasosa (interface coluna-MS) e a ionização da amostra (CHIARADIA *et al.*, 2008; LANÇAS, 2009). A principal interface utilizada na análise de agrotóxicos é baseada na Ionização a Pressão Atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*) que engloba a Ionização por Eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*), a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a Fotoionização a Pressão Atmosférica (APPI, do inglês – *Atmospheric pressure Photoionization*) (LANÇAS, 2009, NASCIMENTO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2019).

As interfaces ESI e APCI foram as técnicas empregadas neste estudo. A descrição mais detalhada das suas características, assim como dos processos e teorias que envolvem a ionização estão colocadas a seguir. De uma forma geral são processos complexos, onde há muitos parâmetros instrumentais, os quais influenciam drasticamente na eficiência da ionização. É requerida uma otimização cuidadosa do espectrômetro de massas para obter sua máxima sensibilidade. Isto inclui os ajustes dos parâmetros típicos da interface como voltagem do capilar na ESI e a corrente na agulha de descarga da APCI, bem como, pressão dos gases de spray/nebulização e temperatura da interface (TITATO, BICUDO, LANÇAS, 2007; PICÓ e BLASCO, 2007).

3.4.2.1 Ionização por Eletronebulização – ESI

Em ESI, moléculas de baixo ou alto peso molecular, de média a alta polaridade e complexidade estrutural podem ser facilmente ionizadas por um modo brando e analisadas

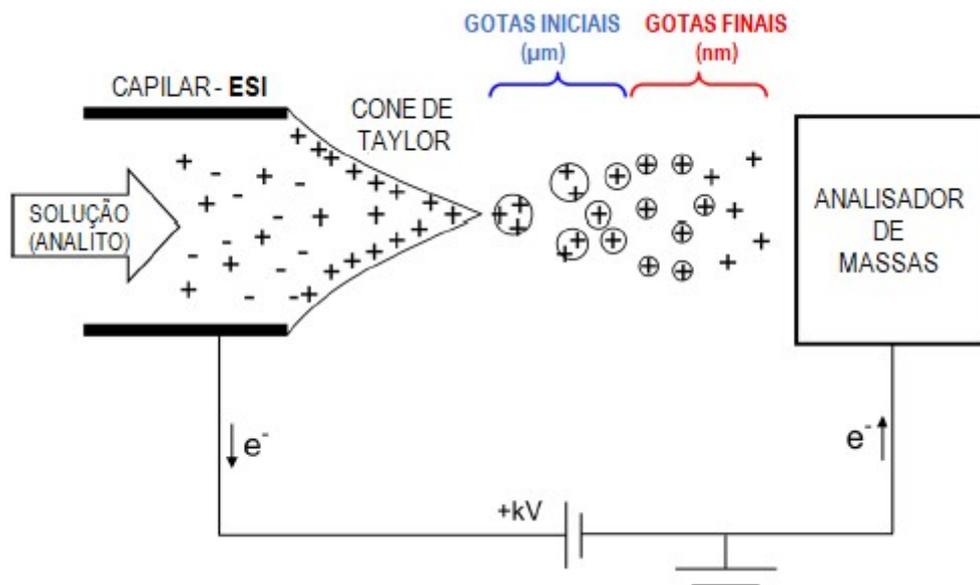
por MS. A característica principal deste modo de ionização (Figura 3) é que as espécies dos analitos são ionizadas em solução no interior do capilar e transferidas para a fase gasosa como entidades isoladas, na qual três tipos de íons são formados por processos essencialmente distintos: reações redox (oxidação/redução) que produzem íons moleculares ($M^{\bullet+}$) ou ($M^{\bullet-}$); reações ácido/base (protonação/desprotonação) que resultam na formação de moléculas protonadas ($[M+H]^+$) ou desprotonadas ($[M-H]^-$) onde normalmente são denominadas de íons quasi-moleculares; e reações de coordenação com cátions (geralmente os da família 1A) ou ânions (principalmente cloretos), que leva à formação de moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$), ($[M+K]^+$) ou anionizadas ($[M+Cl]^-$) (CROTTI, 2006; CHIARADIA, 2008; ALBERICI *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2017).

No processo de ionização por ESI uma solução da amostra em pH levemente ácido ou básico (ou “neutra” de um sal) é submetida a um tubo capilar de aço inox, ao qual é aplicado uma voltagem tipicamente entre 3000 e 5000V (MASIÁ, BLASCO, PICÓ, 2014). Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas perdem sucessivamente o solvente (são dessolvatadas), e o volume das gotas é reduzido, o que provoca um aumento na repulsão entre as cargas, assim, as gotas se subdividem. Eventualmente, devido à alta repulsão entre os íons de mesma carga, ou se formam gotas contendo apenas um íon – modelo de cargas residuais (CRM) ou íons evaporam (são “ejetados”) das gotas para a fase gasosa – modelo de evaporação de íons (IEM) (COLE, 2000).

O CRM propõe que as gotículas carregadas saem da ponta do capilar num spray de formato cônico (cone de Taylor) e com o auxílio de um fluxo de gás aquecido (N_2), as gotículas carregadas com várias unidades de carga sofrem a evaporação do solvente, tendo seu tamanho reduzido e conseqüentemente um aumento da densidade de carga, tornando a repulsão entre as cargas, maior que a tensão superficial. Este efeito faz com que as gotículas se desintegram em gotículas ainda menores e o mesmo processo pode ser repetido até que o solvente seja evaporado por completo, restando apenas os íons da amostra (SNYDER, 1995).

O IEM (modelo de evaporação de íons) propõe que o aumento da densidade superficial de carga devido à evaporação do solvente cria um campo superficial que supera as forças de solvatação dos íons antes de exceder a tensão superficial do solvente, causando a ejeção do íon antes da explosão coulômbica. Este mecanismo favorece a formação de íons multiplamente carregados, característica que pode ser utilizada na determinação de macromoléculas.

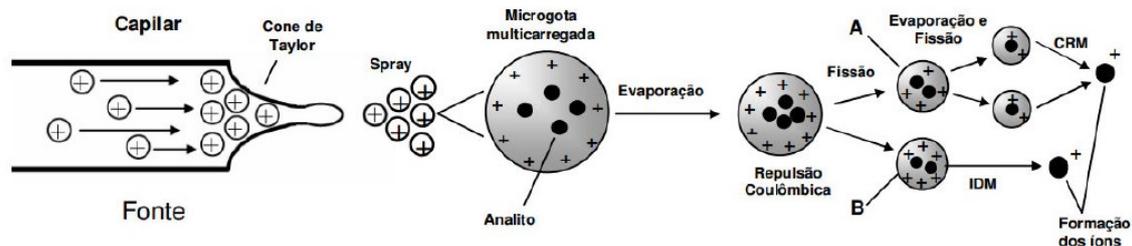
Figura 3: Representação do processo de ionização por Eletrospray - ESI



Fonte: Adaptado de Konermann et al, 2012

Atualmente, ainda não foi possível estabelecer as condições que definem se a ionização está sendo realizada exclusivamente por CRM ou IEM. O que parece mais provável é que os dois mecanismos (Figura 4) ocorrem simultaneamente e o processo de ionização por eletrospray possibilite a ocorrência destes dois processos indistintamente (BERKEL, 1995; KATTA; ROCKWOOD; VESTAL, 1991). Há estudos que apontam uma tendência para que moléculas hidrofílicas sejam ionizadas por CRM e moléculas hidrofóbicas pelo processo IEM (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Um modelo mais recente apresentado por (COLE, 2000) propõe que os mecanismos podem operar simultaneamente. A Figura 4 ilustra a ocorrência simultânea destes dois processos. O mecanismo de Dole, ou do resíduo de carga, seria predominante em massas superiores a 3.000Da e o mecanismo de Iribarne e Tomsom, ou da evaporação do íon predominaria em massas inferiores (BERKEL, 1995; PICO, 2007).

Figura 4: Dois mecanismos propostos para formação de íons gasosos no processo de ionização por Eletrospray

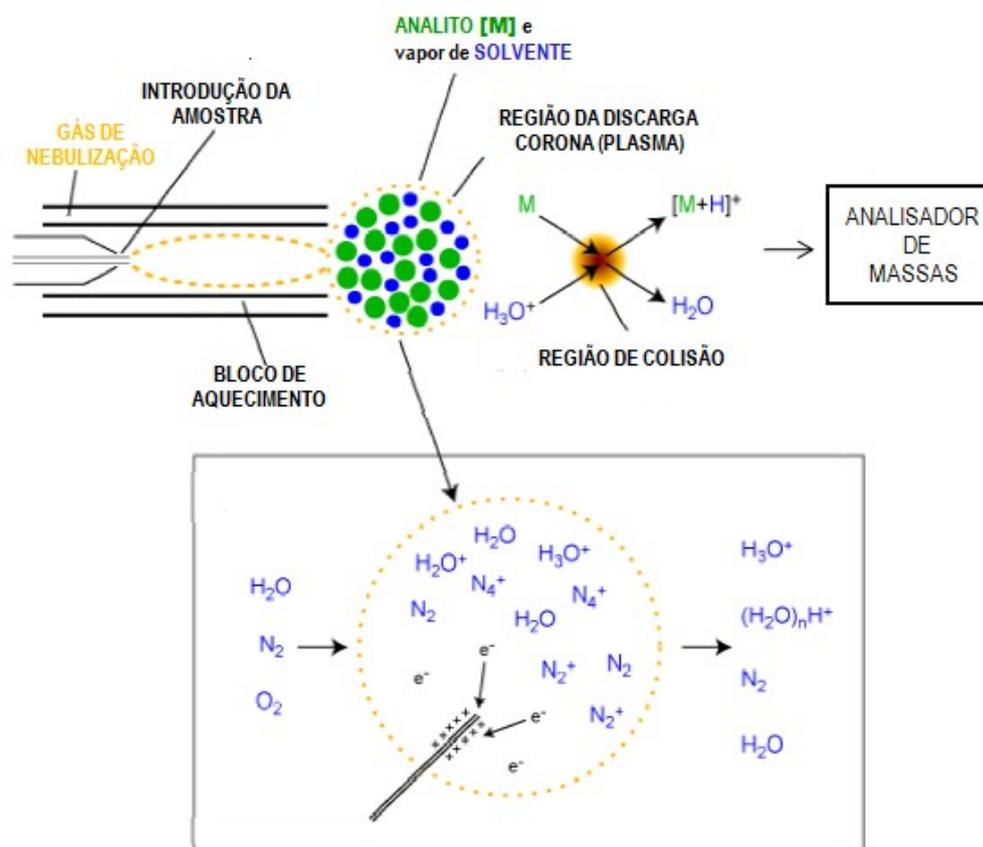


Fonte: Konermann et al, 2012

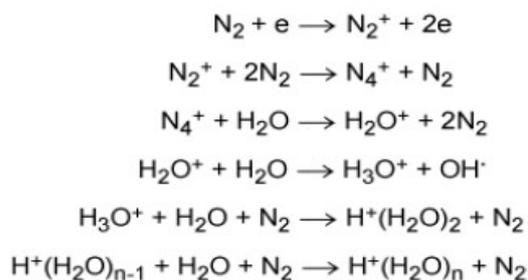
3.4.2.2 Ionização Química à Pressão Atmosférica – APCI

No caso de moléculas de polaridade média a baixa, a ESI pode não apresentar uma resposta adequada para o fim analítico de interesse. Com isso, surge uma técnica de ionização alternativa, Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) (LANÇAS, 2013; MASIÁ, BLASCO, PICÓ, 2014). A técnica de APCI é uma ferramenta indicada para a análise de moléculas neutras que não sejam facilmente ionizáveis em solução, e não muito lábeis. Nesse caso, diferentemente de ESI, o analito é primeiramente volatilizado (o que requer que o mesmo apresente certa estabilidade térmica) e posteriormente ionizado. Análoga a ionização química, APCI é uma ionização relativamente suave e induz a pequena ou nenhuma fragmentação do analito, pois não são aplicadas voltagens no spray formado, e as moléculas neutras são levadas para a fase gasosa por um processo térmico. O processo de dessolvatação é alcançado pelo aquecimento da solução dentro da sonda de APCI, normalmente mantido entre 150 e 550 °C. Isso acontece por meio de uma sonda com um capilar de sílica fundido envolto por uma resistência; a essa é aplicada uma corrente que eleva a temperatura do meio, levando à vaporização da fase móvel. O analito em fase gasosa é então direcionado a uma agulha metálica (Agulha Corona), onde é aplicada alta corrente que induz a ionização. A descarga corona com uma voltagem aplicada entre 3-5 kV proporciona os elétrons que ionizam o analito gasoso via uma série de reações íon/molécula em fase gasosa à pressão atmosférica (Figura 5). Inicialmente são ionizadas as moléculas mais presentes no meio (N₂, visto que a ionização ocorre à pressão atmosférica), que posteriormente transferem carga para os analitos de interesse por meio de uma cascata de reações íon-molécula (LANÇAS, 2013).

Figura 5: Representação do processo de ionização química à pressão atmosférica-APCI



Fonte: Adaptado de Nachtigall, 2009



Como exemplo, no modo positivo, os elétrons energéticos iniciam uma sequência de reações com o gás de nebulização (normalmente nitrogênio) formando íons moleculares de nitrogênio. Dependendo da composição da fase móvel (solvente, S) são formados íons do tipo $\text{S}^{\bullet+}$ ou $[\text{S} + \text{H}]^+$ entre outros, via uma série de reações íon/molécula com os íons moleculares de nitrogênio. A ionização é iniciada pela transferência de elétrons para o cátion radicalar $\text{S}^{\bullet+}$ e por transferência exotérmica de prótons a partir do íon de solvente protonado (NACHTIGALL, 2009). As moléculas neutras do analito são conseqüentemente transformadas na fase gasosa em íons moleculares ($\text{M}^{\bullet+}$) ou moléculas protonadas ($[\text{M} + \text{H}]^+$), respectivamente.

A técnica de APCI determina massas molares menores do que 2000 unidades, podendo ser usada na maioria dos casos no modo positivo. O fato de serem empregadas temperaturas mais altas, em relação à ESI, desfavorece a técnica, sendo menos utilizada em análise de biomoléculas grandes (ex.: carboidratos e proteínas) e termicamente instáveis (NUÑEZ, 2005; PRESTES, 2011).

Atualmente, as fontes ESI e APCI estão universalmente disponíveis e têm sido usadas para desenvolver métodos para determinar agrotóxicos em amostras ambientais e de alimentos.

Os autores Titato, Bicudo e Lanças (2007) otimizaram as variáveis experimentais em ESI e APCI para a determinação de dez pesticidas das classes de organoclorados, carbamatos, triazóis dentre outros por LC-MS em amostras de laranja e os resultados mostraram que os efeitos da matriz não interferiram na determinação dos pesticidas em seu estudo.

Chen e colaboradores (2014) realizaram um estudo comparativo das fontes ESI e APCI utilizando UHPLC – MS/MS. Avaliou os limites de detecção (LD), linearidade e o efeito matriz em cinco matrizes diferentes de chá. A comparação das duas fontes testadas mostrou que a fonte APCI é menos afetada pela supressão de ionização produzida pelos componentes da matriz. No entanto, os LDs dos compostos para a fonte ESI foram inferiores em relação à APCI para maioria dos pesticidas. A escolha para validação do método foi realizada com a ESI utilizando a calibração por superposição na matriz nas cinco amostras de chá.

Alguns trabalhos têm sido publicados avaliando a sensibilidade da ESI e APCI de diferentes analitos em amostras complexas. Tian e colaboradores (2016) compararam as técnicas ESI e APCI para quantificação do hormônio levonorgestrel em plasma humano. Nesse estudo os resultados também mostraram que a fonte APCI foi menos afetada pela supressão de ionização produzida por componentes da matriz. Porém a ESI apresentou menores valores de LD e LQ, e uma calibração por adição de padrão na matriz e uso de padrão interno foi realizado no estudo da linearidade do método, obtendo-se faixa de concentração de 0,25 – 50 ng mL⁻¹ e coeficiente de correlação > 0,99.

Um levantamento bibliográfico foi realizado nas bases de dados da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Web of Science e SciELO, datados do período de 2015 a 2019. Como palavras-chave foram utilizadas: frutas e hortaliças em LC-MS/MS. Na Tabela 2, estão apresentados os trabalhos, nos quais foram analisadas cerca de 55 matrizes de frutas, cereais e hortaliças. De acordo com a tabela, pode-se verificar

que o QuEChERS tem sido o método de extração de pesticidas mais utilizado e a ESI foi a técnica de ionização adotada em todos os trabalhos. Uma média de 65 analitos foram mensurados em cada trabalho e o LD variou de 0,00003 a 0,3 mg kg⁻¹. Diante disso, verificou-se que as técnicas adotadas no presente trabalho são eficientes, uma vez que vem sendo empregadas em diversos trabalhos recentes, como a extração por QuEChERS e ionização por ESI, bem como a APCI. Além disso, com o uso destas técnicas é possível a obtenção de ótimos níveis de detecção e quantificação dos agrotóxicos estudados.

Tabela 2: Análise de resíduos de agrotóxicos empregando LC-ESI-MS/MS e LC-APCI-MS//MS em amostras de alimentos no período de 2015-2019

Nº	Matriz	Nº de analitos	Extração/Clean up	Detector MS	Métodos de ionização	Modo de Aquisição	Faixa de valores (sensibilidade) mg.kg ⁻¹	Referências
1	Tangerina e laranja	4	Método EtOAc	Q-Trap	ESI	MRM	-	Besil <i>et al.</i> (2019)
2	Uva e ameixas	1	QuEChERS	QQQ	ESI	SIM	LD: 0,000031 ±0,000014mg.kg ⁻¹	Ceballos-Alcantarilla <i>et al.</i> (2019)
3	Orégano	335	QuEChERS	QQQ	ESI	MRM	LQ: 0,001 –0,153 mg kg ⁻¹	Drabova <i>et al.</i> (2019)
4	chá, maçã e brócolis	20	QuEChERS/ d-SPE	QQQ	ESI	MRM	LQ: 0,01 – 0,02 mg kg ⁻¹	Guo <i>et al.</i> (2019)
5	cereais, tubérculos, legumes, e frutas	470	QuEChERS	QQQ	ESI	MRM	LD: 0,3 mg kg ⁻¹	Ingenbleek <i>et al.</i> (2019)
6	maçã, pêssego, pêra e ameixa	133	BiT-MSPD	QQQ	ESI	SRM	LD:0,003mg kg ⁻¹	Kemmerich <i>et al.</i> (2019)
7	Pepino, uva, cenouras, alface, peras, maçãs, batatas, soja	6	QuEChERS	Q-Trap	ESI	MRM	LD:0,00005 – 0,00061 mg.kg ⁻¹	Li <i>et al.</i> (2019)
8	alface, laranja, aveia e soja	14	MeOH/filtro de 0,2m de fluoreto de polivinilideno (PVDF)	Q-Trap	ESI	MRM	LQ: 0, 02 –0,2mg.kg ⁻¹	López <i>et al.</i> (2019)
9	alface, maçã, uva e tomate	22	QuEChERS	QQQ	ESI	SRM	LD:0,00005–0,002 mg.kg ⁻¹	Montiel-León <i>et al.</i> (2019)
10	Pêssego, morango, repolho, couve-flor, cenoura, brócolis,alface.	5	QuEChERS	QQQ	ESI	MRM	LD:0,0001 –0,001mg.kg ⁻¹	Narendran <i>et al.</i> (2019)
11	Repolho	22	QuEChERS/clean-up/d-SPE	QQQ	APCI, ESI	SRM	LQ: 0,0003–0,0015mg.kg ⁻¹	Silva <i>et al.</i> (2019)
12	Llimão	3	QuEChERS	Q-Trap	ESI	MRM	LD:0,001–0,01 mg.kg ⁻¹	Soliven <i>et al.</i> (2019)
13	Pimentão, cenoura, cebola, batata doce, mirtilo e morango	2	QuEChERS	QQQ	APCI	MRM	LD:0,01 mg kg ⁻¹	Badoud <i>et al.</i> (2018)
14	tomate, laranja e alho-poró	164	Citrato - QuEChERS	QQQ	ESI	MRM	LD: 0,005 mg kg ⁻¹	Cutillas <i>et al.</i> (2018)
15	Pimenta verde e pepino	170	QuEChERS	QQQ	ESI	MRM	LD:0,001 – 0,005 mg kg ⁻¹	Golge, Hepsag e Kabak (2018)
16	Kiwis	49	QuEChERS/dSPE	QQQ	ESI	MRM	LD: 0,003 –0,089 mg.kg ⁻¹	Kim <i>et al.</i> (2018)
17	Banana, brócolis,	2	Metanol (MeOH) e	QQQ	ESI	SRM	LD: 0,001 –0,002 mg.kg ⁻¹	Liao <i>et al.</i> (2018)

	cenoura, abóbora, tomate, couve-flor, alho-poró e etc.		diclorometano (DCM)					
18	alface, uvas.	17	QuEChERS/dSPE	QQQ	ESI	TIC, SIM	LQ: 0,03- 2,2 mg.kg ⁻¹	Neely <i>et al.</i> (2018)
19	Pepino, tomate, couve, uva, amoreira, maçã e pera	22	MSPE	QQQ	ESI	MRM	LQ: 0.00015 0,001mg. kg ⁻¹	Zhao <i>et al.</i> (2018)
20	Cebola, trigo, batata e ervilha	11	QuPPE/C18, GCB, Florisil, quitosana e grafeno.	QTRAP	ESI	MRM	LQ: 0,01 mg kg ⁻¹	Kaczynski (2017)
21	Tomate, laranja e etc.	64	QuEChERS	IT	NSI	TIC	LQ: 0,000003 – 0,000083 mg.kg ⁻¹	Moreno-González <i>et al.</i> (2017)
22	Alho-poró	41	Método híbrido QuEChERS/QuPPE com clean-up d- SPE	QQQ	ESI	MRM	LQ: 0,00004 – >1 mg.kg ⁻¹	Robles-Molina <i>et al.</i> (2017)
23	Brócolis, salsa, alho-poró, pepino, morango, batata e abacate e etc.	160	Citrato – QuEChERS com/sem clean-up PSA. Acetato de Etila. Métodos “NL”.	QQQ	ESI	SRM	LD: 0,01 mg.kg ⁻¹	Uclés <i>et al.</i> (2017)
24	maçãs, damascos, alface e cebola	28	QuPPE	QQQ	ESI	SRM	LQ: 0,0005 – 0,01 mg.kg ⁻¹	Danezis <i>et al.</i> (2016)
25	Uva	2	QuEChERS	Q-Trap	ESI	MRM	-	Dutta <i>et al.</i> (2016)
26	Polpa de côco	10	Acetato -QuEChERS/ d-SPE	QQQ	ESI	SRM	LD: 0,003 mg.kg ⁻¹	Ferreira <i>et al.</i> (2016)
27	Uva, mamão, banana, maçã, aipo, berinjela, alho-poró, tomate, chá verde, milho, soja e óleo de soja	1	QuPPE/Clean-up r- DSPE	QQQ	ESI	SRM	LD: 0,0003 – 0,0033 mg.kg ⁻¹	Han <i>et al.</i> (2016)
28	Alface, tomate, pimentão, cenoura, abobrinha, acelga e etc.	140	QuEChERS/ clean-up d-SPE	QQQ	ESI	MRM	LQ: 0,002 – 0,050 mg.kg ⁻¹	Lemos <i>et al.</i> (2016)
29	Café verde brasileiro	2	QuEChERS	QQQ	ESI	SRM	LQ: 0,005 mg.kg ⁻¹	Oliveira, Pacheco e Scherer (2016)
30	Laranja	115	QuEChERS/ clean-up d-SPE	QQQ	ESI	MRM	LD: 0,001-0,011 mg.kg ⁻¹	Golge e Kabak (2015a)

31	Tomates	109	QuEChERS	QQQ	ESI	MRM	LD: 0,005–0,010 mg.kg ⁻¹	Golge e Kabak (2015b)
32	Quiabo	2	Acetato de etila com clean-up d-SPE	QQQ	ESI	MRM	LQ: 0,001 – 0,005 mg.g ⁻¹	Hingmire <i>et al.</i> (2015)
33	frutos e folhas de pimenta	1	QuEChERS	QQQ	ESI	MRM	LD: 0,01 –0,02 mg.kg ⁻¹	Kim <i>et al.</i> (2015)
34	Brócolis, cenoura, couve-flor, pepino, alface, pimentão, repolho, morango e etc	120	QuEChERS	QQQ, Q-Trap	ESI, APCI	MRM	-	Mol <i>et al.</i> (2015)
35	Frutas e vegetais (berinjela, couve-flor, couve, goiaba, quiabo, cebola, maçã, batata, banana, uva, manga, laranja e romã)	60	SPE	TOF	ESI	TIC	LD: 0,0003–0,0038mg.kg ⁻¹	Sivaperumal, Anand e Riddhi (2015)
36	Grão de cacau	26	ELL com clean-up d-SPE	Q-Trap	ESI	MRM	LQ: 0,010mg.kg ⁻¹	Zainudin <i>et al.</i> (2015)

Fonte: Elaborado pela autora

3.4.3 Analisadores de Massa

À medida que a tecnologia avança, novos modelos de espectrômetros de massa apareceram no mercado, diferindo não apenas em relação aos métodos de ionização, mas também ao tipo de analisadores. Existem diferentes sistemas empregados para separação dos íons gerados durante o processo de ionização. Após serem gerados na fonte de ionização, os íons são transferidos para uma região do equipamento, conhecida como analisador ou filtros de massas que são dispositivos responsáveis pela separação ou resolução dos íons conforme sua razão m/z . A região onde a separação ocorre está contida em alto vácuo (10^{-6} a 10^{-10} torr).

Os avanços mais importantes nas análises de multirresíduos de agrotóxicos vêm sendo realizados no campo dos analisadores de massas, onde a escolha do mesmo deve levar em consideração as vantagens, desvantagens e custo/benefício da aquisição do equipamento. Dois tipos de analisadores são descritos segundo sua resolução: de baixa resolução (*Low Resolution Mass Spectrometry*, LRMS), estes aproximam a relação m/z até um número inteiro mais próximo e, os de alta resolução (*High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS), estes aproximam a massa molar até a quarta, sexta casa decimal, medindo a m/z com precisão suficiente para determinar a fórmula molecular de um composto.

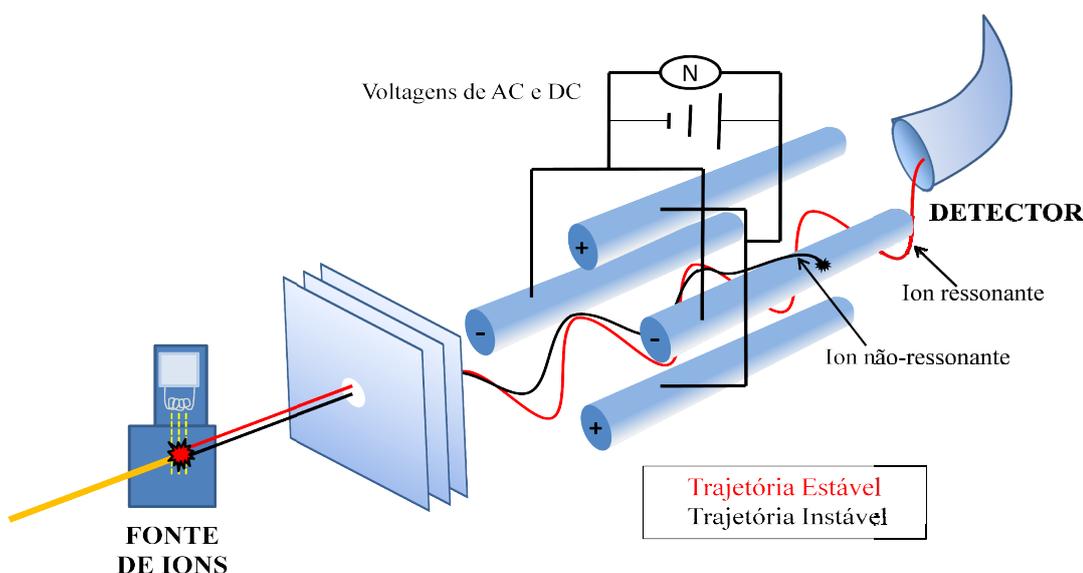
Dentre os diferentes modelos utilizados podem-se citar o quadrupolo, triplo quadrupolo (do inglês, *Triple Quadrupole*, QqQ), *ion trap* tridimensional (do inglês *3 Dimension Ion Trap*, 3D IT), quadrupolo-*ion trap* linear (do inglês, *Quadrupole Linear Ion Trap*, QqLIT), tempo de voo (do inglês, *Time of Light*-TOF), quadrupolo-tempo de voo (do inglês, *Quadrupole-Time of Light*- Q-TOF), Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR – do inglês, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) e o mais recente da espectrometria de massas que é o *Orbitrap*®.

3.4.3.1 Sistemas Quadrupolo

O analisador de massas mais antigo é o quadrupolo simples, o qual ainda hoje é muito utilizado devido ao seu custo mais acessível e sua facilidade de compreensão e operação (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). Estes são constituídos de quatro hastes condutoras paralelas e equidistantes entre si (Figura 6), sobre as quais são aplicados potenciais combinados de corrente contínua (CC) e radio frequência (RF), que variam em magnitude durante a passagem dos íons pelo quadrupolo. Conforme o campo elétrico gerado, consegue-se que somente íons com a relação massa/carga específica atinjam o detector,

enquanto os íons não selecionados são desviados, levando-os a colidir com as hastes, para a sua neutralização (EKMAN *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2017). Apresenta uma resolução considerada baixa na faixa de operação de $R=1000$, podendo ter a resolução aumentada em condições favoráveis para valores maiores que $R=4000$. Possui a capacidade de trabalhar com uma ampla faixa de massa sendo ela entre 10 a 4000 Da. A exatidão fornecida pelas análises do mesmo estão entre 0,1 e 0,2 Da (LANÇAS, 2013).

Figura 6: Representação de um sistema quadrupolo simples



Fonte: Elaborado pela autora

3.4.3.2 Analisador de Massa Triplo Quadrupolo – *QqQ*

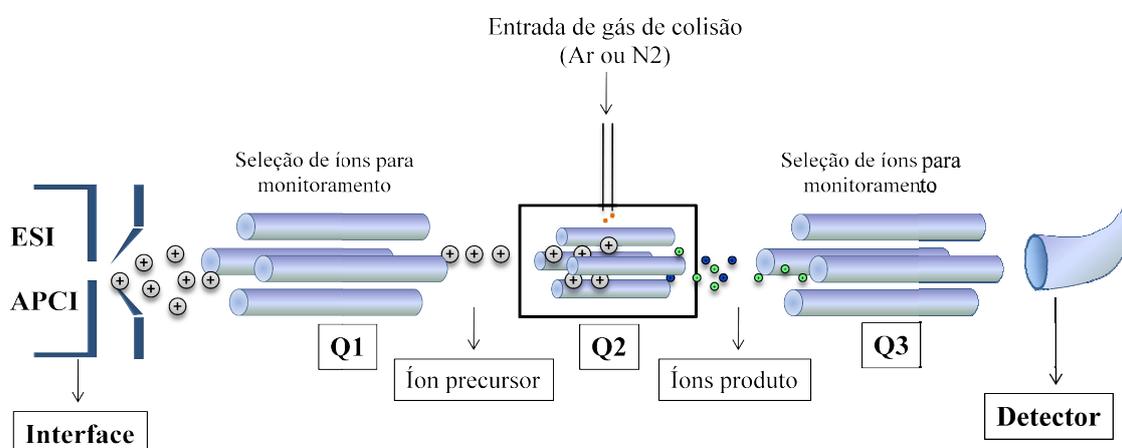
Em equipamentos onde os analisadores de massa são dispostos em sequência, estes são chamados de *tandem* ou MS/MS. Diversas são as possibilidades de combinações em *tandem*. A grande popularidade dos espectrômetros de massas sequenciais pode ser atribuída ao surgimento de um instrumento do tipo triplo - quadrupolo. Neste dispositivo, três quadrupolos são dispostos sequencialmente, na figura 7 está representado esquematicamente o percurso dos íons. No modo de análise empregado, um íon denominado íon precursor ou íon pai, é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1) e posteriormente fragmentado na cela de colisão, localizada no segundo quadrupolo (Q2), por dissociação ativada por colisão, *Collision Activated Dissociation* (CAD). A fragmentação da molécula é produzida a partir da colisão com gás nitrogênio (CAD gas). Os fragmentos gerados, denominados íons produto ou íons filho, são selecionados pela razão m/z no terceiro quadrupolo (Q3) e transmitidos para o sistema de detecção (HOFFMANN, 2007; EKMAN *et al.*, 2009; LANÇAS, 2009). O

monitoramento dos produtos obtidos a partir da fragmentação que ocorre no Q2 confere maior seletividade e permite distinguir de modo eficiente e inequívoco, os analitos de interesse dos interferentes da matriz mesmo que a separação cromatográfica não tenha sido completa. A técnica, desta forma, mostra-se efetiva na análise de agrotóxicos em níveis baixos de concentração, mesmo na presença de interferentes. A fragmentação controlada do MS/MS é uma ferramenta essencial para garantir a confiabilidade na identificação do composto alvo. Outra vantagem desta técnica de fragmentação é a obtenção de sinais mais limpos, melhorando a razão sinal/ruído e diminuindo, portanto os limites de detecção e quantificação (GARRIDO-FRENICH *et al.*, 2005).

O acoplamento MS/MS permite a utilização de várias estratégias para a seleção dos íons de interesse, tais como a varredura dos íons produto (*product ion scan*), *full scan*, varredura dos íons precursores (*precursor ion scan*), varredura da constante perda de íons neutros (*Constant neutral loss scan*), monitoramento seletivo de reação (*selected reaction monitorig*– SRM) ou monitoramento de reações múltiplas (*multiple reaction monitorig*– MRM) (SISMOTTO, PASCOAL e REYES, 2013).

Ao usar o SRM, tanto o primeiro como o segundo analisador são focalizados nas razões m/z selecionadas, não havendo varredura, o que aumenta a sensibilidade para o monitoramento, associada ao aumento na seletividade. Este é o modo mais comumente utilizado na quantificação de agrotóxicos em amostras de alimentos. Em geral, faz-se uma primeira aquisição com o padrão do composto no modo de varredura do íon produto, para depois selecionar as transições SRM que serão usadas na análise por LC-MS.

Figura 7: Representação de sistema do tipo triplo quadrupolo



Fonte: Elaborado pela autora

3.4.3.3 Analisadores Ion-Trap

O *ion-trap* é um quadrupolo tridimensional que “captura” todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantém “aprisionados” até que uma determinada radiofrequência seja aplicada e torna os íons de certa razão m/z instáveis, de forma que são liberados do trap.

Analisadores do tipo Quadrupolo – *Ion Trap (QIT)* consiste em um sistema híbrido, composto por dois analisadores de massas diferentes: um quadrupolo e um do tipo *ion trap*. Este último é formado por três eletrodos, um em forma de anel que fica entre os outros dois, que têm formato hiperbólico e são isolados nas pontas. A diferença de potencial oscilante entre o anel e os eletrodos hiperbólicos gera um campo magnético capaz de confinar ou deixar passar os íons. Este tipo de analisador tem a característica única de conduzir fragmentações em múltiplos estágios (MS^n). Quando os íons entram no *ion-trap*, todas as fragmentações ocorrem no mesmo local, mas em tempos diferentes, apresentando melhor sensibilidade na varredura do que os QqQ, mas com a limitação de não realizar aquisições alternadas entre os modos de varredura do íon produto e de varredura de perda neutra. Além disso, estes instrumentos são menos robustos para análise de matrizes mais complexas e podem apresentar baixa repetibilidade e faixa dinâmica muito estreita para a quantificação. O *Triplo-quadrupolo – Ion-Trap linear (QLIT)* baseia-se em um tipo de configuração similar ao QqQ, onde o Q3 pode ser operado tanto como um filtro de massas convencional, quanto como uma armadilha de íons com ejeção axial de íons. O QLIT agrupa as vantagens do QqQ e do QIT sem perda de desempenho com relação a seus precursores, podendo ser operado nos mesmos modos que o QqQ, ainda possuindo a habilidade de acúmulo de íons para realizar análises com fragmentações múltiplas para elucidação estrutural. Também possui um recurso de varredura avançada de íons produtos, onde os íons produtos são acumulados no *Ion-Trap*, possibilitando o aumento de sensibilidade na varredura, o que o torna ideal para análises onde se deseja quantificar e confirmar a identidade de compostos que possuem padrões de pouca fragmentação.

3.4.3.4 Analisadores de Tempo-de-Voo (*Time-of-Flight – TOF*)

Os analisadores TOF baseiam-se no princípio de que, como os íons são gerados na mesma fonte de ionização do espectrômetro de massas, eles possuem a mesma energia

cinética, de maneira que as suas velocidades serão diferenciadas apenas pelas suas massas (velocidade é inversamente proporcional à raiz quadrada da massa do íon). Por isso, neste analisador de massas, os íons produzidos na fonte de ionização são acelerados através de um tubo de voo (de 1 a 2 m de comprimento) para serem identificados, uma vez que o tempo que levam para atravessá-lo está relacionado com a razão m/z de cada íon (LANÇAS, 2009; SISMOTTO, PASCOAL e REYES, 2013; MASIÁ, BLASCO e PICÓ, 2014).

Instrumentos do tipo ToF são configurados como: ToF simples ou em sistemas híbridos em série como o analisador quadrupolo – tempo de voo (QToF). Este último é construído de maneira a direcionar os íons ortogonalmente do quadrupolo ao tempo de voo, através de um acelerador de íons, para análises no modo de espectrometria de massas em série (MS/MS) com varredura dos íons produtos. A grande vantagem destes analisadores está no fato de oferecerem informações espectrais completas com resolução de média a alta ($R=100000$), medida de massa exata e excelente sensibilidade no modo de varredura total. Permitem também a análise de composição elementar, através da medição precisa da razão m/z e conseqüentemente, a quantificação e confirmação inequívocas dos analitos, bem como a triagem e quantificação de compostos desconhecidos ou produtos de degradação. Sendo assim, analisadores do tipo Q-ToF são ideais para a busca de compostos cuja presença é suspeita nas amostras (SISMOTTO, PASCOAL e REYES, 2013; GARCIA-REYES *et al.*, 2017).

3.4.3.5 Analisador Orbitrap

Um novo tipo de analisador chamado orbitrap surgiu como uma nova tecnologia na espectrometria de massas de ultra alta resolução (UHR-MS) e chamou a atenção devido ao desempenho analítico em termos de resolução e precisão. O espectrômetro de massas orbitrap emergiu como uma alternativa mais acessível, em relação a tamanho e custo, pois compartilha vários recursos semelhantes do espectrômetro de massas de ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS) (NASCIMENTO *et al.*, 2017).

O analisador Orbitrap é precedido de um dispositivo que realiza a injeção externa dos íons (C-trap). Os íons têm sua energia cinética (E_c) diminuída por meio de colisões com gás nitrogênio e em seguida são acelerados no C-trap. Quando todos os íons têm aproximadamente a mesma E_c , eles são ejetados tangencialmente para dentro do analisador sendo aprisionado sem torno do eletrodo central que está sob uma alta voltagem. Os íons são puxados para a região equatorial do analisador devido ao forte campo eletrostático existente

na região. O campo eletrostático, aliado com a alta E_c dos íons, faz com que os íons iniciem oscilações axiais, evitando assim que os mesmos se chocam com o eletrodo central. Sendo assim, os íons com mesmo m/z irão oscilar com a mesma frequência e suas imagens decorrentes serão detectadas por sensores presentes nas paredes externas do analisador Orbitrap. Estes sinais são convertidos em frequências por transformada de Fourier e em seguida, por outras operações matemáticas (FARRÉ, PICÓ, BARCELÓ, 2014; MAKAROV, ELUIS, S., 2015; COVAS, 2019).

3.5 Validação de Método

A validação de um método analítico é um processo necessário na etapa do seu desenvolvimento para que ele possa gerar informação sobre a amostra de forma confiável. O objetivo da validação de um método é mostrar que o procedimento utilizado é adequado para o fim pretendido (ANVISA, 2017; MAPA, 2011). Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais e internacionais, não havendo um consenso entre elas, por isso, alguns termos e conceitos são encontrados diferentes na literatura. Contudo, os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2017; MAPA, 2011; SANTE2015).

Todo sistema apresenta limitações, não existe modelos prontos para validação. Validação a 100% de confiabilidade é utopia e os parâmetros exigem adequações às necessidades diferentes para cada método, sendo assim, o importante na validação é conhecer os limites e assegurar que o sistema analítico apresente o desempenho esperado, dentro desses limites esperados no processo de validação (LANÇAS, 2004; LEITE, 2008).

Na validação de procedimentos analíticos, existem os guias desenvolvidos com o objetivo de garantir que os dados gerados possuam a qualidade necessária, em termos de confiabilidade, rastreabilidade, entre outros, para o fim que se propõem. No Brasil existem os guias estabelecidos pelo Ministério da Saúde - “RDC nº 166/2017 - Validação de Métodos de Ensaio Químico Analítico” da ANVISA (2017); pelo documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE 008/2016 – Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, produzido pelo INMETRO (2016), onde constam as orientações sobre validação de métodos analíticos; como também o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) através do Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica. RIBANI *et al.*, (2004) apresentaram

uma excelente revisão sobre validação de métodos como sendo um processo contínuo de avaliação dos métodos, desde a etapa de planejamento até a coleta de dados da aplicação.

A validação pode também ser baseada em guias internacionais como a Organização Internacional de Normatização (*International Organization for Standardization – ISO*), a Conferência Internacional em Harmonização (*International Conference on Harmonization – ICH*) e EURACHEM (*The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*) (EURACHEM, 2014) apresentam uma versão geral que não especifica o tipo de analito, mas discute questões relacionadas com as figuras de mérito ou parâmetros analíticos de validação. O guia SANTE/11813/2017 - (EC, 2018) (*Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*) estabelecido pela Direção Geral de Saúde e Segurança Alimentar da Comissão Europeia que especifica a validação para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

3.5.1 Seletividade

A seletividade é o primeiro parâmetro avaliado no desenvolvimento de um método analítico (RIBANI *et al.*, 2004). É monitorada em todas as etapas da validação e aplicação, pois avalia o grau de interferência de espécies, como outros ingredientes ativos, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes (MAPA, 2011).

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir em suas determinações em uma amostra complexa. Em métodos cromatográficos, o uso de testes utilizando técnicas de avançadas detecções, como LC-MS/MS, são apontadas como técnicas altamente seletivas (MAPA, 2011). Portanto, a seletividade deve ser assegurada para garantir que os parâmetros de linearidade, recuperação e precisão não sejam comprometidos (EC, 2018).

3.5.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de um procedimento produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (MAPA, 2011; EC, 2018).

Para que a quantificação de determinado analito seja confiável é necessário que se conheça a dependência entre a resposta medida (y) e a concentração (x). Em cromatografia, a relação entre a área e a concentração é linear, podendo ser plotada utilizando algum software para o tratamento de dados, como o Excel ou Origin, onde são obtidas as equações da reta (Equação 1) e seus coeficientes de determinação (R^2) correspondentes.

$$Y = ax + b \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

y = sinal analítica (intensidade ou área de pico cromatográfico);

x = concentração do analito;

a = inclinação experimental (coeficiente angular);

b = intercepto experimental (coeficiente linear).

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. E no caso de análise de impurezas, o nível de concentração máximo deve ir a 120% do limite máximo estabelecido. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação (r) e determinação (R^2), significância do coeficiente angular, homocedasticidade do modelo e soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear (EURACHEM, 2014). É sabido que a determinação da verdadeira concentração de resíduos de pesticidas em amostras desconhecidas depende da qualidade das curvas de calibração projetadas na validação do método (MARTINS *et al.*, 2018). Geralmente a análise quantitativa é realizada usando regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) em todos os níveis de concentração na condição de variâncias iguais (homocedasticidade). Como também, existem muitos métodos analíticos que não têm uma precisão constante em uma ampla faixa de concentrações padrão apresentando heterocedasticidade nas variações. Isso implica que a precisão na extremidade inferior da faixa da curva é prejudicada. Para combater essas dificuldades, precisamos modificar nossa abordagem, e o uso do método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) é muito útil para essas práticas (MAPA, 2011; BARBOSA *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2018).

Para avaliar a homogeneidade da variância dos erros de cada curva, são realizados testes de homocedasticidade, como o recomendado pelo MAPA (2011), através do Teste F, onde as transformações adequadas são realizadas para a utilização da Análise de Variância (ANOVA). O teste estatístico F, trata-se da comparação de variâncias (quadrado do desvio padrão) das respostas instrumentais ou dos resíduos nos níveis de calibração (MAPA, 2011). Esse parâmetro é obtido pela equação 2:

$$F = \frac{s_{\max}^2}{s_{\min}^2} \quad \text{Equação (2)}$$

Em que:

s_{\max}^2 = maior variância calculada para as réplicas em cada nível de concentração da calibração

s_{\min}^2 = menor variância calculada para as réplicas em cada nível de concentração da calibração

Se $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ as variâncias são diferentes e o modelo é heterocedástico. Se $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$, as variâncias são iguais dentro do erro experimental e o modelo é homocedástico, ou seja, adequado para o método dos mínimos quadrados ordinários. A homocedasticidade também é avaliada através da análise do gráfico de resíduos (BARBOSA *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2018).

Em caso de homogeneidade das variâncias, procede-se com estimativa da curva de calibração pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Já em casos de variâncias não homogêneas (heterocedasticidade), o modelo deve ser obtido pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP), que representa o método de regressão adequado para esta condição. Por fim, deve-se avaliar estatisticamente o ajuste do modelo, empregando-se o teste t_r , para qualidade do ajuste, pois só assim pode-se concluir, com confiabilidade, que o modelo linear está ajustado (MAPA, 2011; MILLER; MILLER, 2010).

A significância dos parâmetros (coeficientes angular e linear) pode ser avaliada utilizando-se um teste de hipótese por meio do parâmetro t de Student, para comparar os valores estimados para a inclinação (a') e intercepto (b') com os valores de referência a e b , levando em consideração as duas equações que se seguem (DANZER; CURRIER, 1998; LIGIERO *et al.*, 2009).

$$t_{\text{calc},a} = \frac{|a - a'|}{s_a} \quad \text{Equação (3)}$$

$$t_{calc,b} = \frac{|b'-b|}{s_b} \quad \text{Equação (4)}$$

onde: s_a = desvio padrão da inclinação

s_b = desvio padrão do intercepto

Paralelamente, obtêm-se os desvios da inclinação (s_a) e do intercepto (s_b) e faz-se o comparativo dos valores de t_{calc} com os valores de $t_{v,95\%}$ tabelado, considerando o número de graus de liberdade ($v = p - 2$) para um modelo linear, onde p é o número de níveis de concentração da calibração. O teste pode ser avaliado para 95% de confiança, de modo que deve ser interpretado como mostrado abaixo:

- Se o $t_{calc} < t_{crit,\alpha,v}$, o valor do parâmetro de calibração não é significativamente diferente do valor teórico esperado, podendo ser eliminado;
- Se o $t_{calc} > t_{crit,\alpha,v}$, o valor do parâmetro de calibração é significativamente diferente do valor teórico esperado, não podendo ser descartado.

3.5.3 Efeito matriz

Efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou aumento do sinal ou resposta instrumental. O efeito matriz pode ser mensurado por meio da Equação 5. Quando esses valores forem $\leq 20\%$ pode ser considerado desprezível. Nesse caso, a curva analítica pode ser preparada tanto em solvente quanto no extrato da matriz. Para valores $> 20\%$, o efeito matriz é considerado significativo, sendo necessária a construção da curva analítica no extrato da matriz a fim de se reduzir a influência dos co-extrativos da matriz (MAPA, 2011; EC, 2018).

Quando a análise de uma amostra complexa é realizada utilizando a técnica de espectrometria de massas, o efeito matriz é uma das desvantagens mais relevantes. O efeito matriz é definido pela IUPAC como “o efeito combinado de todos os componentes da amostra diferente da substância sobre a medição da quantidade. Se um componente específico pode ser identificado como causador de um efeito, então este é conhecido como interferente”. A

supressão de íons aparece como um tipo de efeito matriz especificamente ligado à espectrometria de massas.

O efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas no solvente e na matriz, contendo no mínimo cinco pontos, realizados em triplicata, como mostra a equação 5. Posteriormente, testes estatísticos adequados devem ser realizados para a avaliação desse efeito. O paralelismo entre as curvas é indicativo de ausência de efeito matriz (ANVISA, 2017).

$$EM (\%) = \left[\left(\frac{\text{Coeficiente angular da curva na matriz}}{\text{Coeficiente angular da curva no solvente}} \right) - 1 \right] \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

3.5.4 Limite de Detecção

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado pelo método, porém, não necessariamente quantificado como um valor exato sob as condições estabelecidas pelo método desenvolvido (MAPA, 2011; EURACHEM, 2014; EC, 2018).

Esse parâmetro se faz importante, pois quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito (análise de traços), como resíduos de agrotóxicos, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2016). Para métodos instrumentais como a LC, GC, espectroscopia etc., o LD pode ser calculado através do método das diluições sucessivas de concentrações conhecidas até o menor nível detectável, utilizando a relação entre o sinal analítico e o ruído da linha de base (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). Segundo o MAPA (2011), o LD deve apresentar valores de relação sinal/ruído maiores ou iguais a 3:1.

Em casos de métodos instrumentais, ainda se pode calcular o LD através do cálculo de no mínimo três curvas de calibração próximas ao suposto LQ, considerando o desvio padrão do coeficiente linear e a sua relação com o coeficiente angular. Os cálculos também podem ser realizados utilizando-se curvas do branco da amostra (EURACHEM, 2014; ANVISA, 2017; INMETRO 2016) através da Equação 6:

$$LD = 3 \frac{Sb}{a} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde:

Sb: desvio padrão dos coeficientes lineares da curva

a: coeficiente angular

3.5.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições estabelecidas pelo método em estudo (ANVISA, 2017).

Assim como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas. Contudo, sabe-se que ao considerar menores concentrações, diminui-se também a precisão das análises. Se maiores precisões forem exigidas, o valor de LQ deve considerar uma maior concentração (RIBANI *et al.*, 2004).

O LQ pode ser determinado através da relação sinal/ruído. Determina-se o ruído proveniente da linha de base e considera-se a concentração capaz de gerar o sinal superior a 10 vezes o ruído (ANVISA, 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

O LQ pode também ser calculado através dos parâmetros da curva de calibração da amostra ou do branco, como mostra a Equação 7. O valor da concentração que expressa o LQ, deve ser o primeiro ponto (desconsiderando o branco) da curva de calibração do método (INMETRO, 2016; EURACHEM, 2014).

$$LQ = 10 \frac{Sb}{a} \quad \text{Equação (7)}$$

Onde:

Sb: desvio padrão dos coeficientes lineares da curva

a: coeficiente angular

3.5.6 Exatidão (Recuperação)

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor considerado verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos níveis de desvio, pois é sabido que um valor mesmo que

considerado verdadeiro, comporta erros associados a ele (ANVISA, 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

A faixa de variação aceitável para uma dada concentração está associada ao nível de concentração em que ela se encontra. Os maiores níveis de concentração comportam variações menores, enquanto concentrações em nível de traços comportam variações mais elevadas (RIBANI *et al.*, 2004).

Os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação (ANVISA, 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

Um Material de Referência Certificado (MRC) é um material de referência acompanhado de um certificado, emitido por órgãos reconhecidos e confiáveis, que possui o valor de concentração de dadas substâncias (entre elas o(s) analito(s)) com um nível de incerteza associado. A avaliação da exatidão pelo MRC é feita através da comparação entre os resultados obtidos pelo MRC (é importante a avaliação da semelhança das propriedades do MRC com a matriz utilizada) e os resultados obtidos pela amostra (EURACHEM, 2014; RIBANI *et al.*, 2004).

Pode ser possível avaliar a exatidão comparando resultados do método em estudo com aqueles obtidos a partir de um método já estabelecido. Este pode ser um método de referência na área ou um método já habitualmente utilizado no laboratório em que a validação está em estudo, sendo o método de referência mais utilizado por fornecer valores com menores níveis de incerteza. As análises são efetuadas em replicata, utilizando os dois métodos separados (o método em desenvolvimento e o método de referência) sobre as mesmas amostras, na faixa de concentração em que se pretende validar o método. Com os resultados obtidos, a comparação entre os dois é realizada (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016; RIBANI *et al.*, 2004).

Quando se é possível o acesso a matriz isenta do analito, são realizados estudos de recuperação, também chamados de fortificação. Nesse caso, o analito é adicionado à matriz em quantidade conhecida e todas as etapas do método são realizadas, proporcionando um valor de recuperação do analito no método em estudo. Esse procedimento apresenta um problema associado quando o analito de interesse é encontrado naturalmente na amostra, pois, estima-se que esse analito adicionado à matriz provavelmente não será tão fortemente ligado a matriz como aquele que está naturalmente presente na matriz, então, a técnica dará uma impressão irreal da eficiência de extração (ANVISA, 2017; INMETRO, 2016; EURACHEM, 2014; RIBANI *et al.*, 2004).

O estudo de recuperação é expresso em porcentagem de recuperação (R%), e é calculada de acordo com a Equação 8. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo e da seletividade do mesmo, verificando-se a recuperação a partir de três pontos de concentração da curva, sendo eles nos limites inferiores, superiores e no meio da curva. Cada concentração realizada em triplicata, totalizando no mínimo nove determinações por analito (ANVISA, 2017; INMETRO, 2016).

$$\text{Recuperação}(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

Onde:

C₁: concentração determinada na amostra adicionada

C₂: concentração determinada na amostra não adicionada (branco)

C₃: concentração adicionada

Quando é possível a obtenção de amostras sem a presença do analito, C₂ assume valor zero, modificando a Equação 8, para a Equação 9 (ANVISA, 2017).

$$\text{Recuperação}(\%) = \left(\frac{C_1}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação (9)}$$

Os valores de recuperação recomendados pelo Guia SANTE 2015 estão na faixa de 70-120%, porém, para casos em que não é possível obter esses valores, devido a perdas na etapa de partição em caso de analitos de maior polaridade, por exemplo, e desde que se tenha precisão $\leq 20\%$, valores de recuperações mais baixos são aceitos.

3.5.7 Precisão

A precisão é definida como a concordância dos resultados obtidos em uma série de medidas independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas para o método (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017; MAPA, 2011). Quanto mais próximos os resultados obtidos estiverem entre si menores serão os graus de dispersão de medidas e maiores as precisões obtidas (LEITE, 2008).

A precisão é utilizada para verificar a estabilidade da técnica, do equipamento, do analista, da amostra e influências do ambiente sobre a análise. É utilizada também quando

ocorre a necessidade de transferir um determinado método ou realizar alguma modificação no método (LEITE, 2008).

A precisão de um método analítico pode ser expressa através do desvio padrão (s), conforme a Equação 10, ou através do desvio padrão relativo (DPR), ou do coeficiente de variação (CV%), conforme expresso na Equação 11 (ANVISA, 2017; RIBANI, 2004). Segundo a ANVISA (2017), o valor máximo de dispersão de valores aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(Xi - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{Equação (10)}$$

Onde:

\bar{X} : média aritmética de um pequeno número de medições

X : valor individual de uma medição.

n : número de medições

$$CV \% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (11)}$$

Onde:

S : desvio padrão das medidas

\bar{X} : média das medições

3.5.7.1 Repetibilidade

A repetitividade ou repetibilidade é determinada pela também chamada de precisão intra-corrída, ou precisão intra-dia. Na repetibilidade analisa-se a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo método, o mesmo analista, a mesma amostra, no mesmo laboratório e mesma instrumentação (ANVISA, 2017; LANÇAS, 2004; MAPA, 2011).

Deve-se ter cuidado para não confundir repetibilidade com precisão instrumental, que consiste em inserir repetidas quantidades da mesma amostra no equipamento. Pois isto se

configura apenas em precisão do equipamento utilizado e não do método em questão (EURACHEM, 2014; RIBANI *et al.*, 2004).

Segunda a ANVISA (2017), a repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método. Sendo três concentrações: baixa, média e alta, no mínimo, em triplicata. Outra possibilidade é realizar no mínimo seis determinações a 100% da concentração do teste.

3.5.7.2 Precisão Intermediária

Precisão intermediária, também conhecida como precisão inter-corrída ou inter-dias, é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2017).

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa das maneiras de representar o parâmetro da precisão dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2017).

Para a realização das análises de precisão intermediária, recomenda-se no mínimo dois dias de diferença, com analistas diferentes, utilizando as mesmas recomendações utilizadas da repetibilidade (ANVISA, 2017).

3.5.7.3 Reprodutibilidade

A precisão pode também ser expressa em termos de reprodutibilidade, também chamada de precisão inter-laboratorial, na qual se realizam as análises em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos aplicados, por exemplo, à padronização de metodologia analítica. O desvio-padrão obtido através da reprodutibilidade é normalmente duas vezes maior que os obtidos pela repetibilidade, resultados facilmente explicados pela maior variação das condições de análise (ANVISA, 2017; LANÇAS, 2004). Porém, os parâmetros mais comuns em análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos são a repetibilidade e a precisão intermediária.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química Instrumental da Fundação Núcleo de Tecnologia do Ceará (LQI/NUTEC), que fica localizado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará.

4.1 Instrumentação e acessórios

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos abaixo:

- ✓ Agitador orbital tipo vortex, modelo MA162, Marconi (Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão com 4 casas decimais, modelo AY220, Shimadzu (Brasil);
- ✓ Centrífuga Excelsa II, modelo 206 BL, Fanem (Brasil);
- ✓ Multiprocessador de alimentos, Walita (Brasil);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3®, Millipore (EUA);
- ✓ Sistema de microfiltração à vácuo Millipore;
- ✓ Sistema LC-MS/MS – Cromatógrafo a líquido – Thermo Fisher Scientific, equipado com:
 - Bomba quaternária modelo surveyor LC pump plus, Thermo Fisher Scientific (EUA);
 - Coluna Ascentis C-18, 150 mm de comprimento, 2,1mm de d.i. e 3,0 µm de tamanho da partícula, marca Sigma Aldrich (Alemanha);
 - Detector Triplo Quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access, com fonte API, utilizando o modo de ionização por Eletrobulização (Eletrospray-ESI) e Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) - Thermo Fisher Scientific (EUA);
 - Sistema de aquisição de dados através do software *X-Calibur* 1.4, Thermo Fisher Scientific (EUA).

4.2 Reagentes e consumíveis:

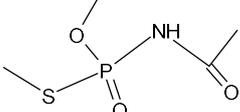
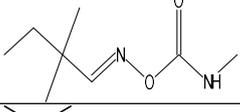
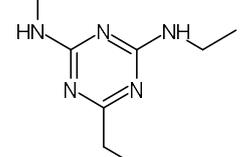
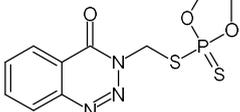
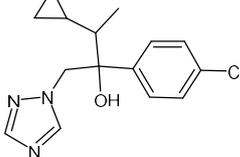
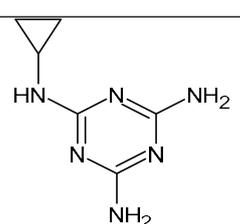
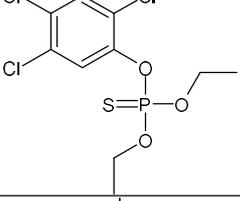
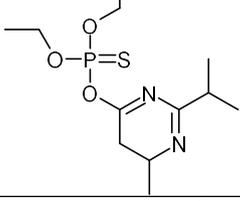
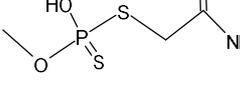
Os reagentes e consumíveis utilizados no presente trabalho foram custeados pelo Banco do Nordeste através do Projeto BNB – Fundeci 002/2017.

- ✓ Acetonitrila (J. T. Baker)
- ✓ Metanol (Sigma-Aldrich)
- ✓ Ácido fórmico 85% (Sigma-Aldrich)
- ✓ Formiato de Amônio
- ✓ Padrões listados na Tabela 2 (Sigma-Aldrich ou Fluka);
- ✓ Hidrogênio Citrato de Sódio sesquidratado
- ✓ Cloreto de Sódio; Citrato de Sódio diidratado; Sulfato de Magnésio (Vetec);
- ✓ Sorvente PSA com tamanho de partícula 40µm (Sigma-Aldrich);
- ✓ Micropipetador de 2 à 20µL, modelo Labmate (HTL);
- ✓ Micropipetador de 20 à 200µL, modelo Labmate (HTL);
- ✓ Micropipetador de 100 à 1000µL (EPPENDORF);
- ✓ Vidrarias comuns de laboratório.
- ✓ Gás Argônio 4.8 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins - Brasil);
- ✓ Gás Nitrogênio comercial usado na fonte de ionização do sistema LC-MS/MS, para evaporação do solvente e nebulização da amostra (White Martins - Brasil);

4.3 Agrotóxicos e preparo das soluções analíticas

Para este estudo foram selecionados 17 agrotóxicos das classes dos organofosforados, carbamatos, triazinas e triazóis que são frequentemente investigados em programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos, como também são aplicados nas culturas especificamente investigadas neste estudo. Na tabela 3, é apresentada a lista dos agrotóxicos aqui estudados com informações das propriedades físico-químicas bem como classe, grupo químico, fórmula molecular e classificação toxicológica.

Tabela 3: Informações das propriedades físico-químicas, classe, grupo químico, classificação toxicológica e fórmula molecular de cada agrotóxico em estudo

Agrotóxico	pKa	pK _{ow}	Classe	Grupo Químico	Classificação toxicológica	Fórmula Molecular
Acefato	8,35	-0,85	Inseticida	Organofosforado	III	
Aldicarbe	-	1,30	Inseticida	Carbamato	III	
Ametrina	4,10	2,98	Herbicida	Triazina	III	
Azinfos-metil	-	2,75	Inseticida	Organofosforado	III	
Ciproconazol	-	2,90	Fungicida	Triazol	III	
Ciromazina	5,22	-0,07	Inseticida	Triazina	III	
Clorpirifos	-	4,96	Inseticida	Organofosforado	II	
Diazinon	2,6	3,81	Inseticida	Organofosforado	III	
Dimetoato	-	0,78	Inseticida	Organofosforado	II	

Etoprofos	-	2,99	Inseticida	Organofosforado	II	
Ethion	-	5,07	Inseticida	Organofosforado	II	
Fenamifos	-	3,30	Nematicida	Organofosforado	III	
Fention	-	4,84	Inseticida	Organofosforado	II	
Fentoato	-	3,69	Inseticida	Organofosforado	II	
Malation	-	2,36	Inseticida	Organofosforado	III	
Profenofós	-	4,68	Inseticida	Organofosforado	II	
Propiconazol	1,09	3,75	Fungicida	Triazol	III	

Fonte: IUPAC, (2019); PUBCHEM, (2019).

As soluções analíticas (estoque) de agrotóxicos foram preparadas individualmente, pesando aproximadamente 10 mg de cada padrão, considerando a pureza dos padrões sólido, para um volume final de solução de 10,0 mL através da dissolução em metanol grau HPLC. Este procedimento permite obter soluções estoque de concentração de

1000 mg.L⁻¹. Após o preparo, as soluções foram transferidas para frascos de 15 mL contendo tampa rosqueada, rotuladas e armazenadas em freezer em temperatura abaixo de -20°C.

Em seguida, foi preparado através de diluições, solução analítica de cada composto, na concentração de 10 mg.L⁻¹ em metanol/acetato de amônio 5 mM com 0,1% de ácido fórmico na proporção (50:50). Estas soluções foram utilizadas na infusão diretamente na fonte de ionização (ESI/APCI) do espectrômetro de massas a fim de obter o íon molecular e suas respectivas transições de massa para cada composto.

Para os ensaios de validação, foi preparado através de diluições, solução mistura contendo todos os compostos de interesse, nas concentrações de 10,0 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ em acetonitrila. Estas soluções foram utilizadas para os ensaios de fortificação (estudo de recuperação/exatidão) e no preparo das soluções analíticas de trabalho nas concentrações: 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 150,0 e 200,0 µg L⁻¹. Estas soluções foram preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz, para a construção das curvas analíticas para o estudo da linearidade, sensibilidade e de efeito matriz. As soluções de trabalho contendo a mistura dos analitos no solvente e no extrato foram preparadas diariamente, enquanto as soluções estoque eram preparadas mensalmente e armazenadas a -20° C.

4.4 Otimização do sistema cromatográfico LC - MS/MS

Os experimentos deste trabalho foram realizados empregando um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) com interface por eletronebulização (ESI) e Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) marca Thermo Scientific, equipado com bomba quaternária, modelo surveyor plus marca Thermo Scientific. Para separação dos compostos foi usada uma coluna analítica Ascentis C-18 da marca Sigma-Aldrich (15cm x 2,1mm d.i., 3,0µm) à temperatura de 35°C (±3).

Figura 8: Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas Thermo Scientific, modelo TSQ Quantum Access, LQI/NUTEC



Fonte: Autor

4.4.1 Condições do sistema de detecção de massas - Interfaces ESI e APCI

A parte inicial deste trabalho se deu através da obtenção dos espectros de massas de cada composto e em seguida a montagem da biblioteca espectral, a fim de obter as condições ótimas de análise dos agrotóxicos em estudo. Para isso, foram realizadas injeções diretamente no espectrômetro de massas, através das fontes ESI e APCI, com soluções analíticas padrão de 10 mg L^{-1} de cada composto individualmente. Esse procedimento foi aplicado utilizando as fontes ESI e APCI para cada composto separadamente. A partir das infusões foi selecionado o modo (positivo) de ionização da fonte. Para a fonte ESI foi ajustada a voltagem do capilar, temperatura da fonte, como também a temperatura e pressão do gás de dessolvatação para secagem do solvente. Nitrogênio foi usado como gás de dessolvatação. Para a fonte APCI foi ajustada a corrente da agulha corona, temperatura do capilar e temperatura do vaporizador. Nitrogênio também foi usado como gás de dessolvatação e nebulização.

Após a escolha destas condições, foram selecionadas duas diferentes transições, uma para quantificação, denominada íon quantificador e outra para confirmação, denominada íon qualificador. Estes íons foram monitorados empregando o modo *fullscan*, usando o modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM).

4.4.2 Preparo da fase móvel para o sistema cromatográfico

A próxima etapa, após o estabelecimento das condições espectrométricas, foi o desenvolvimento da separação cromatográfica. A definição da fase móvel para a separação cromatográfica foi composta por uma fração aquosa e outra orgânica. A fração aquosa foi composta de uma mistura de solução de acetato de amônio 5,0 mmol/L acidificada a 0,1% de ácido fórmico e a fração orgânica metanol acidificado a 0,1% de ácido fórmico. A fase móvel foi constituída por um gradiente de eluição baseada em informações obtidas por meio de revisão bibliográfica sobre o assunto (BOTITSI *et al*, 2008; KMELLÁR *et al*, 2011). A composição do gradiente que foi estabelecido para o método é mostrada na tabela 4.

Tabela 4: Gradiente usado na separação do sistema cromatográfico

Tempo (min)	Solução de Acetato de Amônio 5,0 mmol/L acidificada a 0,1% de Ácido Fórmico (%)	Metanol (%)
0,00	90	10
2,00	90	10
4,00	10	90
18,00	10	90
20,00	90	10
25,00	90	10

4.5 Preparo de amostras: couve-flor, repolho e brócolis - extração pelo método QuEChERS-citrato

Os brancos das amostras de couve-flor, repolho e brócolis, empregados no desenvolvimento e validação do método, foram obtidos de um estabelecimento comercial da cidade de Fortaleza, onde um dos principais fornecedores é a Associação dos Produtores Orgânicos da Ibiapaba (APOI). As amostras foram trituradas em um multiprocessador de uso doméstico e imediatamente utilizadas para obtenção dos extratos para construção da curva analítica. A parte remanescente foi armazenada e acondicionada em frascos de vidro que foram tampados e mantidos em freezer, à cerca de -22°C.

O método de preparo de amostra é uma das etapas mais importantes e laboriosas na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. A estratégia de escolha do método de

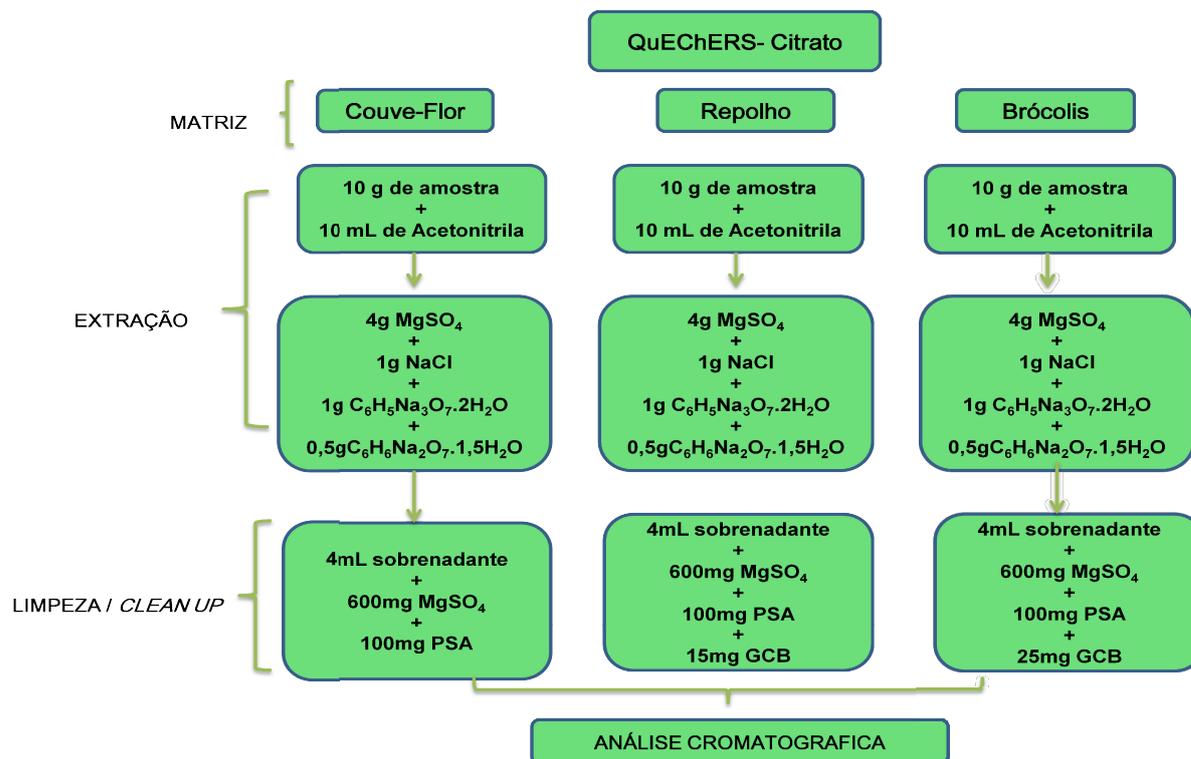
preparo é diretamente influenciada pelo aumento na eficiência do método analítico. Para este trabalho, o método QuEChERS-citrato foi escolhido por ser um método oficial de referência adotado pelos órgãos internacionais *European Committee for Standardisation* – EU e *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC, como também recomendado no Brasil pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

Para a extração das três matrizes foi utilizado o método QuEChERS-citrato. Este método fundamenta-se no método QuEChERS original com modificações propostas em 2007 por Anastassiades e colaboradores. O procedimento a seguir foi utilizado para os ensaios de fortificação e recuperação, bem como para obtenção do extrato branco para construção da curva na matriz.

O procedimento foi realizado com a pesagem de 10g da amostra (couve-flor/repolho/brócolis) recém processada em tubo de polipropileno, Em seguida foram adicionados 10 mL de acetonitrila e agitado por 1 min em agitador Vortex. Após agitação foram adicionados 4 g de Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$) anidro, 1 g de Cloreto de Sódio (NaCl), 1 g de Citrato de Sódio tribásico ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) e 0,5 g de Hidrogenocitrato de Sódio sesquihidratado ($C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$) e novamente agitado por 1 min seguida de centrifugação por 10 min a 3000 rpm. Retirou-se 4 mL do extrato e transferiu para outro tubo de polipropileno para a etapa de limpeza ou *clean-up*.

Na etapa de limpeza, foi utilizada a extração em fase sólida dispersiva (D-SPE), adicionando 600 mg de Sulfato de Magnésio anidro e 100 mg do sorvente amina primária secundária (*primary secondary amine* – PSA) a 4mL do extrato inicial. Para os extratos de repolho e brócolis foram adicionados GCB (*Graphitized Carbon Black*), por estes apresentarem coloração verde intensa no extrato inicial (a quantidade de GCB adicionada foi proporcional à coloração obtida do extrato inicial, em que já foi estabelecido em análise de rotina do LQI/NUTEC de acordo com características similares, no caso coloração verde, das matrizes aqui trabalhadas). Em seguida executada agitação por 1 min em agitador vórtex para promover dispersão do sorvente no extrato primário da matriz. Finalmente, após centrifugação por 10 min, retira-se o sobrenadante, ou seja, o extrato final limpo. (para os ensaios de recuperação, retira-se uma alíquota, e injeta-se 20 μ L no sistema cromatográfico). A Figura 9, mostra o fluxograma da marcha analítica do método QuEChRES-citrato, utilizado no presente trabalho para as três matrizes em estudo.

Figura 9: Fluxograma da marcha analítica do método QuEChERS-Citrato



4.6 Validação do método

Uma vez definidas as melhores condições para determinação dos agrotóxicos, foram conduzidos os estudos de validação do método. Neste estudo, utilizou-se para validação do método analítico para análise de multirresíduos de agrotóxicos em hortaliças (couve-flor, repolho e brócolis) por LC-MS/MS as figuras de mérito de validação considerados mais importantes e usuais propostas nos guias das agências reguladoras nacionais e internacionais, como: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, efeito matriz, exatidão (recuperação) e precisão. Todos os ensaios foram realizados utilizando a fonte ESI como também APCI.

4.6.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da comparação entre os cromatogramas obtidos através do sistema LC-ESI-MS/MS, com a solução do extrato da matriz branca e o cromatograma com o extrato da matriz branca adicionada da solução padrão. Este ensaio teve por objetivo avaliar a ocorrência de co-eluição de interferentes da matriz e dos analitos de interesse através da presença de sinais dos íons monitorados para cada um dos agrotóxicos

estudados. Os cromatogramas foram avaliados a fim de observar a presença de picos interferentes.

4.6.2 Linearidade / Faixa de Trabalho

O parâmetro da linearidade foi avaliado através da construção do gráfico das curvas analíticas preparadas tanto em solvente, quanto no extrato da matriz, utilizando a padronização por superposição na matriz. Inicialmente, obteve-se soluções nas concentrações de 2; 5; 10; 20; 50; 100; 150 e 200 μgL^{-1} . Estas soluções foram inicialmente preparadas em solvente a fim de verificar a faixa linear do equipamento. Estas curvas foram realizadas em triplicatas e a linearidade foi avaliada pelo método de regressão linear. De posse da curva de calibração (padronização externa) obtida pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), procedeu-se com a avaliação da viabilidade de uso desse modelo, através do teste de homocedasticidade. Para isso, primeiramente foi examinado o perfil de distribuição dos resíduos ao longo dos valores de concentração e, em seguida, para os gráficos de resíduos, verificou-se a linearidade do modelo com a execução do teste F de Hartley (Equação 2). Todas essas avaliações foram feitas individualmente para cada analito, nas três matrizes (repolho, brócolis e couve-flor) e aplicando as duas técnicas ESI e APCI, utilizando o software Microsoft Excel 2016.

O valor de F calculado deve ser comparado com o valor crítico tabelado do parâmetro ($F_{crit,\alpha,v}$) para o grau assumido de significância α e o número calculado de graus de liberdade ($v=n-1$), sendo n o número de pontos de calibração. De modo que, se o valor calculado de F não exceder o valor crítico ($F_{calc} \leq F_{crit}$), então se pode inferir que as variâncias não diferem de forma significativa (homocedasticidade das variâncias). Se o valor calculado F é maior do que o valor crítico observado na tabela ($F_{calc} > F_{crit}$), então se admite que as variâncias comparadas diferem de maneira estatisticamente significativa, sugerindo heterocedasticidade aplicando, portanto, o modelo de ajuste pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP).

Em caso positivo de verificação de homocedasticidade, seguiu-se com o teste de ajuste do modelo. Já para as curvas que apresentaram evidências de heterocedasticidade dos resíduos nos pontos de calibração, procedeu-se com a confecção das curvas analíticas usando o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) e, logo após, realizou-se o teste da qualidade do ajuste para o referido modelo através de testes de significância dos parâmetros da curva de calibração por tratamento estatístico.

4.6.3 Efeito Matriz

Para a estimativa do efeito matriz foram realizadas as curvas analíticas no solvente (acetonitrila) e nos extratos de couve-flor, repolho e brócolis. O efeito matriz foi determinado através da comparação entre os coeficientes angulares obtidos nas diferentes curvas analíticas, obtidos através da equação 3.

4.6.4 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

O limite de quantificação foi realizado através do método das diluições sucessivas. Onde se obteve a menor concentração com precisão e exatidão disponível no método para cada analito. Foram realizadas seis análises dos limites calculados para verificação da exatidão e precisão deles. O limite de detecção seguiu o mesmo princípio do limite de quantificação.

4.6.5 Precisão

Para expressar o parâmetro da precisão foi utilizada a análise de resultados por dispersão de dados, através do cálculo do coeficiente de variação (%CV) em todos os seus subitens.

A repetibilidade foi avaliada através da preparação de três concentrações da curva, sendo realizada a triplicata dos pontos alto, médio e baixo, totalizando nove determinações. As soluções foram preparadas no mesmo dia, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e avaliando a dispersão de resultados entre os pontos analisados, para todos os analitos.

A precisão intermediária foi avaliada utilizando o mesmo procedimento da repetibilidade, contudo, utilizando dias diferentes e analistas diferentes, em apenas um nível de concentração (ponto médio da curva) e a dispersão dos resultados foi avaliada entre eles.

4.6.6 Exatidão

O procedimento utilizado para a avaliação da exatidão foi o da recuperação, realizando o método de fortificação. Foram preparadas nove determinações, três determinações do menor ponto da curva, três determinações do ponto médio e três determinações do maior ponto da curva. Amostras de couve-flor, repolho e brócolis (isentas

de agrotóxicos) foram fortificadas nos níveis de 2, 10 e 50 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, a partir da adição de um volume conhecido de solução padrão com a mistura dos agrotóxicos a 10,0 g da amostra.

Posteriormente as concentrações obtidas foram calculadas e a porcentagem de recuperação foi obtida através da Equação fornecida no item 3.4.4 da revisão bibliográfica, utilizando o auxílio do software Microsoft Excel 2016. Para isso, utilizaram-se as curvas analíticas por superposição na matriz.

4.6.7 Aplicação do método

Foram adquiridas 15 amostras de hortaliças divididas nas três matrizes (couve-flor, repolho e brócolis), disponíveis para o consumidor final, adquirida nos meses de novembro e dezembro de 2019, em rede de supermercados de diferentes bairros na cidade de Fortaleza. As amostras foram preparadas usando o método QuEChERS como descrito no item 4.5 e executadas em triplicata. A identificação e quantificação foram realizadas utilizando a técnica LC-ESI-MS/MS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Otimização dos parâmetros para ionização e fragmentação dos íons monitorados e detectados no MS-MS

Para que o espectrômetro de massas faça a identificação dos compostos separados por cromatografia líquida, é necessário que se indique quais íons e fragmentos são formados na fonte e separados no analisador de massas. Para tal, fez-se a infusão direta dos padrões na fonte do espectrômetro de massas. Com a obtenção dos íons e seus fragmentos, registrou-se a maior intensidade dos valores de m/z (ver Apêndice I-A e I-B), verificando se esta era reprodutível sob as mesmas condições. Além disso, foram ajustadas e registradas as energias que promovem a ionização e fragmentação dos íons que serão monitorados e detectados.

Na fonte de íons, as melhores condições do experimento foram consideradas, quando se usou a ESI: a voltagem do capilar foi otimizada em 4500 V com temperatura da fonte de 270 °C e nitrogênio foi usado como gás de dessolvatação com fluxo de 100 L h⁻¹. No uso da APCI, a corrente da agulha foi de 2,5 µA, vazão do gás de nebulização de 350 L h⁻¹, vazão do gás do cone de 150 L h⁻¹, temperatura da fonte de 250 °C e temperatura de dessolvatação de 300 °C. Para ambas as interfaces, a varredura MS₁ foi utilizada para selecionar o modo de ionização e a seleção do íon precursor foi baseada na intensidade do mesmo em um espectro de massas em *fullscan* obtido no primeiro quadrupolo (Q₁). Todos os compostos foram ionizados no modo positivo de acordo com os parâmetros necessários para a montagem do método no modo de aquisição SMR. Conforme a tabela 5, observa-se que para todos os compostos as duas transições foram selecionadas. A quantificação de cada agrotóxico foi determinada pela transição mais intensa, e a confirmação deste foi realizada pela segunda transição. A quantificação juntamente com a confirmação gera uma confiabilidade ao método, pois é difícil apresentar dois compostos com os mesmos fragmentos. O analisador triplo quadrupolo é muito eficiente nestes casos, por quantificar e qualificar com rapidez os analitos de interesse, mesmo em baixas concentrações.

Os íons produzidos pela fragmentação do íon precursor no segundo quadrupolo (Q₂), íon produto, foram otimizados em modo semi automático através da seleção de três íons mais intensos (ver que foram escolhidos apenas dois). Cada um dos íons foi otimizado em relação ao (DP - *Declustering Potencial*), potencial aplicado na interface que é responsável por focalizar o íon protonado para o interior do orifício de entrada do cone; e à energia de colisão (CE-*Collision Energy*), que é responsável pela ótima fragmentação do íon precursor

no Q2 e sua posterior passagem pelo terceiro quadrupolo (Q3). Os íons fragmentados obtidos por ESI e APCI são idênticos para a maioria dos compostos, com algumas diferenças, dentre elas, da voltagem necessária para que as fragmentações ocorram de forma eficiente.

Tabela 5: Resultados da otimização das condições de fragmentação para determinação dos compostos estudados com ionização por ESI(+) e APCI(+) (*Continua*)

Agrotóxicos	ESI				APCI			
	Ion Precursor	Ion Produto	CE(eV)	DP(V)	Ion Precursor	Ion Produto	CE(eV)	DP(V)
Acefato	184,1	143,2	5	40,3	184,1	143,2	6	38
		125,3	18	40,3		125,3	20	38
Aldicarbe	213,0	89,5	16	29,0	208,2	89,5	16	24
		156,3	9	29,0		191,4	5	24
Ametrina	228,1	186,2	18	86	228,1	186,3	18	65
		68,2	35	86		138,3	22	65
Azinfos-metil	318	261,1	5	128	318,1	261,1	5	31
		143,3	18	128		125,0	16	31
Ciproconazol	292	125,3	28	67	292,3	125,3	29	63
		139,2	21	67		139,2	26	63
Ciromazina	167,3	68,3	35	93,6	167,2	125,3	14	55
		125,3	16	93,6		108,4	19	55
Clorpirifos	350,0	198,0	17	55	350,0	198,0	19	51
		321,9	10	55		322,0	10	51
Diazinon	305,1	169,3	21	63	305,3	169,3	21	57
		249,2	17	63		249,2	17	57
Dimetoato	230,1	199,2	6	44	230,1	199,2	6	37
		171,2	14	44		171,2	14	37
Etoprofos	243,0	215,1	7	45,8	243,2	215,2	9	49
		173,1	12	45,8		173,2	13	49
Etion	385,3	143,2	25	51,8	385,2	143,2	23	34
		97,3	38	51,8		97,3	35	34
Fenamifos	304,0	217,1	21	100,6	304,1	217,2	23	67
		234,1	15	100,6		234,2	15	67
Fention	279,2	247,2	12	58,1	279,2	247,2	11	55
		169,2	15	58,1		169,2	16	55
Fentoato	321,0	247,1	6	46,31	321,2	247,1	9	42
		275,1	5	46,31		275,1	5	42
Malation	331,1	285,2	5	165	331,1	285,2	5	36
		99,4	21	165		143,2	22	36
Profenofós	375,0	305,1	14	51	375,0	305,1	18	60
		347,2	38	51		347,2	11	60
Propiconazol	342,3	159,2	29	79,8	342,3	159,2	28	66

** Os íons em negrito referem-se aos íons de quantificação; EC (Energia de Colisão); DP (*Declustering Potencial*)

O íon precursor consistiu da formação entre a molécula neutra do agrotóxico somada à massa do íon próton de hidrogênio, onde gerou íons moleculares protonados $[M+H]^+$ para a maioria dos agrotóxicos em estudo. Diazinon e clorpirifós mostram como são dadas as informações da identificação espectral dos compostos para a formação do banco de dados na construção do método.

Figura 10: Representação gráfica da formação dos fragmentos com suas respectivas energias de colisão e o espectro de massas do agrotóxico Diazinon na fonte ESI

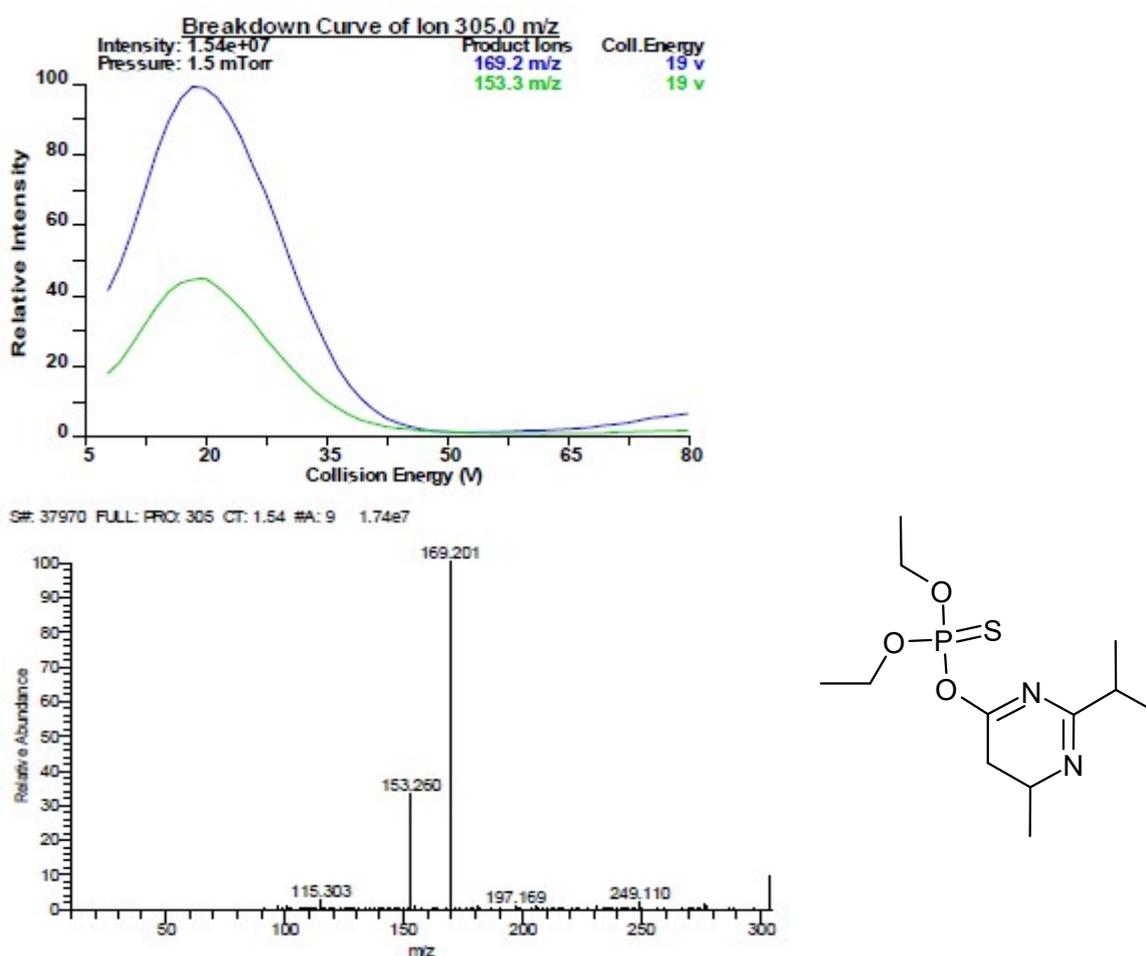
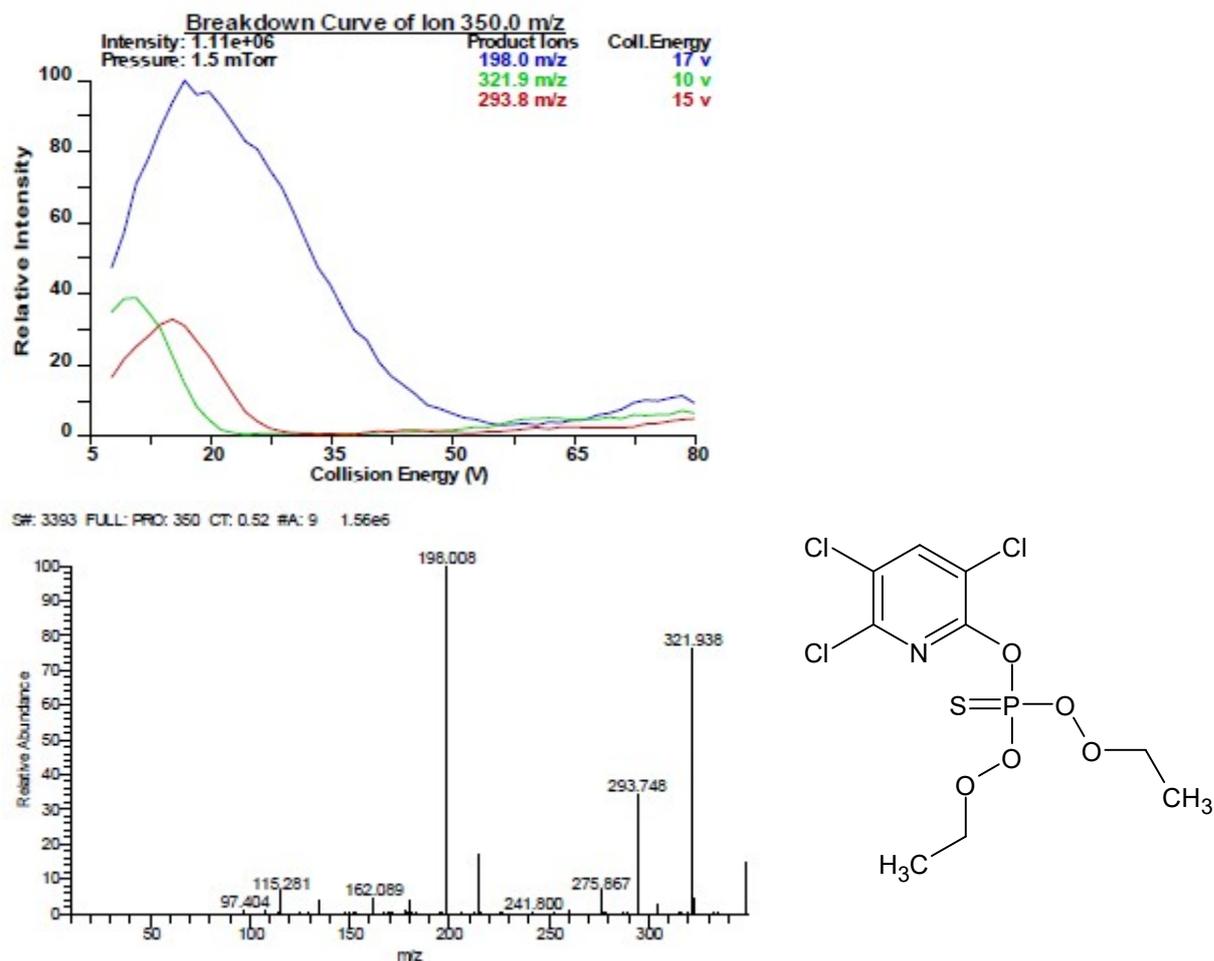
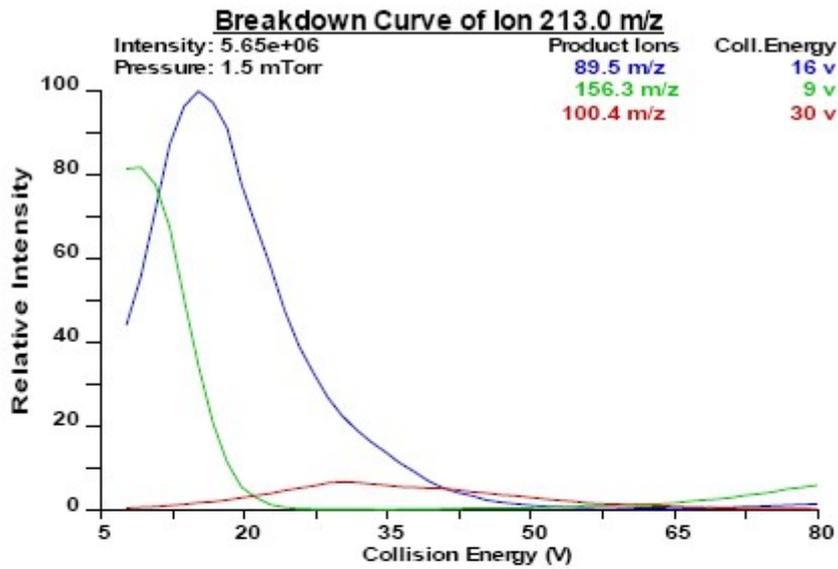


Figura 11: Representação gráfica da formação dos fragmentos com suas respectivas energias de colisão e o espectro de massas do agrotóxico Clorpirifós na fonte ESI



Para o agrotóxico aldicarbe o íon precursor na fonte ESI consistiu na formação de um íon aduto, através da formação da molécula neutra somada à massa do íon de sódio, formando íons do tipo $[M+Na]^+$. Na fonte APCI, o íon precursor se deu pela formação do íon aduto entre a molécula neutra somada a massa do íon amônio (presente na fase móvel) formando íons do tipo $[M+NH_4]^+$. Isso pode ser justificado porque na fonte APCI como a protonação ocorre no estado de vapor, a adição do íon sódio também deve ocorrer de forma significativa, e os íons de sódio não são prontamente produzidos no estado de vapor quando se usa a fonte APCI.

Figura 12: Representação gráfica da formação dos fragmentos com suas respectivas energias de colisão e o espectro de massas do agrotóxico aldicarbe na fonte ESI



#: 3865 FULL: PRO: 213 CT: 0.51 #A: 9 8.81e5

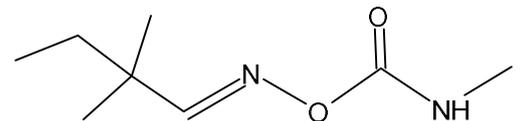
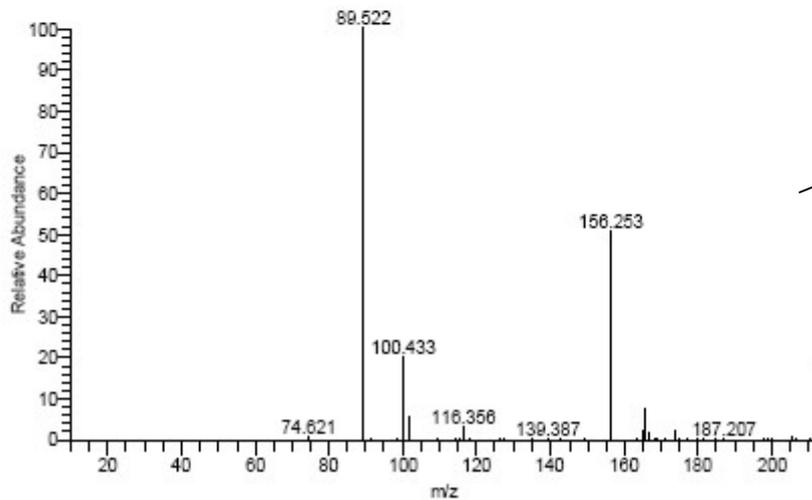
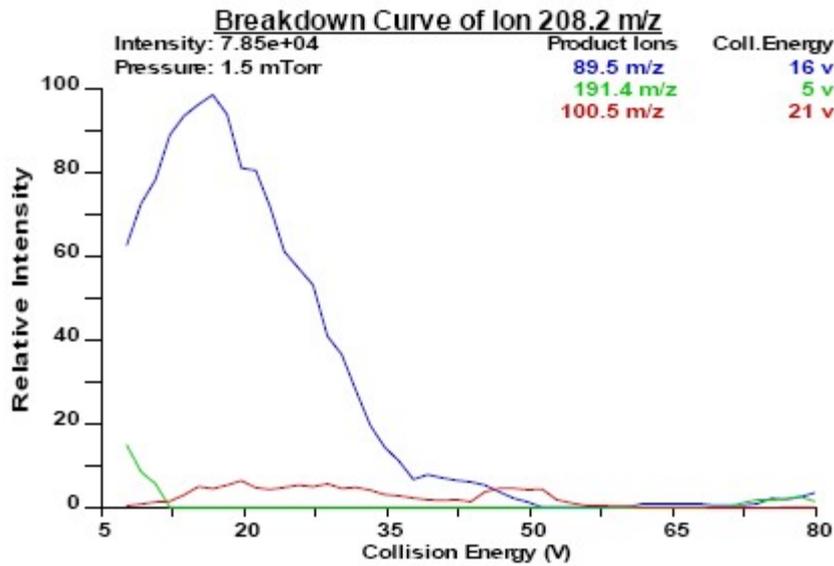
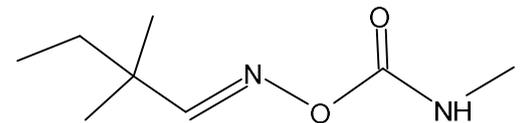
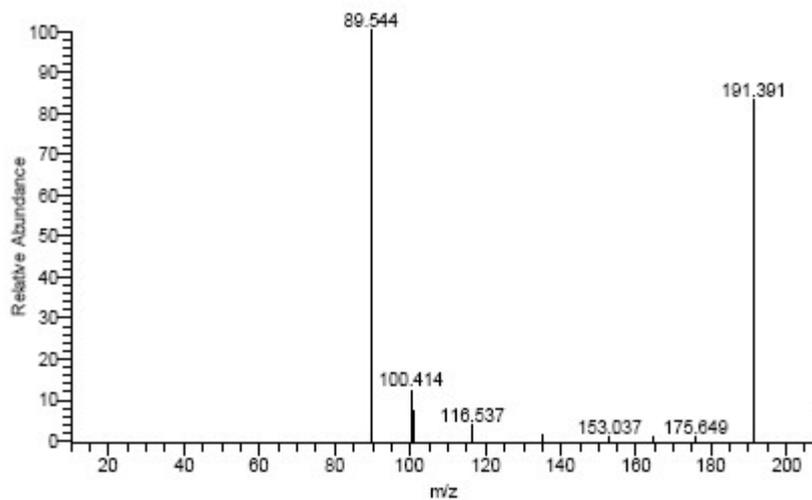


Figura 13: Representação gráfica da formação dos fragmentos com suas respectivas energias de colisão e o espectro de massas do agrotóxico aldicarbe na fonte APCI



S#: 0429 FULL: PRO: 208 CT: 0.52 #A: 9 2.08e4

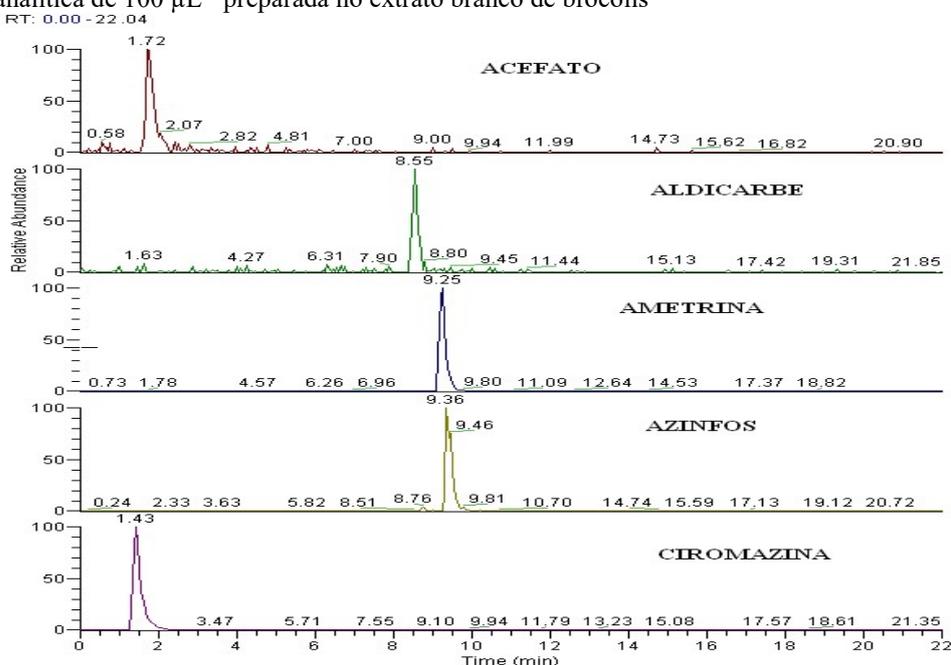


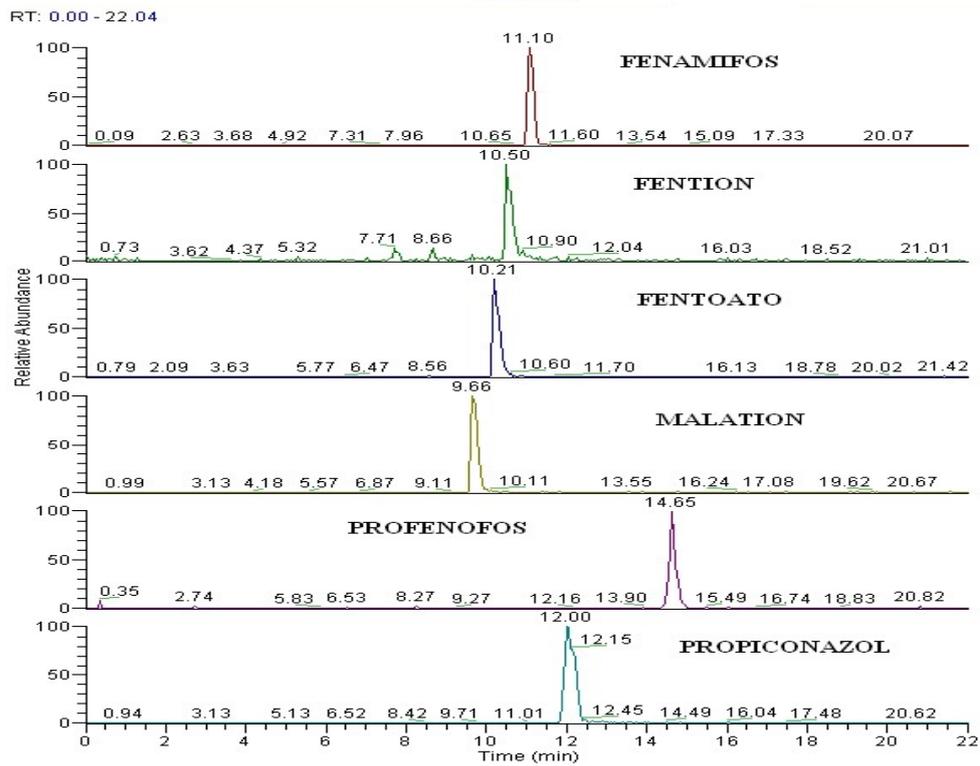
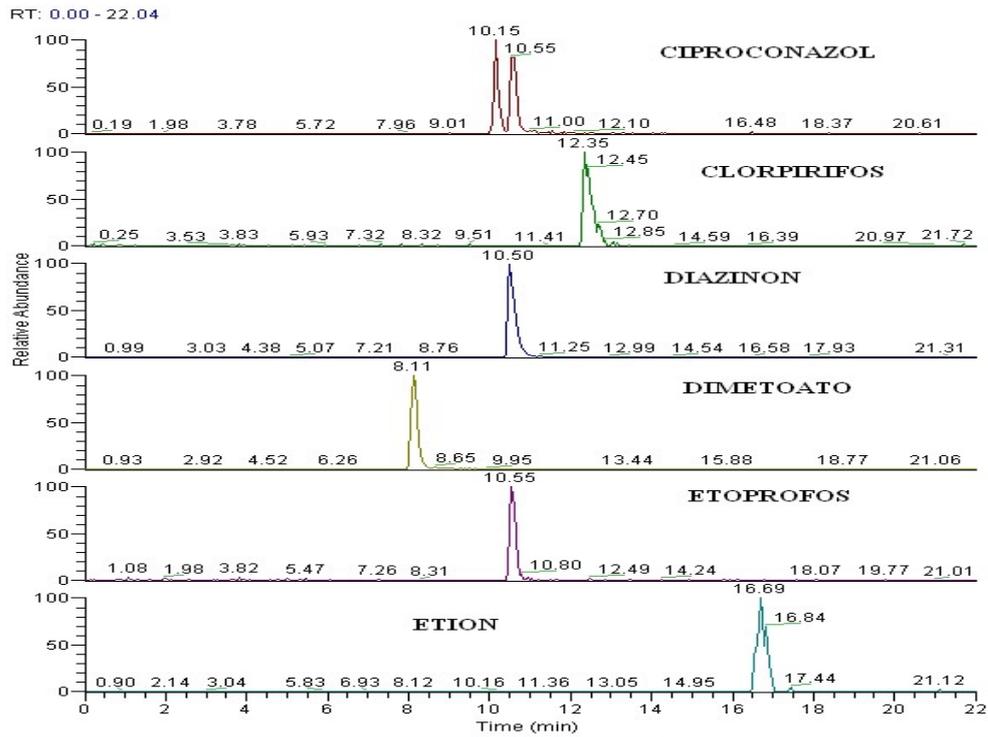
5.2 Otimização das condições cromatográficas

A separação cromatográfica dos compostos foi obtida após a otimização das melhores condições no sistema LC-MS/MS, associado à fonte de íons (ESI e APCI separadamente).

Na figura 14, pode ser visualizado o cromatograma de íon total(TIC) para cada um dos compostos, obtido através do monitoramento de reações selecionadas (SRM), nas quais foram analisadas as transições(m/z) de quantificação e confirmação.

Figura 14: Cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS para os compostos no modo SRM de uma solução analítica de $100 \mu\text{L}^{-1}$ preparada no extrato branco de brócolis





5.3 Validação do Método

5.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando os cromatogramas obtidos através do extrato em branco e da amostra fortificada ($100 \mu\text{gkg}^{-1}$). A ausência de sinais de compostos de interferência de matriz no mesmo tempo de retenção dos compostos, considerando as respectivas transições m/z , confirmou a seletividade do método.

Na análise para ambas as fontes (ESI e APCI), o método foi assegurado como seletivo analisando a ausência de interferentes com os mesmos íons de quantificação e confirmação no tempo de retenção dos analitos avaliados no branco da matriz (couve-flor, repolho e brócolis). No caso dos agrotóxicos estudados neste trabalho, todos apresentaram íons precursores, assim como íons produtos (quantificação), distintos uns dos outros, o que assegura a seletividade. A figura 15 apresenta o cromatograma selecionado e o espectro de massas do agrotóxico azinfos-metil na matriz repolho utilizando a fonte ESI, mostrando as suas duas transições, de quantificação e confirmação, respectivamente: $m/z 318.1 > 261$ e $m/z 331.1 > 143.3$. A figura 16 mostra a mesma avaliação na fonte APCI também para o azinfos-metil mostrando as transições $m/z 318.1 > 261.1$ e $m/z 318.1 > 125.0$. Desse mesmo modo o critério de análise estendeu-se a todos os outros compostos deste trabalho, confirmando a elevada seletividade da instrumentação, nas matrizes em estudo.

Figura 15: Cromatograma de monitoramento de reação selecionada (SRM) do azinfos-metil no extrato de repolho em branco e amostra dopada usando a fonte ESI

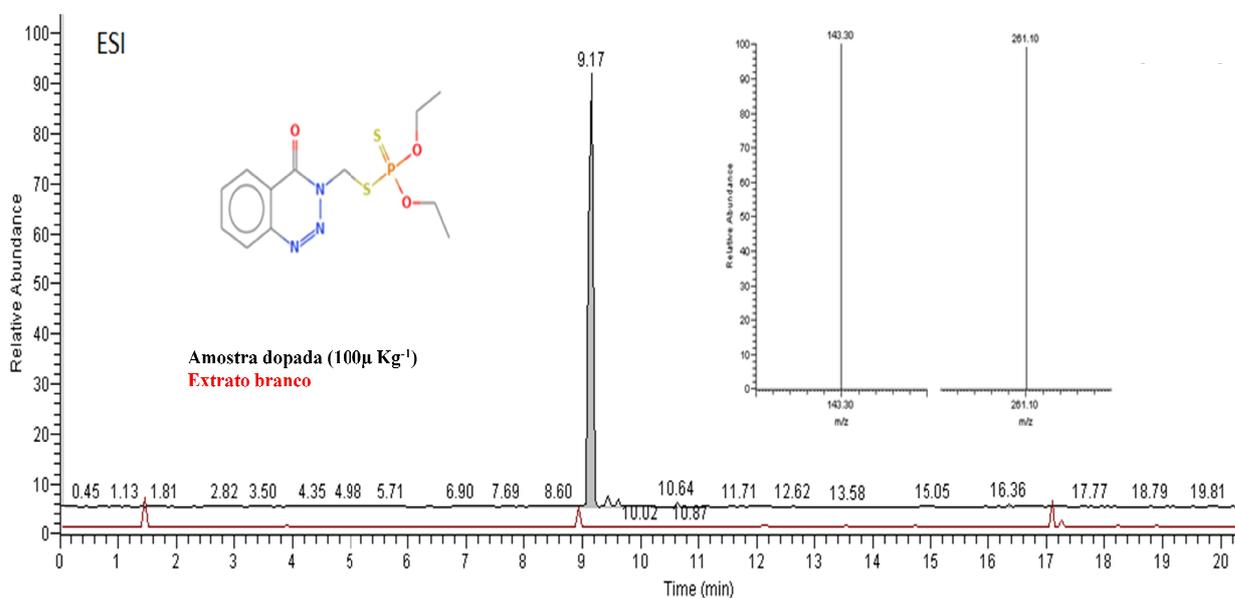
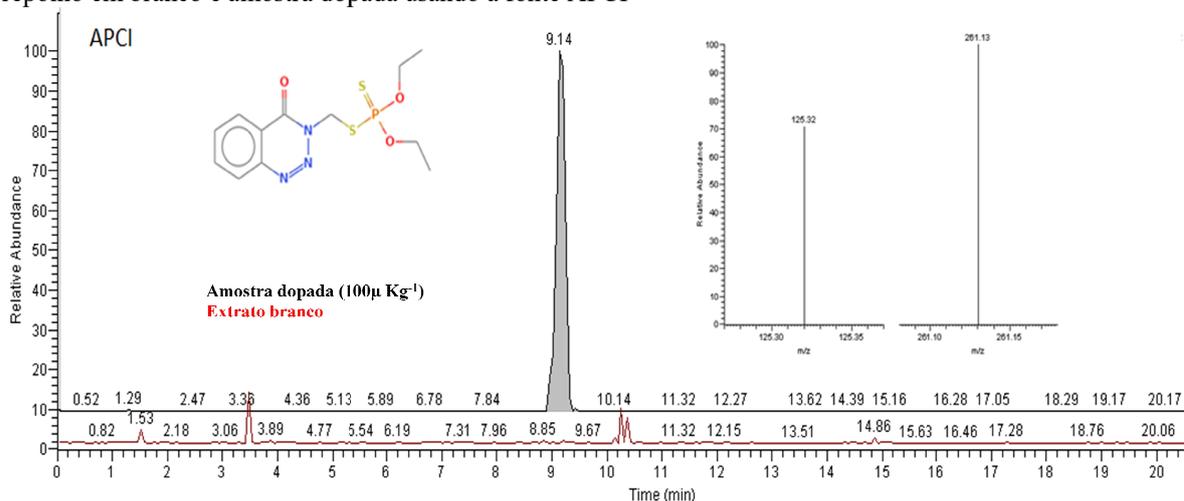


Figura 16: Cromatograma de monitoramento de reação selecionada (SRM) do azinfos-metil no extrato de repolho em branco e amostra dopada usando a fonte APCI



5.3.2 Sensibilidade

A sensibilidade de uma técnica analítica é principalmente determinada através da inclinação da reta (coeficiente angular) da curva de calibração.

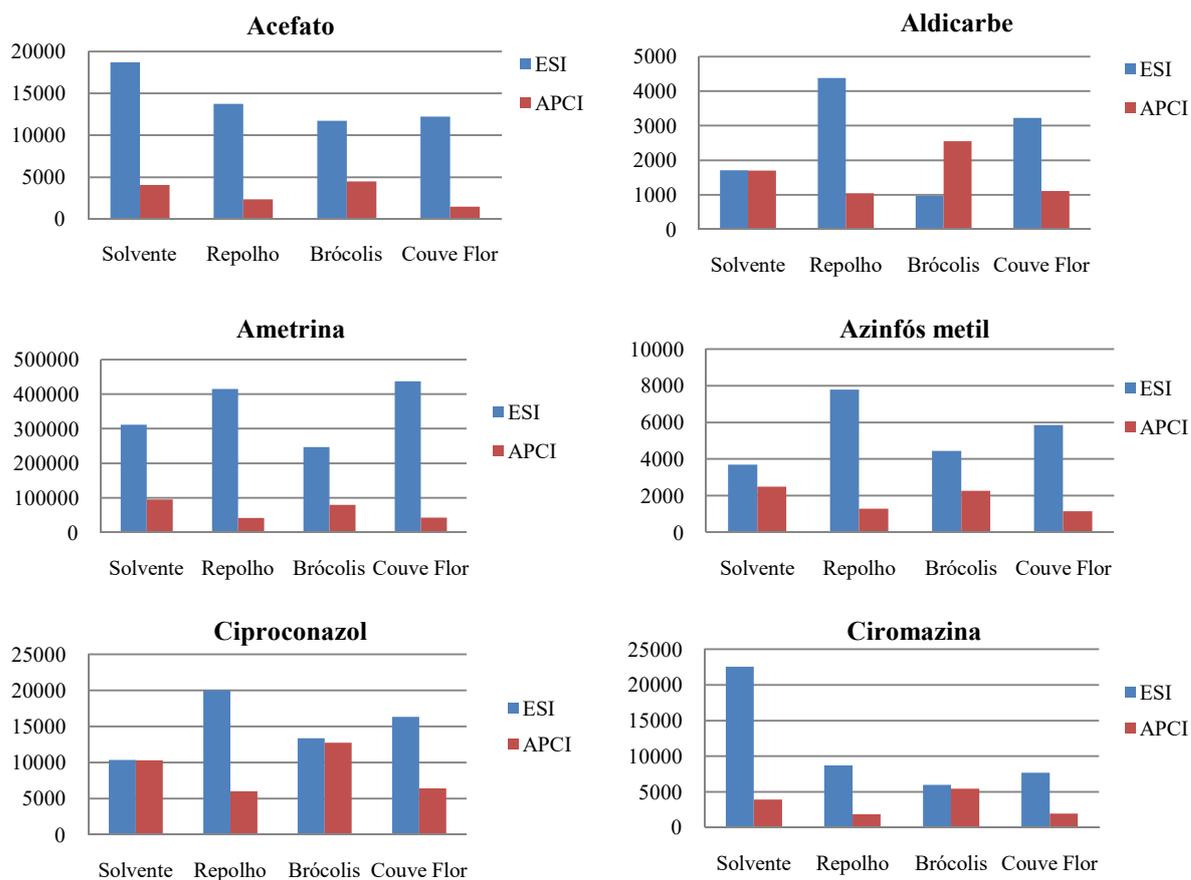
Neste estudo avaliou-se a melhor sensibilidade dos compostos frente ao processo de ionização comparando-se os coeficientes angulares das curvas no solvente e nos extratos das matrizes de repolho, brócolis e couve-flor, nas duas fontes (ESI e APCI). A figura 17 mostra os resultados dessa avaliação através de gráficos de barras comparando as duas fontes nas diferentes curvas analíticas. Nestes, observa-se que o número de compostos com boa sensibilidade para a fonte ESI foi equivalente ao número de composto com melhor sensibilidade para a fonte APCI.

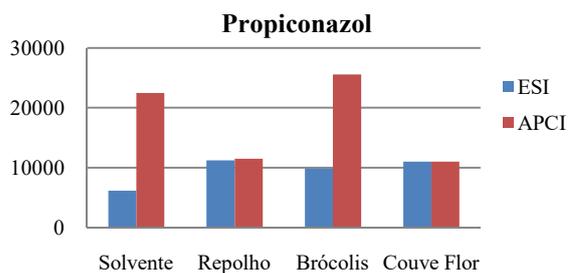
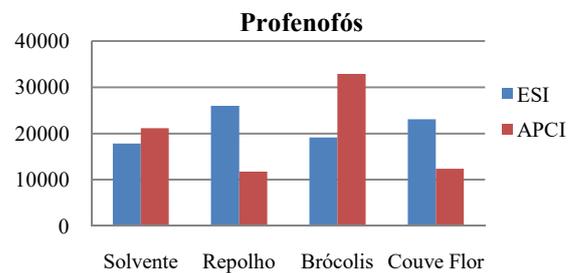
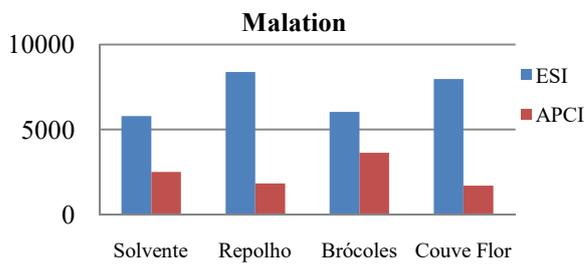
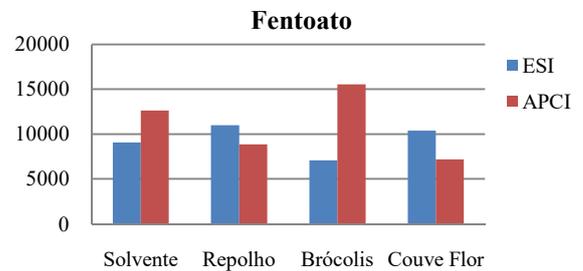
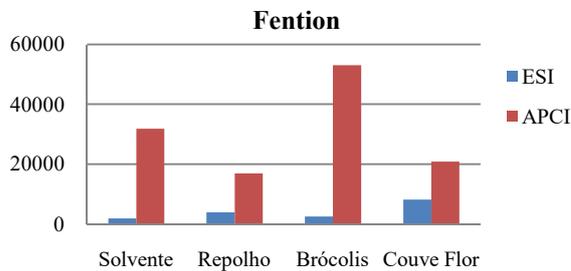
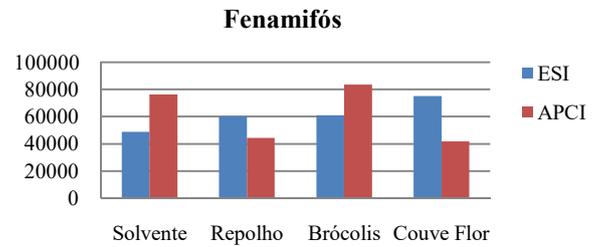
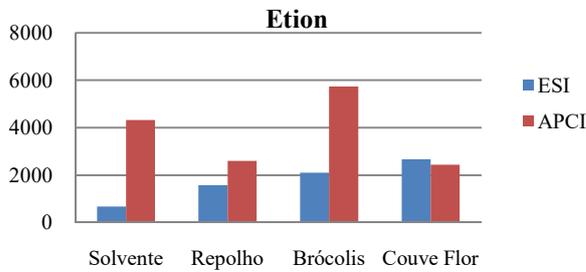
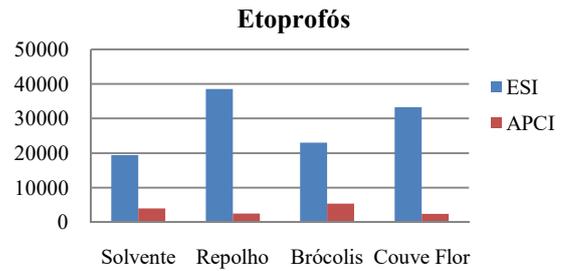
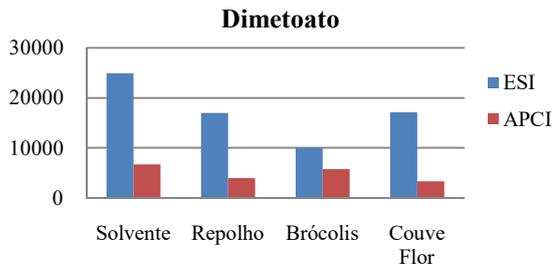
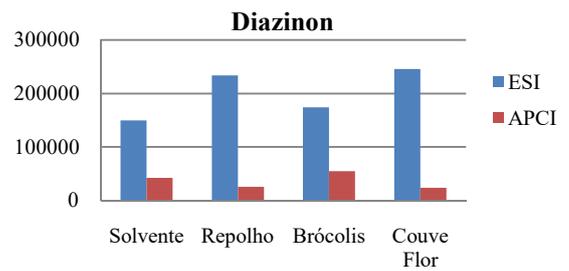
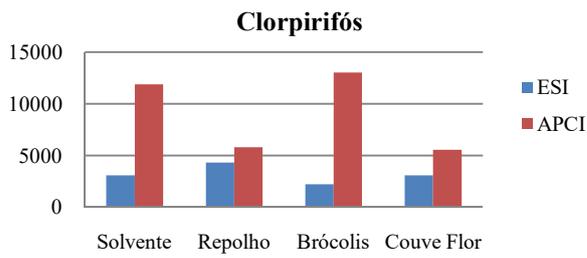
Não existe uma técnica de ionização universal que possa ionizar todos os compostos em diferentes matrizes. É necessária uma técnica de ionização adequada para compostos específicos, pois cada técnica tem sua própria vantagem para estruturas químicas e grupos funcionais orgânicos específicos (ALBERICI *et al.*, 2010). Sabe-se que a sensibilidade está relacionada às características físico-química das moléculas e uma dessas características se refere ao coeficiente de partição (pK_{ow}) que define o grau de polaridade de moléculas orgânicas. Os resultados mostraram a melhor sensibilidade dos compostos para cada fonte de acordo com o esperado, relacionando à polaridade de cada molécula.

Os compostos aldicarbe ($\log P=1,13$) e ciproconazol ($\log P=2,9$) apresentaram sensibilidade equivalente para ambas as fontes na curva no solvente. Nas curvas por

superposição na matriz a sensibilidade foi superior na fonte ESI para as matrizes em estudo. Ao passo que para os agrotóxicos do grupo das triazinas, ametrina ($\log P=2,98$) e ctiromazina ($\log P= -0,07$), bem como os organofosforados polares, acefato ($\log P= -0,85$), azinfol metil ($\log P=2,75$), dimetoato ($\log P=0,78$), etoprofos ($\log P=2,99$) e malation ($\log P=2,36$), mostraram sensibilidade superior na ESI, nas curvas no solvente e por superposição na matriz. Por outro lado, os compostos organofosforados que apresentam polaridade média a baixa, tais como clorpirifós ($\log P=4,96$), etion ($\log P=5,07$), fenamifós ($\log P=3,23$), fention ($\log P=4,09$), fentoato ($\log P=3,69$) e profenofós ($\log P=4,68$), assim como o propiconazol ($\log P=3,78$) que pertence classe dos triazóis, apresentaram melhor sensibilidade na fonte APCI.

Figura 17: Gráficos da sensibilidade dos compostos comparando as fontes ESI e APCI





As fontes de ESI e APCI podem ser usadas no modo positivo ou negativo, dependendo do caráter ácido ou básico da molécula (pKa). Para a maioria das moléculas, o modo íon positivo produz uma corrente de íon mais forte. Os pesticidas ácidos, tais como propiconazol (pKa = 1,09) produzem mais íons negativos do que íons positivos (Silva *et al*, 2019). No entanto, todos os pesticidas estudados mostraram boa resposta no modo positivo em ambas as fontes.

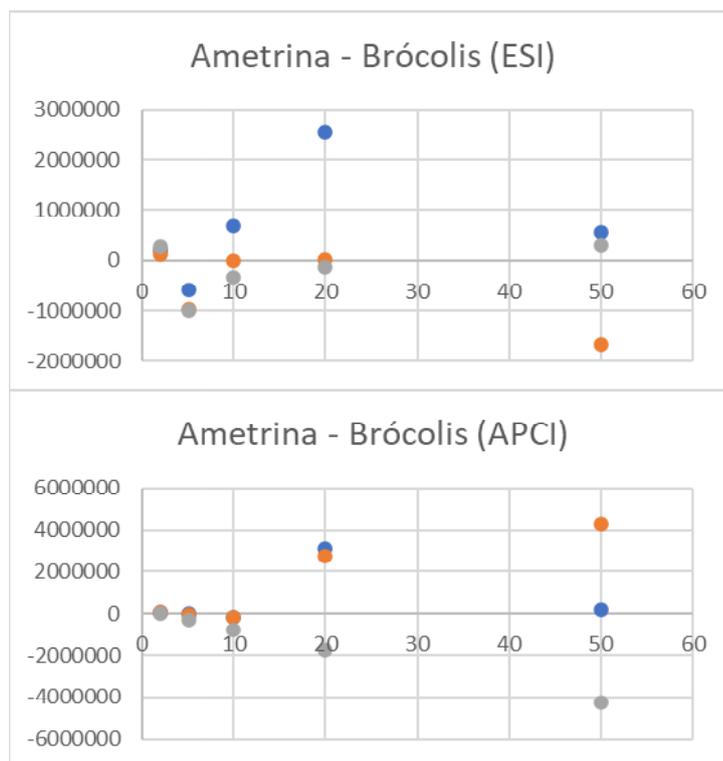
5.3.3 Linearidade

Foram construídas curvas analíticas a partir da injeção dos padrões puros em solventes, ou seja, padronização externa, como também a partir da adição dos padrões no extrato da matriz, ou seja, padronização externa com superposição na matriz. A construção das curvas por padronização com superposição na matriz objetivou em avaliar a linearidade assim como a sensibilidade e o efeito matriz nas duas fontes, ESI e APCI.

O estudo da linearidade foi realizado na faixa de concentração de 2,0 a 200,0 ppb, como mostram as tabelas no apêndice II. Optou-se em utilizar a faixa de trabalho de 2,0 a 50,0 ppb devido as baixas concentrações encontradas nas amostras analisadas e por apresentarem melhores valores de R.

A avaliação da linearidade das curvas de analíticas foi realizada com base na análise dos coeficientes linear, angular e de determinação das retas bem como os gráficos de resíduos e análise estatística de significância dos parâmetros. Verificou-se a linearidade do modelo com a execução de teste F, calculado segundo a equação 2. Ao mesmo tempo, obteve-se o valor crítico tabelado de F, correspondente ao respectivo grau de liberdade ($f = J - 1$) no numerador e no denominador, para um nível de confiança de 95%, sendo J o número de réplicas por ponto de calibração (BARBOSA *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2018). As figuras 18(a) e (b) mostram os gráficos de resíduos nas fontes ESI e na APCI para o composto ametrina. Pode-se observar claramente o formato do perfil afunilado, mostrando tendência nas variações de acordo com o nível de concentração, confirmando o modelo heterocedástico, o que reflete a um perfil geral observado nos 17 analitos alvo nas diferentes matrizes.

Figura 18: Gráficos de resíduos para o composto ametrina nas fontes ESI e APCI



Com base nos testes F e na análise dos gráficos de resíduo, os resultados apresentaram que para todas as curvas o modelo se mostrou heterocedástico e a análise de regressão foi avaliada aplicando-se o modelo dos MMQP, onde os dados de regressão da curva analítica nas matrizes (repolho, brócolis e couve-flor) de cada composto, coeficiente de determinação, a faixa linear de cada um e seus respectivos valores calculados e tabelados de F, são mostrados nas tabelas 6 e 7. As tabelas mostram também os resultados da análise estatística de significância dos parâmetros, em que todos os coeficientes angulares das curvas de calibração são significativos e alguns dos coeficientes lineares não são significativos, já que $t_{calc,a} > t_{crit}$ e $t_{calc,b} < t_{crit}$. Desta forma, quando $t_{calc,b} < t_{crit}$ os coeficientes lineares foram desconsiderados e a quantificação realizada com base nas curvas corrigidas mostradas nas tabelas a seguir. Portanto a estratégia de testes estatísticos visou garantir uma maior confiabilidade nos resultados.

Tabela 6: Dados dos parâmetros das curvas analíticas, linearidade e testes estatísticos para a fonte ESI

Agrotóxico	M	ESI									
		Coef. angular	Coef. linear	Faixa de trabalho	r	F _{cal}	F _{crit}	t _a	t _b	t _{crit}	Curva corrigida
Acefato	RP	13778	-16806	2 – 50	0,998	523	19	28,79	1,42	3,18	y = 13778x - 16806
	BR	8261	38690	2 – 50	0,999	5	19	41,59	7,91	3,18	y = 8261x + 38690
	CF	12946	2661	2 – 50	0,997	1206	19	25,38	0,21	3,18	y = 12946x
Aldicarbe	RP	12079	6460	5 – 100	0,996	334	19	5,11	1,65	3,18	y = 12079x
	BR	2246	-1616	5 – 100	0,992	287777	19	3,57	1,47	3,18	y = 2246x
	CF	4700	53107	5 – 100	0,994	128	19	4,08	3,36	3,18	y = 4700x + 53107
Ametrina	RP	427546	-1015157	2 – 50	0,996	281563	19	21,57	2,08	3,18	y = 427546x
	BR	227815	-143956	2 – 50	0,999	645	19	51,42	1,32	3,18	y = 227815x
	CF	490205	101533	2 – 50	0,999	342	19	286,1	1,85	3,18	y = 490205x
Azinfos metil	RP	8356	-23344	2 – 50	0,997	1155	19	23,86	2,70	3,18	y = 8356x
	BR	3793	-6456	2 – 50	0,998	13068	19	33,08	2,28	3,18	y = 3793x
	CF	6441	-103	2 – 50	0,995	106	19	18,57	0,01	3,18	y = 6441x
Ciproconazol	RP	14111	-26272	2 – 50	0,997	45090	19	22,97	1,73	3,18	y = 14111x
	BR	11960	-13180	2 – 50	0,999	425	19	100,3	4,49	3,18	y = 11960x - 13180
	CF	16845	-11881	2 – 50	0,999	639	19	96,92	2,77	3,18	y = 16845x
Cimozina	RP	8535	-28177	2 – 50	0,997	3133	19	25,53	3,42	3,18	y = 8535x - 28177
	BR	5600	-25798	2 – 50	0,995	795	19	9,90	1,85	3,18	y = 5600x
	CF	7534	-22668	2 – 50	0,997	757	19	26,83	3,28	3,18	y = 7534x - 22668
Clorpirifós	RP	2612	-1538	2 – 50	0,997	179	19	25,55	0,61	3,18	y = 2612x
	BR	1859	-5740	2 – 50	0,996	746	19	20,34	2,55	3,18	y = 1859x
	CF	3112	-12443	2 – 50	0,991	13409	19	11,99	1,94	3,18	y = 3112x
Diazinon	RP	281119	-721300	2 – 50	0,995	1778	19	18,76	1,95	3,18	y = 281119x
	BR	164851	-132120	2 – 50	0,999	404	19	60,05	1,95	3,18	y = 164851x
	CF	252762	131374	2 – 50	0,999	55	19	54,25	1,14	3,18	y = 252762x
Dimetoato	RP	19387	-38316	2 – 50	0,998	1013	19	36,69	2,94	3,18	y = 19387x
	BR	7526	-9225	2 – 50	0,998	1431	19	14,01	0,48	3,18	y = 7526x
	CF	19013	10970	2 – 50	0,992	526	19	13,69	0,32	3,18	y = 19013x
Etoprofós	RP	41366	-69108	2 – 50	0,996	320	19	21,64	1,46	3,18	y = 41366x
	BR	21825	-26029	2 – 50	0,999	1322	19	69,71	3,38	3,18	y = 21825x - 26029
	CF	35675	-10790	2 – 50	0,999	214	19	99,61	1,22	3,18	y = 35675x
Etion	RP	1424	-4248	2 – 50	0,995	4177	19	18,83	2,28	3,18	y = 1424x
	BR	1982	-4726	2 – 50	0,998	2823	19	34,03	3,30	3,18	y = 1982x - 4726
	CF	2917	-4266	2 – 50	0,998	551327	19	27,77	1,65	3,18	y = 2917x
Fenamifós	RP	58480	26443	2 – 50	0,998	103	19	28,46	0,52	3,18	y = 58480x

	BR	63681	-49062	2 – 50	0,999	3963	19	130,4	4,08	3,18	$y = 63681x - 49062$
	CF	84556	-7752	2 – 50	0,999	59	19	117,9	0,43	3,18	$y = 84556x$
Fention	RP	4276	90300	2 – 50	0,992	204	19	7,19	6,17	3,18	$y = 4276x + 90300$
	BR	2169	94652	2 – 50	0,996	29	19	6,78	12,0	3,18	$y = 2169x + 94652$
	CF	6035	167922	2 – 50	0,988	106	19	3,95	3,26	3,18	$y = 6035x + 167922$
Fentoato	RP	11753	-30936	2 – 50	0,999	5101	19	45,34	4,85	3,18	$y = 11753x - 30936$
	BR	6943	-14186	2 – 50	0,999	46464	19	47,80	3,97	3,18	$y = 6943 - 14186$
	CF	6434	-1972	2 – 50	0,999	2129	19	42,02	0,52	3,18	$y = 6434x$
Malation	RP	8157	-2843	2 – 50	0,997	193	19	25,44	0,36	3,18	$y = 8157x$
	BR	6265	-2567	2 – 50	0,999	187	19	48,06	0,80	3,18	$y = 6265x$
	CF	8538	-2078	2 – 50	0,999	444	19	54,63	0,54	3,18	$y = 8538x$
Profenofós	RP	16955	-932	2 – 50	0,997	9341	19	25,78	0,05	3,18	$y = 16955x$
	BR	17536	-25112	2 – 50	0,999	135893	19	61,21	3,56	3,18	$y = 17536x - 25112$
	CF	24071	-23602	2 – 50	0,999	2163	19	70,54	2,81	3,18	$y = 24071x$
Propiconazol	RP	9866	-24228	2 – 50	0,997	32494	19	24,51	2,44	3,18	$y = 9866x$
	BR	13369	6509	2 – 50	0,997	5978	19	25,95	0,51	3,18	$y = 13369x$
	CF	11904	-24873	2 – 50	0,999	9095	19	45,14	3,83	3,18	$y = 11904x - 24873$

M = Matriz; RP = Repolho; BR = Brócolis; CF = Couve-flor

Tabela 7: Dados dos parâmetros das curvas analíticas, linearidade e testes estatísticos para a fonte APCI

Agrotóxico	M	APCI									
		Coef. angular	Coef. linear	Faixa de trabalho	r	F _{cal}	F _{crit}	t _a	t _b	t _{crit}	Curva corrigida
Acefato	RP	2358	-2806	2 – 50	0,990	174	19	12,70	0,61	3,18	y = 2358x
	BR	3420	1365	2 – 50	0,997	158213	19	10,67	0,17	3,18	y = 3420x
	CF	1137	4224	2 – 50	0,992	13693	19	4,93	2,64	3,18	y = 1137x
Aldicarbe	RP	1225	3980	2 – 50	0,993	400	19	3,91	0,81	3,18	y = 1225x
	BR	2975	9201	2 – 50	0,991	182477	19	3,95	2,34	3,18	y = 2975x
	CF	535	6572	2 – 50	0,994	566	19	3,91	1,95	3,18	y = 535x
Ametrina	RP	6152	-80804	2 – 50	0,999	49	19	6,14	0,59	3,18	y = 6152x
	BR	98185	-21778	2 – 50	0,998	17763	19	32,30	2,91	3,18	y = 98185x
	CF	54763	-138000	2 – 50	0,992	7208	19	9,11	0,93	3,18	y = 54763x
Azinfos metil	RP	1546	-5539	2 – 50	0,998	345	19	24,85	3,61	3,18	y = 1546x - 5539
	BR	1642	-1809	2 – 50	0,996	874796	19	19,44	0,87	3,18	y = 1642x
	CF	815	365	2 – 50	0,997	4483	19	22,66	0,41	3,18	y = 815x
Ciproconazol	RP	6092	4938	2 – 50	0,992	1777	19	13,23	0,43	3,18	y = 6092x
	BR	14426	-40196	2 – 50	0,999	2770	19	36,21	4,09	3,18	y = 14426x - 40196
	CF	5127	-5317	2 – 50	0,997	38	19	14,32	1,07	3,18	y = 5127x
Cimozina	RP	1892	15482	2 – 50	0,996	121	19	18,17	6,04	3,18	y = 1892x + 15482
	BR	4141	-5095	2 – 50	0,998	4976	19	29,9	1,49	3,18	y = 4141x
	CF	2460	-2120	2 – 50	0,994	391	19	15,51	0,54	3,18	y = 2460x
Clorpirifós	RP	5375	-2883	2 – 50	0,995	438	19	7,95	0,22	3,18	y = 5375x
	BR	5895	-5977	2 – 50	0,996	1522	19	3,49	1,02	3,18	y = 5895x
	CF	6797	-20159	2 – 50	0,989	19372	19	11,76	1,41	3,18	y = 6797x
Diazinon	RP	31123	-26171	2 – 50	0,998	9997	19	31,85	1,08	3,18	y = 31123x
	BR	66784	-223449	2 – 50	0,995	176	19	17,55	2,38	3,18	y = 66784x
	CF	12698	72998	2 – 50	0,993	83	19	9,39	2,19	3,18	y = 12698x
Dimetoato	RP	5013	-4991	2 – 50	0,995	2504	19	16,72	0,67	3,18	y = 5013x
	BR	4737	-7223	2 – 50	0,996	15355	19	6,09	0,01	3,18	y = 4737x
	CF	2032	5786	2 – 50	0,995	38	19	16,74	1,94	3,18	y = 2032x
Etoprofós	RP	2651	1892	2 – 50	0,996	5029	19	20,23	0,59	3,18	y = 2651x
	BR	6726	-13898	2 – 50	0,999	4560	19	41,11	3,45	3,18	y = 6726x - 13898
	CF	2545	-161	2 – 50	0,996	9853	19	19,64	0,05	3,18	y = 2545x
Etion	RP	3575	-6171	2 – 50	0,999	538	19	50,51	3,54	3,18	y = 3575x - 6171
	BR	3337	-4483	2 – 50	0,996	4988	19	3,50	0,65	3,18	y = 3337x
	CF	1525	101	2 – 50	0,997	399	19	23,44	0,06	3,18	y = 1525x
Fenamifós	RP	56838	-21348	2 – 50	0,997	2092	19	22,65	0,34	3,18	y = 56838x

	BR	96199	-230291	2 – 50	0,998	15058	19	27,32	2,65	3,18	$y = 96199x$
	CF	25718	105141	2 – 50	0,992	997	19	13,40	2,22	3,18	$y = 25718x$
Fention	RP	22337	52703	2 – 50	0,994	397	19	4,59	2,48	3,18	$y = 22337x$
	BR	27457	162218	2 – 50	0,989	178	19	23,99	12,5	3,18	$y=27457x + 162218$
	CF	14509	145076	2 – 50	0,992	111	19	3,28	0,99	3,18	$y = 14509x$
Fentoato	RP	9151	-7728	2 – 50	0,999	11401	19	34,42	1,18	3,18	$y = 9151x$
	BR	16021	-43525	2 – 50	0,998	20501	19	29,64	3,27	3,18	$y = 16021x - 43525$
	CF	6434	-1972	2 – 50	0,999	2129	19	42,02	0,52	3,18	$y = 6434x$
Malation	RP	2049	-3955	2 – 50	0,999	54	19	45,00	2,35	3,18	$y = 2049x$
	BR	3784	-14789	2 – 50	0,995	516	19	17,27	2,74	3,18	$y = 3784x$
	CF	1153	162	2 – 50	0,997	1539	19	10,70	0,06	3,18	$y = 1153x$
Profenofós	RP	14681	-13246	2 – 50	0,999	20	19	34,52	1,26	3,18	$y = 14681x$
	BR	27068	-30302	2 – 50	0,997	142	19	19,45	1,42	3,18	$y = 27068x$
	CF	8030	12681	2 – 50	0,997	290	19	22,32	1,43	3,18	$y = 8030x$
Propiconazol	RP	13587	-19	2 – 50	0,997	27059	19	24,01	0,01	3,18	$y = 13587x$
	BR	17405	-23390	2 – 50	0,994	1461	19	3,27	1,07	3,18	$y = 17405x$
	CF	12772	-33968	2 – 50	0,995	5664	19	17,14	1,85	3,18	$y = 12772x$

M = Matriz; RP = Repolho; BR = Brócolis; CF = Couve-flor

5.3.4 Efeito Matriz

Como sabido, em matrizes complexas como alimentos, a análise de compostos de interesse pode sofrer interferência de outras substâncias, notadamente conhecido como efeito de matriz. Em LC-MS/MS essa interferência ocorre no momento da ionização em decorrência da competição no processo de ionização, fazendo com que o sinal do analito em questão seja intensificado ou suprimido.

A quantificação do efeito matriz foi realizada com base na equação 5. As figuras 19 e 20 apresentam os resultados dos estudos de efeito matriz, nas fontes ESI e APCI respectivamente, onde pode verificar que a porcentagem do efeito matriz foi superior a $\pm 20\%$ para maioria dos compostos independente da fonte utilizada. O efeito matriz é considerado baixo para intervalos entre $-20\% < C\% < 20\%$, médio para os intervalos $-50\% < C\% < -20\%$ ou $20\% > C\% > 50\%$ e elevado para os intervalos $C\% < -50\%$ ou $C\% > 50\%$ (ECONOMOU *et al*, 2009).

Pode-se observar variação de sinais tanto positivo como negativo para os compostos em ambas as fontes. Isso indica a presença de efeito matriz nas curvas analíticas dos compostos estudados, confirmando a importância de se estudar curvas preparadas no extrato da matriz durante a etapa de desenvolvimento de métodos, principalmente por se tratar de amostras complexas.

Na fonte ESI, ocorreu uma maior variabilidade (intensificação e supressão) de sinal entre os compostos nas amostras, na qual o percentual de efeito matriz destes compostos foram superiores ao determinado na APCI. Nessa fonte, os agrotóxicos de maior polaridade, de modo geral, apresentaram maiores porcentagens de efeito matriz (acefato: -34% a -26%), (ciromazina: -44% a -38%) e (dimetoato: -31% a -20%), nas três matrizes estudadas, indicando uma maior influência dos componentes da matriz, ocorrendo supressão de sinal. Na matriz brócolis, alguns compostos praticamente não ocorreu efeito matriz: etoprofós (-2,4%), etion (9,0%), malation (4,3%) e profenofós (7,4%) indicando assim, baixo efeito matriz.

Na fonte APCI ocorreu uma supressão de sinal em praticamente quase todos os compostos e que os percentuais do efeito matriz não ultrapassou 40%. Somente na matriz brócolis ocorreu enriquecimento de sinal para alguns dos agrotóxicos como também foi a matriz que apresentou um maior número de compostos com baixo percentuais de efeito matriz, ou seja, $\geq 20\%$. Acefato (-14,7%), ametrina (-16,5%), azinfos metil (-9,2%), clorpirifos (9,8%), dimetoato (-14,7%), etoprofós (11,7%), fenamifos (9,5%) e propiconazol (13,7%).

ESI e APCI se complementam, pois não há critério exclusivo para escolher a interface mais adequada e sensível quando novos métodos analíticos estão sendo desenvolvidos para pesticidas, especialmente em análise de multirresíduos. Thurman e colaboradores (2001) avaliaram a sensibilidade de 75 pesticidas por LC-MSMS usando APCI e ESI. Os autores avaliaram apenas a sensibilidade dos padrões (analitos no solvente), onde se sabe que estes podem se comportar de forma diferente quando analisado sem amostras reais por LC – MS/MS. Portanto, a comparação de APCI e ESI em termos de sensibilidade para amostras reais é significativa.

Diferentes comportamentos são relatados na literatura quando se utiliza como fonte de ionização a ESI ou a APCI na determinação de agrotóxicos em alimentos, uma vez que, em se tratando de amostras complexas, não é passível a compreensão de todos os efeitos de matriz observados. Alguns autores relatam que o ESI está mais sujeito a supressão de íons. CABRERA (2012), no estudo de efeito matriz de agrotóxicos em arroz mostrou que 80% dos compostos apresentaram supressão de sinal. No entanto, GARCIA, *et al*, (2011) relataram que APCI foi mais afetada por supressão, o mesmo observado no presente trabalho. CHEN *et al.*, (2014), no estudo comparativo das fontes ESI e APCI relataram que em ambas as fontes os analitos sofreram supressão de sinal e que a APCI foi menos afetada. Na verdade, as duas técnicas são consideradas igualmente afetadas, pois em ambos os casos, a natureza e a composição da fase móvel são conhecidas por influenciar em larga medida, o processo de ionização. Além disso, devido à ionização ocorrer em fase líquida para ESI e na fase gasosa para APCI, os mecanismos envolvidos na formação dos íons dos analitos são diferentes para as duas técnicas.

Alguns pesquisadores procuram avaliar possíveis formas de contornar a questão da variação no sinal dos analitos pelos componentes da matriz. FERREIRA *et al* (2016) realizaram diluição apropriada dos extratos da amostra após a etapa de limpeza e antes da injeção no sistema LC-MS/MS. Esta é uma estratégia simples que oferece a vantagem da redução de concentração da matriz e reduz/elimina o efeito matriz. No entanto, isso pode também diminuir a sensibilidade do método, ou mesmo levar a não detecção dos compostos de interesse na amostra.

Figura 19: Representação gráfica do Efeito Matriz dos agrotóxicos na ESI

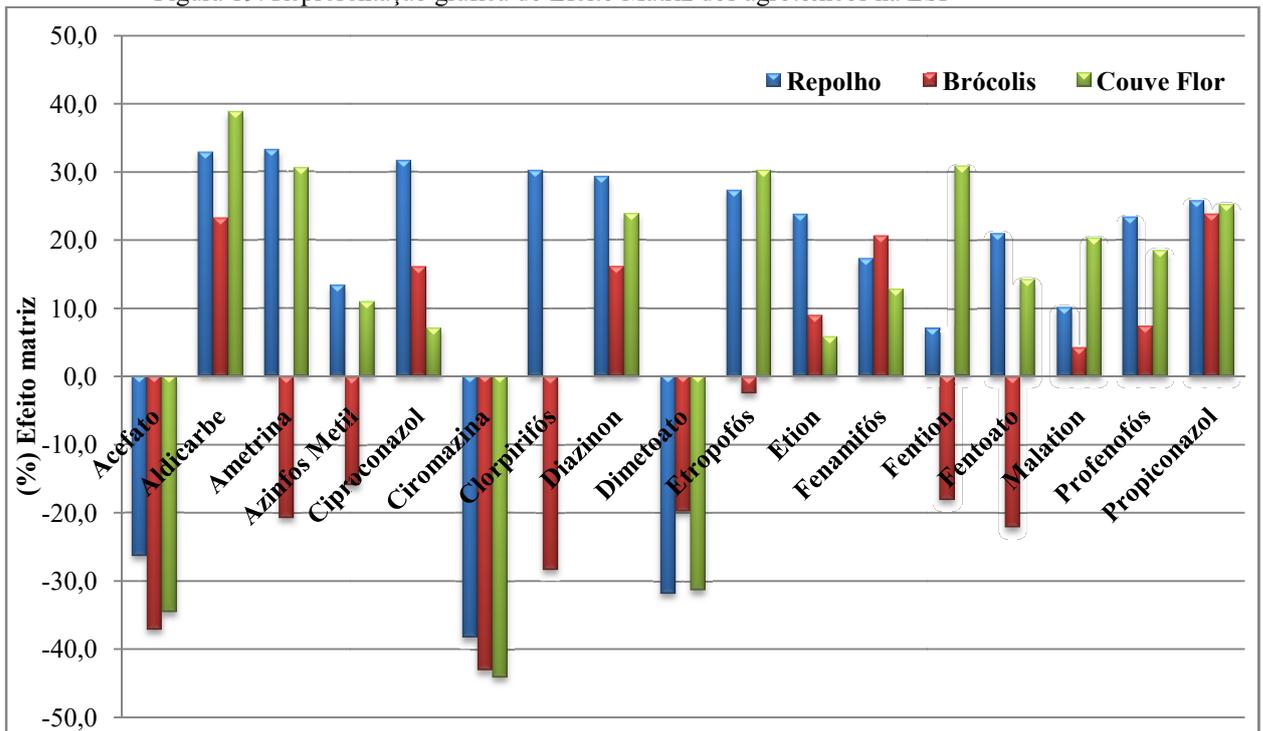
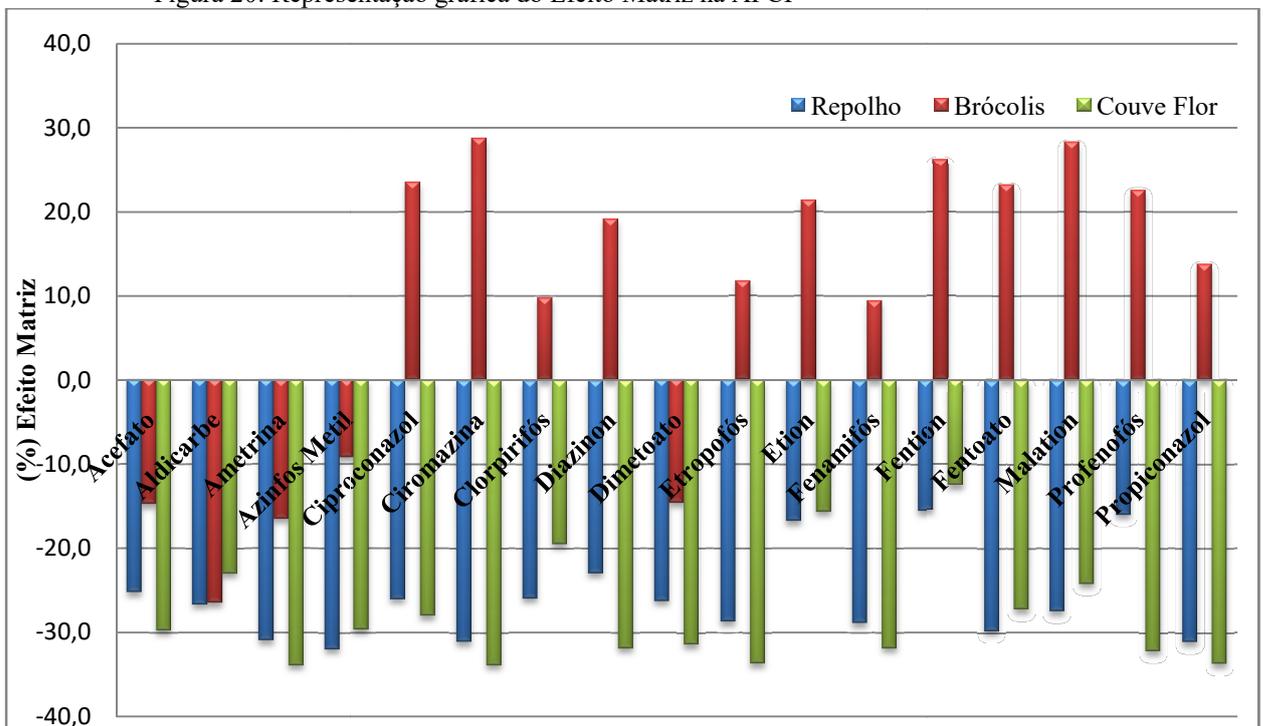


Figura 20: Representação gráfica do Efeito Matriz na APCI



5.3.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Na tabela 7, são apresentados os Limites de Detecção (LD_i) e Limites de Quantificação (LQ_i) do instrumento apresentados em μgL^{-1} . Estes limites foram

determinados avaliando a resposta da relação sinal/ruído de soluções padrão diluídas em solvente. A tabela também apresenta os Limites de Quantificação do método (LQ_m), apresentados em $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Este valor de LQ_m de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foi determinado como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentou recuperações entre 70 e 120% com %CV menor que 20% para maioria dos compostos realizado na fonte APCI, na qual apresentou maiores valores de LD e LQ. Assim, empregou-se a mesma concentração para estabelecer o LQ_m para a fonte ESI. Observa-se que valores de LQ_m para os compostos aplicados nas culturas em estudo, estão abaixo dos valores de LMR, estabelecidos pela ANVISA garantindo a sensibilidade do método para o monitoramento destes compostos em amostras reais.

O método desenvolvido não apresenta fator de diluição e/ou concentração, sendo assim, para todos os compostos os valores de LD e LQ mostrou que os agrotóxicos estudados têm boa detectabilidade no sistema LC-MS/MS. Observa-se também que, para todos os compostos, os valores de LD e LQ utilizando a fonte ESI, apresentaram valores inferiores em relação à fonte APCI. Vale ressaltar que para efeitos de comparação entre as duas fontes citadas foram estabelecidas as mesmas condições de faixa de trabalho para ambas as fontes. Esta condição foi estabelecida devido à limitação da fonte APCI que não atingiu os mesmos limites de detecção que a fonte ESI. Portanto, este estudo mostra que a fonte ESI apresenta uma melhor detectabilidade para todos os compostos. Na tabela 7, estão os Limites de Detecção e os Limites de Quantificação para cada composto nas duas fontes, bem como a faixa de trabalho e os LMR (mg.Kg^{-1}) para repolho segundo ANVISA e EU.

Tabela 8: Valores dos Limites de Detecção e Quantificação com respectivos valores de LMRs

Composto	TIPO DE FONTE	FAIXA LINEAR	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ_m ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)	LMR (mg.Kg^{-1}) (ANVISA)	LMR (mg.Kg^{-1}) (EU)
Acefato	ESI	2 - 150	0,10	0,30		0,5	0,01
	APCI	2 - 150	0,50	1,50	2,00		
Aldicarbe	ESI	2 - 200	0,10	0,30		-	0,01
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Ametrina	ESI	2 - 200	0,05	0,10		-	0,01
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Azinfos-metil	ESI	2 - 200	0,25	0,75		-	0,05
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Ciproconazol	ESI	2 - 200	0,25	0,75		-	0,05
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Ciromazina	ESI	2 - 200	0,10	0,30		-	0,05
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		

Clorpirifos	ESI	2 - 200	0,25	0,75		-	0,01
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Diazinon	ESI	1 - 200	0,25	0,75		-	0,01
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Dimetoato	ESI	2 - 200	0,25	0,75		-	0,01
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Etoprofos	ESI	2 - 200	0,25	0,75		-	0,02
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Ethion	ESI	2 - 200	0,25	0,75		-	0,01
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Fenamifos	ESI	2 - 200	0,25	0,75		-	0,02
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Fention	ESI	2 - 200	0,25	0,75		-	0,01
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Fentoato	ESI	2 - 200	0,25	0,75		-	0,01
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Malation	ESI	2 - 200	0,25	0,75		3,0	0,02
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Profenofós	ESI	2 - 200	0,25	0,75		0,05	0,01
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		
Propiconazol	ESI	2 - 200	0,25	0,75		-	0,01
	APCI	2 - 200	0,50	1,50	2,00		

Em estudos recentes envolvendo análise de agrotóxicos em matrizes complexas, apresentam valores de LOD e de LOQ superiores ou equivalentes aos valores obtidos no presente estudo (Tabela 8). Portanto, confirma-se a alta eficiência e sensibilidade de métodos desenvolvidos utilizando LC-APCI-MS/MS e LC-ESI-MS/MS mesmo em diferentes matrizes.

Tabela 9: Dados da literatura de LD e LQ em diferentes hortaliças utilizando LC-MS/MS

Agrotóxico	Matriz	Fonte de íons	Analizador	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Referência
Ametrina	Alface	ESI	Q-TOFII	5,0	10,0	Chiarello e Moura, 2018a
Ciproconazol				7,0	10,0	
Clorpirifós				5,0	10,0	
Diazinon				1,0	5,0	
Dimetoato				1,0	5,0	
Etion				3,0	5,0	
Fention				5,0	10,0	
Ametrina				Cenoura	ESI	
Ciproconazol	0,5	5,0				
Clorpirifós	0,8	5,0				
Diazinon	1,0	5,0				
Dimetoato	4,0	10,0				
Ethion	0,9	5,0				
Fenthion	3,6	40,0				

Clorpirifós Diazinon Dimetoato Malation	Alface	ESI	QqQ	-	0,07-0,60	Neely <i>et al.</i> , 2018
Acefato	Pimentão verde e pepino	ESI	QqQ	1,0	3,0	Golge, Hepsag e Kabak, 2018
Azinfos-metil				2,0	7,0	
Clorpirifós				2,0	8,0	
Ciproconazol				1,0	4,0	
Dimetoato				3,0	10,0	
Fention				2,0	7,0	
Malation				1,0	4,0	
Propiconazol				2,0	5,0	
Acefato	Pimenta verde	ESI	QqQ	-	10,0	Song <i>et al.</i> , 2019
Diazinon				-	10,0	
Malation				-	10,0	
Clorpirifós				-	10,0	

5.3.6 Exatidão (Recuperação)/ Precisão

A exatidão da metodologia desenvolvida foi avaliada a partir de ensaios de recuperação realizada em três níveis de concentração e em triplicata. Neste trabalho, seguiu-se a recomendação da ANVISA (2017) de que as recuperações em amostras complexas devem estar entre 70 a 120%, na faixa de concentração utilizada. A precisão do método em termos de repetibilidade foi calculada e expressa em termos do coeficiente de variação. A precisão intermediária foi avaliada em dias diferentes e por analistas diferentes, porém em um só nível de concentração (ponto médio) e foi expressa em termos do coeficiente de variação (%CV). A tabela 9 mostra resultados de recuperação, na fonte ESI, com respectivo coeficiente de variação (%CV) de cada nível de concentração. Obteve bons resultados e dentro do limite recomendado para os níveis de concentração aplicados para a maioria dos compostos, com exceção do composto ametrina (128%) que apresentou valores de recuperação acima do recomendado (>120%) e valores abaixo do recomendado (< 70%) para o fention (63,3%) na matriz couve-flor; etion (66,5%) no repolho, aldicarbe (69,6%) e malation (63,6%) (68,1%) na matriz brócolis.

Na tabela 10, mostra os resultados de recuperação dos compostos na fonte APCI, que também apresentou bons resultados para maioria dos compostos. Aldicarbe e etion não apresentaram valores de recuperação no menor nível de concentração em couve-flor e brócolis, respectivamente. Etopofós (60,7%) apresentou valores de recuperação abaixo do recomendado (< 70%) na matriz couve-flor, assim como o acefato (61,2%) (60,4%) na matriz brócolis.

Tabela 10: Resultados do estudo da recuperação para as matrizes: couve-flor, repolho e brócolis, utilizando a fonte ESI

Concentração	Couve-flor						Repolho						Brócolis					
	2 µg.Kg⁻¹		10 µg.Kg⁻¹		50 µg.Kg⁻¹		2,0 µg.Kg⁻¹		10 µg.Kg⁻¹		50 µg.Kg⁻¹		2 µg.Kg⁻¹		10 µg.Kg⁻¹		50 µg.Kg⁻¹	
Composto	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV
Acefato	118,3	7,84	108,12	14,08	99,62	14,78	98,72	15,42	95,22	5,26	100,71	17,88	92,95	12,36	95,15	10,41	89,48	15,16
Aldicarbe	78,40	19,30	70,31	6,24	88,72	13,81	113,81	20,35	116,12	10,31	117,06	14,28	69,57	11,13	70,71	12,45	75,20	9,09
Ametrina	114,01	2,24	117,5	10,11	128,32	6,84	101,38	8,24	105,01	2,25	109,36	9,99	100,99	2,42	99,52	7,89	98,77	11,64
Azinfos-metil	102,55	13,14	107,03	8,41	100,01	16,32	100,16	8,15	118,91	6,86	115,03	14,52	106,10	9,90	109,11	7,97	105,17	11,60
Ciproconazol	96,81	11,18	95,90	4,24	100,87	11,78	90,28	17,70	85,02	8,23	100,56	12,11	81,52	10,40	90,52	8,63	108,63	14,88
Ciromazina	71,16	15,03	91,17	12,32	87,91	15,33	70,85	14,80	88,74	8,39	80,56	17,83	70,99	15,77	71,05	8,28	74,11	12,34
Clorpirifós	83,41	9,78	97,10	9,10	87,50	8,98	91,85	11,11	100,15	2,60	101,58	10,25	106,27	9,35	99,55	6,77	114,25	6,32
Diazinon	108,50	9,55	99,01	8,62	105,54	11,10	97,56	6,55	96,88	8,54	100,41	9,75	91,77	8,99	99,44	9,65	90,14	18,24
Dimetoato	98,46	4,10	101,23	3,15	102,01	1,23	116,18	12,10	110,32	11,82	118,14	14,17	80,83	4,69	99,71	3,17	95,15	16,26
Etoprofós	95,61	2,68	72,31	8,91	83,95	3,42	99,21	9,59	100,32	5,59	98,55	13,87	103,27	5,55	94,98	4,44	100,50	12,84
Etion	71,64	10,11	95,14	7,72	90,48	17,11	66,54	15,49	70,13	12,59	110,90	9,74	60,91	16,12	85,55	7,99	80,66	4,47
Fenamifós	95,69	6,46	114,71	10,42	81,26	3,83	104,25	12,66	100,51	6,65	99,59	3,24	99,67	9,14	97,25	13,12	98,88	11,92
Fention	63,30	14,56	70,18	16,30	85,17	18,14	99,25	11,47	109,56	11,54	116,89	15,16	107,71	9,18	101,42	3,89	99,24	4,22
Fentoato	109,71	13,55	92,30	7,32	98,16	5,18	70,86	12,26	75,25	7,41	71,48	16,10	102,31	9,31	99,69	10,25	100,11	16,78
Malation	97,20	11,60	80,33	9,30	112,45	10,78	83,13	12,55	81,69	4,44	90,00	7,61	63,59	15,62	81,12	11,63	68,11	18,10
Profenofós	98,16	2,14	100,17	4,19	100,23	1,31	101,12	12,31	99,02	6,59	113,54	19,15	81,47	16,13	80,91	5,67	92,90	18,11
Propiconazol	94,52	5,14	76,51	3,24	99,91	6,50	101,48	13,65	102,55	11,24	101,13	15,80	91,72	11,24	93,88	6,12	90,87	15,01

Tabela 7: Resultados do estudo da recuperação para as matrizes: couve-flor, repolho e brócolis, utilizando a fonte APCI

Concentração	Couve-flor						Repolho						Brócolis					
	2 µg.Kg⁻¹		10 µg.Kg⁻¹		50 µg.Kg⁻¹		2 µg.Kg⁻¹		10 µg.Kg⁻¹		50 µg.Kg⁻¹		2 µg.Kg⁻¹		10 µg.Kg⁻¹		50 µg.Kg⁻¹	
Composto	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV	%Rec	%CV
Acefato	89,17	17,35	85,77	5,51	107,17	12,97	61,19	8,94	60,42	11,60	90,07	15,00	92,10	16,96	96,6	10,04	75,16	13,44
Aldicarbe	-	-	70,31	16,24	88,72	13,81	90,64	19,30	76,12	12,30	70,36	15,08	93,31	14,23	107,50	12,45	114,20	9,09
Ametrina	89,75	11,20	94,42	9,70	100,41	13,23	121,38	4,28	105,01	2,25	119,73	19,54	110,01	5,24	117,5	9,47	118,32	5,64
Azinfos-metil	84,69	17,41	99,79	12,51	104,92	7,42	100,16	8,15	98,91	6,86	109,03	7,88	86,81	19,14	99,25	12,17	95,10	10,59
Ciproconazol	70,61	2,24	96,95	4,40	101,67	12,78	86,28	17,70	99,02	13,23	113,21	17,14	106,09	19,47	99,58	12,00	107,20	13,39
Ciromazina	89,65	4,30	106,02	8,88	96,02	15,30	82,33	19,01	95,40	18,24	101,67	18,50	95,99	16,55	113,05	18,21	94,71	12,34
Clorpirifós	95,44	6,37	113,05	8,33	101,1	9,20	109,80	12,20	112,47	16,72	103,90	15,77	78,77	7,79	89,90	10,60	87,60	5,55
Diazinon	105,78	14,75	100,54	5,02	100,09	3,36	90,62	18,79	97,54	3,47	95,75	12,40	90,90	9,65	106,11	3,47	102,43	9,21
Dimetoato	86,49	11,30	94,52	8,67	108,90	5,19	113,66	15,02	109,32	2,82	111,64	10,41	70,63	6,88	110,21	5,02	78,44	17,83
Etoprofós	60,69	12,28	70,86	2,25	71,58	9,96	100,11	8,99	107,89	9,50	105,25	3,45	97,31	14,11	84,75	9,03	92,33	16,40
Etion	99,55	11,30	95,28	9,90	100,68	13,98	80,16	19,00	99,15	12,59	101,22	6,36	88,61	10,52-	103,12	12,33	81,25	10,77
Fenamifós	109,65	15,10	107,60	5,17	101,25	10,65	88,60	17,78	96,72	5,55	98,90	5,43	80,67	12,14	96,55	6,47	95,15	10,51
Fention	97,57	2,12	99,36	2,52	83,14	18,65	89,59	14,66	80,25	10,10	70,89	9,88	111,12	16,18	118,27	11,89	115,24	10,22
Fentoato	89,56	10,21	88,23	9,37	91,74	13,12	96,68	9,48	90,91	4,76	106,14	6,87	100,23	12,10	98,69	8,92	109,10	13,15
Malation	91,90	4,68	99,09	4,60	102,28	9,97	89,03	12,48	91,96	6,57	104,05	4,76	103,50	9,40	97,47	16,24	99,11	12,80
Profenofós	83,69	4,47	105,27	5,62	101,38	12,00	107,32	9,51	99,91	8,96	103,90	10,34	95,40	13,17	89,29	6,56	102,13	8,20
Propiconazol	98,38	8,65	90,67	8,64	93,55	3,33	107,51	15,75	109,27	13,70	101,44	8,45	96,69	14,19	93,91	17,70	111,13	16,15

5.4 Aplicação do método

Neste estudo aplicou-se o procedimento desenvolvido na determinação de resíduos de agrotóxicos em 15 amostras divididas nas matrizes em estudo adquiridas em cinco supermercados em diferentes localidades na cidade de Fortaleza. As amostras foram denominadas de: repolho: RP-1, RP-2, RP-3, RP-4, RP-5; brócolis: BR-1; BR-2; BR-3; BR-4; BR-5; e couve-flor: CF-1; CF-2; CF-3; CF-4; CF-5. Dentre as 15 amostras analisadas o acefato foi encontrado em sete (3 amostras de repolho e 4 amostras de brócolis), porém nas amostras de repolho não foram encontrados níveis quantificáveis, ou seja, abaixo dos limites de quantificação do método. Das 5 amostras de brócolis, 4 apresentaram valores quantificáveis para o acefato. Nas análises realizadas, foi encontrado o ingrediente ativo clorpirifós na amostra RP-1, que não tem uso autorizado para essa cultura. Foram também detectados os agrotóxicos dimetoato, malation, profenofós e propiconazol, porém estes se encontram abaixo dos limites de quantificação do método, desta forma a concentração não pode ser estimada com confiabilidade (Tabela 11).

Tabela 8: Resultados das amostras analisadas de repolho, couve-flor e brócolis expressa em $\mu\text{.kg}^{-1}$

Amostra Agrotóxico	RP1	RP2	RP3	RP4	RP5	CF1	CF2	CF3	CF4	CF5	BR1	BR2	BR3	BR4	BR5
Acefato	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	4,6	4,6	4,2	< LD	5,1						
Aldicarbe	< LD														
Ametrina	< LD														
Azinfosmetil	< LD	< LD	< LD	< LD	3,3	< LD	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LQ
Ciproconazo	< LD														
Ciromazina	< LD														
Clorpirifós	9,4	< LD													
Diazinon	< LD	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LQ	< LD				
Dimetoato	< LQ	< LQ	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LQ	< LQ	< LD	< LD	< LQ				
Etopofós	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LQ	< LD								
Etion	< LD														
Fenamifós	< LD														
Fention	< LD														
882Fentoato	< LD														
Malation	< LQ	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LD									
Profenofós	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LD	< LD	< LQ
Propiconazol	< LQ	< LD	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LD	< LD	< LD

De acordo com os resultados, os ingredientes ativos encontrados estão na lista dos agrotóxicos com maior índice de detecção segundo o relatório do programa de análise de resíduo de agrotóxicos (PARA) realizados entre 2013 e 2015. A tabela 12 mostra os

percentuais dos dois agrotóxicos com maior número de detecção irregular, sendo o acefato encontrado em 18 dos 25 tipos de alimentos monitorados.

Tabela 9: Dados referentes aos agrotóxicos com maior número de detecção irregulares do PARA-2015

Agrotóxico	Nº de alimentos monitorados	Nº de amostras monitoradas	Total de amostras com detecções	% de amostras com detecções	Nº de amostras com detecções irregulares	% de amostras com detecções irregulares
Acefato	25	12051	1268	10,5%	613	5,09%
Clorpirifós	22	10454	946	9,04%	343	3,28%

Fonte: ANVISA, 2015

De acordo com o relatório (PARA, 2015), foram analisadas 491 amostras de repolho, sendo encontrados acefato (73 amostras), clorpirifós (2 amostras), dimetoato (2 amostras) e profenofós (2 amostras), bem como agrotóxicos não autorizados para a cultura.

Segundo a Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará (ADAGRI), os compostos que são encontrados com frequência durante fiscalizações em campo que são aplicados no cultivo de hortaliças e que estão no escopo do presente trabalho são: acefato, ciromazina, clorpirifós, dimetoato e malation. Por isso, a importância de se determinar agrotóxicos em alimentos com concentração abaixo do LMR e mesmo não sendo autorizados pela ANVISA, uma vez que muitos agricultores fazem uso dos mesmos sem nenhum critério técnico.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, o qual propôs adaptar e aperfeiçoar as melhores condições de um método LC-MS/MS, usando as fontes ESI e APCI, em análise multirresíduo de agrotóxico em hortaliças, várias conclusões são relatadas a seguir:

No estudo espectrométrico (MS) de cada composto usando a injeção individual diretamente no espectrômetro de massas, utilizando as fontes ESI e APCI, todos os compostos apresentaram maior sensibilidade para ionização e fragmentação no modo positivo.

No tocante a validação do método os parâmetros estudados, seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, LD e LQ, foram considerados satisfatórios para a grande maioria dos compostos, pois apresentaram valores de acordo aos especificados nas normas técnicas e corroborados com dados da literatura para métodos cromatográficos.

O método, usando as fontes ESI/APCI, mostrou-se seletivo e apresentou satisfatória linearidade dentro da faixa de concentração investigada, bem como valores de coeficiente de determinação maiores que 0,99. Os valores de recuperação e de precisão encontram-se dentro dos critérios aceitos de validação pela ANVISA para a maioria dos agrotóxicos, apresentando resultados satisfatórios em relação à recuperação (70-120%) e precisão ($\leq 20\%$). No método associado à fonte ESI, os compostos apresentaram menor limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ).

No método LC-MS/MS, usando a fonte APCI, o efeito matriz não superou um sinal analítico maior que $\pm 35\%$ para todos os compostos estudados, dentro da faixa de trabalho avaliada, ao passo que um menor efeito de matriz foi observado em relação a fonte ESI indicando vantagens na redução da interferência de compostos presentes na matriz.

No tocante a aplicação do método LC-ESI-MS/MS, dentre as 15 amostras analisadas, o acefato foi detectado em 3 amostras de repolho e 4 de brócolis. O clorpirifós foi detectado em uma amostra de repolho, o qual não tem uso autorizado para essa cultura. Também foram detectados os compostos dimetoato, malation, profenofós e propiconazol em níveis abaixo dos limites de quantificação do método.

De uma forma geral as técnicas LC-ESI-MS/MS e LC-APCI-MS/MS demonstraram ser uma ferramenta analítica eficiente quanto à identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos em amostras de couve-flor, repolho e brócolis usando o método de extração QuEChERS, uma vez que nos estudos de validação, ambas as técnicas mostraram bons desempenho e adequabilidade para determinação de agrotóxicos nas amostras comerciais.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA):** Relatório de atividades de 2011-2012. Brasília, DF: ANVISA, 2013. 44 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acesso em: 05 dez 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA):** Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013-2015. Brasília, DF: ANVISA, 2016. 246p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acesso em: 05 dez 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil.** Brasília, DF: ANVISA, 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/consulta-publica-sobre-avaliacao-toxicologi-1/219201/ Acesso em: 28 maio 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA).** Brasília, DF: ANVISA, 2017. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 ago 2017.
- AGRICULTURA, M. D. **Balança Comercial do Agronegócio.** Ministério da Agricultura [s. l.], 2016.
- ALCÂNTARA, D. B.; FERNANDES, T. S. M.; NASCIMENTO, H. O.; LOPES, A. F.; MENEZES, M. G. G.; LIMA, A. C. A.; CARVALHO, T. V.; GRINBERG, P.; MILHOME, M. A. L.; OLIVEIRA, A. H. B.; BECKER, H.; ZOCCOLO, G. J.; NASCIMENTO, R. F. Diagnostic detection systems and QuEChERS methods for multiclass pesticide analyses in different types of fruits: An overview from the last decade. **Food Chemistry**, v.298, p. 1-14, 2019.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJINBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; UFPR. **Seminário Mercado de Agrotóxicos e regulação**, Brasília, DF: ANVISA, 2012.
- ANVISA. – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; UFPR. **Seminário Mercado de Agrotóxicos e regulação**, Brasília, DF: ANVISA, 2015.
- AUGUSTO, L. G. S. **A construção de indicadores em saúde ambiental: desafios conceituais.** Saúde e ambiente sustentável: estreitando nós. Rio de Janeiro, RJ: Fiocruz.2002.

- BADOUD, F.; ERNEST, M; HAMMEL, Y. A.; HUERTAS-PÉREZ, J. F. Artifact-controlled quantification of folpet and phthalimide in food by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, **Food Control**, v. 91, p.412-420, 2018.
- BESIL, N.; PÉREZ-PARADA, A.; BOLOGNA, F.; CESIO, M. V.; RIVAS, F.; HEINZEN, H. Dissipation of selected insecticides and fungicides applied during pre-harvest on mandarin and orange trees in Uruguay. **Scientia Horticultura**, v. 248, p.34-40, 2019.
- BLANKSON, G.K.; OSEI-FSU, P.; ADEENDZE, E. A.; ASHIE, D. Contamination levels of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in vegetables marketed in Accra, Ghana. **Food Control**, v. 68, p. 174-180, 2016.
- BOTITSI, E.; ECONOMOU, A.; ANTONIOU, S; TSIPI, D. Determination of Different Classes on Pesticides Residues in Processed Fruits and Vegetables by LC-MS using the TSQ Quantum Ultra according to EU Directive 91/414 EEC. [s. l.], Application Notes: 425.2016. Disponível em: <http://www.thermo.com/appnotes>. Acesso em: 12 out 2016.
- BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J.A. A química dos agrotóxicos. **Química e Sociedade: Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p.10-15, 2012.
- BRASIL. Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União**: Seção 1, Brasília, DF, p.11459, 12 jul. 1989.
- BRASIL. DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/decreto-4074-2002-decreto-dos-agrotoxicos>. Acesso em: 05 dez. 2019.
- BERKEL, G. J. V.; ZHOUT, F. Electrospray as a Controlled Current Electrolytic Cell: Electrochemical Ionization of Neutral Analytes for Detection by Electrospray Mass Spectrometry. **Análítica Chemistry**, v. 67, p. 3958–3964, 1995.
- BRITO, N. M.; DE AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p. 129-146, 2003.
- BRONDI, S. H. G.; DE SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; DE CAMARGO, L. A.; MAJARON, R. F. Desenvolvimento e validação do método QuEChERS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em leite e carne de búfalo. **Química Nova**, v. 36, n. 1, 2013.
- CANELLA, D. S.; LOUZADA, M. L. C.; CLARO, R. M.; COSTA, J. C.; BANDONI, D. H.; LEVY, R. B.; MARTINS, A. P. B. Consumo de hortaliças e sua relação com os alimentos ultra-processados no Brasil. **Saúde Pública**, v. 52, n. 50, 2018.
- CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. (org.). **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro, RJ: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CARNEIRO, R. P.; OLIVEIRA, F. A. S.; MADUREIRA, F. D.; SILVA, G.; DE SOUZA, W. R.; LOPES, R. P. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS analysis. **Food Control**, v.33, n. 2, p. 413-423, 2013.

CEBALLOS-ALCANTARILLA, E.; AGULLO, C.; ABAD-SOMOVILLA, A.; ABAD-FUENTES, A.; MERCADER, J. H. sensitive monoclonal antibody-based immunoassays for the analysis of fluopyram in food samples. **Food Chemistry**, v. 288, p.117-126, 2019.

COLGE, O.; KABAK, B. Determination of 115 pesticide residues in oranges by high-performance liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry in combination with QuEChERS method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 86–97, 2015.

CUTILLAS, V.; GALERA, M. M.; RASJSKY, L.; FERNANDEZ-ALBA, A. Evaluation of supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for pesticide residues in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1545, p.67-74, 2018.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acopladas à espectrometria de massas na análise de alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CUNHA, S.C.; FERNANDES, J. O. Assessment of bisphenol A and bisphenol B in canned vegetables and fruits by gas chromatography and mass spectrometry after QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 549-555, 2013.

DANEZIS, G P.; ANAGNOSTOPOULOS, C J.; LIAPIS, K.; KOUPPARIS, M A. Multi-residue analysis of pesticides, plant hormones, veterinary drugs and mycotoxins using HILIC chromatography – MS/MS in various food matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 942, p.121-138, 2016.

DRABOVA, L.; ALVAREZ-RIVERA, G.; SUCHANOVA, M.; SCHUSTEROVA, D.; PULKRABOVA, J.; TOMANIOVA, M.; KOCOUREK, V.; CHEVALLIER, O.; ELLIOTT, C.; HAJLSLOVA, J. Food fraud in oregano: Pesticide residues as adulteration markers. **Food Chemistry**, v. 276, p.726-734, 2019.

DUTTA, M. K.; SENGAR, N.; MINHAS, N.; SARKAR, B.; GOON, A.; BANERJEE, K. Image processing-based classification of grapes after pesticide exposure. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 72, p.368-376, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Hortaliças. 2019. Brasília, DF: Embrapa. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br>. Acesso em: Set. 2019.

European Commission. Document n° SANTE/11813/2017. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed**. [s. l.]. Disponível em: <http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl/article.asp?CntID=727> Acesso em: 11 Jul. 2018.

- FAN, S.; ZHAO, P.; YU, C.; PAN, C.; LI, X. Simultaneous determination of 36 pesticide residues in spinach and cauliflower by LC-MS/MS using multi-walled carbon nanotubes based dispersive solid-phase clean-up. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 1, p. 73-82, 2014.
- FARINA, Y.; ABDULLAH, M. P.; BIBI, N.; KHALIK, W. M. Determination of pesticide residues in leafy vegetables at parts per billion levels by a chemometric study using GC-ECD in Cameron Highlands, Malaysia. **Food Chemistry**, v. 224, n. 1, p. 55-61, 2017.
- FERRER, I.; THURMAN, E. M. Multiresidue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1175, n. 1, p. 24 – 37, 2007.
- FERREIRA, J. A.; FERREIRA, J. M. S.; TALAMINI, V.; FACCO, J. F.; RIZZETTI, T. M.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.; BOTTOLI, C. B. G. Determination of pesticides in coconut (*Cocos nucifera* Linn.) water and pulp using modified QuEChERS and LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 213, p. 616-624, 2016.
- FILGUEIRA, A. R. F. **Novo Manual de Olericultura**. Viçosa, MG: UFV, 2000.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF UNITED NATIONS. **AGP - Pest and Pesticide Management**. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematicsitemap/theme/pests/en/> Acesso em: 26 jun. 2019.
- GARCIA-REYES, J. F.; MORENO-GONZÁLEZ, D.; NORTES-MÉNDEZ, R.; GILBERT-LÓPEZ, B.; DÍAZ, A. M. HRMS: Hardware and Software. In: ROBERTO ROMERO-GONZÁLEZ; FRENICH, A. G. (Ed.). **Applications in High Resolution Mass Spectrometry Food Safety and Pesticide Residue Analysis**. p. 15–57, 2017.
- GARP – (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas); **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**, apostila, [s. l.], 1999.
- GUEDES, J.A.C.; SILVA, R. O.; LIMA, C. G.; MILHOME, M. A. L.; NASCIMENTO, R. F. Matrix effect in guava multiresidue analysis by QuEChERS method and gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 199, p. 380-386, 2016.
- GOLGE, O.; KABAK, B. Determination of 115 pesticide residues in oranges by high-performance liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry in combination with QuEChERS method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 86-97, 2015a.
- GOLGE, O.; KABAK, B. Evaluation of QuEChERS sample preparation and liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry method for the determination of 109 pesticide residues in tomatoes. **Food Chemistry**, v. 176, p. 319-332, 2015b.
- GOLGE, O.; HEPSAG, F.; KABAK, B. Health risk assessment of selected pesticide residues in green pepper and cucumber. **Food And Chemical Toxicology**, v. 121, p. 51-64, 2018.

GOMES, H. O.; MENEZES, J. M. C.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; TEIXEIRA, R. N. P.; NASCIMENTO, R. F. Evaluating the presence of pesticides in bananas: An integrative review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.189, n. 110016, 2020.

GUO, J.; TONG, M.; TANG, J.; BIAN, H.; WAN, X.; HE, L.; HOU, R. Analysis of multiple pesticide residues in polyphenol-rich agricultural products by UPLC-MS/MS using a modified QuEChERS extraction and dilution method. **Food Chemistry**, v. 274, p.452-459, 2019.

HAN, Y.; SONG, L.; ZHAO, P.; LI, Y.; ZOU, N.; QIN, Y.; LI, X.; PAN, C. Residue determination of glufosinate in plant origin foods using modified Quick Polar Pesticides (QuPPE) method and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 197, p.730-736, 2016.

HINGMIRE, S.; OULKAR, D. P.; SAGAR, C.; UTTURE, T. P.; SHABEER, A.; BANERJEE, K. Residue analysis of fipronil and difenoconazole in okra by liquid chromatography tandem mass spectrometry and their food safety evaluation. **Food Chemistry**, v. 176, p.145-151, 2015.

HOFFMANN, E.; CHARETTE, J.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

HOLME, F.; THOMPSON, B.; HOLTE, S.; VIGOREN, E. M.; ESPINOZA, N.; ULRICH, A.; GRIFFITH, W.; FAUSTMAN, E. M. The role of diet in children's exposure to organophosphate pesticides. **Environmental Research**, v. 147, p 133-140, 2016.

HOU, F.; ZHAO, L.; LIU, F. Determination of Chlorothalonil Residue in Cabbage by a Modified QuEChERS-Based Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, p.656–663, 2016.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Disponível em: <https://iupac.org/>. Acesso em: 10 jan. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA.

Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo.

Brasília, DF: INMETRO, 2016. 31 p. Disponível em:

http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. Acesso em: 05 set. 2017.

INGENBLEEKA, L.; HUC, R.; PEREIRA, L. L. COLETC, A. P. I.; KONED, A. Z.; ADEGBOYEE, A.; HOSSOUF, S. E.; DEMBELEG, Y.; OYEDELEE, A. D.; KISITOH, C. S. K.; EYANGOHA, S.; VERGERI, P.; LEBLANCJ, J. C.; BIZECB, B. L. Sub-Saharan Africa total diet study in Benin, Cameroon, Mali and Nigeria: Pesticides occurrence in foods. **Food Chemistry**, v. 2, p. 100034-100046, 2019.

KACZYNSKI, P. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. **Food Chemistry**, v. 230, p.524-531, 2017.

KEMMERICH, M.; DEMARCO, M.; BERNARDI, G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Balls-in-tube matrix solid phase dispersion (BiT-MSPD): An innovative and simplified technique for multiresidue determination of pesticides in fruit samples. **Journal Of Chromatography A**, p.460640-460647, 2019.

KIM, S. W.; EL-ATY, A.M. A.; RAHMAN, M. M.; CHOI, J. H.; L, Y. J.; KO, A.Y.; CHOI, O. J.; JUNG, H. N.; HACIMÜFTÜOĞLU, A.; SHIM, J. H. The effect of household processing on the decline pattern of dimethomorph in pepper fruits and leaves. **Food Control**, v. 50, p.118-124, 2015.

KIM, Y. A.; EL-ATY, A.M. A.; RAHMAN, M. M.; JEONG, J. H.; SHIN, H. C.; WANG, J.; SHIN, S.; SHIM, J. H. Method development, matrix effect, and risk assessment of 49 multiclass pesticides in kiwifruit using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography B**, v. 1076, p.130-138, 2018.

JARDIM, A.N.O. **Resíduos de Pesticidas em alimentos: Validação de métodos analíticos, análise em frutas e avaliação da exposição da população brasileira pelo método probabilístico.** 2012. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2012.

JARDIM, A. N. O.; MELLO, D. C.; GOES, F. C. S.; FROTA JUNIOR, E. F.; CALDAS, E. D. Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC–ECD, GC–FPD and LC–MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment. **Food Chemistry**, v.164, p. 195–204, 2014.

JOBIM, P. F. C.; NUNES, L. N.; GIUGLIANI, R.; CRUZ, I. B. M. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição debate. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 15, n.1, p. 277-288, 2010.

KMELLÁR, B.; PAREJA, L.; FERRER, C.; FODOR, P.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Study of the effects of operational parameters on multiresidue pesticide analysis by LC-MS/MS. **Talanta**, v.84, n.2, p. 262-273, 2011.

KARNSA-ARD, S.; SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S.; SRIJARANAI, S. Modified QuEChER Sand cloud-point extraction combined with visible spectrophotometric detection for carbaryl residue analysis in vegetables. **Analytical Chemistry**, v.9, n. 1, p. 150-156, 2013.

KONERMANN, L.; AHADI, E.; RODRIGUEZ, A. D.; VAHIDI, S. Unraveling the mechanism of Electrospray Ionization. **Analytical Chemistry**, v.85, n. 1, p. 2-9, 2012.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? II. A escolha do Analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27-46, 2013.

LESUEUR, C.; KNITTL, P.; GARTNER, M.; MENTLER, A.; FUERHACKER, M. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foods tuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. **Food Control**, v. 19, n. 9, p. 906 – 914, 2008.

LEMOS, J.; SAMPEDRO, M. C.; ARIÑO, A.; ORTIZ, A.; BARRIO, R. J. Risk assessment of exposure to pesticides through dietary intake of vegetables typical of the Mediterranean diet in the Basque Country. **Journal Of Food Composition And Analysis**, v. 49, p.35-41, 2016.

LI, L.; WANG, H.; SHUANG, Y.; LI, L. The preparation of a new 3,5-dichlorophenylcarbamated cellulose-bonded stationary phase and its application for the enantioseparation and determination of chiral fungicides by LC-MS/MS. **Talanta**, v. 202, p.494-506, 2019.

LIAO, Y.; BERTHION, J. M.; COLET, I.; MERLO, M.; NOUGADÉRE, A.; HU, R. Validation and application of analytical method for glyphosate and glufosinate in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, v. 1549, p.31-38, 2018.

LÓPEZ, S. H.; SCHOLTEN, J.; KIEDROWSKA, B.; KOK, A. Method validation and application of a selective multiresidue analysis of highly polar pesticides in food matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, v. 1594, p.93-104, 2019.

LOZANO, A.; RAJSKI, Ł.; GÓMEZ-RAMOS, M. del M.; FERRER, C.; HERNANDO D., M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Pesticide Residues and Their Metabolites in Food Samples. In: **Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and their Metabolites**. p. 187–205. 2015.

LOZOWICKA, B.; ILYASOVA, G.; KACZYNSKI, P.; JANJOWSKAM, M.; RUTKOWSKA, E.; HRYNKO, I.; MOJSKAK, P.; SZABUNKO, J. Multi-residue methods for the determination of over four hundred pesticides in solid and liquid high sucrose content matrices by tandem mass spectrometry coupled with gas and liquid chromatography. **Talanta**, v. 151, p. 51-61, 2016.

LOUZADA, M. L. C.; MARTINS, A. P. B.; CANELLA, D. S.; BARALDI L, G.; LEVY, R. B.; CLARO, R. M.; MOUBARAC, J.C.;CANNON, G.; MONTEIRO, C.A. Impacto de alimentos ultraprocesados sobre o teor de micronutrientes da dieta no Brasil. **Saúde Publica**, v.49, n.45, 2015.

MARTINS, A. P. B.; LEVY, R. B.; CLARO, R. M.; MOUBARAC, J.; MONTEIRO, C. A. Participação crescente de produtos ultraprocesados na dieta brasileira (1987-2009). **Saúde Publica**, v.47, n.4, p.656-65, 2013.

MASIÁ, A.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography–mass spectrometry. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 11-24, 2014.

MOL, H. G. J.; ZOMER, P.; LÓPEZ, M. G.; FUSSELL, R. J.; SCHOLTEN, J.; KOK, A.; WOLHEIM, A.; ANASTASSIADES, M.; LOZANO, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. Identification in residue analysis based on liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Experimental evidence to update performance criteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 873, p.1-13, 2015.

MONTIEL-LEÓN, J. M.; DUY, S. V.; MUNOZ, G.; VERNER, M. A.; HENDAWI, M. Y.; MOYA, H.; AMYOT, M.; SAUVÉ, S. Occurrence of pesticides in fruits and vegetables from organic and conventional agriculture by QuEChERS extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Control**, v. 104, p.74-82, 2019.

MORENO-GONZÁLEZ, D.; PÉREZ-ORTEGA, P.; GILBERT-LÓPEZ, B.; MOLINA-DÍAZ, A.; GARCÍA – REYES, J. F., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Evaluation of nano flow liquid chromatography high resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in food. **Journal Of Chromatography A**, v. 1512, p.78-87, 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO; INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa Conjunta nº 1, de 16 de junho de 2014**. Brasília, DF: MAPA; IBAMA;

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília, DF: MS, 2016. 139 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agrotoxicos_otica_sistema_unico_saude_v1_t.1.pdf f. Acesso em: 05 set. 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Relatório de Atividades Internacionais do Agronegócio**. Brasília, DF: MAPA, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/relacoes-internacionais>. Acesso em: 20 nov 2019.

MORENO, A.U.; LÓPEZ, S. H.; REICHERT, B.; FERNÁNDEZ, A. L.; GUIL, M. D. H.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Micro flow liquid chromatography coupled to mass spectrometry-an approach to significantly increase sensitivity, decrease matrix effects, and reduce organic solvent usage in pesticide residue analysis. **Analytical Chemistry**, v. 87, n.2, p. 1018-1025, 2014.

MUÑOZ, N.C.; FLORIANO, L.; DE SOUZA, M. P.; BANDEIRA, N. M. G.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Determination of Pesticide Residues in Golden Berry (*Physalis peruviana* L.) by Modified QuEChERS Method and Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, p.320-329, 2017.

NARENDERAN, S. T.; MEYYANATHAN, S.N.; KARRI, REDDY, V. V. S.; BABU, B.; CHINTAMANENI, P. Multivariate response surface methodology assisted modified QuEChERS extraction method for the evaluation of organophosphate pesticides in fruits and vegetables cultivated in Nilgiris, South India. **Food Chemistry**, v. 300, p.125188-125188, 2019.

NEELY, S.; MARTIN, J.; CRUZ, N. F.; PIESTER, G.; ROBINSON, M.; OKONIEWSKI, R.; TRAN, B. N. Application of dispersive solid phase extraction for trace analysis of toxic chemicals in foods. **Journal of Chromatography B**, v. 1092, p.65-71, 2018.

NOGUEIRA, E. Fiscalização identifica irregularidade no uso de agrotóxicos no Ceará. **Agência Brasil**, Fortaleza, CE, 12 ago. 2017. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2017-08/fiscalizacao-identifica-irregularidades-no-uso-de-agrotoxicos-no-ceara>. Acesso em: 12ago. 2017.

OLIVEIRA, L. A. B.; PACHECO, H. P.; SCHERER, R. Flutriafol and pyraclostrobin residues in Brazilian green coffees. **Food Chemistry**, v. 190, p.60-63, 2016.

ORSO, D.; FLORIANO, L.; RIBEIRO, L. C.; BANDEIRA, N. M. G.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Simultaneous Determination of Multiclass Pesticides and Antibiotics in Honey Samples Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 1638 -1653, 2016.

OUERTANI, R.; EL ATRACHE, L.L.; HAMIDA, N.B. Chemometrically assisted optimization and validation of reversed phase liquid chromatography method for the analysis of carbamatos pesticides. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 154, p. 38 – 44, 2016.

PEREIRA, I. S.; PEREIRA, M. P. **Olericultura**. Brasília: NT, 2016.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multiresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

PICÓ, Y. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. *In*: PICÓ, Y. **Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments**. 1.ed. Elsevier Science, 2007.p.509-559.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; SOMMERFELD, L. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; PIGNATTI, M. G. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: A strategy for health surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n.10, p. 3281-3293, 2017.

QUEIROZ, S.C.N.; FERRACINI, V.L.; ROSA, M.A. Validação de Métodos multiresíduos para Determinação de Pesticidas em Alimentos Empregando QUECHERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**,v. 35, n. 1, p. 185-192, 2012.

RAJSKIA, L.; LOZANO, A.; UCLÉS, A.; FERRER, C.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-up followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 109-120, 2013.

REBELO, A. M. **Desenvolvimento e validação de método analítico via LC-ESI-MSMS para determinação de agrotóxico em arroz Irrigado**. 2014. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIGOTTO, R.M; VASCONCELOS, D. P; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014.

RIGOTO, M. R.; SILVA, A. M. C.; FERREIRA, M. J. M.; ROSA, I. F.; AGUIAR, A. C. P. Tendências de agravos crônicos à saúde associados a agrotóxicos em região de fruticultura no Ceará, Brasil. **Ver. Brasileira Epidemiol**, v. 16, p. 763-773, 2013.

ROBLES-MOLINA, J.; GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Simultaneous liquid chromatography/mass spectrometry determination of both polar and “multiresidue” pesticides in food using parallel hydrophilic interaction/reversed-phase liquid chromatography and a hybrid sample preparation approach. **Journal Of Chromatography A**, v. 1517, p.108-116, 2017.

SANTANA, V. S.; MOURA, M. C. P.; NOGUEIRA, F. F. Mortalidade por intoxicação ocupacional relacionada a agrotóxicos, 2000-2009, Brasil. **Saúde Publica**. v. 47, n.3, p.598-606, 2013.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides – Uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, p. 339-349, 2007.

SERVICOS DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Agronegócio: Horticultura**. Brasília, DF: SEBRAE, 2018. 46p. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/Busca?q=%20horticultura>. Acesso em: 05 dez. 2019.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Fruticultura: Cenários e Projeções Estratégicas**. Brasília, DF: SEBRAE, 2016. Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/e93e6e44c0b1ec9bed5f9ed186ab6b7e/\\$File/6083.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/e93e6e44c0b1ec9bed5f9ed186ab6b7e/$File/6083.pdf). Acesso em: 23 out. 2018.

SILVA, F. R. Genotoxicity of *Nicotiana tabacum* leaves on *Helix aspersa*. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 36, n. 2, p. 269-275, 2013.

SILVA, R. O.; CASTRO, R. C.; MILHOME, M. A. L.; NASCIMENTO, R. F. Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for determination of twenty multi-class pesticide residues in cashew, **Food Science Technology**, v. 59, p. 21-25, 2014.

SILVA, R. O.; MENEZES, M. G. G.; CASTRO, R. C.; NOBRE, C. A.; MILHOME, M. A. L.; NASCIMENTO, R. F. Efficiency of ESI and APCI ionization sources in LC-MS/MS systems for analysis of 22 pesticide residues in food matrix. **Food Chemistry**, v. 297, p.124934-124934, 2019.

SISMOTTO, M.; PASCHOAL, J. A. R.; REYS, F. G. R. Aspectos analíticos e regulatórios na determinação de resíduos de macrolídeos em alimentos de origem animal por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 449-461, 2013.

SIVAPERUMAL, P.; ANAND, P.; RIDDHI, L. Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 168, p.356-365, 2015.

SOLIVEN, A.; RODRIGUEZ, C.; PAREJA, L.; COLAZZO, M.; CESIO, V.; SHALLIKER, R. A.; PEREZ-PARADA, A.; HEINZEN, H. The parallel segmented flow column as an alternative front-end LC strategy for trace analyses. **Microchemical Journal**, v. 148, p.177-184, 2019.

SOARES, W.L; PORTO, M. F. S. Uso de agrotóxicos e impactos econômicos sobre a saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 2, p. 209-217, 2012.

SOBHANZADEH, E.; BAKAR, N. K.; ABAS, M. R.; NEMATI, K. A simple and efficient multi-residue method based on QuEChERS for pesticides determination in palm oil by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Environment Monitoring Assess**, v. 184, p. 5821-5828, 2012.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ S.; VEUTHEY, J. L. Matrix Effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. **Journal Of Chromatography A**, v. 1058, p. 61–66, 2004.

STACHNIUK, A.; FORNAL, E. Liquid Chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticides residues in food. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 1654-1665, 2016.

THURMAN, E. M.; FERRER, I.; BARCELÓ, D. Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides. **Analítica Chemistry**, v. 73, p. 5441–5449, 2001.

TITATO, G. M.; BICUDO, R.C.; LANÇAS, F.M. Optimization of the ESI and APCI experimental variables for the LC/MS determination of triazines, methyl carbamates, organophosphorous, benzimidazoles, carboxamide and phenylurea compounds in orange samples. **Journal Mass Spectrometric**, v. 42, p. 1348–1357, 2007.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 5, p. 616-623, 2002.

UCLÉS, S.; LOZANO A.; SOSA A.; PARRILLA VÁZQUEZ, P.; VALVERDE, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Matrix interference evaluation employing GC and LC coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 174, p.72-81, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Agriculture and Consumer Protection: International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides**. WHO; FAO, 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-bc870e.pdf>. Acesso em: 20 nov 2019.

WAGN, L., ZHOU, Y.; HUANG, H.; WANG, R.; LIN, Z.; CHEN, Y.; WAND, D.; LIN, D.; XU, D. Determination of 51 carbamate pesticide residues in vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on optimization of QuEChERS sample preparation method. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 31, n.12, p. 1167-1175, 2013.

ZARN, J.A.; BRÜSCHWEILER B.J.; SCHLATTER J.R. Azole fungicides affect mammalian steroid genesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. **Environment Health Perspect**, v. 111, p. 255-261, 2003.

ZAINUDIN, B. H.; SALLEH, S.; MOHAMED, R.; YAP, K. C.; MUHAMAD, H. Development, validation and determination of multiclass pesticide residues in cocoa beans using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 172, p.585-595, 2015.

ZHAO, P., WANG Z., GAO X., GUO X., ZHAO L. Simultaneous enantioselective determination of 22 chiral pesticides in fruits and vegetables using chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 277, p.298-306, 2019.

ZHOU, Z.J. Health problem caused by long-term organophosphorus pesticides exposures – study in China. *In*: STOYTCHEVA M. **Pesticides in the Modern World-Effects of Pesticides Exposure**. 1.ed. Croácia: Intech, p.59-78, 2011.

APÊNDICE A – ESPECTRO DE MASSAS DOS AGROTÓXICOS OBTIDOS NA FONTE ESI

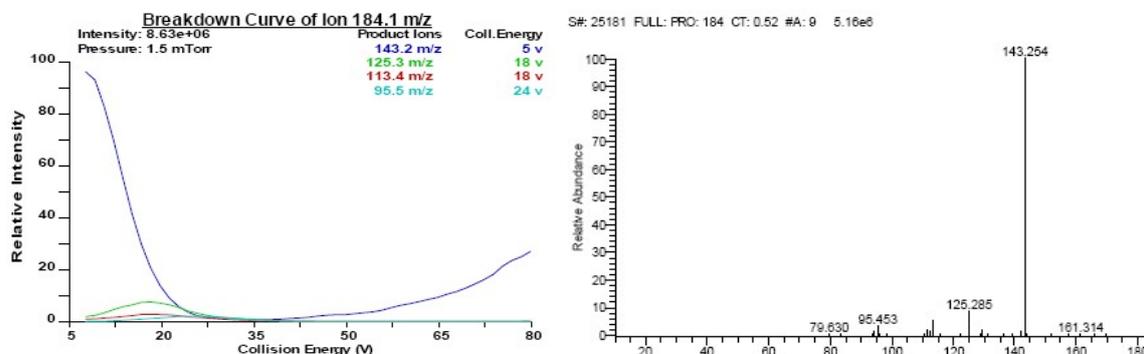
ACEFATO

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

10:58:07: Optimizing Tube Lens for ion 184.10 m/z
10:58:13: Previous Setting = 46.81, New Setting = 40.30
10:58:13: Maximum Intensity = 1.43e+07
10:58:13: 14 % Improvement
10:58:13: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
10:58:13: Waiting for the collision gas to stabilize
10:58:34: Finding the product ions of ion 184.1 m/z
10:58:39: Constructing the breakdown curve of ion 184.1 m/z
10:58:41: Product Ion: 143.25 Maximum Intensity: 8.63e+06
10:58:43: Product Ion: 125.28 Maximum Intensity: 6.59e+05
10:58:45: Product Ion: 113.40 Maximum Intensity: 2.45e+05
10:58:47: Product Ion: 95.45 Maximum Intensity: 1.87e+05
10:58:47: Collision Energy Optimization Results:
10:58:47: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
10:58:47: 143.25 5
10:58:47: 125.28 18
10:58:47: 113.40 18
10:58:47: 95.45 24
10:58:48: Finish compound optimization
  
```



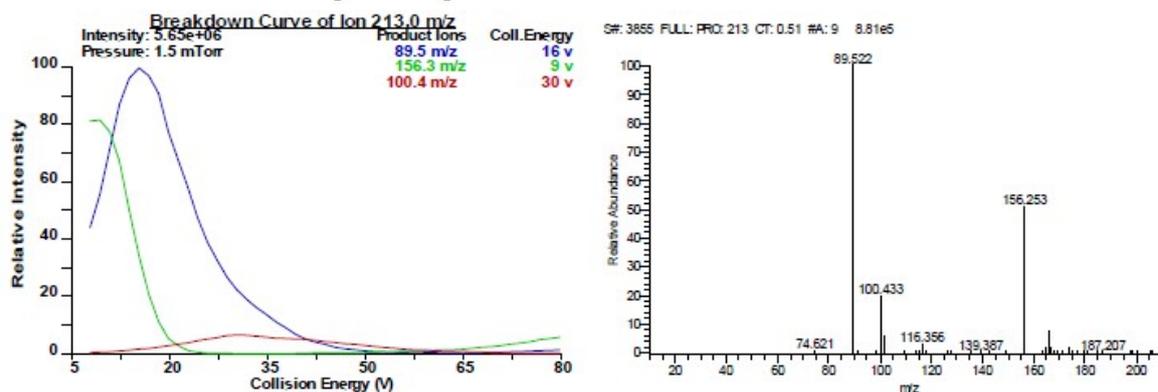
ALDICARBE

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

11:00:37: Optimizing Tube Lens for ion 213.00 m/z
11:00:43: Insignificant improvement, kept the previous setting
11:00:43: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
11:00:43: Waiting for the collision gas to stabilize
11:01:05: Finding the product ions of ion 213.0 m/z
11:01:10: Constructing the breakdown curve of ion 213.0 m/z
11:01:12: Product Ion: 89.52 Maximum Intensity: 5.65e+06
11:01:14: Product Ion: 156.26 Maximum Intensity: 4.63e+06
11:01:16: Product Ion: 100.43 Maximum Intensity: 3.73e+05
11:01:16: Collision Energy Optimization Results:
11:01:16: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
11:01:16: 89.52 16
11:01:16: 156.26 9
11:01:16: 100.43 30
11:01:17: Finish compound optimization
  
```



AMETRINA

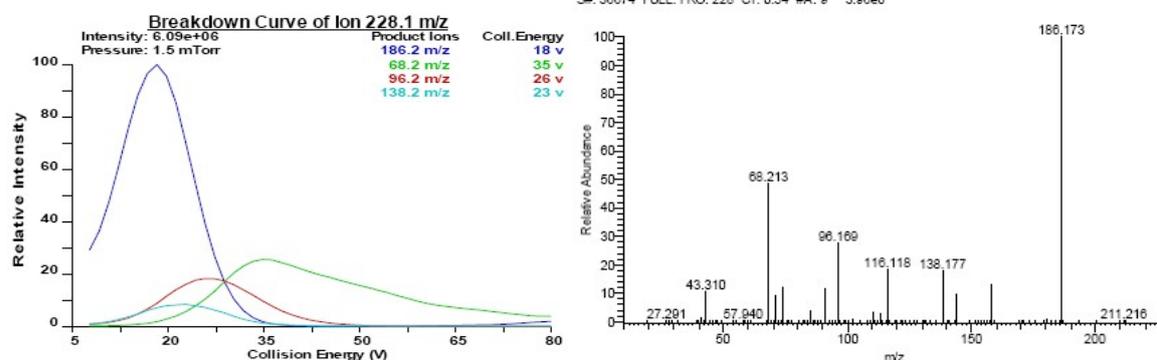
Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

16:02:49: Optimizing flat device(s) using ion 228.00 m/z
16:02:51: Optimizing Spray Voltage for Q1MS
16:03:32: Previous Setting = 5000.00, New Setting = 5000.00
16:03:32: Maximum Intensity = 6.69e+06
16:03:32: Insignificant improvement, kept the previous setting
16:03:33: Optimizing Tube Lens for ion 228.00 m/z
16:03:39: Previous Setting = 95.61, New Setting = 85.85
16:03:39: Maximum Intensity = 8.13e+06
16:03:39: 5 % Improvement
16:03:40: Old Parent Mass: 228.000, New Parent Mass: 228.128
16:03:40: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
16:03:40: Waiting for the collision gas to stabilize
16:04:01: Finding the product ions of ion 228.1 m/z
16:04:08: Constructing the breakdown curve of ion 228.1 m/z
16:04:10: Product Ion: 186.17 Maximum Intensity: 6.09e+06
16:04:12: Product Ion: 68.21 Maximum Intensity: 1.57e+06
16:04:14: Product Ion: 96.17 Maximum Intensity: 1.12e+06
16:04:16: Product Ion: 138.19 Maximum Intensity: 5.14e+05
16:04:16: Collision Energy Optimization Results:
16:04:16: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
16:04:16: 186.17 18
16:04:16: 68.21 35
16:04:16: 96.17 26
16:04:16: 138.19 23
16:04:17: Finish compound optimization
  
```

S#: 36074 FULL: PRO: 228 CT: 0.54 #A: 0 3.00e6



AZINFOS METIL

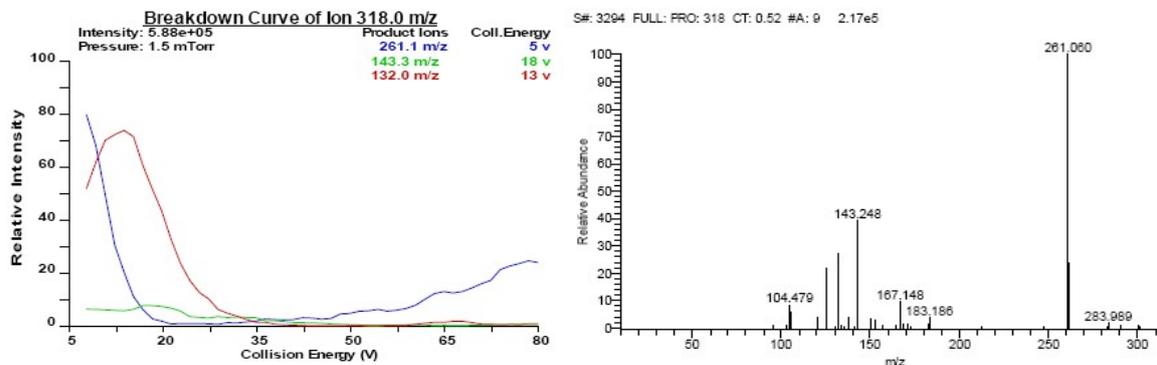
Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

11:05:18: Optimizing flat device(s) using ion 318.00 m/z
11:05:19: Optimizing Spray Voltage for Q1MS
11:05:35: Previous Setting = 4081.00, New Setting = 5000.00
11:05:35: Maximum Intensity = 3.31e+06
11:05:35: 33 % Improvement
11:05:36: Optimizing Tube Lens for ion 318.00 m/z
11:05:42: Insignificant improvement, kept the previous setting
11:05:42: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
11:05:42: Waiting for the collision gas to stabilize
11:06:04: Finding the product ions of ion 318.0 m/z
11:06:10: Constructing the breakdown curve of ion 318.0 m/z
11:06:11: Product Ion: 261.14 Maximum Intensity: 5.88e+05
11:06:14: Product Ion: 143.29 Maximum Intensity: 4.69e+04
11:06:16: Product Ion: 132.04 Maximum Intensity: 4.44e+05
11:06:16: Collision Energy Optimization Results:
11:06:16: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
11:06:16: 261.14 5
11:06:16: 143.29 18
11:06:16: 132.04 13
11:06:17: Finish compound optimization
  
```

S#: 3294 FULL: PRO: 318 CT: 0.52 #A: 0 2.17e5



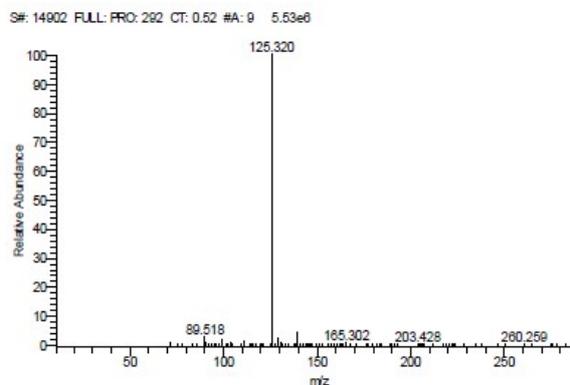
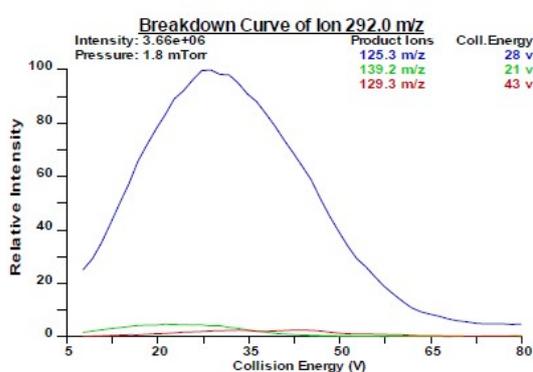
CIPROCONAZOL

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

09:51:48: Optimizing Tube Lens for ion 292.00 m/z
09:51:53: Previous Setting = 58.50, New Setting = 66.83
09:51:53: Maximum Intensity = 4.10e+07
09:51:53: 5 % Improvement
09:51:53: Optimizing collision energy at 1.8 mTorr
09:51:54: Waiting for the collision gas to stabilize
09:52:14: Finding the product ions of ion 292.0 m/z
09:52:20: Constructing the breakdown curve of ion 292.0 m/z
09:52:22: Product Ion: 125.32 Maximum Intensity: 3.66e+06
09:52:24: Product Ion: 139.25 Maximum Intensity: 1.76e+05
09:52:26: Product Ion: 129.32 Maximum Intensity: 9.66e+04
09:52:26: Collision Energy Optimization Results:
09:52:26: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
09:52:26: 125.32 28
09:52:26: 139.25 21
09:52:26: 129.32 43
09:52:27: Finish compound optimization
  
```



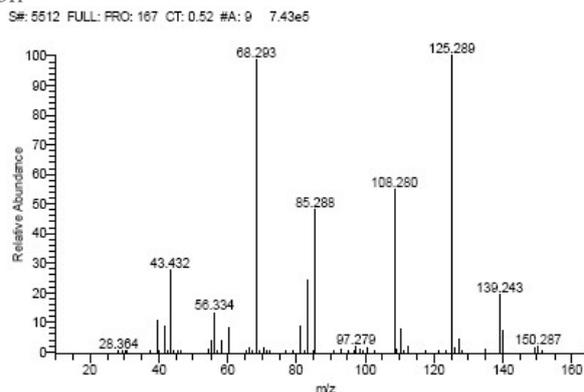
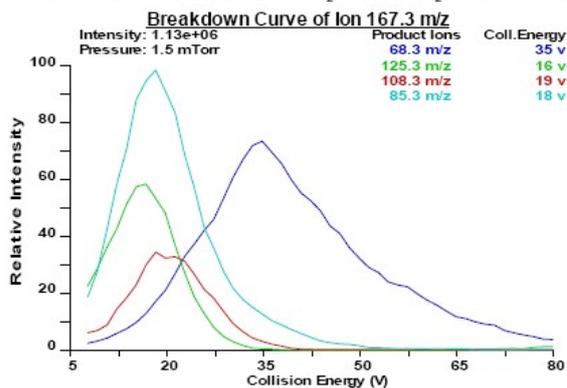
CIROMAZINA

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

10:20:40: Optimizing flat device(s) using ion 167.10 m/z
10:20:41: Optimizing Spray Voltage for Q1MS
10:20:57: Previous Setting = 5000.00, New Setting = 5000.00
10:20:57: Maximum Intensity = 5.89e+06
10:20:57: Insignificant improvement, kept the previous setting
10:20:58: Optimizing Tube Lens for ion 167.10 m/z
10:21:04: Insignificant improvement, kept the previous setting
10:21:05: Old Parent Mass: 167.100, New Parent Mass: 167.295
10:21:05: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
10:21:05: Waiting for the collision gas to stabilize
10:21:26: Finding the product ions of ion 167.3 m/z
10:21:32: Constructing the breakdown curve of ion 167.3 m/z
10:21:34: Product Ion: 68.29 Maximum Intensity: 8.39e+05
10:21:36: Product Ion: 125.28 Maximum Intensity: 6.69e+05
10:21:38: Product Ion: 108.28 Maximum Intensity: 3.91e+05
10:21:40: Product Ion: 85.29 Maximum Intensity: 1.13e+06
10:21:41: Collision Energy Optimization Results:
10:21:41: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
10:21:41: 68.29 35
10:21:41: 125.28 16
10:21:41: 108.28 19
10:21:41: 85.29 18
10:21:42: Finish compound optimization
  
```



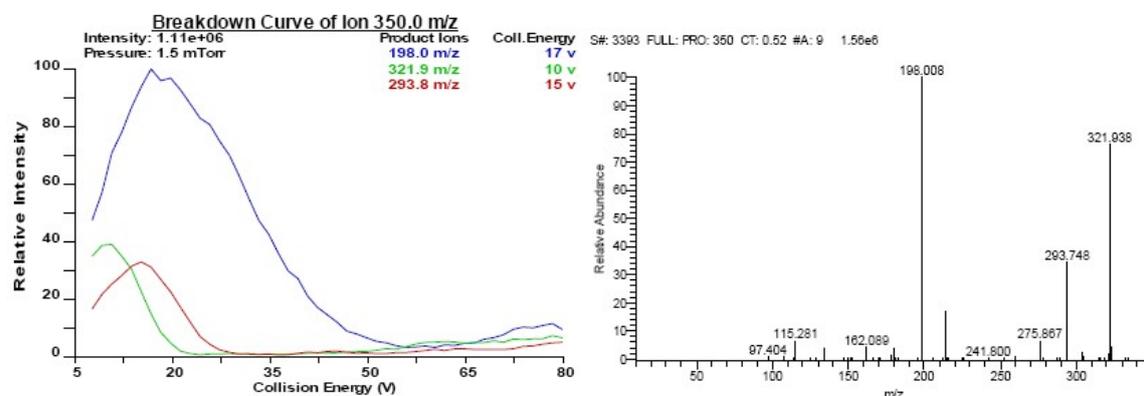
CLORPIRIFOS

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

13:48:19: Optimizing flat device(s) using ion 350.00 m/z
13:48:21: Optimizing Sheath Gas Pressure for Q1MS
13:48:40: Previous Setting = 40.00, New Setting = 40.00
13:48:40: Maximum Intensity = 6.32e+06
13:48:40: Insignificant improvement, kept the previous setting
13:48:41: Optimizing Aux Gas Pressure for Q1MS
13:49:06: Previous Setting = 55.00, New Setting = 55.00
13:49:06: Maximum Intensity = 4.98e+06
13:49:06: Insignificant improvement, kept the previous setting
13:49:07: Optimizing Tube Lens for ion 350.00 m/z
13:49:13: Insignificant improvement, kept the previous setting
13:49:13: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
13:49:13: Waiting for the collision gas to stabilize
13:49:35: Finding the product ions of ion 350.0 m/z
13:49:41: Constructing the breakdown curve of ion 350.0 m/z
13:49:43: Product Ion: 198.01 Maximum Intensity: 1.11e+06
13:49:45: Product Ion: 321.92 Maximum Intensity: 4.47e+05
13:49:47: Product Ion: 293.84 Maximum Intensity: 3.69e+05
13:49:47: Collision Energy Optimization Results:
13:49:47: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
13:49:47: 198.01 17
13:49:47: 321.92 10
13:49:47: 293.84 15
13:49:48: Finish compound optimization
  
```



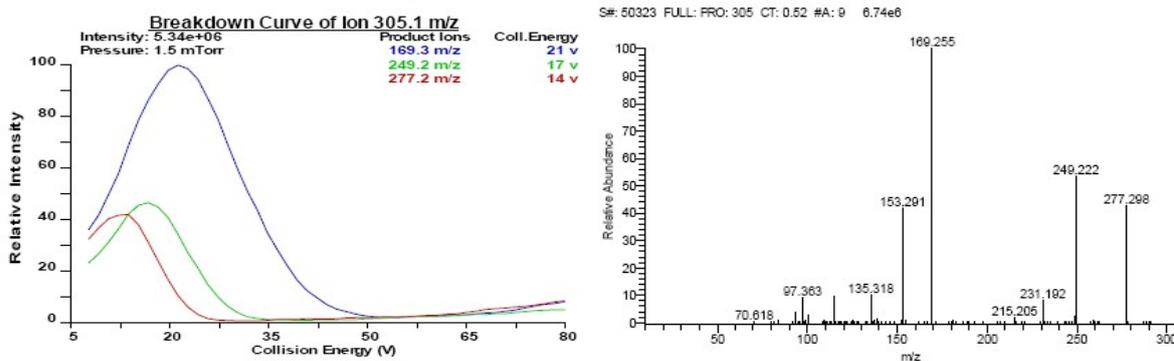
DIAZINON

Results from Compound Optimization

Compound optimization in MS and MS/MS

```

14:35:39: Optimizing flat device(s) using ion 305.10 m/z
14:35:41: Optimizing Spray Voltage for Q1MS
14:35:57: Previous Setting = 5000.00, New Setting = 5000.00
14:35:57: Maximum Intensity = 1.17e+07
14:35:57: Insignificant improvement, kept the previous setting
14:35:57: Optimizing Tube Lens for ion 305.10 m/z
14:36:03: Insignificant improvement, kept the previous setting
14:36:03: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
14:36:03: Waiting for the collision gas to stabilize
14:36:24: Finding the product ions of ion 305.1 m/z
14:36:31: Constructing the breakdown curve of ion 305.1 m/z
14:36:33: Product Ion: 169.25 Maximum Intensity: 5.34e+06
14:36:35: Product Ion: 249.19 Maximum Intensity: 2.48e+06
14:36:37: Product Ion: 277.24 Maximum Intensity: 2.24e+06
14:36:37: Collision Energy Optimization Results:
14:36:37: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
14:36:37: 169.25 21
14:36:37: 249.19 17
14:36:37: 277.24 14
14:36:38: Finish compound optimization
  
```



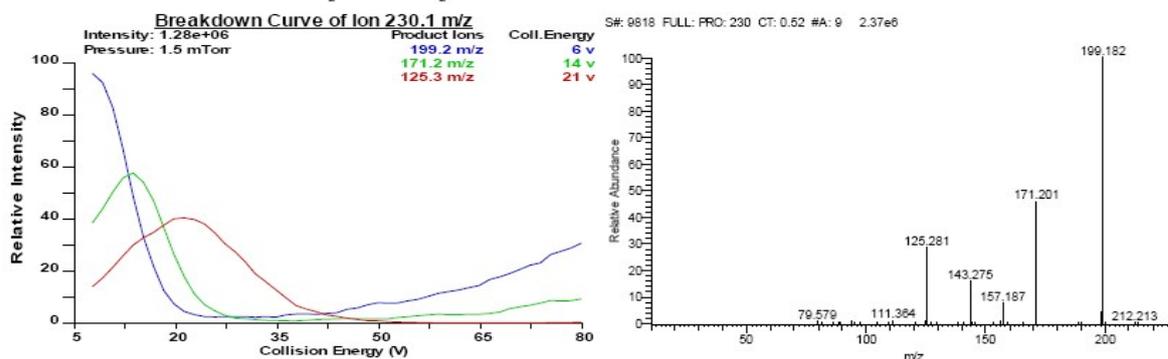
DIMETOATO

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

13:47:26: Optimizing Tube Lens for ion 230.00 m/z
13:47:32: Previous Setting = 56.56, New Setting = 43.80
13:47:32: Maximum Intensity = 4.04e+06
13:47:32: 31 % Improvement
13:47:33: Old Parent Mass: 230.000, New Parent Mass: 230.141
13:47:33: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
13:47:33: Waiting for the collision gas to stabilize
13:47:54: Finding the product ions of ion 230.1 m/z
13:47:59: Constructing the breakdown curve of ion 230.1 m/z
13:48:01: Product Ion: 199.19 Maximum Intensity: 1.28e+06
13:48:03: Product Ion: 171.18 Maximum Intensity: 7.44e+05
13:48:05: Product Ion: 125.28 Maximum Intensity: 5.24e+05
13:48:05: Collision Energy Optimization Results:
13:48:05: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
13:48:05: 199.19 6
13:48:05: 171.18 14
13:48:05: 125.28 21
13:48:06: Finish compound optimization
  
```



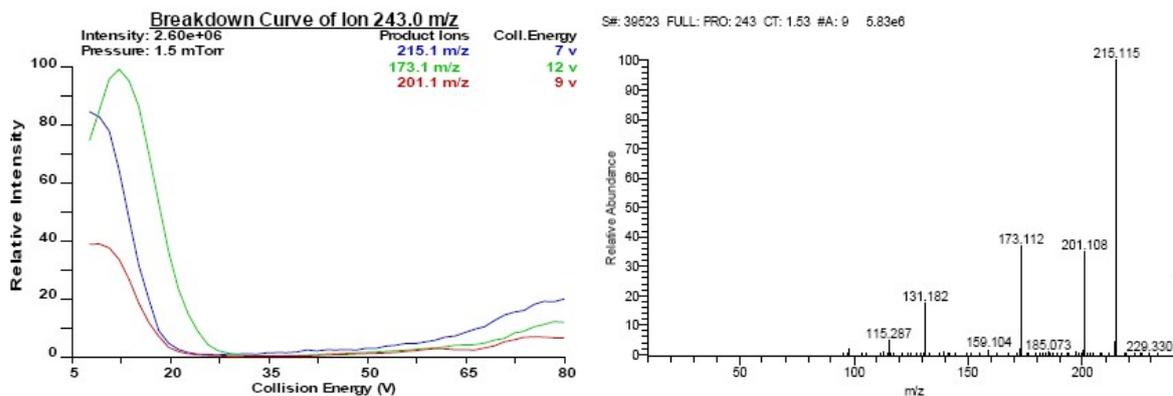
ETOPROFÓS

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

14:46:57: Optimizing flat device(s) using ion 243.00 m/z
14:47:00: Optimizing Spray Voltage for Q1MS
14:47:40: Previous Setting = 5000.00, New Setting = 5000.00
14:47:40: Maximum Intensity = 1.84e+07
14:47:40: Insignificant improvement, kept the previous setting
14:47:41: Optimizing Sheath Gas Pressure for Q1MS
14:48:30: Previous Setting = 40.00, New Setting = 50.00
14:48:30: Maximum Intensity = 1.89e+07
14:48:31: Insignificant improvement, kept the previous setting
14:48:31: Optimizing Aux Gas Pressure for Q1MS
14:49:23: Previous Setting = 5.00, New Setting = 5.00
14:49:23: Maximum Intensity = 1.69e+07
14:49:23: Insignificant improvement, kept the previous setting
14:49:25: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
14:49:25: Waiting for the collision gas to stabilize
14:49:51: Finding the product ions of ion 243.0 m/z
14:50:07: Constructing the breakdown curve of ion 243.0 m/z
14:50:09: Product Ion: 215.12 Maximum Intensity: 2.21e+06
14:50:11: Product Ion: 173.09 Maximum Intensity: 2.60e+06
14:50:13: Product Ion: 201.08 Maximum Intensity: 1.02e+06
14:50:13: Collision Energy Optimization Results:
14:50:13: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
14:50:13: 215.12 7
14:50:13: 173.09 12
14:50:13: 201.08 9
14:50:13: Finish compound optimization
  
```



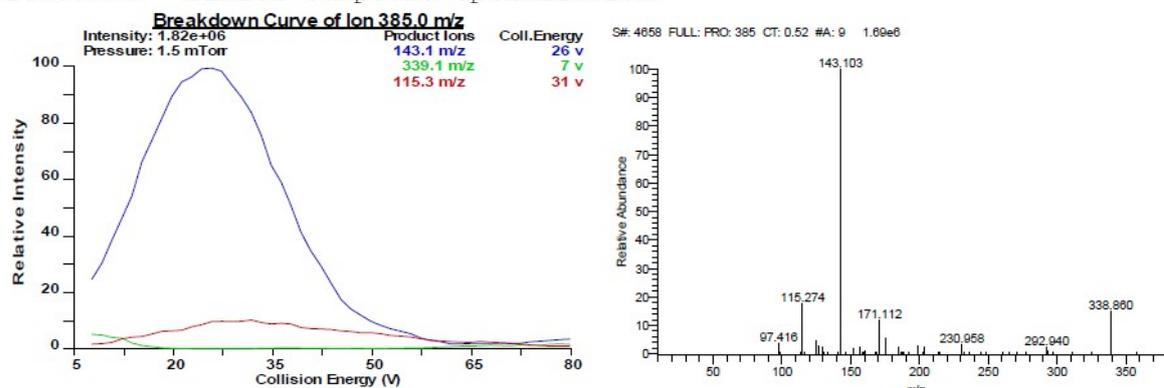
ETION

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

14:04:49: Optimizing Tube Lens for ion 385.00 m/z
14:04:55: Previous Setting = 92.85, New Setting = 107.37
14:04:55: Maximum Intensity = 9.03e+06
14:04:55: 3 % Improvement
14:04:55: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
14:04:55: Waiting for the collision gas to stabilize
14:05:17: Finding the product ions of ion 385.0 m/z
14:05:23: Constructing the breakdown curve of ion 385.0 m/z
14:05:25: Product Ion: 143.11 Maximum Intensity: 1.82e+06
14:05:27: Product Ion: 339.05 Maximum Intensity: 1.02e+05
14:05:29: Product Ion: 115.31 Maximum Intensity: 1.90e+05
14:05:29: Collision Energy Optimization Results:
14:05:29: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
14:05:29: 143.11 26
14:05:29: 339.05 7
14:05:29: 115.31 31
14:05:30: Finish compound optimization
  
```



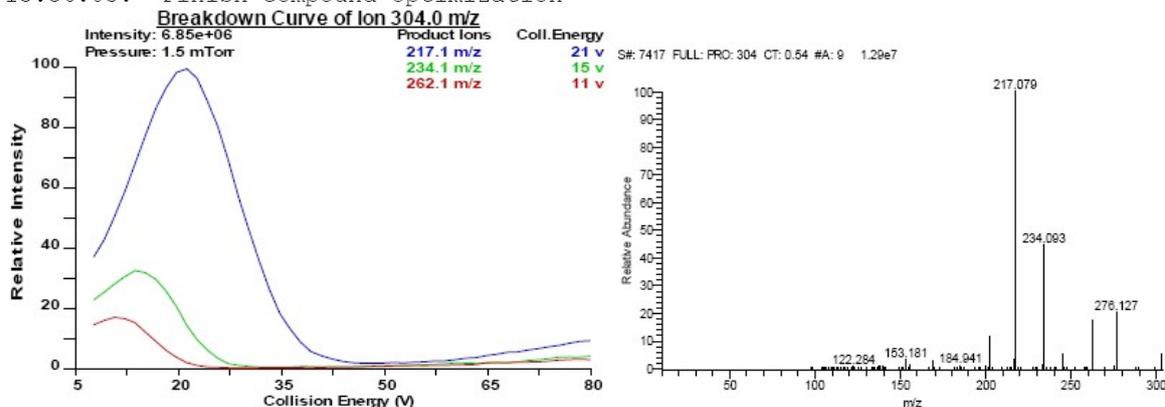
FENAMIFOS

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

15:35:24: Optimizing Tube Lens for ion 304.00 m/z
15:35:29: Insignificant improvement, kept the previous setting
15:35:29: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
15:35:29: Waiting for the collision gas to stabilize
15:35:52: Finding the product ions of ion 304.0 m/z
15:35:58: Constructing the breakdown curve of ion 304.0 m/z
15:36:00: Product Ion: 217.08 Maximum Intensity: 6.85e+06
15:36:02: Product Ion: 234.09 Maximum Intensity: 2.25e+06
15:36:04: Product Ion: 262.13 Maximum Intensity: 1.19e+06
15:36:04: Collision Energy Optimization Results:
15:36:04: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
15:36:04: 217.08 21
15:36:04: 234.09 15
15:36:04: 262.13 11
15:36:05: Finish compound optimization
  
```



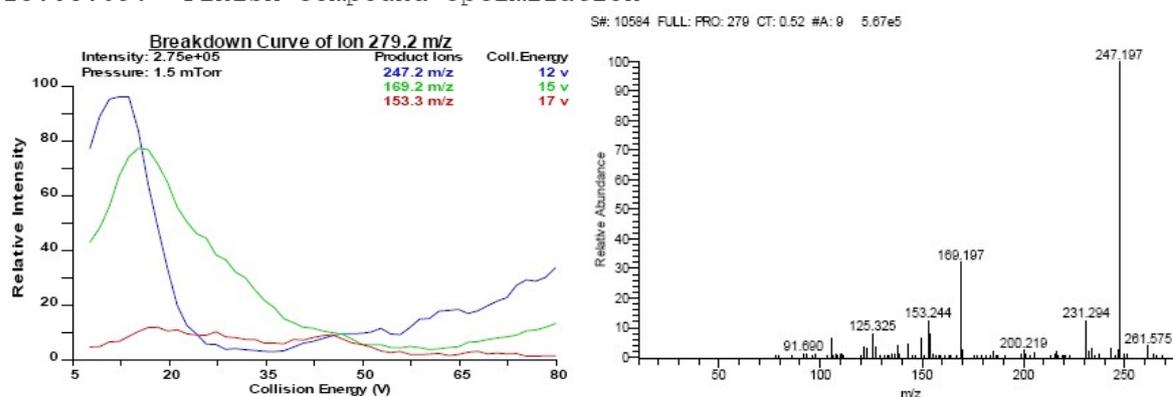
FENTION

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

15:02:29: Optimizing Tube Lens for ion 279.00 m/z
15:02:34: Insignificant improvement, kept the previous setting
15:02:35: Old Parent Mass: 279.000, New Parent Mass: 279.205
15:02:35: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
15:02:35: Waiting for the collision gas to stabilize
15:02:56: Finding the product ions of ion 279.2 m/z
15:03:02: Constructing the breakdown curve of ion 279.2 m/z
15:03:04: Product Ion: 247.18 Maximum Intensity: 2.75e+05
15:03:06: Product Ion: 169.20 Maximum Intensity: 2.14e+05
15:03:08: Product Ion: 153.33 Maximum Intensity: 3.39e+04
15:03:08: Collision Energy Optimization Results:
15:03:08: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
15:03:08: 247.18 12
15:03:08: 169.20 15
15:03:08: 153.33 17
15:03:09: Finish compound optimization
  
```



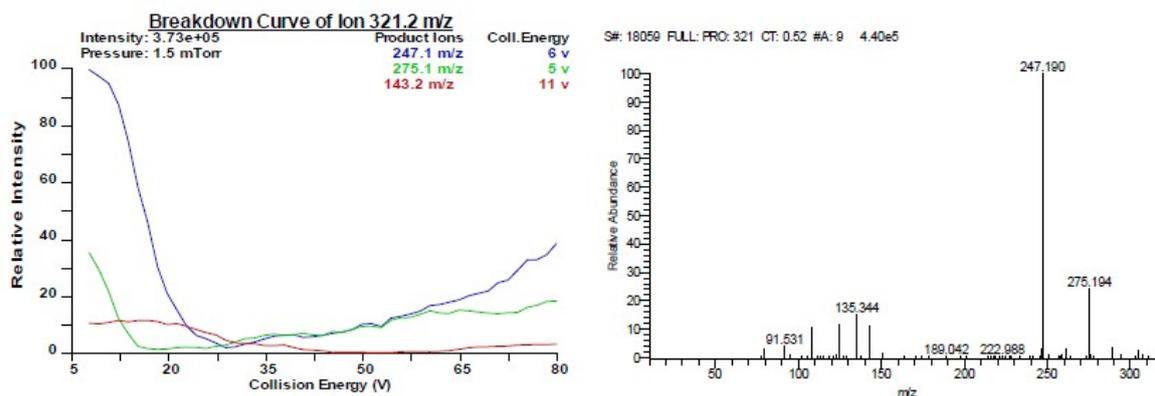
FENTOATO

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

10:32:58: Optimizing Tube Lens for ion 321.20 m/z
10:33:04: Previous Setting = 59.41, New Setting = 46.31
10:33:04: Maximum Intensity = 1.30e+06
10:33:04: 11 % Improvement
10:33:05: Old Parent Mass: 321.200, New Parent Mass: 321.234
10:33:05: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
10:33:05: Waiting for the collision gas to stabilize
10:33:26: Finding the product ions of ion 321.2 m/z
10:33:32: Constructing the breakdown curve of ion 321.2 m/z
10:33:34: Product Ion: 247.10 Maximum Intensity: 3.73e+05
10:33:36: Product Ion: 275.13 Maximum Intensity: 1.58e+05
10:33:38: Product Ion: 143.16 Maximum Intensity: 4.74e+04
10:33:38: Collision Energy Optimization Results:
10:33:38: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
10:33:38: 247.10 6
10:33:38: 275.13 5
10:33:38: 143.16 11
10:33:39: Finish compound optimization
  
```



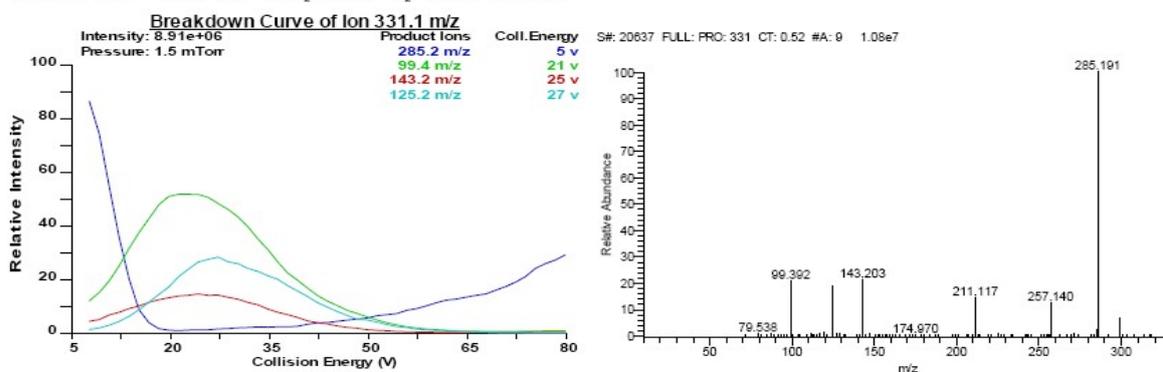
MALATION

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

14:41:05: Optimizing Tube Lens for ion 331.00 m/z
14:41:11: Previous Setting = 60.82, New Setting = 50.56
14:41:11: Maximum Intensity = 3.46e+07
14:41:11: 8 % Improvement
14:41:12: Old Parent Mass: 331.000, New Parent Mass: 331.145
14:41:12: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
14:41:12: Waiting for the collision gas to stabilize
14:41:32: Finding the product ions of ion 331.1 m/z
14:41:39: Constructing the breakdown curve of ion 331.1 m/z
14:41:40: Product Ion: 285.19 Maximum Intensity: 8.91e+06
14:41:42: Product Ion: 99.40 Maximum Intensity: 4.65e+06
14:41:44: Product Ion: 143.19 Maximum Intensity: 1.31e+06
14:41:46: Product Ion: 125.24 Maximum Intensity: 2.53e+06
14:41:47: Collision Energy Optimization Results:
14:41:47: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
14:41:47: 285.19 5
14:41:47: 99.40 21
14:41:47: 143.19 25
14:41:47: 125.24 27
14:41:48: Finish compound optimization
  
```



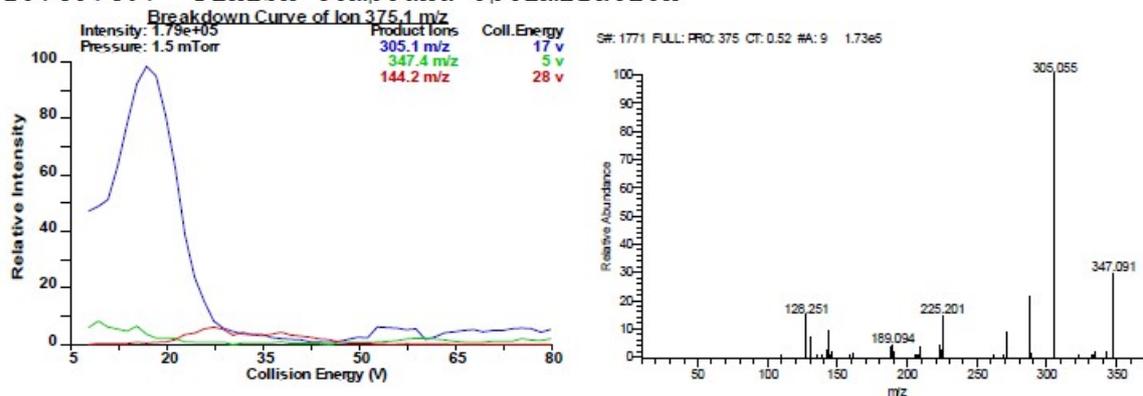
PROFENOFÓS

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

15:44:59: Optimizing Tube Lens for ion 375.00 m/z
15:45:05: Previous Setting = 68.33, New Setting = 97.36
15:45:05: Maximum Intensity = 5.72e+05
15:45:05: 509 % Improvement
15:45:06: Old Parent Mass: 375.000, New Parent Mass: 375.121
15:45:06: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
15:45:06: Waiting for the collision gas to stabilize
15:45:27: Finding the product ions of ion 375.1 m/z
15:45:33: Constructing the breakdown curve of ion 375.1 m/z
15:45:35: Product Ion: 305.05 Maximum Intensity: 1.79e+05
15:45:37: Product Ion: 347.40 Maximum Intensity: 1.54e+04
15:45:39: Product Ion: 144.18 Maximum Intensity: 1.09e+04
15:45:39: Collision Energy Optimization Results:
15:45:39: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
15:45:39: 305.05 17
15:45:39: 347.40 5
15:45:39: 144.18 28
15:45:40: Finish compound optimization
  
```

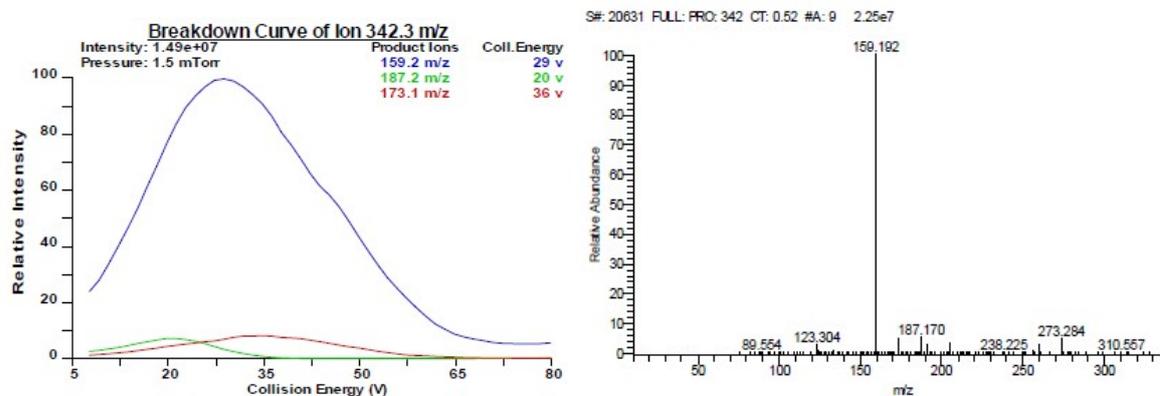


PROPICONAZOL

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```
10:56:29: Optimizing Tube Lens for ion 342.30 m/z
10:56:35: Previous Setting = 60.07, New Setting = 79.84
10:56:35: Maximum Intensity = 5.14e+07
10:56:35: 12 % Improvement
10:56:35: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
10:56:35: Waiting for the collision gas to stabilize
10:56:56: Finding the product ions of ion 342.3 m/z
10:57:03: Constructing the breakdown curve of ion 342.3 m/z
10:57:05: Product Ion: 159.19 Maximum Intensity: 1.49e+07
10:57:07: Product Ion: 187.17 Maximum Intensity: 1.10e+06
10:57:09: Product Ion: 173.12 Maximum Intensity: 1.25e+06
10:57:09: Collision Energy Optimization Results:
10:57:09: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
10:57:09: 159.19 29
10:57:09: 187.17 20
10:57:09: 173.12 36
10:57:10: Finish compound optimization
```



APÊNDICE B – ESPECTRO DE MASSAS DOS AGROTÓXICOS OBTIDOS NA FONTE APCI

*OBSERVAÇÃO: Os espectros aqui mostrados são somente os que apresentaram os Íons moleculares (Íons precursores) e/ou íons produtos (Quantificação ou Qualificação) diferentes da fonte ESI. Os demais compostos apresentaram íons idênticos.

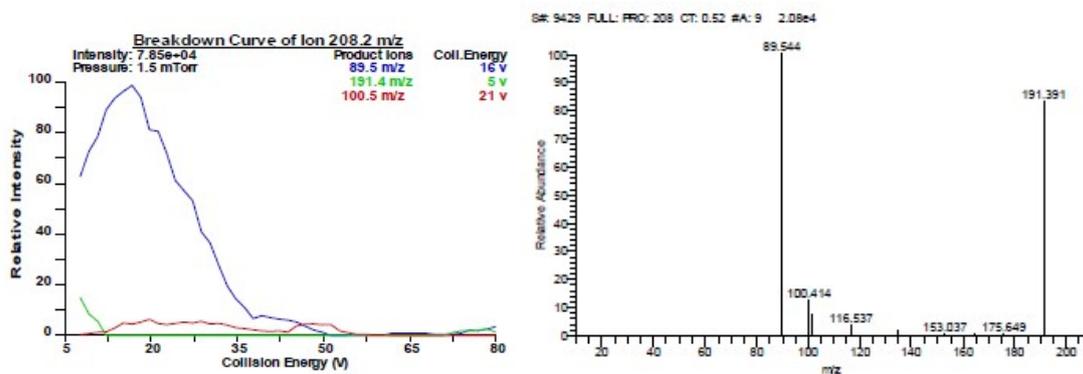
ALDICARBE

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

14:28:54: Optimizing Tube Lens for ion 208.00 m/z
14:28:59:   Previous Setting = 55.87, New Setting = 24.03
14:28:59:   Maximum Intensity = 1.92e+05
14:28:59:   Significant Improvement
14:29:00: Old Parent Mass: 208.000, New Parent Mass: 208.218
14:29:00: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
14:29:01: Waiting for the collision gas to stabilize
14:29:21: Finding the product ions of ion 208.2 m/z
14:29:27: Constructing the breakdown curve of ion 208.2 m/z
14:29:29:   Product Ion: 89.49 Maximum Intensity: 7.85e+04
14:29:31:   Product Ion: 191.40 Maximum Intensity: 1.95e+04
14:29:33:   Product Ion: 100.46 Maximum Intensity: 5.09e+03
14:29:33: Collision Energy Optimization Results:
14:29:33: Product Ions (m/z)      Coll. Energy (v)
14:29:33:      89.49                16
14:29:33:      191.40               5
14:29:33:      100.46               21
14:29:34: Finish compound optimization
  
```



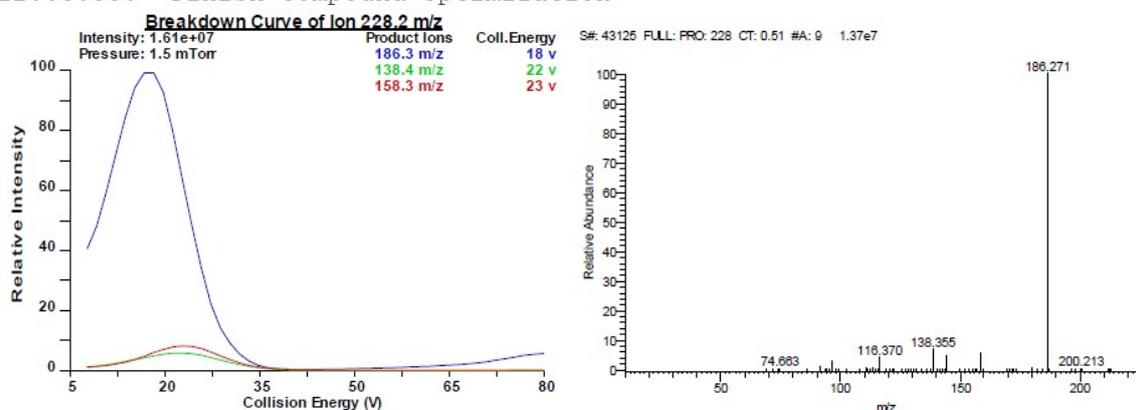
AMETRINA

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

12:02:55: Optimizing Tube Lens for ion 228.00 m/z
12:03:00: Insignificant improvement, kept the previous setting
12:03:02: Old Parent Mass: 228.000, New Parent Mass: 228.243
12:03:02: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
12:03:02: Waiting for the collision gas to stabilize
12:03:23: Finding the product ions of ion 228.2 m/z
12:03:29: Constructing the breakdown curve of ion 228.2 m/z
12:03:30: Product Ion: 186.27 Maximum Intensity: 1.61e+07
12:03:32: Product Ion: 138.35 Maximum Intensity: 9.45e+05
12:03:34: Product Ion: 158.28 Maximum Intensity: 1.32e+06
12:03:35: Collision Energy Optimization Results:
12:03:35: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
12:03:35: 186.27 18
12:03:35: 138.35 22
12:03:35: 158.28 23
12:03:35: Finish compound optimization
  
```



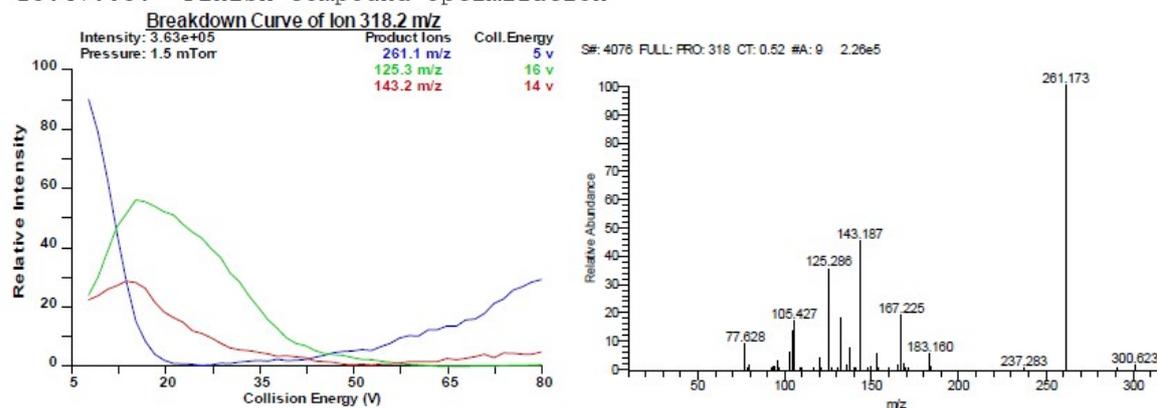
AZINFOS METIL

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

13:46:25: Optimizing Tube Lens for ion 318.10 m/z
13:46:30: Previous Setting = 59.31, New Setting = 31.54
13:46:30: Maximum Intensity = 3.59e+06
13:46:30: 125 % Improvement
13:46:31: Old Parent Mass: 318.100, New Parent Mass: 318.182
13:46:31: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
13:46:32: Waiting for the collision gas to stabilize
13:46:52: Finding the product ions of ion 318.2 m/z
13:46:58: Constructing the breakdown curve of ion 318.2 m/z
13:47:00: Product Ion: 261.13 Maximum Intensity: 3.63e+05
13:47:02: Product Ion: 125.32 Maximum Intensity: 2.05e+05
13:47:04: Product Ion: 143.18 Maximum Intensity: 1.04e+05
13:47:04: Collision Energy Optimization Results:
13:47:04: Product Ions (m/z) Coll. Energy (v)
13:47:04: 261.13 5
13:47:04: 125.32 16
13:47:04: 143.18 14
13:47:05: Finish compound optimization
  
```



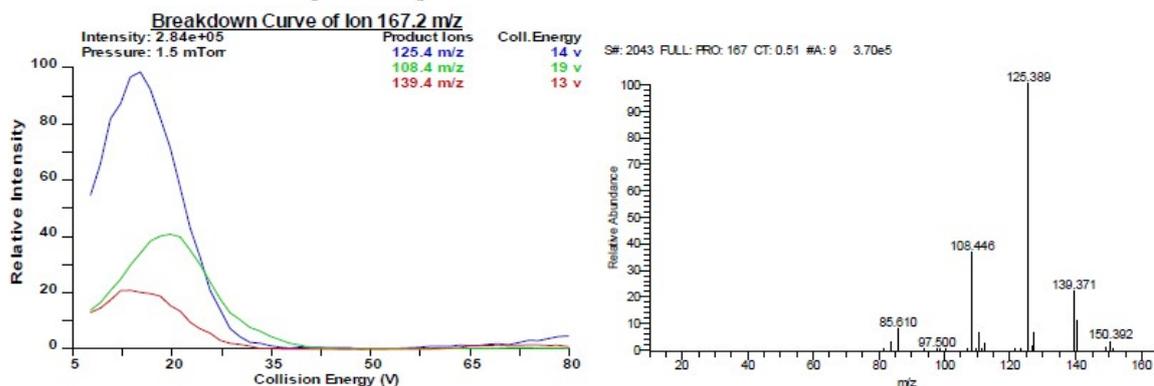
CIROMAZINA

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

13:20:18: Optimizing Tube Lens for ion 167.00 m/z
13:20:24: Insignificant improvement, kept the previous setting
13:20:25: Old Parent Mass: 167.000, New Parent Mass: 167.216
13:20:25: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
13:20:25: Waiting for the collision gas to stabilize
13:20:46: Finding the product ions of ion 167.2 m/z
13:20:51: Constructing the breakdown curve of ion 167.2 m/z
13:20:53:   Product Ion: 125.39 Maximum Intensity: 2.84e+05
13:20:55:   Product Ion: 108.45 Maximum Intensity: 1.19e+05
13:20:57:   Product Ion: 139.39 Maximum Intensity: 6.10e+04
13:20:57: Collision Energy Optimization Results:
13:20:57: Product Ions (m/z)      Coll. Energy (v)
13:20:57:      125.39                14
13:20:57:      108.45                19
13:20:57:      139.39                13
13:20:58: Finish compound optimization
  
```



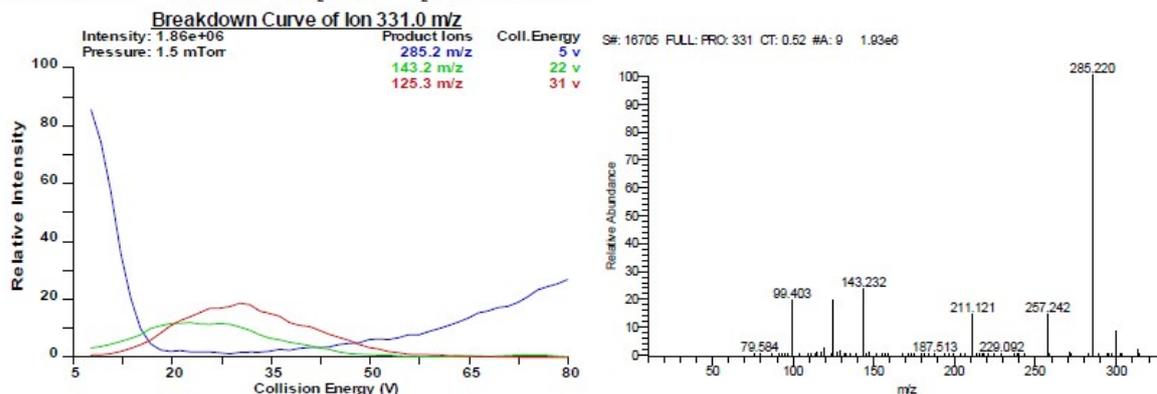
MALATION

Results from Compound Optimization

Compound Optimization in MS and MS/MS

```

10:33:43: Optimizing Tube Lens for ion 331.00 m/z
10:33:49: Insignificant improvement, kept the previous setting
10:33:49: Optimizing collision energy at 1.5 mTorr
10:33:49: Waiting for the collision gas to stabilize
10:34:10: Finding the product ions of ion 331.0 m/z
10:34:16: Constructing the breakdown curve of ion 331.0 m/z
10:34:18:   Product Ion: 285.22 Maximum Intensity: 1.86e+06
10:34:20:   Product Ion: 143.23 Maximum Intensity: 2.26e+05
10:34:22:   Product Ion: 125.30 Maximum Intensity: 3.53e+05
10:34:22: Collision Energy Optimization Results:
10:34:22: Product Ions (m/z)      Coll. Energy (v)
10:34:22:      285.22                5
10:34:22:      143.23                22
10:34:22:      125.30                31
10:34:23: Finish compound optimization
  
```



**APÊNDICE C – DADOS DA LINEARIDADE E TESTES ESTATÍSTICOS DE AMBAS AS FONTES ESI E APCI UTILIZANDO A
FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 2,0 A 200,0 PPB**

Agrotóxico	M	ESI					APCI				
		Coef. angular	Coef. linear	r	F _{cal}	F _{tab}	Coef. angular	Coef. linear	r	F _{cal}	F _{tab}
Acefato	RP	14095	-15841	0,999	2649	19	2276	-1547	0,999	11148	19
	BR	11773	-9897	0,996	1719	19	4141	-11373	0,996	158213	19
	CF	12121	12608	0,999	5234	19	1437	299	0,995	3902	19
Aldicarbe	RP	4602	80189	0,991	10005	19	1066	9017	0,995	221	19
	BR	967	2913	0,995	490391	19	2549	-15510	0,969	264	19
	CF	3226	49244	0,992	4470405	19	930	-1084	0,991	9434	19
Ametrina	RP	415351	-1190609	0,999	2427378	19	41538	291501	0,995	59365	19
	BR	247173	-569578	0,999	32297	19	79220	1522484	0,875	32651597	19
	CF	437093	1416337	0,997	2154	19	42711	40225	0,994	30722	19
Azinfos metil	RP	7793	-17413	0,999	106717	19	1283	-2317	0,998	11706	19
	BR	4437	-13360	0,999	271688	19	2267	-16968	0,990	1446942	19
	CF	5852	11981	0,998	622	19	1159	-4772	0,995	12845	19
Ciproconazol	RP	20014	-77904	0,998	377	19	6031	3175	0,998	18361	19
	BR	13359	-22418	0,998	8371	19	12754	-42474	0,991	48350	19
	CF	16326	-940	0,999	7364	19	6474	-35103	0,998	25780	19
Ciromazina	RP	7676	-20133	0,992	255986	19	1880	14534	0,999	2443	19
	BR	5973	-29614	0,998	79066	19	3626	-971	0,998	65217	19
	CF	7690	-25926	0,999	24780	19	1989	6018	0,998	4388	19
Clorpirifós	RP	3148	-12253	0,997	2096	19	5796	-2279	0,998	2445	19
	BR	2218	-12794	0,998	13283	19	13173	-101279	0,992	318370	19
	CF	3092	-17098	0,995	211928	19	5559	-1260	0,993	20029	19
Diazinon	RP	233805	136583	0,998	81209	19	25802	36708	0,998	50393	19
	BR	174108	-363223	0,999	17619	19	54745	-63719	0,998	9335	19
	CF	245701	361120	0,999	758	19	23966	-137266	0,992	2692	19

Dimetoato	RP	16998	-12566	0,999	124635	19	3949	12553	0,998	5891	19
	BR	9978	-51644	0,997	54421	19	5728	-8964	0,998	19967	19
	CF	17120	47702	0,999	1612	19	3304	-16275	0,996	4726	19
Etoprofós	RP	38580	16262	0,997	1950	19	2529	1971	0,997	99240	19
	BR	23034	-54931	0,999	17386	19	5330	3888	0,997	4560	19
	CF	33300	53962	0,998	1891	19	2383	-970	0,991	16645	19
Etion	RP	1579	-11220	0,989	12330	19	2595	6798	0,995	17514	19
	BR	2102	-6796	0,999	100984	19	5681	-32690	0,991	213765	19
	CF	2665	1133	0,999	5216318	19	2442	-13031	0,996	9593	19
Fenamifós	RP	60354	-51191	0,999	776	19	44305	193002	0,997	53827	19
	BR	60969	-14840	0,999	94587	19	83559	-180109	0,994	100296	19
	CF	75168	228475	0,997	838	19	41813	-115994	0,996	8837	19
Fention	RP	3913	84358	0,992	204	19	17177	158435	0,991	919	19
	BR	2449	90657	0,997	392	19	53100	-376156	0,972	41907	19
	CF	8070	135204	0,994	3502	19	20394	46720	0,988	85161	19
Fentoato	RP	10996	-26430	0,999	46356	19	7340	16288	0,998	60666	19
	BR	7079	-15912	0,999	1080357	19	15549	-52407	0,998	164017	19
	CF	10381	8889	0,999	375154	19	7188	-20825	0,998	2256	19
Malation	RP	8386	-14926	0,996	3286	19	7340	16288	0,998	60666	19
	BR	6046	-1969	0,999	6063	19	15549	-52407	0,998	164017	19
	CF	7975	14153	0,998	949	19	7188	-20825	0,998	2256	19
Profenofós	RP	25955	-138389	0,997	9341	19	11845	28057	0,998	1426	19
	BR	19125	-53605	0,999	20455	19	32223	-229470	0,990	10537	19
	CF	23083	1590	0,999	24509	19	12206	-68938	0,995	1330	19
Propiconazol	RP	11231	-54891	0,997	77056	19	11520	20214	0,997	165247	19
	BR	13928	-5584	0,999	84476	19	25374	-120164	0,997	78190	19
	CF	10989	-9743	0,999	21812	19	11225	-11485	0,999	5664	19