



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

MARÍLIA GABRIELA GOMES DE MENEZES

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS
EM ÁGUAS DE ABASTECIMENTO DO ESTADO DO CEARÁ USANDO LC-MS/MS-
SPE**

FORTALEZA

2019

MARÍLIA GABRIELA GOMES DE MENEZES

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM
ÁGUAS DE ABASTECIMENTO DO ESTADO DO CEARÁ USANDO LC-MS/MS- SPE

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química, do Departamento de Química Analítica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento

FORTALEZA

2019

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)

M512d Menezes, Marília Gabriela Gomes de.

Desenvolvimento de um método multirresíduos de agrotóxicos em águas de abastecimento do estado do Ceará usando LC-MS/MS- SPE / Marília Gabriela Gomes de Menezes. – 2019.
111 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

1. Agrotóxicos. 2. Água de abastecimento. 3. SPE. 4. LC MS/MS. I. Título.

CDD 540

MARÍLIA GABRIELA GOMES DE MENEZES

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM
ÁGUAS DE ABASTECIMENTO DO ESTADO DO CEARÁ USANDO LC-MS/MS- SPE

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química, do Departamento de Química Analítica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Analítica.

Aprovada: 29/11/2019

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. André Henrique Barbosa de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Carla Bastos Vidal
Centro Universitário Unifanor (Unifanor)

A Deus.

A minha família, Osmidia, Crislany e Natiele
Gomes de Menezes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a razão de tudo em minha vida. Por ter me conduzido e concedido a graça de adentrar nessa jornada de aprendizagem e crescimento. Por ter estado comigo em todos os momentos e não ter me permitido desistir. Por ter me dado uma Mãe maravilhosa e amigos no céu com quem posso contar. Pela graça de receber a santa Eucaristia tantas e tantas vezes, indo ou voltando dos estudos. Por utilizar de todas as experiências aqui vivenciadas para me fazer uma mulher melhor e com maior têmpera. Por me ensinar que maior do que a sabedoria e a inteligência é o temor de Deus. E por fim, por me mostrar que a verdadeira felicidade se encontra dentro de si.

A minha família. Minha mãe Maria Osmidia e minhas irmãs Crislany e Natielle que sempre e em tudo me apoiaram, me deram sustento moral, emocionou e por vezes financeiro, para que esta jornada fosse passível de se concretizar. Agradeço também aos meus cunhados Emerson e Alysson e a minha sobrinha Maria Júlia, por me alegrarem tantas vezes. Vocês são parte de mim, estarão sempre perto, porque estarão sempre dentro de mim. Eu os amo muito.

Ao meu orientador Ronaldo Nascimento, por ter me concedido a graça da sua orientação desde o início. Obrigada por todo acolhimento, disponibilidade e conhecimento doado.

A minha amiga e companheira de bancada Renata Oliveira, por toda vida e conhecimento compartilhado. Obrigada por toda a ajuda desde o início até esta etapa final, por toda paciência e cuidado que teve para comigo. Lhe levo para a vida.

A Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC), pelo suporte e apoio na realização das atividades de pesquisa deste trabalho, em especial, aos membros do Laboratório de Química Instrumental (LQI), Crisiana Andrade, Vitor Paulo e Cleidiane. Agradeço também aos amigos Rubens e Luciana, por toda caridade e pelas pessoas maravilhosas que o são. A todos vocês o meu agradecimento imensurável.

Agradeço aos membros do Laboratório de Análises de Traços (LAT) e Laboratório de Análises de Água (LANAGUA), que tantas vezes me ajudaram com materiais de pesquisa e com conhecimento. Em especial ao Daniel Barbosa que tanto me foi solícito.

Aos amigos Tatiana, Glemilson, Paulo, Hortência, Nayanna, Dalila e Sávvia, por se fazerem presentes nesta etapa. Levo vocês da UECE para toda a vida.

Aos amigos do Grupo de Oração Universitário Guerreiros (GOU Guerreiros), que ajudaram a dar sentido a esta jornada e a torná-la mais prazerosa.

Aos amigos que a Comunidade Canção Nova me trouxe, Hitalo Targino, Jéssica Virginia, Lorena Lobo, Samyra Magda, Renata Santiago, Rose Lopes e Isabel Fernandes, por serem quem são, por se alegrarem com as minhas alegrias e por chorarem comigo as minhas dores. Eu os amo muito, essa vitória também é de vocês.

Agradecimentos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

“Não exalto a mim mesmo, mas a Deus,
porque é Ele que faz a obra em mim. E se faz
em mim, Ele também pode fazê-la em você.”

Mons. Jonas Abib

RESUMO

A água de abastecimento domiciliar passa por procedimentos específicos em estações de tratamento de água, visando fornecer para a população água com boa qualidade, livre de impurezas. No entanto, as etapas de tratamento produzem apenas remoção parcial de compostos químicos, como os agrotóxicos, por vezes não sendo o suficiente para configurar baixos níveis de concentrações as águas de abastecimento. A Portaria de Consolidação nº5 publicada pelo Ministério da Saúde Brasileiro em 2017 rege o monitoramento da qualidade das águas, dentre os parâmetros de potabilidade estão os valores máximos permitidos para alguns agrotóxicos. No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método para a determinação de 8 agrotóxicos em águas de abastecimento, utilizando Extração em Fase Sólida (SPE) para o preparo de amostras e a Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas sequencial (LC-MS/MS), com analisador triplo quadrupolo para a detecção dos agrotóxicos. A técnica de SPE aqui desenvolvida conta com um pré-tratamento de acidificação da amostra com ácido fórmico (10%) até pH 4, utilizando um volume de amostra de 100mL, empregando o sorvente polimérico Oasis HLB 500mg/6mL e eluição dos agrotóxicos em 7,5mL da solução (1/1) MeOH/DCM. Os métodos cromatográficos elaborados permitiram a identificação e quantificação dos compostos em 22min e 10min, nos modos de ionização positivo e negativo, respectivamente. Após a validação o método foi considerado seletivo para todos os compostos, apresentando boa linearidade com coeficientes de determinação superiores a 0,99 e tratamentos estatísticos que confirmam as suas respectivas linearidades. Apenas o 2,4-D não apresentou boa linearidade. As faixas de trabalho estão na faixa de 0,01-1,5 µg/L. E os limites de quantificação variaram entre 0,01-0,3 µg/L. A precisão no quesito repetibilidade apresentou valores de DPR variando de 0,7-20,9% e a precisão intermediária entre 2-24%, valores inferiores a 30%, limite indicado para a faixa de concentração trabalhada. A exatidão foi avaliada através da recuperação, alguns agrotóxicos apresentaram recuperações superiores ao recomendado (40-120%). Foram analisadas vinte e sete amostras reais de águas de abastecimento do estado do Ceará, os resultados mostraram 78% de contaminação, no entanto os níveis de concentração encontrados foram abaixo dos limites estabelecidos pela legislação vigente. O método proposto pode ser utilizado em análise de rotina laboratorial, podendo ser uma excelente ferramenta utilizada em programas de monitoramento de agrotóxicos em águas destinadas ao consumo humano do estado do Ceará.

Palavras-Chave: Agrotóxicos. Água de abastecimento. SPE. LC-MS/MS.

ABSTRACT

Supplies water goes through specific procedures in water treatment plants, aiming to provide the population with good quality water, free of impurities. However, the treatment steps produce only partial removal of chemical compounds such as pesticides, sometimes not enough to set low concentrations in the supplies water. Consolidation Ordinance n°5 published by the Brazilian Ministry of Health in 2017 governs the monitoring of water quality, among the potability parameters are the maximum values allowed for some pesticides. In the present work a method for the determination of 8 pesticides in water supply was developed and validated using Solid Phase Extraction (SPE) for sample preparation and Sequential Mass Spectrometry (LC-MS/MS) coupled Liquid Chromatography, with triple quadrupole analyzer for the detection of pesticides. The SPE technique developed here has a sample acidification pretreatment with formic acid (10%) to pH 4, using a sample volume of 100mL, using the Oasis HLB 500mg polymeric sorbent and eluting pesticides in 7 0.5 ml of the (1/1) MeOH/DCM solution. The elaborated chromatographic methods allowed the identification and quantification of the compounds in 22min and 10min, in the positive and negative ionization modes, respectively. After validation, the method was considered selective for all compounds, presenting good linearity with coefficients of determination greater than 0.99 and statistical treatments that confirm their respective linearities. Only 2,4-D did not show good linearity. The working ranges are in the range 0.01-1.5 µg/L. And the limits of quantification ranged from 0.01-0.3 µg/L. The accuracy in the repeatability item presented RDS values ranging from 0.7-20.9% and the intermediate precision between 2-24%, values below 30%, indicated limit for the concentration range worked. Accuracy was assessed by recovery, some pesticides showed higher recoveries than recommended (40-120%). Twenty-seven real samples of water supply from the state of Ceará were analyzed, the results showed 78% contamination, however the concentration levels found were below the limits established by the current legislation. The proposed method can be used in routine laboratory analysis and can be an excellent tool used in pesticide monitoring programs in waters intended for human consumption in the state of Ceará.

Keywords: Pesticides. Household water. SPE. LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Resumo do método de extração em fase sólida.	27
Figura 2- Fases poliméricas do cartucho Oasis HLB.....	29
Figura 3- Resumo esquemático das partes de um espectrômetro de massas.....	35
Figura 4- Eletronebulização.....	38
Figura 5- Tipos de ionização na fonte electrospray.....	39
Figura 6- Analisador tipo quadrupolo.	41
Figura 7- Analisador em sequência tipo triplo quadrupolo.	42
Figura 8- Multiplicador de elétrons.	44
Figura 9- Sistema LC-ESI-MS/MS.....	62
Figura 10- Sistema de extração em fase sólida.	64
Figura 11- Cromatograma de íons selecionados para o modo positivo de ionização.	72
Figura 12- Cromatograma de íons selecionados para o modo negativo de ionização.	73
Figura 13- Gráficos de superfície de resposta. a) Aldicarbe Sulfóxido b) Trifloxistrobina.	74
Figura 14- Diagrama de Pareto. a) 2,4,5-T b) Diuron.....	75
Figura 15- Gráfico de superfície de resposta. a) 2,4,5-T; b) Diuron.....	76
Figura 16-Cromatograma mostrando a seletividade do método para os compostos de ionização no modo positivo.	78
Figura 17-Cromatograma mostrando a seletividade do método para os compostos de ionização no modo negativo.	79
Figura 18- Efeito Matriz considerando os coeficientes angulares e os níveis baixos, médios e altos das curvas de calibração.....	79
Figura 19- Curva analítica para o pesticida 2,4-D.	81
Figura 20- Hidrolise do benomil em carbendazim.....	81
Figura 21- Resíduos plotados para o carbofurano e para o 2,4,5-T.	82
Figura 22-Curva de concentração corrigida com intervalo de confiança a 95% para o pesticida 2,4,5-T.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Classificação agrotóxicos.....	23
Tabela 2-Informações sobre as classes e propriedades físico-químicas dos pesticidas estudados.	59
Tabela 3- Gradiente utilizado para método cromatográfico no modo positivo	63
Tabela 4- Planejamento de experimentos	66
Tabela 5- Curvas de calibração.....	66
Tabela 6-Resultado da obtenção dos íons precursores e seus respectivos fragmentos otimizados.	70
Tabela 7- Íons obtidos por trabalhos da literatura	71
Tabela 8-Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central referente ao modelo para melhor extração do pesticida 2,4,5-T.....	76
Tabela 9-Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central referente ao modelo para melhor extração do pesticida Diuron.	77
Tabela 10- Resultados para teste de Levene.....	82
Tabela 11- Resultados para Teste F, mostrando F calculado e F tabelado.....	83
Tabela 12-Valores dos coeficientes angulares e lineares, seus respectivos desvios e t calculados, P-valor respectivo.	83
Tabela 13- Resultados da curva do carbofurano obtidos para os cálculos de Σxy , Σx^2 , Σy^2 , SS_{resid} , S_{xy} , S_{xx} and S_y	85
Tabela 14- Intervalo de confiança para 95% de confiança da concentração de carbofurano e faixa de aceitação.....	86
Tabela 15-Resultados das equações experimentais, equações finais e seus limites de confiança para os coeficientes pertencentes as equações finais.	87
Tabela 16- Resultado dos parâmetros de LD, LQ, faixa linear, precisão e recuperação.	89
Tabela 17-Relação das amostras reais analisadas que apresentaram contaminação por agrotóxicos e valores máximos de resíduos permitidos por órgãos reguladores.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química a Pressão Atmosférica
APPI	Fotoionização a Pressão Atmosférica
C8	Octil
C18	Octadecil
CAGECE	Companhia de Água e Esgoto do Ceará
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	Coefficiente de Variação
CID	Dissociação Induzida por Colisão
DC	Corrente Contínua
DCM	Diclorometano
DP	Declustering Potencial
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Energia de Colisão
EM	Multiplicador de Elétrons
ETA	Estação de Tratamento de Água
ES	Eletrospray
ESI	Ionização por Eletrospray
EUA	Estados Unidos da América
Full Scan	Detecção do Espectro Completo
GC	Cromatografia Gasosa
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IE	Impacto de Elétrons
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IT	Armadilha de Elétrons
LC	Cromatografia Líquida
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LQI	Laboratório de Química Instrumental
MeOH	Metanol
MRC	Material de Referência Certificado
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MS	Espectrômetro de massas
MSPD	Dispersão da Matrix em Fase Sólida
PCC	Planejamento Composto Central
pK_{ow}	Coefficiente octanol-água
Q	Quadrupolo
QqQ	Triplo Quadrupolo
QqToF	Quadrupolo-Tempo de Voo
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto e Seguro
RF	Radiofrequência
SIM	Monitoramento Seletivo de Íons
SPE	Extração em Fase Sólida
SPME	Microextração em Fase Sólida
SEM	Monitoramento Seletivo de Reações
TOF	Tempo de Voo
NUTEC	Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Estado do Ceará
VMP's	Valores Máximos Permitidos
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Águas de abastecimento	19
3.2	Agrotóxicos e sua atividade poluidora	20
3.3	Toxicidade dos agrotóxicos e política governamental	22
3.4	Métodos de Extração de Resíduos de Pesticidas	25
3.4.1	<i>Método de Extração em Fase Sólida – SPE</i>	26
3.5	Planejamento experimental	31
3.6	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas	33
3.6.1	<i>Sistema de injeção da amostra</i>	35
3.6.2	<i>Fontes de ionização em LC</i>	36
3.6.2.1	<i>Ionização por eletrospray</i>	37
3.6.3	<i>Analísadores de massas</i>	39
3.6.3.1	<i>Quadrupolo</i>	40
3.6.3.2	<i>QqQ - Triplo quadrupolo</i>	41
3.6.4	<i>Detectores</i>	43
3.6.5	<i>Controle dos fragmentos em LC-MS/MS</i>	44
3.7	Validação de Método	45
3.7.1	<i>Seletividade</i>	46
3.7.2	<i>Efeito matriz</i>	46
3.7.3	<i>Linearidade</i>	48
3.7.4	<i>Faixa de trabalho</i>	52
3.7.5	<i>Limite de Detecção (LD)</i>	52

3.7.6	<i>Limite de Quantificação (LQ)</i>	53
3.7.7	<i>Precisão</i>	54
3.7.7.1	<i>Repetibilidade</i>	55
3.7.7.2	<i>Precisão intermediária</i>	55
3.7.7.3	<i>Reprodutibilidade</i>	56
3.7.8	<i>Exatidão</i>	56
3.7.9	<i>Robustez</i>	58
4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1	Reagentes e padrões de pesticidas	59
4.2	Amostragem	61
4.3	Condições instrumentais e preparação da amostra	61
4.3.1	<i>Cromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massas (LC-MS/MS)</i>	61
4.3.1.1	<i>Otimização do sistema LC-ESI-MS/MS</i>	62
4.3.1.1.1	Otimização do sistema de detecção de massas.....	62
4.3.1.1.2	Otimização do sistema cromatográfico.....	63
4.3.2	<i>Extração em fase sólida</i>	63
4.3.2.1	<i>Condições do método de extração/concentração</i>	64
4.4	Planejamento experimental	65
4.5	Curva analítica	66
4.6	Parâmetros de Validação	66
4.6.1	<i>Seletividade</i>	67
4.6.2	<i>Efeito Matriz</i>	67
4.6.3	<i>Linearidade / Faixa de Trabalho</i>	67
4.6.4	<i>Limite de Quantificação e Limite de Detecção</i>	67
4.6.5	<i>Precisão</i>	68
4.6.5.1	<i>Repetibilidade e Precisão Intermediária</i>	68

4.6.6	<i>Exatidão</i>	68
4.6.7	<i>Aplicação do método</i>	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1	Obtenção da Biblioteca Espectral	70
5.2	Desenvolvimento do método cromatográfico	71
5.3	Planejamento experimental	73
5.4	Validação do método	78
5.4.1	<i>Seletividade</i>	78
5.4.2	<i>Efeito Matriz</i>	79
5.4.3	<i>Linearidade</i>	80
5.4.4	<i>LD, LQ, faixa linear, precisão e recuperação.</i>	87
5.5	Aplicação em amostras reais	91
6	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICE A- ESPECTROS DE MASSAS E GRÁFICOS DE ENERGIA DE COLISÃO POR INTENSIDADE RELATIVA PARA CADA PESTICIDA ESTUDADO	107
	APÊNDICE B- GRÁFICOS REFERENTES AS CURVAS ANALÍTICAS DOS PESTICIDAS ESTUDADOS	109
	APÊNDICE C- CURVAS FINAIS CONTENDO O INTERVALO DE CONFIANÇA A 95%	110

1. INTRODUÇÃO

A água é uma substância composta complexa, essencial para a vida e dotada de valor econômico (ANA, 2018). A água doce destinada ao abastecimento domiciliar passa por procedimentos específicos em estações de tratamento de água, visando a remoção de macroimpurezas, assim como também é desejável a remoção de micropoluentes, os agrotóxicos. A contaminação das águas por agrotóxicos é uma preocupação mundial, visto que possui impacto direto na saúde humana, fazendo-se importante assegurar a qualidade da água a ser utilizada pela população. No entanto, as etapas de tratamento produzem apenas remoção parcial desses compostos químicos, por vezes não sendo suficiente para configurar as águas de abastecimento baixos níveis de concentrações de agrotóxicos (PEREIRA *et al.*, 2018).

O Brasil é um país de agricultura essencialmente tradicional, sendo a utilização de agrotóxicos considerada relevante no modelo agrícola do país. No entanto, devido a sua toxicidade o uso de agrotóxicos tem merecido atenção por parte das comunidades científicas, governamentais e sociais (ABRASCO, 2015; SOUZA e ARMADA, 2015). Nos últimos 25 anos após ter sido detectado a presença de agrotóxicos em águas subterrâneas destinadas ao consumo humano nos EUA, surgiram numerosas campanhas de monitoramento de agrotóxicos em corpos hídricos por todo o mundo (CASADO, SANTILLO e JOHNSTON, 2018).

O Ministério da Saúde do Brasil adotou como política de monitoramento das águas de abastecimento a Portaria de Consolidação nº5, de 28 de setembro de 2017, que utiliza os Valores Máximos Permitidos (VMP's) para vinte e sete parâmetros de agrotóxicos de diferentes classes, como um dos critérios para a qualidade das águas. Exigindo o monitoramento da rede de abastecimento da água consumida pela população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Devido à grande diversidade de agrotóxicos empregados na agricultura, os procedimentos analíticos multirresíduos são especialmente recomendáveis quando se trata de identificação e quantificação de resíduos em matrizes complexas (MAPA, 2011). Para a análise multirresíduos de agrotóxicos em água, a Extração em Fase Sólida (SPE) é a técnica de preparo de amostras mais aplicada (DONATO *et al.*, 2015).

A SPE é extensamente usada para extrair analitos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas. Essa técnica consiste em isolar os analitos presentes em uma matriz, por meio de uma fase sólida, chamada sorvente (ou adsorbente). Após a extração dos analitos,

uma pequena quantidade de solvente de eluição adequado é utilizada para eluir os analitos de interesse retidos, obtendo-se um extrato concentrado, possibilitando uma maior sensibilidade no método final. Essa técnica tem sido amplamente utilizada para remover ou concentrar traços de compostos orgânicos a partir de amostras líquidas (ZINI, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Os extratos obtidos por SPE são comumente aplicados a cromatografia líquida (LC – *Liquid Chromatography*) ou cromatografia gasosa (GC- *Gás Chromatography*), um método de separação e determinação de compostos considerados de baixa, média e alta polaridade e não-voláteis e/ou termicamente lábeis. No entanto, se faz necessário a utilização de detectores acoplados ao cromatógrafo. Dentre os detectores atualmente utilizados, destacam-se os espectrômetros de massas (MS), que apresentam alta sensibilidade e seletividade. Estes podem ainda ser utilizados de modo sequencial (MS/MS) permitindo melhores resultados em análises complexas, como as de nível traços em matrizes de alimentos, reduzindo a interferência espectral e aumentando a sensibilidade (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARAN, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2017).

No entanto, até mesmo para métodos de análises utilizando técnicas avançadas como a LC-MS/MS, é necessário apresentar dados que confirmem a credibilidade dos resultados, isto se faz através da validação do método analítico. A validação é um estudo experimental que tem por objetivo demonstrar que o método analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos (ANVISA, 2017).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho é desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação multirresíduos de agrotóxicos em água de abastecimento, utilizando as técnicas de SPE e LC-MS/MS, visando aplicar o método obtido em amostras reais de águas de abastecimento do estado do Ceará.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação de resíduos de pesticidas de diferentes classes de agrotóxicos em água de abastecimento, utilizando a extração em fase sólida (SPE), e a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS).

2.2 Objetivos Específicos

- Utilizar a técnica LC-MS/MS na identificação e quantificação dos compostos- 2,4-D; 2,4,5-T; aldicarbe sulfóxido; benomil; carbendazim; carbofurano; diuron; imidacloprido; tebuconazol e trifloxistrombina.
- Utilizar a técnica de SPE na etapa de preparo de amostra;
- Validar a metodologia desenvolvida utilizando as figuras de mérito- seletividade; efeito matriz; linearidade; faixa de trabalho; limite de detecção; limite de quantificação; precisão e exatidão.
- Analisar amostras de águas de abastecimento provenientes de municípios do estado do Ceará.
- Correlacionar as concentrações das amostras com os Valores Máximos Permitidos (VMP's) estabelecidos pela Legislação Vigente- Portaria de Consolidação N°5.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Águas de abastecimento

A água é um recurso natural limitado, que comporta em si valor econômico e é imprescindível para todos os seres vivos (ANA, 2018). A água pode conter várias substâncias em sua composição, por exemplo, as águas superficiais podem apresentar substâncias húmicas, sólidos dissolvidos em forma ionizada, gases dissolvidos, compostos orgânicos dissolvidos e matéria em suspensão, tais como, microrganismos (bactérias, algas e fungos) e coloides. Devido a isso, a água é considerada uma substância complexa (SAMPAIO, 2016).

Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2005), a água pode ser encontrada em três tipos- água doce, água salobra e água salgada. Sendo esses tipos divididos em treze classes, de acordo com sua qualidade e utilização recomendada. As águas doces possuem salinidade igual ou menor que 0,5% e são destinadas ao consumo humano e outras finalidades.

O Brasil é um dos países que possuem a maior disponibilidade de água doce do mundo, utilizada principalmente para irrigação, abastecimento humano e animal, indústria, geração de energia, mineração, aquicultura, navegação, turismo e lazer (ANA, 2018).

As águas rotuladas como pertencentes as classes especial, 1, 2 e 3, são destinadas ao abastecimento domiciliar. Essas águas passam por tratamento simplificado ou convencional, sendo estes respectivamente: Um processo de clarificação por meio de filtração, desinfecção e correção de pH quando necessário; um processo de clarificação com utilização de coagulação, floculação, seguida de desinfecção e correção de pH (CONAMA, 2005).

A maioria das Estações de Tratamento de Água - ETA atuais usa métodos de tratamento convencionais, como coagulação-floculação, sedimentação, filtração de areia e desinfecção visando a produção de água para abastecimento do consumo humano. As águas brutas utilizadas nas ETA's podem ser de fontes subterrâneas, de poços, ou águas superficiais, tais como rios, lagos, lagoas e sistemas de reservatório (SAMPAIO, 2016).

Atualmente, a Companhia de Água e Esgoto do Ceará – CAGECE, utiliza na ETA Gavião após a captação da água bruta, um sistema de pré-oxidação com dióxido de cloro; coagulação; fluoretação com ácido fluossilícico e fluossilicato de sódio; filtração direta descendente e cloro gasoso na desinfecção, para posterior distribuição. Essa ETA é

responsável pelo abastecimento de Fortaleza e quase toda a região metropolitana (FORTALEZA, 2014; SAMPAIO, 2016).

O tratamento de águas de abastecimento deve garantir a pureza das águas, por sua vez, deveria garantir a remoção de compostos químicos, como os agrotóxicos. Sendo a poluição das águas por agrotóxicos um problema de âmbito mundial, constituindo um risco tanto para a qualidade da água como para a saúde humana. No entanto, as etapas de tratamento produzem apenas remoção parcial desses compostos, por vezes não sendo o suficiente para configurar as águas de abastecimento baixos níveis de concentração de agrotóxicos. O que indica a necessidade de novos estudos nessa área, buscando viabilizar novas técnicas de remoção desses compostos e estudando a formação de subprodutos e as características desses (PEREIRA *et al.*, 2018).

3.2 Agrotóxicos e sua atividade poluidora

A legislação brasileira descreve agrotóxicos como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados a diversas etapas do sistema de produção agrícola, com a finalidade de alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (PARANÁ, 2018).

Os pesticidas podem ser classificados com base do seu uso, fase da vida da praga a ser controlada, grupo químico, modo de entrada, modo de ação e formulação. No entanto, a classificação mais comum correlaciona os pesticidas com as pragas a serem controladas, por exemplo- fungicidas (usado para o controle de fungos), inseticidas (usado para o controle de insetos), etc. Outra classificação comumente empregada utiliza o grupo químico ao qual o pesticida pertence, os mais comuns são- organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e atrazinas (PICO, BLASCO e FONT, 2004).

O Brasil possui um alto potencial agrícola, sendo muito característica a agricultura tradicional, devido a isso os agrotóxicos são considerados extremamente relevantes no modelo de desenvolvimento da agricultura no país (ABRASCO, 2015). No entanto, o uso de agrotóxicos tem merecido atenção da comunidade científica, dos órgãos governamentais e da sociedade civil em todo o mundo, devido aos graves efeitos tóxicos na saúde humana associados à sua utilização, sobretudo nos países em desenvolvimento onde o impacto à saúde tem sido mais relevante (SOUZA e ARMADA, 2015; MILHOME *et al.*, 2019).

Preocupações sobre a presença de pesticidas em diferentes corpos de água aumentaram acentuadamente nos últimos 25 anos, depois de algumas delas terem sido

encontradas em águas subterrâneas destinadas ao consumo humano nos EUA. Desde então, numerosas campanhas de monitoramento mostraram o potencial dos pesticidas para contaminar as águas superficiais, águas subterrâneas e água potável (CASADO, SANTILLO e JOHNSTON, 2018).

A razão para a presença de pesticidas em todos estes corpos hídricos é que, após a aplicação em campos agrícolas, os pesticidas podem ser transportados por escoamento para águas superficiais, através do processo de lixiviação, onde esses constituintes químicos podem ser levados pela água através do solo para as águas subterrâneas. Além disso, os agrotóxicos podem ser carregados pelas águas fluviais por longas distâncias, causando contaminação na fauna e na flora (MARQUES *et al.*, 2019; CASADO, SANTILLO e JOHNSTON, 2018).

Não existe uso de agrotóxicos sem a contaminação do meio ambiente onde ele é aplicado, e conseqüentemente, sem afetar as pessoas que trabalham ou vivem neste entorno. Pelo menos 30% dos agrotóxicos pulverizados não atinge o alvo desejado. Quando a aplicação é realizada através da pulverização aérea, estima-se que em torno de 70% da solução de agrotóxico aplicado não atinge o alvo desejado, estando passível de contaminar todo o entorno da plantação (LONDRES, 2011).

Como citado anteriormente, a contaminação de água potável por agrotóxicos é uma realidade atual. O estudo realizado por Klarich *et al.* (2017), detectou a presença de pesticidas piretróides (clotianidina, imidacloprido e tiametoxam) em concentrações maiores que 57 ng/L em amostras de água coletada do sistema de tratamento de água potável da Universidade de Iowa nos EUA.

Barreto (2006), realizou um estudo no município de Tianguá, no Ceará, sobre a contaminação por três diferentes pesticidas (atrazina, simazina e parationa metílica) das águas subterrâneas do local. O estudo constatou a presença desses compostos em 82% das 153 amostras analisadas. Das amostras analisadas quantitativamente, foram encontradas 17 amostras com atrazina; 21 amostras com simazina e 14 amostras com parationa metílica, todas com dosagens superiores ao permitido pela legislação (atrazina- 2 µg/L; simazina- 2 µg/L e parationa metílica- 9 µg/L).

No Brasil a política adotada pelo Ministério da Saúde para controlar a qualidade da água a ser consumida pela população está baseada no estabelecimento de valores máximos permitidos (VMPs), exigindo o monitoramento da rede de abastecimento de águas, a qual é

controlada atualmente pela Portaria de consolidação nº5, de 28 de setembro de 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

3.3 Toxicidade dos agrotóxicos e política governamental

O efeito tóxico dos pesticidas varia de acordo com o grupo químico em que se enquadram. Os organoclorados, por exemplo, são apontados por causarem efeitos tais como o câncer, danos ao sangue, rim e fígado. Além disso, atuam sobre o sistema nervoso central, e estudos apontam evidências que demonstram a associação positiva entre a exposição de recém-nascidos a organoclorados e distúrbios do desenvolvimento neurológico, incluindo desenvolvimento psicomotor prejudicado, perda de memória, ansiedade e autismo (SARAVI e DEHPOUR, 2016; MOAWED e RADWAN, 2017). No entanto, devido a sua toxicidade e considerando a persistência ambiental esses pesticidas foram sendo substituídos pelos organofosforados e carbamatos que vêm sendo muito utilizados (SILVA, 2015; PATEL, RAWTANI e AGRAWAL, 2019).

Os organofosforados atuam na fosforilação da enzima acetilcolinesterase (AChE) nas terminações nervosas. Com o bloqueio da enzima, o órgão efector torna-se superestimulado pela acumulação do neurotransmissor acetilcolina (ACh), a substância que transmite o impulso nervoso. Esse efeito ocasiona salivação excessiva, fraqueza muscular, coma e em casos de exposição extrema até o óbito (PATEL, RAWTANI e AGRAWAL, 2019). Os carbamatos atuam de maneira similar aos organofosforados inibindo a enzima AChE, no entanto, a inibição apresenta curta duração, provavelmente pela maior instabilidade das moléculas de carbamato. Depois dos organoclorados, os organofosforados são os pesticidas mais nocivos aos seres humanos e outros mamíferos. Estes são comumente utilizados como inseticida, no entanto, é comum observar agrotóxicos que possuem mais de um tipo de ação (SILVA, 2015).

Milhome et al., (2019), desenvolveram um método multiresíduo para análise de pesticidas em farinha de milho. Ao analisar amostras de farinha de milho comercializadas no estado do Ceará, foi encontrada a presença de fenitrotiona, um organofosforado de classificação toxicológica nível II, com aplicação permitida na cultura do milho. O agrotóxico fenitrotiona foi encontrada em 20% das amostras analisadas, no entanto, em concentrações menores dos que as permitidas pela ANVISA (1,0 mg/kg).

Quando os pesticidas são aplicados de maneira inadequada nas culturas, sem a condução das Boas Práticas Agrícolas, resíduos destes compostos tóxicos podem persistir no meio ambiente, nas águas superficiais e subterrâneas, como também nos frutos e hortaliças, gerando uma rota de exposição humana via alimentação (exposição dietética). Para que haja garantias da segurança alimentar da população é necessário o monitoramento eficiente dos teores residuais de pesticidas nos alimentos consumidos, de maneira que órgãos e agências de regulação nacionais e internacionais têm implementado diretrizes estritas e programas para monitorar a presença destes compostos em alimentos (APWR, 2019; GREENPEACE, 2017).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), anunciou no dia 23 de setembro de 2019, um novo marco regulatório para a classificação de risco de agrotóxicos. O marco utiliza o 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. Além disso, 53 países já realizaram a implementação total e 12 países a implementação parcial. O marco regulatório consolidado em 2019, já havia sido publicado como consulta pública em 2011, 2015, 2016 e 2018 mostrando que a ANVISA já tinha interesse em aderir o GHS (ANVISA, 2019).

Com o novo marco regulatório têm-se 6 classificações de agrotóxicos, diferente das 4 classificações utilizadas anteriormente. A nova classificação só considera um produto “extremamente ou altamente tóxico” se o mesmo apresentar risco de morte na ingestão ou em contato com a pele e/ou os olhos. Enquanto a classificação utilizada anteriormente, permitia a classificação de produtos que não apresentavam risco de morte, mas causavam severos danos a saúde se ingerido ou em contato com a pele e/ou olhos, como “extremamente ou altamente tóxico” (ANVISA, 2019).

O novo perfil de segurança dos agrotóxicos fornecido pela ANVISA, onde se divide a escala em seis diferentes classificações e através das cores, segundo GHS, está expresso na Tabela 1. Os pesticidas classificados como 1 e 2 são considerados conhecidos, presumidamente ou possíveis indutores de mutações em células germinativas de seres humanos, podendo causar graves doenças ou a morte. Devido a isso, pertencem a classificação mais danosa (ANVISA, 2016).

Tabela 1-Classificação agrotóxicos.

Classe	Classificação	Cor da faixa da embalagem
1	Extremamente tóxico	Vermelho

2	Altamente tóxico	Vermelho
3	Moderadamente tóxico	Amarela
4	Pouco Tóxico	Azul
5	Improvável de Causar Dano	Azul
6	Não Classificado	Verde

Fonte- Anvisa, 2016

Dos 2.201 agrotóxicos registrados no Brasil que estão no mercado, a ANVISA já recebeu dados para reclassificação de risco de 1.981 produtos. Para o Greenpeace isso representa um “afrouxamento” da lei. Do total de produtos liberados até o momento pelo governo em 2019 (290), 41% são considerados extremamente ou altamente tóxicos e 32% são proibidos na União Europeia. Podemos citar como exemplo, o agrotóxico 2,4-D, um herbicida classificado como extremamente tóxico e provável carcinogênico. Outro agrotóxico que pode ser citado é o imidacloprido, classificado como altamente tóxico. É nocivo a abelhas e outros polinizadores (APRW, 2019; GREENPEACE, 2019; ANVISA, 2019).

As abelhas são insetos que além de produzirem grande quantidade de mel, possuem grande importância polinizadora. Esses insetos tornaram-se importantes indicadores para a avaliação da presença de contaminação por agrotóxicos, podendo monitorar grandes áreas devido às longas distâncias percorridas. As abelhas visitam as culturas contaminadas e podem transportar os agrotóxicos para dentro das colmeias, causando o abandono de colônias, bem como a mortalidade da maioria das abelhas. Na União Europeia, o uso de neonicotinóides em culturas atraentes para abelhas foi temporariamente suspenso, devido a sua alta toxicidade. Na França, por exemplo, o imidacloprido é proibido em sementes de girassol e milho desde 1999 (ALCANTARA et al., 2019).

O plantio realizado em determinada região interfere diretamente no tipo de agrotóxico que será mais utilizado na mesma. No estado do Ceará, mais especificamente no Vale do Jaguaribe as culturas predominantes em área de plantio são arroz, banana, milho e feijão, ao passo que os princípios ativos abamectina, alfa-cipermetrina, ametrina, atrazina, clorotalonil, clorpirifós, diuron, glifosato, imidacloprido, tiofanato-metílico e trifloxistrobina são mais frequentemente usados nos produtos agrícolas. A bacia hidrográfica do rio Jaguaribe ocupa uma área de 74.621 km², quase 48% do território cearense, e é subdividida em cinco sub-bacias- Salgado, Alto Jaguaribe, Médio Jaguaribe, Baixo Jaguaribe e Banabuiú (MILHOME et al., 2009; GAMA, OLIVEIRA, CAVALCANTE, 2013).

Estudos avaliaram o potencial de contaminação por agrotóxicos de águas superficiais e subterrâneas na região do Baixo Jaguaribe, a qual representa importante área de agronegócio do estado do Ceará. Esses estudos indicaram que alguns pesticidas têm alto

potencial de contaminação para águas subterrâneas, tais como atrazina, imidacloprido, metolacloror, nicosulfuram, tiametoxan, azoxistrobina, 2,4 D, metamidofós, propiconazole e triazofós. Também apresentaram alto risco de contaminação de águas superficiais pelo transporte dissolvido em água, os pesticidas atrazina, azoxistrobina, fenitrotion, imidacloprido, lambda-cialotrina, metolacoloro, paration metil, tiametoxan e triazofós (MILHOME et al., 2009).

Tendo em vista os fatos apresentados, os inegáveis riscos a saúde dos agricultores e consumidores associados a utilização de agrotóxicos, se faz necessário iniciativas que visem diminuir e/ou monitorar a utilização desses produtos. Neste sentido, cabe incentivar o consumo de produtos orgânicos, os quais possuem grande potencial para aumento de produção no território brasileiro. Adicionalmente se tem o quesito preventivo, no sentido de sensibilizar os agricultores para a diminuição da utilização desses compostos. Neste entorno, é essencial que haja também maneiras de monitoramento viáveis para o acompanhamento da contaminação por resíduos de agrotóxicos, levando em consideração a pluralidade de agrotóxicos utilizados.

O Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (2011), alerta que devido à grande diversidade de agrotóxicos empregados na agricultura, os procedimentos analíticos multirresíduos são especialmente recomendáveis quando se trata de identificação e quantificação de resíduos em matrizes complexas (MAPA, 2011).

3.4 Métodos de Extração de Resíduos de Pesticidas

Na maioria das análises químicas, se faz necessário uma etapa de preparo de amostras. Essa etapa constitui uma das mais importantes da análise sendo capaz de envolver o maior número de erros. No entanto, a mesma se faz indispensável nas conjunturas atuais, principalmente tratando-se de amostras ambientais, como no caso da análise de pesticida em matrizes aquosas (OSHITA e JARDIM, 2015).

Além da extração dos analitos, a etapa de preparo da amostra envolve a concentração da amostra em relação aos analitos estudados, sobretudo quando se trabalha a baixas concentrações, a nível de traços como é o caso das análises de pesticidas em água. Ainda nesta etapa é possível a redução dos interferentes, melhorando a qualidade da análise (TOFFOLI e LANÇAS, 2015; OSHITA e JARDIM, 2015).

Existem várias técnicas de extração de pesticidas em alimentos descritas na literatura, sendo as mais utilizadas- extração líquido-líquido, Extração em Fase Sólida do

inglês “*Solid Phase Extraction*” (SPE), dispersão da matrix em fase sólida (MSPD), microextração em fase sólida (SPME) e a técnica QuEChERS quando se fala de matrizes de frutas e vegetais (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARAN, 2018). Entretanto, somente o método SPE será explorado a seguir.

3.4.1 Método de Extração em Fase Sólida – SPE

Visto a complexidade das amostras de água combinada aos baixos níveis de concentração dos analitos, faz-se necessário uma etapa de preparo da amostra antes da determinação instrumental. Para a análise multiressíduos de agrotóxicos em água, a SPE é a técnica de preparo de amostras mais aplicada (DONATO *et al.*, 2015).

A SPE é uma das mais poderosas técnicas de preparação de amostras atualmente utilizadas. A técnica possui um alto potencial de automação, seletividade e flexibilidade para o uso (CHROMACADEMY, 2010).

A SPE tem suas raízes comerciais no final dos anos 70. Desde então, tornou-se comum e vem sendo utilizada como uma técnica eficaz para extrair analitos de amostras complexas (PICO, BLASCO e FONT, 2004).

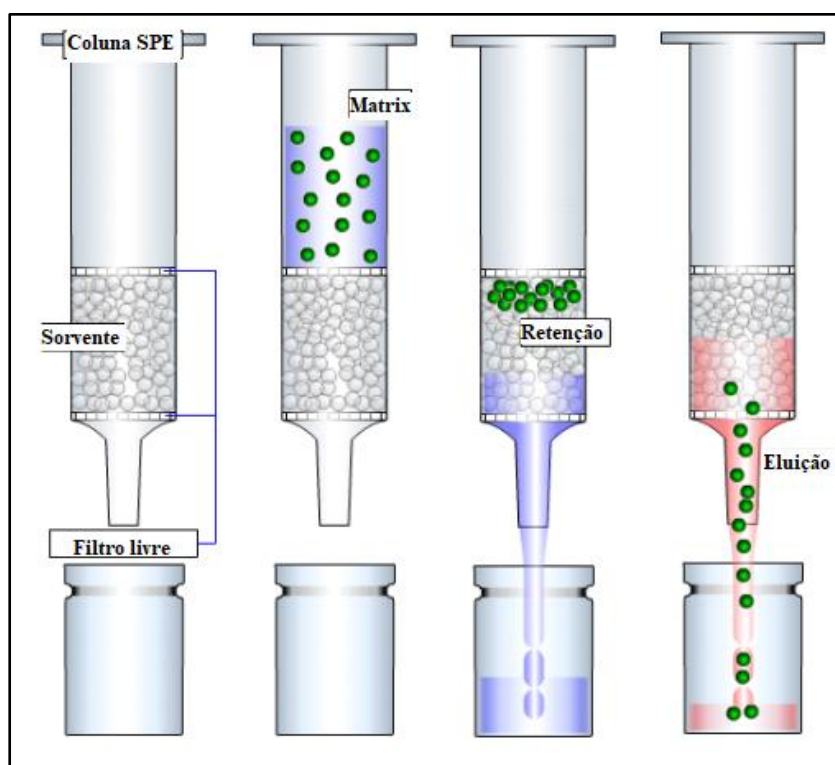
Yoshimura, *et al.* (1976), iniciaram o primeiro trabalho utilizando a técnica de SPE para extração e concentração de metais em água provinda de fontes naturais. Desde então, a técnica foi sendo aperfeiçoada, até chegar ao quadro atual, onde se têm diferentes sorventes, tornando possível a análise de analitos de diferentes polaridades.

A técnica SPE é extensamente usada para extrair analitos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas. Consiste em isolar os analitos presentes em uma matriz complexa, por meio de uma fase sólida, chamada sorvente. As interações entre os compostos da amostra e o sorvente podem ocorrer via interações de van der Waals (forças de dispersão), dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, ligações de hidrogênio e interações iônicas (troca iônica). Quanto ao mecanismo de retenção, a extração pode se dar por adsorção, partição, troca iônica, etc. Essa técnica tem sido amplamente utilizada para remover ou concentrar traços de compostos orgânicos a partir de amostras líquidas (ZINI, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Pico, Blasco e Font, (2004), relatam que, tradicionalmente a SPE é encontrada na execução do tratamento de amostras de água (100-1000mL) através de um sorvente (100-500mg) colocado em uma coluna, seringa, cartucho ou disco. Os pesticidas são eluídos com

10–15 mL de um solvente orgânico apropriado que pode ser evaporado e concentrado a um volume adequado (Figura 1). A SPE também pode ser usada para reter interferentes, permitindo que os analitos passem sem serem retidos através do sorvente. Mais de 10 anos depois, pode-se observar que a técnica de SPE em sua essência continua a mesma, no entanto, devido aos avanços tecnológicos, podem ser encontrados valores bem menores para as massas de sorvente e os volumes de eluição utilizados (NASCIMENTO *et al.*, 2018; DONATO *et al.*, 2015; CHROMACADEMY, 2010).

Figura 1- Resumo do método de extração em fase sólida.



Fonte- Chromacademy, 2010. Modificada pela autora

A técnica de preparo de amostras através da extração líquido-líquido é a que mais se assemelha a SPE, em termos de finalidade. No entanto, observa-se que a SPE apresenta vantagens na sua utilização, como- menor consumo de solvente orgânico, não formação de emulsões, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, volumes reduzidos de resíduos tóxicos, capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de muitos equipamentos e sorventes para SPE, permitindo uma maior adequabilidade da análise a diferentes tipos de analito. Como desvantagens da SPE pode-se citar o alto custo dos materiais utilizados para a análise (cartuchos e manifold), a baixa reutilização dos cartuchos, a eventual dificuldade em selecionar o sorvente adequado

para os tipos de analito e a dificuldade em obter reprodutibilidade com cartuchos de lotes diferentes (JARDIM, 2010; TOFFOLI e LANÇAS, 2015).

As etapas da extração na SPE resumem-se no pré tratamento da amostra, na ativação e equilíbrio do sorvente, na introdução da amostra através da fase sólida/retenção dos analitos no sorvente, eliminação dos interferentes da matriz e eluição dos compostos de interesse, onde se obtém a concentração dos analitos (ZINI, 2016).

O pré-tratamento da amostra é por vezes necessário para o bom rendimento da extração por SPE. Um dos fatores mais importantes a serem analisados é o pH da amostra, devido a interação dos analitos com o sorvente variar dependendo da espécie presente. Essa variação pode ser dramática no caso de substâncias iônicas. Nesse caso, para substâncias aniônicas observa-se melhor rendimento em pHs mais ácidos (CASADO, SANTILLO e JOHNSTON, 2018).

Wang, et al., (2019), estudaram a melhor faixa de pH para o pré-tratamento de amostras de alguns pesticidas e seus produtos de degradação em água, utilizando uma fase HLB modificada na SPE para o preparo de amostras e a LC-MS para a quantificação das amostras. Foi observado que para os compostos Ametrina, Prometon, Dimetoato, Carbendazim e Tebuconazol a máxima eficiência de extração se deu a um pH de 3,0 ou 4,5, enquanto um pH de 6,0 causou uma diminuição significativa na adsorção. Esses resultados foram atribuídos ao fato de que esses compostos se tornam mais hidrofóbicos em soluções neutras, resultando em uma forte retenção de fase reversa nos sorventes.

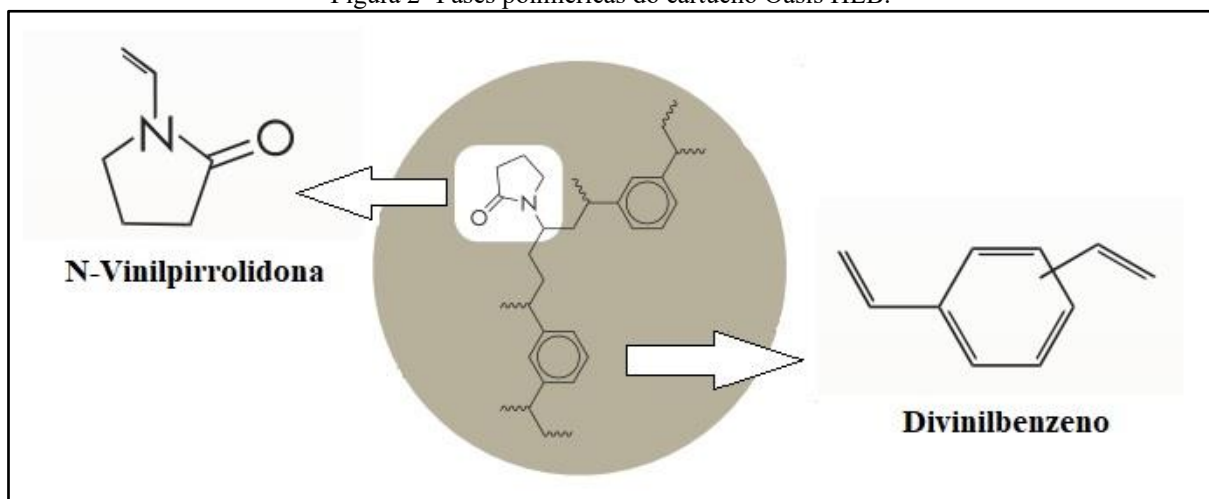
A escolha do sorvente utilizado é uma etapa delicada na técnica de SPE, pois é necessário que haja compatibilidade entre a fase sólida e o analito. Os dois tipos de fases sorventes mais comuns, são com a base de sílica e polímeros (CHROMACADEMY, 2010; DONATO *et al.*, 2015).

O sorvente a base de sílica possui a sílica ativada em seu substrato, onde um grupo funcional é ligado. O grupo funcional transmite para a fase as capacidades retentivas primárias, embora a sílica base também desempenhe um papel ativo em muitas extrações. Comercialmente, existem diversos sorventes a base de sílica disponíveis, entre eles, a C18, C8, fenilo, etc (CHROMACADEMY, 2010).

Os sorventes poliméricos também estão amplamente disponíveis abrangendo um amplo espectro de polaridades. Os sorventes mais frequentemente utilizados são os apolares, usualmente os copolímeros são a base de estireno-divinilbenzeno, as vezes modificados para criar sorvente de troca iônica. Outros polímeros incorporam grupos funcionais polares no

polímero, o que torna o polímero molhável e oferece possibilidades adicionais para mecanismos de retenção. A Figura 2 apresenta um exemplo de sorvente polimérico, pertencente ao cartucho Oasis HLB da marca Waters (EUA), contendo n-vinilpirrolidona (fase hidrofílica) e divinilbenzeno (fase lipofílica) (CHROMACADEMY, 2010).

Figura 2- Fases poliméricas do cartucho Oasis HLB.



Fonte- Waters, 2017 modificado pelo autor.

Vidal et al., (2015) ao estudar a concentração de desreguladores endócrinos em amostras de águas residuais por SPE, relataram a maior eficiência e capacidade seletiva dos sorventes poliméricos (Oasis HLB e Strata-X) na extração e concentração dos desreguladores endócrinos estudados. Essa capacidade de concentração é de suma importância, visto que mesmo na utilização de técnicas sensíveis como a HPLC, a concentração dos analitos permite menores limites de quantificação em análises de nível traços.

O tamanho das partículas da fase sorvente interferem diretamente na velocidade do fluxo, pois, dependendo do tamanho da partícula será necessária uma maior pressão para que haja um fluxo aceitável para a análise. O tamanho da partícula da coluna SPE varia de 8–70 microns, mas as de uso mais comum estão em torno de 40-60 microns. Outra característica importante da fase sorvente é o tamanho dos poros das partículas. O uso de sorventes com pequenas porosidades (por exemplo, 60 Angstroms) tem o benefício de uma área superficial muito alta, fornecendo alta capacidade de retenção do analito na fase sorvente (CHROMACADEMY, 2010).

Em amostras possuindo analitos com diferentes características, como as análises multiresíduo de pesticidas, têm sido utilizado cartuchos com fases poliméricas. Donato *et al.*

(2015), observaram que se obtém melhor recuperação para pesticidas com características polares utilizando sorventes poliméricos, quando comparados com fases apolares, como o octadecilsilano (C18).

A etapa de ativação do cartucho é de suma importância para o condicionamento do sorvente com o solvente adequado, a fim de ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra. Para isso, recomenda-se utilizar o mesmo solvente para ativar o cartucho e para fazer a eluição do analito (JARDIM, 2010; ZINI, 2016). Casado, Santillo e Johnston, (2018) observaram resultados similares utilizando acetonitrila e metanol na eluição de pesticidas em análise de água. Devido a menor toxicidade do metanol, ele foi escolhido como solvente de trabalho.

Logo após o condicionamento do cartucho é necessário realizar uma etapa de equilíbrio da coluna de SPE, para simular o mais próximo possível o ambiente da amostra. Isso é necessário para que as características químicas da amostra não alterem o ambiente de extração ao longo da aplicação da amostra. Se o sorvente não for adequadamente equilibrado, com o pH da amostra por exemplo, pode ocorrer ruptura dos analitos, gerando resultados irreprodutíveis e pobres recuperações de analitos (CHROMACADEMY, 2010).

A velocidade do fluxo da amostra é de extrema importância, pois o tempo de permanência dos analitos no sorvente de extração deve ser suficiente para a interação cromatográfica necessária. Este procedimento é tradicionalmente conduzido com o auxílio de uma pipeta, com a percolação da amostra através da fase sorvente, sendo potencializada pela aplicação de um sistema de vácuo. O volume de amostra pode variar na faixa de litros a microlitros (CHROMACADEMY, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2018)

Como a interação do analito e do sorvente são espacialmente dependentes, a aplicação da amostra com um fluxo muito alto, ou seja, baixo período de permanência do analito em contato com o sorvente, pode resultar em percas do analito devido a rupturas. Por isso, a introdução da amostra deve ser feita de maneira lenta, com vazões ajustadas para valores abaixo de 2 mL/min, proporcionando extrações reprodutíveis (CHROMACADEMY, 2010; LANÇAS, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2018).

O solvente de lavagem geralmente é uma versão do solvente de eluição mais diluída com um solvente miscível. O solvente de lavagem deve ser tão forte quanto possível para retirar os interferentes da amostra que possam dificultar o resultado da análise e não eluir o analito (NASCIMENTO *et al.*, 2018).

O solvente de eluição deve ser forte ao ponto de romper com todas as interações existentes entre os grupos funcionais do analito e os grupos funcionais do sorvente. Um solvente que apresente baixa força de eluição resultará em pobres recuperações e em análises irreprodutíveis. No entanto, o solvente de eluição não deve ser forte o bastante para retirar interferentes fortemente ligados a coluna SPE. A adequação do eluente está diretamente relacionado à polaridade dos compostos a serem extraído (DONATO *et al.*, 2015). Shamsipur, Yazdanfar e Ghambarian (2016), ao desenvolverem um método de extração SPE para análise de pesticidas em água, leite, mel e suco de frutas, testaram como solvente de eluição- acetona, THF, acetonitrila, etanol e metanol. O metanol se mostrou o solvente mais eficaz para a eluição dos pesticidas estudados, que apresentam características apolares.

Após a eluição dos analitos pelo solvente escolhido, se o extrato obtido é compatível com a técnica cromatográfica utilizada, e não é necessário realizar a secagem e ressuspensão, o extrato pode ser injetado diretamente no cromatógrafo. No entanto, a etapa de secagem e ressuspensão é comumente utilizada, visto que permite utilizar um maior volume na etapa de eluição, garantindo uma maior recuperação dos analitos, e posteriormente um extrato mais concentrado pode ser obtido.

Visando uma melhor eficiência do método de extração, por vezes, são realizados estudos de otimização, buscando o aprimoramento de alguns parâmetros utilizados na metodologia escolhida para a análise. Desta forma, têm se maior segurança na qualidade do método desenvolvido.

3.5 Planejamento experimental

Os estudos de combinações fracionárias têm sido muito utilizados em pesquisas de diversos campos da tecnologia industrial, química, biologia, medicina etc. Esses estudos são realizados com o objetivo de reduzir o número de experimentos e proporcionar uma ampla visão dos dados gerados na pesquisa. Grandes avanços nesse âmbito se deram com o trabalho de Box e Wilson (1951), que introduziram o planejamento composto central (PCC) (SILVA, 2014).

Experimentos delineados em esquema fatoriais são aqueles que envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais fatores, considerando fatores as variáveis independentes que tiverem seus níveis fixados de acordo com o interesse do pesquisador. Se

todas as combinações possíveis, entre os níveis de cada fator estão presentes, o esquema fatorial é dito completo (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

Planejamentos fatoriais são úteis para medir as influências de uma ou mais variáveis na resposta de um experimento. O mais comum é realizar um planejamento com dois níveis, no máximo três. Visto que o uso de mais níveis aumentaria bastante o número de pontos experimentais, fato esse que se quer evitar quando se propõe um planejamento (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Considerando um planejamento fatorial de apenas dois níveis, sendo eles- (+) alto e (-) baixo, temos um esquema fatorial de 2^k , onde k é o número de fatores estudados. Se apenas dois fatores são estudados, tem-se um fatorial 2^2 . Gerando um total de 4 experimentos. A medida que se aumenta o número de fatores aumenta-se exponencialmente o número de experimentos para a realização de um esquema fatorial completo (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

Para tornar possível a execução, ao menos aproximada, da inferência estatística, é usual que sejam feitos alguns ensaios no ponto central do espaço experimental, viabilizando as estimativas de intervalos, os cálculos de resíduos, erro puro, variância das respostas, além de evidenciar a qualidade da repetibilidade do processo (RODRIGUES e LEMMA, 2009; SOUSA, 2019).

Um PCC acontece quando se adiciona ao esquema fatorial com pontos centrais, os chamados pontos axiais. Há várias possibilidades para a escolha dos níveis nos pontos axiais, sendo adicionados sempre $\pm\alpha$ (valores somando e subtraindo α), é imprescindível que todos os pontos axiais adicionados sejam equidistantes do ponto central. O parâmetro α assume geralmente o valor $\alpha = (2^k)^{1/4}$, e é chamado de rotabilidade, pois é ele quem adiciona ao plano estudado a propriedade esférica, permitindo obter superfícies de resposta, tornando possível a otimização de processos (RODRIGUES e LEMMA, 2009; CALADO e MONTGOMERY, 2003; MATEUS, BARBIN E CONAGIN, 2001).

De maneira geral, em um PCC com 2 níveis originais, tem-se 2^k pontos fatoriais, $2.k$ pontos axiais e um número de pontos centrais que geralmente varia entre três a cinco pontos (RODRIGUES e LEMMA, 2009; CALADO e MONTGOMERY, 2003; SOUSA, 2019).

Hermann (2013), realizou um planejamento composto central 2^2 , ao otimizar um método de extração em fase sólida, que foi utilizado para extrair resíduos de pesticidas de águas superficiais e posteriormente analisado por GC-MS/MS. Foram otimizados os

parâmetros de pH e solvente de eluição, em diferentes tipos de sorventes. O método otimizado consiste na utilização do cartucho Oasis HLB 60 mg, amostra em pH 6,2 e para a eluição dos agrotóxicos uma solução de 45-55 (MeOH-DCM). Sabin (2007) ao desenvolver um método GC-MS-SPE para a determinação multirresíduo de pesticidas em água potável, realizou um planejamento experimental 2³, para otimizar os parâmetros de injeção da amostra no cromatógrafo gasoso, avaliando os parâmetros de pressão, temperatura e volume líquido injetado. Exemplos como esses, mostram a diversidade de aplicações possíveis para a utilização do planejamento experimental.

3.6 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

Com o avanço da tecnologia, a cromatografia líquida passou a ser conhecida como Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC do Inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”), devido a sua alta eficiência atingida na separação dos componentes (PACHECO *et al.*, 2015; COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

A HPLC permitiu a aplicação de bombas de pressão para o auxílio na promoção dos movimentos da(s) fase(s) móvel(s), bem como do(s) analito(s) através da coluna, influenciando assim na interação do(s) analito(s) com a fase estacionária e, conseqüentemente, na separação dos mesmos. Permitiu também a aplicação de diferentes tipos de detectores para receber o sinal analítico gerado, sendo processado em um software apropriado em computador e convertido em cromatograma (Samsidar, Siddiquee e Shaaran, 2018; Nascimento *et al.*, 2017). Devido aos avanços da técnica, há diferentes possibilidades para a montagem do equipamento, podendo esta ser utilizada de acordo com as necessidades do laboratório.

Para o desenvolvimento de um método cromatográfico fatores como a escolha da fase estacionária e a escolha da fase móvel utilizada, são etapas difíceis e cruciais no desenvolvimento do método. Devido à grande robustez e facilidade em sua utilização, as fases estacionárias reversas possuem grande destaque nesta área. Em cromatografia reversa, pesticidas de polaridade média, polar e iônica são separados de acordo com a diferença na hidrofobicidade. A maioria das fases estacionárias é baseada em sílica que foi quimicamente modificada com octadecil (C18) ou octil (C8), podendo ser encontradas diversas outras fases reversas, como a de cianopropil, fases poliméricas como a estireno-divinilbenzeno, dentre outras (PICO, BLASCO e FONT, 2004).

A fase móvel é importante para obter uma boa separação cromatográfica, mas também afeta a ionização do analito e a sensibilidade do espectrômetro de massas (MS). Alguns constituintes muito utilizados na fase móvel quando se trata de acoplamento com o MS, são o metanol e a acetonitrila. Essa grande utilização se deve ao fato de ambos apresentarem baixas tensões superficiais e constante dielétrica, o que promove uma evaporação iônica, favorecendo o processo de ionização (PICO, BLASCO e FONT, 2004).

É preferível o metanol a acetonitrila, quando o acoplamento do LC com o MS se dá através de um ionizador de eletrospray (ES), pois o metanol possui uma baixa força eluotrópica, fazendo com que os analitos precisem de uma alta porcentagem de fase orgânica para eluir, aumentando assim a sensibilidade da técnica. Outro fator que por diversas vezes auxilia na melhor ionização e sensibilidade é a adição de ácidos orgânicos como o ácido acético e o ácido fórmico (Pico, Blasco e Font, 2004). Aditivos de fase móvel não voláteis (como tampão fosfato), comumente usados em cromatografia, precisam ser evitados ao usar espectrometria de massas (HARRIS, 2007).

A LC é comumente aplicada como um método de separação e determinação de compostos considerados de alta polaridade e não-volátil e/ou termicamente lábeis. No entanto, se faz necessário a utilização de detectores acoplados ao cromatógrafo. Os detectores clássicos são comumente utilizados no acoplamento com a LC, como, detecção UV, detector de fluorescência e detector de matriz de diodos. Outro sistema de detecção que vêm sendo bastante utilizado é o MS, o qual apresenta alta sensibilidade e seletividade sem necessidade de derivatização (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARAN, 2018, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Técnicas mais sensíveis, como a aqui apresentada, foram desenvolvendo-se de acordo com as necessidades analíticas, como a de investigar resíduos de pesticidas em nível traços em alimentos, análise cada vez mais complexa devido à síntese e produção de novos ingredientes ativos de diferentes classes (NASCIMENTO *et al.*, 2017).

O LC-MS/MS foi recentemente aplicado em análise de nível traços para análise de pesticidas em músculo de peixes frescos. Visto a conhecida poluição de resíduos de pesticidas em água, viu-se a necessidade de investigar a presença desses compostos em animais aquáticos. Barbieri *et al.*, (2019) ao utilizar o sistema LC-MS/MS detectaram resíduos de diazinon, diclorvos, metolacloro, quinoxifeno, terbutrino, acetamiprido e diuron em peixes do rio Adige na Itália.

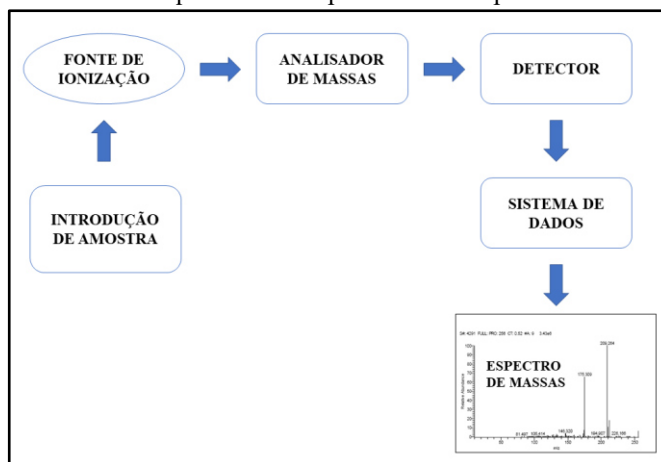
O sistema LC-MS/MS permite a obtenção de um sistema de identificação e

confirmação em um único sistema. Possibilitando uma análise sensível para métodos que visem analisar qualitativamente e quantitativamente resíduos de pesticidas em alimentos. Essa aplicação parece ser a metodologia mais aceita e vêm mostrando possuir um ótimo desempenho na análise de pesticidas de vários resíduos nos últimos anos (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARAN, 2018).

Segundo Alcântara et al., (2019) as classes de pesticidas carbamatos, organofosforados, neonicotinóides e piretróides são comumente analisadas por LC-MS/MS. Enquanto atualmente os organoclorados são mais analisados por GC-MS/MS, isto porque os organoclorados encontram maior sensibilidade na ionização por impacto de elétrons (IE), comum em cromatografia gasosa, do que na ionização por electrospray (ESI), comum em cromatografia líquida.

Existem diversos tipos de espectrômetros de massas, cada um com suas vantagens e limitações. Os componentes básicos de um MS são- sistema de injeção de amostras, fonte de íons, analisador, detector e sistema de dados, como ilustrado na Figura 3.

Figura 3- Resumo esquemático das partes de um espectrômetro de massas



Fonte- Autoria própria.

3.6.1 Sistema de injeção da amostra

A injeção direta da amostra no MS, ou seja, injetando a amostra direto na fonte de íons do espectrômetro sem separação prévia é uma técnica pouco utilizada atualmente, uma vez que o MS sozinho é melhor para a análise de compostos puros. No passado, o composto alvo era previamente isolado e então inserido diretamente através de uma sonda, processo lento e que dificultava a análise de impurezas em concentrações muito baixas (LANÇAS, 2009).

No entanto, o acoplamento das técnicas de cromatografia com o MS proporcionou a otimização desta etapa da análise. Este acoplamento proporcionou o requerimento de menores preparações de amostras, injeções mais rápidas e mais precisas. Através de loops de injeções manuais e sobretudo amostradores automáticos. De modo que, o sistema de injeção para o espectrômetro de massas é o próprio cromatógrafo líquido.

3.6.2 Fontes de ionização em LC

Inicialmente, o acoplamento do sistema LC-MS pareceu incompatível devido as características de ambos. Era necessário que o alto fluxo de fase móvel do LC fosse compatível com o alto vácuo do MS. Para isso foi necessário o uso de novas fontes de ionização que tivessem a sua utilização a pressão atmosférica (NASCIMENTO *et al.*, 2017; LANÇAS, 2009).

As principais fontes de ionização utilizadas no acoplamento do LC-MS são baseadas em Ionização por Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization* - API), como a Ionização por Eletrospray (*Electrospray Ionization* - ESI), Ionização Química a Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization* - APCI) e Fotoionização a Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization* - APPI).

Existem vários parâmetros instrumentais que exercem influências significativas na eficiência de ionização. Por este motivo se faz necessário uma otimização cuidadosa dos parâmetros do espectrômetro de massas para alcançar boa estabilidade, em qualquer fonte de ionização utilizada (PICO, BLASCO e FONT, 2004).

Essa otimização inclui parâmetros típicos como o potencial de ionização no sistema ESI e o potencial de descarga da agulha corona em APCI, as pressões de pulverização dos gases nebulizadores, a temperatura da interface e o “*clustering potential*” (Moraes e Lago, 2003). Além desses fatores, é importante a observância da fase móvel e os aditivos nela utilizados, visto que podem contribuir para o rendimento da ionização dos analitos. No caso da utilização de sistema MS/MS é necessário também a otimização da energia de colisão e pressão do gás de colisão (Pico, Blasco e Font, 2004). Esses parâmetros dependem das características específicas de cada sistema e analito, por isso eles devem ser determinados experimentalmente através da avaliação da sensibilidade e da fragmentação dos compostos alvo.

A fonte de íons é um dos principais componentes de um sistema LC-MS/MS, no

qual as substâncias de uma amostra são transformadas em íons (positivos ou negativos), que são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massa. O principal modo de ionização usado na análise de resíduos de pesticidas por LC-MS/MS é baseado em ionização por pressão atmosférica (API). Sendo as principais as análises por ESI e APCI (Silva et al., 2019). Todavia, somente será abordado a fonte de ionização ESI.

3.6.2.1 Ionização por eletrospray

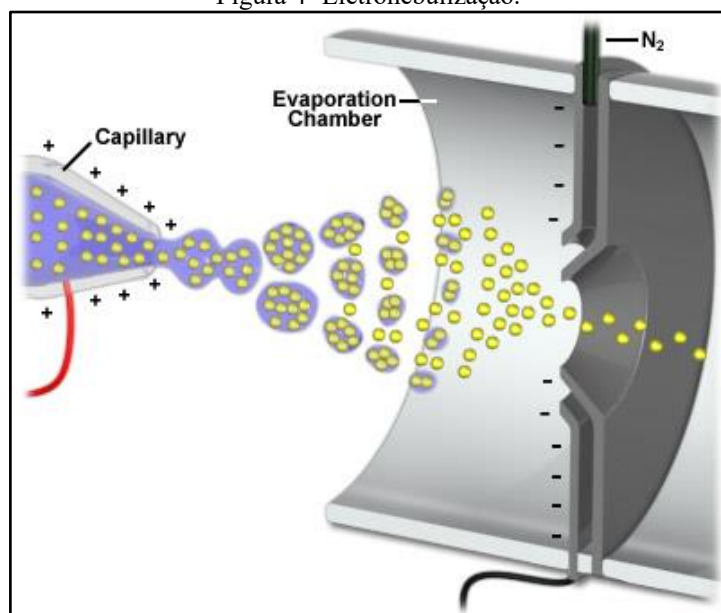
A ESI é uma fonte de ionização à pressão atmosférica utilizada para a análise em massa de compostos polares, incluindo polímeros biológicos (por exemplo, proteínas, péptidos, glicoproteínas e nucleotídeos), produtos farmacêuticos e seus metabolitos. Recentemente, a ESI teve seu uso associado também para a análise de moléculas polares de baixo peso molecular, tais como pesticidas (Nascimento *et al.*, 2017). A faixa de massas ideal para a análise com ESI é de 50 a 500 Da (unidade de massa atômica- u.m.a ou Da), gerando uma ionização branda com pouca fragmentação comparada a outros métodos de ionização, como a ionização por impacto de elétrons (IE) (SILVERSTEIN, 2013).

Uma das principais vantagens da ESI sobre outras técnicas é que a dessolvatação (Figura 4) ocorre gradualmente em temperaturas relativamente baixas (tipicamente, de temperatura ambiente até 80 °C), de forma a não gerar fragmentos. Isto só é possível se houver o controle adequado entre os potenciais da região do cone de amostragem e o “skimmer”, desse modo evita-se a ocorrência de dissociação induzida por colisão (CID) na fonte de ionização (fragmentação do analito na fonte de ionização devido a impacto sofrido com o gás de secagem). Assim, muitos dos íons gerados na fase gasosa mantêm a mesma estrutura e carga das espécies em solução, o que é perfeito para análise de espécies não voláteis (MORAES e LAGO, 2003).

A ionização por eletrospray gera íons a pressão atmosférica ao invés de vácuo. Para a geração dos íons, normalmente as amostras são dissolvidas em um solvente, frequentemente, não polar, introduzida a um tubo capilar feito de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3 a 5 kV. O resultado desse processo é a formação de um aerossol que passa por uma etapa de secagem, feita por um fluxo contínuo de gás, geralmente o nitrogênio (N₂), onde ocorre a dessolvatação das gotículas do aerossol. À medida que o solvente é evaporado, as cargas do aerossol ficam mais próximas, até o ponto da repulsão de Columb ser maior que a tensão superficial da gotícula, ocorrendo uma “explosão”

coulômbica, formando íons ainda menores que os iniciais. Esse processo tende a se repetir até que se tenha a formação de apenas um íon do analito (LANÇAS, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Figura 4- Eletronebulização.



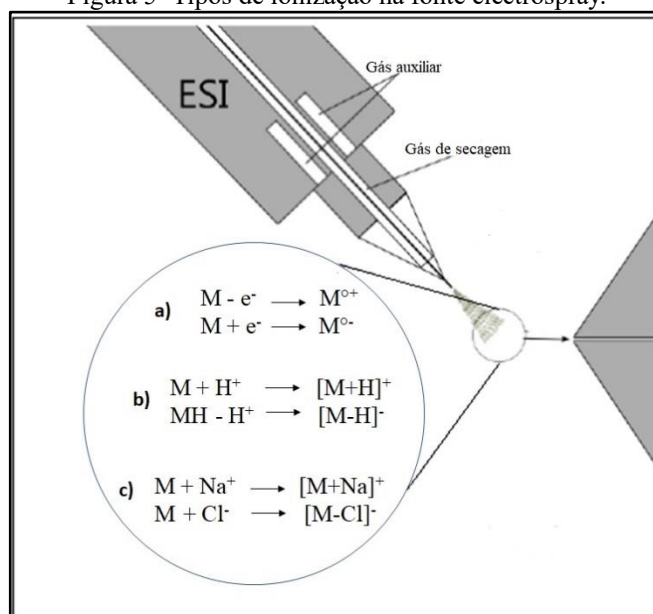
Fonte- NETO, 2015.

A velocidade do fluxo da fase móvel é significativamente importante para o processo de ionização em ESI, pois o potencial elétrico aplicado no capilar metálico (kV) promove a migração de cargas para a interface capilar/solução (figura 4), formando uma dupla camada elétrica. Este processo resulta na formação de gotas com superfícies carregadas, que resultará nas espécies dos analitos ionizadas. A velocidade do fluxo está intimamente ligada a organização da camada elétrica que se forma na interface capilar/solução. Portanto, quanto menor for o fluxo, maior será o tempo de residência das espécies neutras na interface capilar/solução e, conseqüentemente, as reações de oxidação das espécies presentes em solução poderão ocorrer em maior extensão (CROTTI *et al.*, 2006).

Existem três possibilidades para as ionizações das moléculas por eletrospray. São elas- íons moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas e moléculas cationizadas ou anionizadas. Os íons moleculares (M^{+} ou M^{-}) são formados na fonte de íons, quando ocorrem reações de oxidação e redução (Figura 5a). São formadas moléculas protonadas ou desprotonadas ($[M+H]^{+}$ ou $[M-H]^{-}$, respectivamente) através de reações ácido/base (Figura 5b). As moléculas ionizadas (cationizadas ou anionizadas), são formadas através de reações de coordenação (Figura 5c). As moléculas catiônicas são coordenadas com metais (sobre tudo

do grupo 1A), levando a geração de cátions como $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, enquanto a geração de ânions ocorre, sobretudo, com cloretos ($[M+Cl]^-$), ambos podendo estar presente nas fases móveis devido as impurezas. As reações de coordenação podem ocorrer através da coordenação com algum ativo da fase móvel que esteja propositalmente presente, como é o caso de soluções com sais de amônia, que permitem a coordenação $[M+NH_4]^+$ (CROTTI *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Figura 5- Tipos de ionização na fonte electrospray.



Fonte- Autoria própria

Barbieri *et al.*, (2019) ao analisar 52 pesticidas em tecidos de peixe provenientes da Itália, utilizaram a fonte de ionização ESI obtendo íons protonados e desprotonados, utilizando os modos de ionização positivo e negativo para a identificação dos analitos. Já Silva *et al.*, (2019), obteve apenas ionização no modo positivo. No entanto, alguns compostos, sobretudo piretróides apresentaram coordenação com o íon amônia presente na fase móvel.

Silva *et al.*, (2019) desenvolveu um estudo comparativo entre as fontes de ionização ESI e APCI, foi desenvolvido um método para análise de 22 pesticidas em repolho em cada fonte de ionização. Nas duas fontes de ionização foi possível obter boa seletividade e linearidades adequadas, no entanto, obteve-se respostas com maior sensibilidade utilizando a fonte ESI, obtendo menores limites de quantificação. Por esse motivo o método desenvolvido em ESI-LC-MS/MS mostrou-se mais eficiente na análise das amostras.

3.6.3 Analisadores de massas

Dentre os componentes do espectrômetro de massas, o analisador de massas é um dos mais importantes, pois, ele tem como finalidade, selecionar e/ou separar os íons gerados na fonte de ionização de acordo com a relação massa/carga (m/z) de cada analito. Os analisadores possuem mecanismo de ação diferentes entre eles, assim como suas vantagens e limitações. Cabe ao analista verificar qual o melhor analisador a ser utilizado na análise (LANÇAS, 2013).

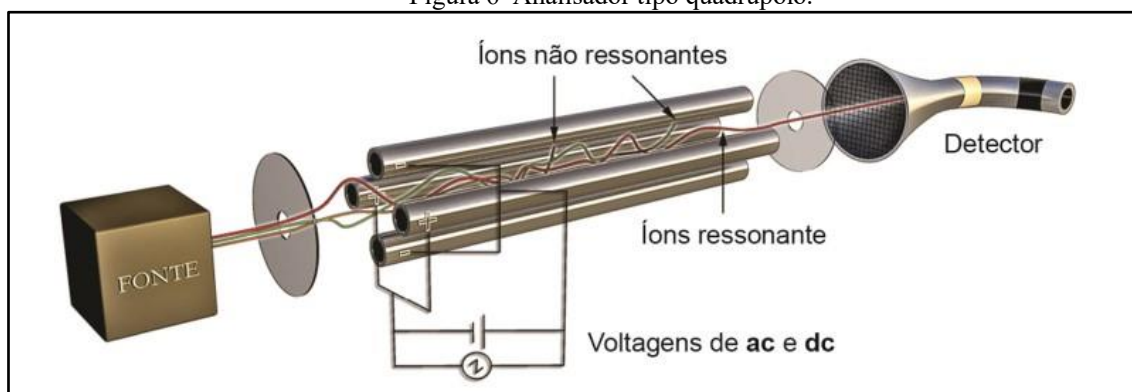
Os analisadores de massas comumente usados no sistema LC-MS são-Quadrupolo (Q), Armadilha de Íons (*Ion Trap* -IT) e o Tempo de Voô (*Time of Flight* – TOF) (Harris, 2007). Entretanto, somente será abordado neste tópico os analisadores de massas do tipo quadrupolo.

3.6.3.1 Quadrupolo

O quadrupolo analisador é o mais comumente utilizado na atualidade, devido ao seu custo mais acessível e sua facilidade de compreensão e operação, é um analisador simples e que possui boa linearidade em análises quantitativas. 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 à 4000 Da. A exatidão fornecida pelas análises do mesmo estão entre 0,1 e 0,2 Da (LANÇAS, 2013).

O analisador quadrupolo consiste basicamente em quatro barras cilíndricas paralelas, geralmente feitas de metal, organizadas em dois pares, como mostra a Figura 6. Um par de barras é mantida em um potencial positivo, enquanto o outro em um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua (DC) e radiofrequência (Rf) são aplicadas aos pares em razão constante. O par de barras positivas atuará como um flip para massas maiores, enquanto o par negativo atuará como um flip para massas pequenas. Os quadrupolos operam em uma resolução constante (relação Rf/DC constante). Uma determinada amplitude de DC e Rf são selecionadas e apenas os íons que correspondem a relação m/z de interesse (íons ressonantes) passam através das barras do analisador. Os demais íons que entram no quadrupolo, mas que não são ressonantes (trajetórias instáveis), colidem nas barras e não são detectados (HARRIS, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Figura 6- Analisador tipo quadrupolo.



Fonte- LANÇAS, 2013

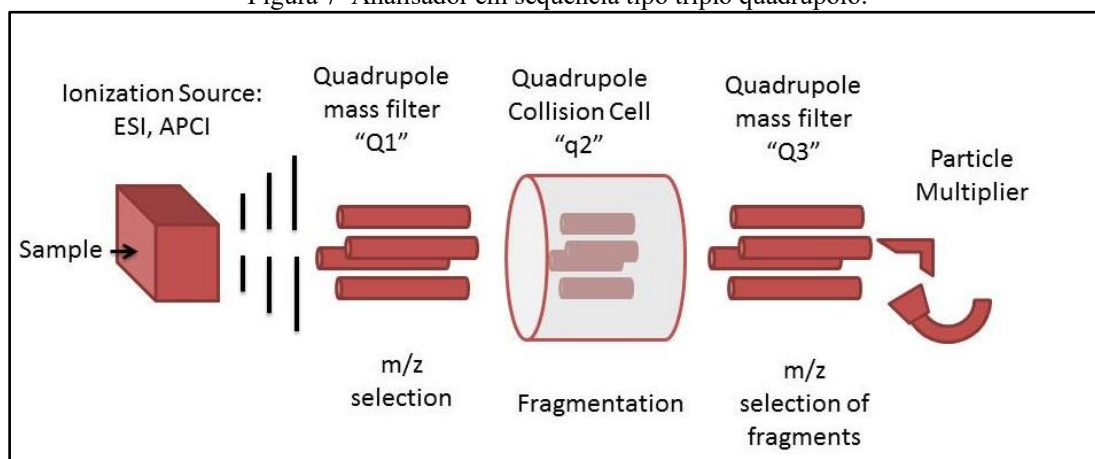
Fernandes et al., (2019) ao estudar o efeito matriz em amostras de pimentões, analisou seis diferentes organofosforados (clorpirifós, diclorvos, dissulfoton, etoprofós, fenclofos e protiofós). Para a realização da análise foi utilizado o quadrupolo simples acoplado a cromatografia gasosa (GC-MS). Vinte e quatro amostras de pimentão de diferentes supermercados de Fortaleza - CE foram analisadas, dentre elas uma amostra apresentou contaminação por clopirifós (0,177 mg/kg), a concentração encontrada é superior ao LMR permitido pela Comissão Europeia (0,01 mg/kg).

Guedes et al., (2016) utilizou a cromatografia gasosa acoplada com o espectrômetro de massas tipo quadrupolo para análise de vinte e um pesticidas em goiaba. As amostras de goiaba foram obtidas em pontos comerciais da cidade de Fortaleza – CE. Segundo os resultados obtidos, cerca de 87% das amostras apresentaram algum tipo de resíduo de pesticida. A trifloxistrobina foi o único composto encontrado com autorização para uso na cultura da goiaba.

3.6.3.2 QqQ - Triplo quadrupolo

O analisador de massas triplo quadrupolo – QqQ, é composto por três quadrupolos em série, como pode ser observado na Figura 7. O primeiro e o terceiro quadrupolo usados para separação de íons através da razão m/z e o segundo quadrupolo é uma célula de colisão (CRUZ, 2017; HARRIS, 2007).

Figura 7- Analisador em sequência tipo triplo quadrupolo.



Fonte- Wikipédia, 2015.

No Q₁ o íon precursor selecionado é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do Q₂, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente o Argônio - Ar). Dessa maneira, têm-se um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, a qual ocorre, geralmente, por dissociação induzida por colisão (“*Collision Induced Dissociation*”) – CID, gerando à formação dos íons produto. Após a geração dos fragmentos, o Q₂ faz o direcionamento dos íons gerados para o Q₃, onde os íons serão selecionados, de acordo com a relação m/z selecionada para o método em questão e enviados ao detector (CRUZ, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Mrzlikar *et al.*, (2019) utilizaram o analisador de massas triplo quadrupolo acoplado com o cromatógrafo líquido para análises de pesticidas neonicotinóides em méis provenientes da Eslovênia. Neste estudo foram utilizadas as técnicas de extração QuEChERS e SPE, assim como o modo de monitoramento de fragmentos SRM. Dessa forma, foi possível identificar traços de acetamiprido e tiacloprido nos méis analisados.

Atualmente, a espectrometria de massas em tandem e mais especificamente o analisador de massas triplo quadrupolo é o principal sistema de detecção em extratos de frutas usado para a determinação de várias classes de pesticidas (carbamato, neonicotinóide, organoclorado, organofosfato e piretróide). A espectrometria de massas em tandem para cromatografia líquida (LC-MS/MS) com ionização por eletrospray (ESI) e a espectrometria de massas em tandem para cromatografia em fase gasosa (GC-MS/MS) com ionização por impacto eletrônico (EI) são consideradas as principais técnicas modernas empregadas em análises multirresíduos de pesticidas (ALCÂNTARA *et al.*, 2019).

3.6.4 Detectores

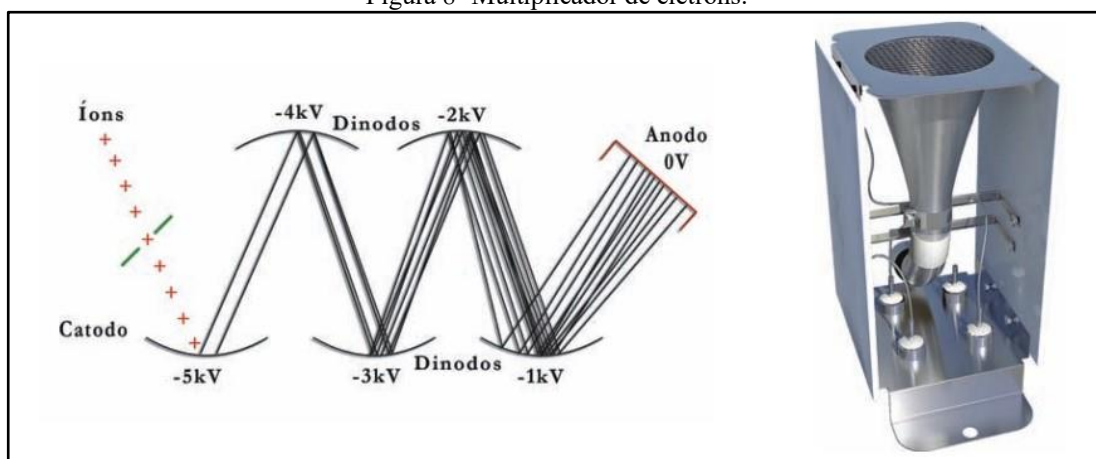
O detector capta e registra a carga induzida ou a corrente produzida quando um íon atravessa ou atinge sua superfície. No caso de um detector de um espectrômetro de massas, este é capaz de efetuar uma varredura de sinal, os sinais analíticos captados pelo detector se referem a razão massa/carga dos analitos (LANÇAS, 2009).

Dentre os componentes do espectrômetro de massas, o detector foi o que sofreu menores avanços e modificações. Mesmo sendo considerado como os “olhos” da análise, há bastante tempo que os detectores mais utilizados são o multiplicador de elétrons (EM) e o detector de Faraday também conhecido como copo de Faraday (KOPPENAAL *et al.*, 2005; LANÇAS, 2009).

O detector de Faraday consiste em um copo feito de metal projetado para captar partículas carregadas em baixas pressões (“vácuo”). A corrente gerada é medida e o valor da corrente utilizado para determinar a quantidade de íons ou elétrons que chegam no copo, gerando o resultado analítico esperado. Contudo, esse sistema apresenta um maior ruído e uma menor sensibilidade que os detectores que utilizam os EM (KOPPENAAL *et al.*, 2005).

O detector EM é o mais utilizado em espectrometria de massas, estes usam como catodo um metal, óxido metálico ou liga que apresenta facilidade em perder elétrons quando atingida por um íon, chamado dinodo (Figura 8). Os íons que chegam ao detector, ao entrarem em contato com o dinodo produzem elétrons secundários, que são direcionados a outros dinodos, onde o mesmo processo irá ocorrer, produzindo assim um efeito cascata, gerando uma grande quantidade de elétrons. Dependendo da quantidade de dinodos no detector (6-20), um único elétron é capaz de gerar 10^6 ou mais elétrons. Esse tipo de detector também apresenta ruídos devido ao possível acúmulo de elétrons secundários (KOPPENAAL *et al.*, 2005).

Figura 8- Multiplicador de elétrons.



Fonte- Lanças, 2009

Na prática, a maioria dos instrumentos utilizados em LC/MS, em especial do tipo com analisadores quadrupolo e armadilha de elétrons, usam o detector EM, pois apresentam boa razão custo/benefício (LANÇAS, 2009).

3.6.5 Controle dos fragmentos em LC-MS/MS

O controle dos fragmentos em LC-MS/MS pode ser realizada em função- Detecção do Espectro Completo (*Full Scan*), Monitoramento Seletivo de Íons (*Single Ion Monitoring - SIM*), Monitoramento Seletivo de Reações (*Selected Reactions Monitoring - SRM*) e Monitoramento de Reações Múltiplas (*Multiple Reactions Monitoring - MRM*). O controle do modo de aquisição de dados fornece as informações necessárias para obter os resultados analíticos. Os modos SRM e MRM aumentam a seletividade da MS para determinados analitos e melhoram a sensibilidade (NASCIMENTO *et al.*, 2017).

No modo SRM um íon precursor é selecionado no primeiro analisador (Q_1), sendo posteriormente fragmentado (Q_2) e o terceiro analisador sequencial (Q_3) monitora os íons gerados relativos ao íon precursor. Já no modo MRM o espectrômetro é programado para que dois ou mais íons sejam separados no primeiro analisador (Q_1), posteriormente fragmentados (Q_2) e monitorados em um terceiro analisador (Q_3). O modo MRM é extremamente útil quando a separação não está completa e é necessário fazer um acompanhamento de dois íons. Bielinska, et al., (2009) fez a utilização do modo MRM para a análise de sulfonamidas, um poderoso quimioterápico veterinário que possui difícil identificação devido aos baixos níveis de concentração e sua ocorrência multicomponetal

geralmente encontrada. Com a utilização do modo MRM, foi possível separar e identificar dez tipos diferentes de sulfonamidas em amostras de solo.

Barbieri et al., (2019) utilizou o modo de aquisição de dados SRM, ao analisar pesticidas em tecido de peixe. O método desenvolvido permitiu analisar 45 compostos de ionização no modo positivo e 7 compostos no modo de ionização negativa no mesmo método, sem que sensibilidade do mesmo fosse prejudicada.

A maioria dos contaminantes analisados em LC-MS/MS utilizam a técnica SRM para a análise de resíduos devido à alta sensibilidade e seletividade desse método (Malik, Blasco e Picó, 2010). Vale ressaltar que se requer uma otimização de parâmetros no MS para cada composto analisado, dessa forma se obtém melhores resultados.

A análise de compostos alvos (*target*) é convencionalmente baseada no desenvolvimento de um método com padrões antes da análise da amostra real. Portanto, não é possível a identificação de compostos cujo padrões não tenham sido previamente analisados no desenvolvimento do método, com o auxílio de espectrômetros de massas de baixa resolução, como o QqQ. No entanto, os objetivos da análise são plenamente satisfeitos, visto que o monitoramento de amostras reais é possível com boa confiabilidade com o auxílio de padrões que são previamente selecionados, geralmente, com base em sua toxicidade e/ou frequência de detecção e com a utilização do estudo de validação do método analítico.

3.7 Validação de Método

A validação é um estudo experimental que tem por objetivo demonstrar que o método analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos (ANVISA, 2017; MAPA, 2011).

O processo de validação é definido como a coleta e avaliação de dados, desde o estágio inicial até o estágio final do processo de obtenção do método ou produto. Estabelecendo evidências do conhecimento científico capazes de assegurar com confiabilidade um método ou um produto de qualidade para os determinados fins de interesse (FDA, 2011; EURACHEM, 2014).

Todo sistema apresenta limitações, não existe modelos prontos para validação. Validação a 100% de confiabilidade é utopia, os parâmetros exigem adequações as 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).

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. Na maioria dos estudos analíticos, são avaliados dependendo das necessidades, os seguintes parâmetros- Seletividade, Linearidade, Intervalo, Limite de detecção, Limite de Quantificação, Precisão, Exatidão e Robustez (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2017).

3.7.1 Seletividade

A seletividade pode ser descrita como a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto, mesmo em amostras complexas, em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz que, porventura, causem alguma interferência na análise (ANVISA, 2017).

O parâmetro da seletividade é apontado como o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método (RIBANI *et al.*, 2004).

Uma das formas de se avaliar a seletividade é pela comparação dos resultados obtidos das matrizes contendo o analito de interesse em quantidades conhecidas e amostras de matrizes sem o analito de interesse, demonstrando a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes (ANVISA, 2017).

Em métodos cromatográficos, o uso de testes utilizando técnicas de avançadas detecções, como LC-MS/MS, são apontadas como técnicas altamente seletivas, garantindo uma identificação inequívoca do analito e nenhum ou quase nenhum interferente ao sinal analítico (MAPA, 2011).

3.7.2 Efeito matriz

Em análises químicas os analitos adotam comportamentos diferentes dependendo do ambiente em que ele está contido, ou seja, uma substância em água ultrapura irá

comportar-se de forma diferente da mesma substância em uma amostra de águas residuais, sangue ou alimentos. A esse efeito chama-se "efeito matriz" (EURACHEM/CITAC, 2016).

Matrizes de amostras complexas podem conter componentes que interfiram no desempenho da análise. Esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal fornecido pelo equipamento de detecção, comprometendo o resultado. A intensidade desse efeito também pode depender da concentração do analito na análise (INMETRO, 2016).

Quando se analisa amostras de matrizes complexas, como frutas e vegetais, é esperado a presença de efeito matriz, no entanto, não depende apenas da natureza do analito, mas também das condições cromatográficas em que a análise é executada. Em cromatografia gasosa é muito comum observar efeito matriz associado ao sistema de injeção (em grande parte associada ao liner), esse efeito é difícil de ser controlado, pois não é constante e usualmente é afetado pelo histórico de uso do injetor. O efeito de matriz associados ao injetor geralmente se refere a superposição de sinal, pois, em temperatura elevada o liner apresenta sítios ativos para a retenção de compostos, na ausência da matriz parte dos analitos acabam retidos no liner diminuindo o sinal dos analitos no detector. No entanto, na presença da matriz, ocorre uma competição entre os componentes da amostra e os analitos pelos sítios ativos do liner, possibilitando que maior quantidade dos analitos seja detectado, causando o efeito de superposição de sinal (POOLE, 2007).

Em cromatografia líquida esse tipo de efeito matriz associado ao injetor não é observado. No LC-MS a extensão do efeito matriz depende, além da natureza da amostra e do analito, do tipo de interface utilizada, ou seja, do modo de ionização utilizada. Uma vez que os mecanismos de ionização são diferentes, e podem afetar a eficiência da formação dos íons, sobretudo na presença de compostos com o mesmo tempo de retenção dos analitos (SILVA *et al.*, 2019).

Em ESI-LC-MS o efeito matriz mais observado é o de supressão de sinal, sobretudo no modo positivo de ionização. Pois, geralmente durante o processo de ionização no capilar e durante a transferência de íons para a fase gasosa da superfície das gotículas, há competição de ionização entre os compostos da matriz e os analitos, diminuindo assim o sinal dos analitos no detector (PANUWET *et al.*, 2016; REICHERT, *et al.*, 2015).

Uma das possíveis abordagens para resolver esse problema é a redução da quantidade de componentes da matriz que entram no detector ao mesmo tempo que o analito. Algumas tentativas de minimizar o efeito matriz são realizadas na etapa do preparo da amostra, como limpeza dos extratos e procedimentos de extração mais seletivos. Quando

esses procedimentos não são viáveis, então uma técnica de calibração que compense os efeitos da matriz deve ser utilizada. Dentre as mais comuns, pode-se citar a padronização externa por superposição da matriz (curva construída na matriz isenta do analito) ou a padronização por padrão interno (resposta do analito corrigida através da resposta do padrão com propriedades semelhantes) (MILHOME *et al.*, 2019; PICO, BLASCO e FONT, 2004).

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 5 pontos, realizados em triplicata. 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). O efeito matriz (EM) pode ser calculado através da Equação 1.

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

Segundo Martins *et al.*, (2018) o efeito matriz pode ser calculado nos níveis baixo, médio e alto da curva. Visto que o efeito matriz não se apresenta da mesma maneira nos diferentes níveis de concentração. A porcentagem de efeito matriz, pode ser calculada de acordo com a Equação 2.

$$EM (\%) = \frac{A_m - A_s}{A_s} \quad (2)$$

Onde A_m é a área do pico da curva na matriz, e A_s é a área do pico na curva do solvente.

Na avaliação do efeito matriz, dependendo da diminuição ou aumento da porcentagem da inclinação, podem ser observados efeitos de matriz de supressão de sinal (diminuição do sinal pela composição da matriz) e efeitos de matriz por sobreposição de sinal (aumento do sinal pela composição da matriz). O efeito de matriz pode ser- baixo com a mudança do sinal em até $\pm 20\%$; médio com a mudança do sinal em até $\pm 50\%$; e alto quando possuir mudança de sinal maiores que $\pm 50\%$ (REICHERT, *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2013).

3.7.3 Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em demonstrar resultados que sejam diretamente proporcionais entre o sinal analítico observado e a concentração do analito na(s) amostra(s), em uma dada faixa de concentração (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017).

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 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 e determinação, significância do coeficiente angular, homocedasticidade do modelo e soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear (EURACHEM, 2014).

A curva analítica pode ser plotada utilizando algum software para o tratamento de dados, como o excel ou origin. Onde são obtidas as equações da reta (Equação 3) e seus coeficientes de determinação (R^2) correspondentes.

$$Y = ax + b \quad (3)$$

Para avaliar a homogeneidade da variância dos erros de cada curva, são realizados testes de homocedasticidade, como o recomendado pelo INMETRO (2016), através do Teste de Levene (1960), onde as transformações adequadas são realizadas para a utilização da Análise de Variância (ANOVA), e posterior utilização da estatística F. Se $F_{cal} > F_{tab}$ as variâncias são diferentes e o modelo é heterocedástico. Se $F_{cal} < F_{tab}$ as variâncias são iguais dentro do erro experimental e o modelo é homocedástico, ou seja, adequado para o método dos mínimos quadrados. A homocedasticidade também é avaliada através da análise do gráfico de resíduos (BARBOSA *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2018).

Para validar a equação da reta encontrada através do método dos mínimos quadrados para cada composto estudado, se faz necessário estimar as incertezas (expressas em forma de desvio padrão) dos coeficientes angulares e lineares e dos valores associados a esses. Essa estimativa pode ser realizada de acordo com Alcântara *et al.* (2018), através das Equações de 4 a 6-

$$s^2_y = \frac{\sum(d^2_i)}{n-2} \quad (4)$$

$$s^2_b = \frac{s^2_y \cdot \sum(x^2_i)}{D} \quad (5)$$

$$s^2_a = \frac{s^2_y \cdot n}{D} \quad (6)$$

onde- s_b = Desvio padrão do coeficiente linear;

s_a = Desvio padrão do coeficiente angular;

s_y = Desvio padrão no eixo y (áreas);

x_i = Valores individuais de x (concentrações);

n = número total de pontos da curva;

d_i = Desvio vertical de cada ponto- $d_i^2 = (y_i - ax_i - b)^2$;

$$D = \text{Determinante-} \begin{vmatrix} \sum (x_i^2) & \sum x_i \\ \sum x_i & n \end{vmatrix}$$

Em posse dos resultados desses desvios, é possível aplicar o teste F (Equação 7), a fim de verificar se a regressão linear obtida é significativa, ou seja, verificar se a correlação entre X e Y é significativa (FILHO *et al.*, 2017).

$$F_{calc} = \frac{s_y/1}{\sum d_i/3} \quad (7)$$

Outro teste estatístico importante é o teste t de Student que permite avaliar a significância dos parâmetros da curva de calibração. A Equação 8 é utilizada para avaliar o coeficiente angular (a) e a Equação 9 para avaliar o coeficiente linear (b) (ALCÂNTARA *et al.*, 2018).

$$t_{cal a} = \frac{a-1}{s_a} \quad (8)$$

$$t_{cal b} = \frac{b-0}{s_b} \quad (9)$$

Os valores de F_{cal} e t_{cal} são comparados com os valores críticos tabelados. Dessa forma se $F_{cal} < F_{tab}$ a regressão não é significativa, ou seja, não há correlação entre os eixos X e Y. Se $F_{cal} > F_{tab}$ há correlação entre X e Y e o modelo de regressão linear é considerado significativo. De forma similar, se $t_{cal} < t_{tab}$ os parâmetros da curva não são significativos e podem ser desprezados, retirados da equação da reta. Se $t_{cal} > t_{tab}$ os parâmetros são significativos e devem fazer parte da equação final da reta. Os resultados obtidos em análises estatísticas como esta são comumente avaliados em um nível de 95% de confiança (FILHO *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018).

Após os testes de homocedasticidade, correlação dos parâmetros e significância dos mesmos, um possível teste a ser realizado é o dos intervalos de confiança para cada curva a 95% de confiança, semelhante ao realizado por Silva *et al.* (2017).

Para o intervalo de confiança ser passível de cálculo, deve-se realizar previamente o cálculo do Desvio Padrão Residual (DPR), como mostrado na equação 10-

$$DPR = \sqrt{\frac{SS_{resid}}{GL}} \quad (10)$$

onde- GL- graus de liberdade, dado por- (N-2)

N- números de pontos da curva

SS_{resid} é o somatório dos resíduos, dado por- $\sum y^2 - a^2 \sum x^2$

Para as curvas analíticas em que os coeficientes lineares não passam pela origem, a fim de estimar os valores para a intercessão verdadeira, calcula-se os intervalos de confiança para o coeficiente linear (b), de acordo com a equação 10-

$$b \pm t (DPR) \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}} \quad (10)$$

onde- N- número de pontos da curva

DPR- desvio padrão dos resíduos

t- $t_{crítico}$. O termo

\bar{x}^2 - média quadrada dos valores de concentração

S_{xx} - soma dos quadrados das concentrações

Para as inclinações (coeficiente angular) não ajustadas, o intervalo de confiança deve ser calculado pela equação 11. Os termos coincidentes entre as equações 11 e 12 possuem os mesmos significados.

$$a \pm \frac{t (DPR)}{\sqrt{S_{xx}}} \quad (12)$$

Para as equações corrigidas onde os coeficientes lineares não irão compô-las, se faz necessário ajustar o coeficiente linear, para que o mesmo possa passar próximo a origem. Esse cálculo é realizado através da equação 13. O intervalo de confiança para o coeficiente angular ajustado é dado pela equação 14.

$$a = \frac{\sum xy}{\sum x^2} \quad (13)$$

$$a \pm \frac{t(DPR)}{\sqrt{\sum x^2}} \quad (14)$$

Onde- x^2 - quadrado das concentrações

xy- produto das concentrações e suas respectivas áreas correspondentes

t- t crítico

DPR- desvio padrão dos resíduos

O intervalo de confiança da concentração verdadeira, ponto a ponto da curva de calibração é dada pela equação 15.

$$\frac{Y}{a} \pm \frac{t(DPR)}{a} \sqrt{\left(1 + \left(\frac{y}{a}\right)^2 \mid \sum x^2\right)} \quad (15)$$

Os resultados dos intervalos de confiança podem ser posteriormente plotados juntamente com a curva de calibração ajustada para cada pesticida.

3.7.4 Faixa de trabalho

O intervalo é uma faixa de trabalho compreendido entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (ANVISA, 2017).

Para métodos de análises de impurezas recomenda-se que a faixa de trabalho estabelecida corresponda a 120% da concentração do limite de impureza estabelecido (ANVISA, 2017).

Para o método de validação se faz importante verificar o intervalo de concentração de aplicação do método, pois, uma faixa de trabalho mal escolhida implica diretamente em erros de outros parâmetros de validação do método. Por isso, o intervalo do método deve ser estabelecido a partir das concentrações nas quais a linearidade é constatada (EURACHEM, 2014; MAPA, 2011).

3.7.5 Limite de Detecção (LD)

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 (EURACHEM/CITAC, 2016).

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; EURACHEM/CITAC, 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 a Anvisa (2017), o LD deve apresentar valores de relação sinal/ruído maiores ou iguais a 2-1.

Em casos de métodos instrumentais, ainda se pode calcular o LD através do cálculo de no mínimo 3 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 16-

$$LD = 3 \frac{Sb}{a} \quad (16)$$

onde- Sb- desvio padrão dos coeficientes lineares da curva

a- coeficiente angular

3.7.6 Limite de Quantificação (LQ)

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 17. 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).

$$LQ = 10 \frac{Sb}{a} \quad (17)$$

onde- Sb- desvio padrão dos coeficientes lineares da curva

a- coeficiente angular

3.7.7 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 18, ou através do desvio padrão relativo (DPR), ou do coeficiente de variação (CV,%), conforme expresso na Equação 19 (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.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(Xi - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (18)$$

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

X - valor individual de uma medição.

n - número de medições

$$CV \% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad (19)$$

Onde- S - desvio padrão das medidas

\bar{X} - média das medições

3.7.7.1 Repetibilidade

Também chamada de precisão intra-corrida, 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 configura-se 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, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método. Sendo 3 concentrações- baixa, média e alta, com no mínimo 3 réplicas de cada. Outra possibilidade é realizar no mínimo 6 determinações a 100% da concentração do teste.

3.7.7.2 Precisão intermediária

Precisão intermediária, também conhecida como precisão inter-corrida 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 2 dias de diferença, com analistas diferentes, utilizando as mesmas recomendações utilizadas para a curva da repetibilidade (ANVISA, 2017).

3.7.7.3 Reprodutibilidade

A precisão pode também ser expressa em termos de reprodutibilidade, também chamada de precisão inter-laboratorial. Pode ser definida como a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. Usualmente necessário em estudos colaborativos aplicados, por exemplo, à padronização de metodologia analítica. O desvio-padrão obtido através da reprodutibilidade é normalmente 2 vezes maior que os obtidos pela repetibilidade, resultados facilmente explicados pela maior variação das condições de análise (ANVISA, 2017; LANÇAS, 2004).

3.7.8 Exatidão

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. Podendo 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 2 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 20. 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 3 pontos de concentração da curva, sendo eles nos limites inferiores, superiores e no meio da curva. Cada concentração realizada em triplicata, totalizando no mínimo 9 determinações por analito (ANVISA, 2017; INMETRO, 2016).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (20)$$

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, C_2 assume valor 0, modificando a Equação 20, para a Equação 21 (ANVISA, 2017).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1}{C_3} \right) \times 100 \quad (21)$$

3.7.9 Robustez

Um estudo de robustez avalia a capacidade de um método em permanecer gerando resultados confiáveis, mesmo quando ocorrem pequenas variações nos parâmetros do método. Isto é realizado através de pequenas modificações estratégicas e o exame das suas consequências. Esse parâmetro acaba inferindo uma maior confiabilidade ao método (EURACHEM/CITAC, 2016; ANVISA, 2017)

Para avaliar a robustez, verifica-se experimentalmente fatores suspeitos de causar modificações sobre a qualidade dos parâmetros analíticos de validação. Se nenhum dos fatores estudados demonstrar capacidade significativa de afetar o resultado da medição, o método analítico é considerado robusto. Isto é, apresentará resultados mais reprodutíveis ao longo do tempo e maior possibilidade de portabilidade (MAPA, 2011).

Em trabalhos nos quais durante o desenvolvimento da metodologia houve mudanças de fornecedores, marcas ou equipamentos, sem as quais apresentassem alteração significativa nos resultados, pode-se dizer que o método possui uma robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudanças de ambiente de análise (RIBANI *et al.*, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

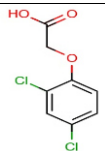
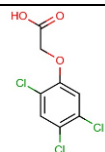
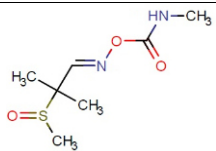
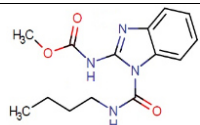
A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Química Instrumental (LQI) pertencente a Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC), localizado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.1 Reagentes e padrões de pesticidas

Neste estudo foram investigados 10 compostos (pesticidas) de classes diferentes. Os critérios de seleção envolveram a escolha de alguns pesticidas exigidos na legislação vigente de análise de água (Portaria consolidação nº5), os mais analisados por cromatografia líquida. O imidacloprido e a trifloxistrobina foram selecionados para a análise por serem pesticidas comumente utilizados nos produtos agrícolas do estado do Ceará, com conhecidos potenciais poluidores.

Estão descritos na Tabela 2 algumas das propriedades físico-químicas dos compostos investigados, tais como a classe química, VMP's em águas ($\mu\text{g/L}$), coeficiente octanol-água (pK_{ow}), pK_a e as respectivas estruturas de cada composto.

Tabela 2- Informações sobre as classes e propriedades físico-químicas dos pesticidas estudados.

Pesticidas	Tipo de Pesticida	Classe Química	VMP* em água ($\mu\text{g/L}$)	pK_{ow} em pH 7 a 20°C	Koc	Solubilidade em água 20°C (mg/L)	pK_a 25°C	Estrutura
2,4-D	Herbicida	Ácido clorofenóxi	30 ^a	-0,82	39,3	24300	3,40	
2,4,5-T	Herbicida	Ácido clorofenóxi	30 ^a	4,0	10	268	2,88	
Aldicarbe Sulfóxido	Inseticida Acaricida	Carbamato	10 ^b	-0,78	1	28000	NA	
Benomil	Fungicida	Benzimidazole	120 ^c	1,4	1900	2	4,48	

CONTINUA

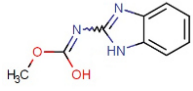
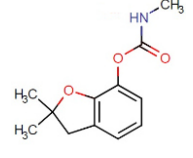
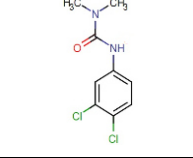
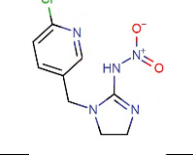
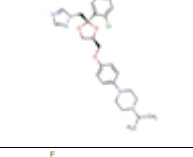
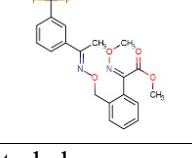
Pesticidas	Tipo de Pesticida	Classe Química	VMP em água (µg/L)	pK _{ow} em pH 7 a 20°C	Koc	Solubilidade em água 20°C (mg/L)	pKa 25°C	Estrutura
Carbendazim	Fungicida	Benzimidazole	120 ^c	1,48	-	8	4,2	
Carbofurano	Inseticida Acaricida	Carbamato	7	1,8	-	322	NA	
Diuron	Herbicida	Fenilamida	90	2,87	680	35,6	NA	
Imidacloprido	Inseticida	Neonicotinóide	**	0,57	-	610	NA	
Tebuconazol	Fungicida	Triazol	180	3,7	-	36	5,0	
Trifloxistrobina	Fungicida	Strobilurin	**	4,5	-	0,61	NA	

Tabela 2- Informações sobre as classes e propriedades físico-químicas dos pesticidas estudados.

Fonte- IUPAC, (2019); CHEMICALIZE, (2019).

VMP= Valor máximo permitido; NA= Não aplicado; ** Pesticida ausente na legislação; a- Somatório permitido para- 2,4-D e o 2,4,5-T; b- Somatório permitido para- aldicarbe, aldicarbe sulfona e aldicarbe sulfóxido; c- Somatório permitido para- benomil e carbendazim.

Os padrões dos pesticidas preparados para a etapa de infusão no espectrômetro de massas, para a obtenção da curva de calibração e teste de validação da curva, foram pesados em balança analítica com precisão de 0,0001g modelo AY220 – Shimadzu (Brasil). Todos os padrões de pesticidas avaliados foram obtidos da marca Sigma Aldrich (Alemanha), apresentaram grau de pureza $\geq 99,0\%$. Para a solubilização dos mesmos foi utilizado Metanol da marca J.T. Baker (EUA), com grau de pureza HPLC.

As soluções padrão multicomponente foram preparadas a partir de 10 mg de cada padrão individual, em metanol, para adquirir volumes de solução de 10mL, obtendo assim soluções em estoque de 1000 mg/L.

As soluções foram transferidas para vials “headspace” e lacradas através de um alicate capaz de recravar os frascos contendo as soluções. As soluções estoque foram armazenadas em geladeiras a uma temperatura de -4 °C.

4.2 Amostragem

Foram analisadas vinte e sete amostras de água de abastecimento proveniente de vinte e sete diferentes municípios do estado do Ceará. As amostras foram cedidas pelo Governo do Estado do Ceará, as coletas foram realizadas entre os meses de julho a setembro de 2019. Após o recebimento das amostras, as mesmas foram condicionadas em frízer com temperatura inferior a 4 °C e foram analisadas em até sete dias após a coleta.

4.3 Condições instrumentais e preparação da amostra

4.3.1 Cromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massas (LC-MS/MS)

Utilizou-se o sistema LC-ESI-MS/MS (Figura 9), composto por um cromatógrafo líquido Thermo Fisher Scientific (EUA), modelo surveyor LC pump plus com bomba quaternária, Thermo Fisher Scientific (EUA) e loop de 20 µL; Coluna Ascentis C-18 (150 mm de comprimento, 2,1 mm de d.i. e tamanho da partícula de 3,0 µm) marca Sigma-Aldrich (Alemanha); Detector Triplo Quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access, com fonte API, utilizando o modo de ionização por Eletrospray-Electrospray (ESI), Thermo Fisher Scientific (EUA); Sistema de aquisição de dados através do software *X-Calibur* 1.4, Thermo Fisher Scientific (EUA).

A pureza dos solventes utilizados foi garantida por sistema de microfiltração à vácuo Millipore (EUA).

Figura 9- Sistema LC-ESI-MS/MS.



Fonte- Autoria própria.

4.3.1.1 Otimização do sistema LC-ESI-MS/MS

4.3.1.1.1 Otimização do sistema de detecção de massas

O desenvolvimento do método LC-ESI-MS/MS se deu através da obtenção da biblioteca espectral, adquirindo o espectro de massas de cada composto separadamente, com o objetivo de obter as melhores condições para detecção de cada agrotóxico.

Para isso, injeções diretas da solução padrão individual de 1 mg/L foram realizadas no MS, utilizando o modo de aquisição de dados Full Scan. A partir dessas injeções, foram definidas as melhores condições de voltagem do capilar, temperatura da fonte, temperatura e pressão do gás de dessolvatação para secagem do solvente e do gás auxiliar, assim como as energias de colisão para a fragmentação do íon precursor causando a geração dos íons produtos. O gás utilizado como gás auxiliar e de dessolvatação foi o nitrogênio (N_2), para a fragmentação do íon precursor foi utilizado o gás argônio (Ar). O mesmo procedimento foi realizado com ionização positiva e negativa.

Após a definição dessas condições de uso, diante dos espectros obtidos e das relativas abundâncias das fragmentações de cada pesticida estudado, foram escolhidos de cada composto os íons produtos de quantificação e qualificação. Posteriormente, foi realizado o monitoramento dos íons através do modo SRM. O controle do sistema, a aquisição e o tratamento de dados foram executados através do software *X-Calibur* versão 1.4.

4.3.1.1.2 Otimização do sistema cromatográfico

A escolha do gradiente de concentração utilizado foi inicialmente norteada através de uma aplicação da Thermo Fisher Scientific (EUA), fabricante do equipamento utilizado, realizada por BOTITSI *et al.* (2008). Em todos os experimentos realizados a fase móvel foi composta por uma fase aquosa e uma fase orgânica, aumentando gradativamente a força de eluição da fase móvel. Utilizou-se como fase orgânica metanol (Solvente A) e como fase aquosa água ultrapura 0,1% de ácido fórmico (Solvente B).

Na Tabela 3 é apresentado o gradiente utilizado para o método do modo positivo.

Tabela 3- Gradiente utilizado para método cromatográfico no modo positivo

Gradiente- 22min		
t (min)	Solvente A	Solvente B
0	10	90
4	10	90
5	90	10
19	90	10
19,5	10	90
22	10	90

Fonte- Autoria própria.

Vale ressaltar que as análises foram realizadas em triplicata, onde soluções de 100 µg/L da mistura dos agrotóxicos preparada em metanol foram injetadas para obter os perfis de respostas cromatográficas.

4.3.2 Extração em fase sólida

Para a etapa de extração fez-se a utilização do sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3® da marca Millipore (EUA), assim como de solventes de grau de pureza HPLC, metanol e diclorometano da marca J.T.Baker (EUA). Os cartuchos SPE tipo seringa de fase polimérica (N-divinilpirrolidona e divinilbenzeno) Oasis HLB, 500 mg e partículas de 60 µm da marca Waters (EUA). A extração foi realizada com o auxílio de bomba de vácuo da marca Fanem (Brasil), acoplada ao Manifold Visiprep™ SPE, modelo 12 portas da marca

Sigma-Aldrich (Alemanha). Posteriormente o processo de secagem foi realizado com o rotaevaporador water bath BM 210 da marca Yamato Scientific America (EUA).

O sistema de extração em fase sólida está expresso na Figura 10.

Figura 10- Sistema de extração em fase sólida.



Fonte- Autoria própria.

4.3.2.1 Condições do método de extração/concentração

Alguns fatores do procedimento de extração foram previamente definidos de acordo com o suporte laboratorial, os objetivos da análise e dados da literatura.

Os cartuchos foram submetidos a etapa de condicionamento e equilíbrio através da utilização de 3 mL de metanol, 3 mL de água ultrapura, 3 mL de água ultrapura no pH da amostra, respectivamente. Nesta etapa os sítios são ativados, condicionados e o cartucho é equilibrado para receber a amostra.

A amostra passa por um pré-tratamento para ajuste de pH, com auxílio de um pHmetro da marca Ohaus (EUA) e uma solução de 10% de ácido fórmico em água. Esta etapa se faz importante, pois o ajuste da química da amostra interfere na retenção dos analitos. O volume de amostra utilizado foi de 100 mL, assim como Donato (2012), Hermann (2013) e Shamsipur, Yazdanfar e Ghambarian (2016), em água potável, água superficial, e água de abastecimento e agrícola respectivamente, sendo considerado um volume representativo e que permite boa recuperação de compostos pesticidas.

A velocidade de percolação da amostra foi de 2 mL/min. Fluxos lentos, como este, melhoram a interação dos analitos com as partículas do sorvente, permitindo uma melhor recuperação dos analitos (LANÇAS, 2004).

Foi utilizado 7,5 mL de solvente de eluição, percolado em 3 alíquotas de 2,5 mL, seguindo a medida analítica de empregar pequenas porções de solvente para uma melhor extração, ao invés de utilizar apenas uma única porção com um maior volume (SKOOG *et al.*, 2006). Cada alíquota de solvente permaneceu em contato com a matriz por 1 min antes da percolação. Esse procedimento faz com que as interações entre os analitos e o sorvente sejam rompidas com maior eficácia, gerando uma análise com maior recuperação dos analitos (LANÇAS, 2004). Posteriormente, o extrato foi levado ao rotaevaporador na temperatura de 60°C e ressuspenso em 1 mL de metanol.

4.4 Planejamento experimental

Inicialmente foi realizado um planejamento experimental a fim de obter um procedimento de extração e pré-concentração com uma melhor eficiência. Para o planejamento experimental utilizou-se um Planejamento Composto Central (PCC), com 2² pontos fatoriais, 2 x 2 pontos axiais e 3 pontos centrais. Totalizando um número de 11 experimentos.

Estudou-se 2 fatores, sendo eles- pH e solvente de eluição, assim como o estudado por Hermann (2013). Para análise de solvente utilizou-se uma combinação de 2 solventes de polaridades diferentes- metanol e diclorometano. O estudo desse fator (solvente de eluição) foi realizado utilizando uma combinação em porcentagem destes dois solventes. Já a análise de pH contou com uma variação da faixa de pH de 2 a 6. A análise dos dados foi realizada através do Microsoft Excel 2016 e do software Statistica 13.5.

Na Tabela 4 estão ilustrados a matriz experimental e os níveis de cada ensaio.

Tabela 4- Planejamento de experimentos

Ensaio	pH	%MeOH/DCM	pH	%MeOH/DCM
E1	-1	-1	3	25/75 (-)
E2	1	-1	5	25/75 (-)
E3	-1	1	3	75/25 (+)
E4	1	1	5	75/25 (+)
E5	-1,41	0	2,59	50/50
E6	1,41	0	5,41	50/50
E7	0	-1,41	4	15/85
E8	0	1,41	4	85/15
E9	0	0	4	50/50
E10	0	0	4	50/50
E11	0	0	4	50/50

Fonte- Autoria própria.

4.5 Curva analítica

Para cada pesticida foram construídas três tipos de curvas analíticas (padrão externo) (Tabela 5), visando o melhor entendimento dos parâmetros de validação.

Tabela 5- Curvas de calibração

Curvas analíticas	Fortificação	Etapa da fortificação
No solvente	Solvente	Anterior a introdução no cromatógrafo
Na água ultrapura	Água ultrapura	Anterior a etapa de extração
Na Matriz	Matriz	Anterior a etapa de extração

Fonte- Autoria própria.

Para a construção das três curvas analíticas, foi utilizado a solução estoque de 1000 mg/L para o preparo das diluições. Preparou-se uma solução multielementar de 10 mg/L dos pesticidas estudados. Em seguida, foram preparadas soluções de 1, 0,1 e 0,01 mg/L. Estas soluções foram utilizadas para o preparo das demais concentrações utilizadas na curva de calibração.

As curvas foram preparadas nas concentrações 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 30,0; 60,0; 90,0; 120,0 e 150,0 µg/L. Todas as soluções foram injetadas em triplicata. Para a construção da curva analítica utilizou-se o software Microsoft Excel 2016.

4.6 Parâmetros de Validação

Os parâmetros de validação foram analisados segundo a ANVISA, pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, de 24 de julho de 2017.

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 sem a adição de qualquer pesticida e o cromatograma com o extrato da matriz branca adicionada da solução padrão. Os cromatogramas foram avaliados a fim de observar a presença de picos interferentes.

4.6.2 Efeito Matriz

Para a estimativa do efeito matriz foram realizadas duas curvas analíticas, sendo elas, a curva na água ultrapura (padronização externa na água ultrapura) e a curva na matriz (padronização externa com superposição de matriz). O efeito matriz foi determinado através da comparação entre os coeficientes angulares e os pontos alto, médio e baixo obtidos nas diferentes curvas analíticas.

4.6.3 Linearidade / Faixa de Trabalho

O parâmetro da linearidade foi avaliado através da construção do gráfico da curva analítica na matriz, observando a relação linear entre a concentração e o sinal analítico. A partir desse, foi possível observar qual a faixa linear obedecida, também chamada de faixa de trabalho.

Posteriormente, foram aplicados uma série de testes estatísticos que permitem observar melhor o parâmetro da linearidade- construção do gráfico de resíduos, equação da reta de regressão através do método dos mínimos quadrados, coeficiente de determinação, significância do coeficiente angular, homocedasticidade através do teste F utilizando um nível de significância de 5%. Todas essas avaliações foram feitas individualmente para cada analito utilizando o software Microsoft Excel 2016.

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 6 análises dos limites calculados para verificação da exatidão e precisão dos mesmos.

O limite de detecção seguiu o mesmo princípio do limite de quantificação, contudo, foram realizadas apenas 2 análises para via de confirmação do resultado.

4.6.5 Precisão

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

4.6.5.1 Repetibilidade e Precisão Intermediária

A repetibilidade foi avaliada através da preparação de 3 concentrações da curva, sendo realizada a triplicata dos pontos alto, médio e baixo, totalizando 9 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 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 9 determinações, 3 determinações do menor ponto da curva, 3 determinações do ponto médio e 3 determinações do maior ponto da curva. Posteriormente as concentrações obtidas foram calculadas e a porcentagem de recuperação foi obtida através da Equação 20 fornecida no item 3.8.8 da revisão bibliográfica, utilizando o auxílio do software Microsoft Excel 2016. Para isso, utilizou-se as curvas

analíticas no solvente (padronização externa no solvente) e na água ultrapura (padronização externa na água ultrapura), calculando a recuperação isolada da interferência da matriz.

4.6.7 Aplicação do método

Após a validação do método, o mesmo foi aplicado em amostras de água potável provenientes de diferentes municípios do estado do Ceará.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção da Biblioteca Espectral

Os íons precursores e seus respectivos fragmentos mais intensos, como mostrado na Tabela 6 e no Apêndice 1, foram selecionados para compor os métodos SRM elaborados neste trabalho.

Tabela 6- Resultado da obtenção dos íons precursores e seus respectivos fragmentos otimizados.

Agrotóxicos	Modo de Ionização	Íon Precursor	Íon Produto	EC(eV)	DP(V)
2,4-D	-	219,4	126,6	28	51
			162,3	17	51
2,4,5-T	-	255,6	160,2	31	69
			198,1	16	69
Aldicarbe Sulfóxido	+	207,1	89,5	15	47
			193,4	70	47
Benomil	+	291,3	160,3	27	47
			192,3	10	47
Carbendazim	+	192,2	132,3	29	89
			160,3	17	89
Carbofurano	+	222,2	123,4	19	65
			165,3	10	65
Diuron	+	233,1	160,2	25	79
			188,1	18	79
Imidacloprido	+	256,2	175,3	16	65
			209,3	14	65
Tebuconazol	+	308,1	125,3	30	63
			151,2	26	63
Trifloxistrobina	+	409,2	145,1	39	54
			186,1	15	54

Fonte- Autoria própria.

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

O 2,4,5-T sofreu uma reação de oxidação, apresentando íons moleculares (M^{\bullet}) predominante nos espectros de massas, enquanto que as moléculas desprotonadas ($[M-H]^-$) aparecem com baixa abundância relativa. Crotti *et al.* (2006) relatam que substâncias contendo sistemas π conjugados, e que não apresentam funções básicas (principalmente aminas e funções carboniladas), a redução e/ou oxidação ocorrem mais facilmente que a

protonação/desprotonação das mesmas. O diuron apresenta o mesmo comportamento, apesar de possuir função básica em sua estrutura (diamida), possui um amplo sistema π conjugado.

A Tabela 7 faz relação de alguns trabalhos da literatura que desenvolveram métodos de análise para alguns dos pesticidas aqui estudados em água por LC-MS/MS, estão descritos na tabela os íons precursores e os respectivos fragmentos para cada pesticida.

Tabela 7- Íons obtidos por trabalhos da literatura

Pesticidas estudados neste trabalho	Íons Obtidos por DONATO, (2012)	Íons Obtidos por ZINI, (2016)	Íons Obtidos por CALDAS, (2009)
2,4 -D	219,0 > 160,6	-	219 > 161 219 > 89
2,4,5-T	252,8 > 158,6 252,8 > 194,5	-	-
Aldicarbe Sulfóxido	207,0 > 105,0 207,0 > 132,0	-	-
Benomil	293,0 > 219,0 293,0 > 101,0	-	-
Carbendazim	192,0 > 160,0 192,0 > 131,9	192,1 > 160,1 192,1 > 132,1	-
Carbofurano	222,0 > 165,0 222,0 > 122,9	222,2 > 165,2 222,2 > 123,1	222 > 165 222 > 123
Diuron	231,0 > 150,0 231,0 > 186,0	233,22 > 72,17 233,22 > 160,09	-
Imidacloprido	-	256,1 > 209,1 256,1 > 175,1	-
Tebuconazol	308,0 > 69,9 308,0 > 124,9	308,2 > 70,1 308,2 > 125,1	308 > 70 308 > 88
Trifloxistrobina	-	409,1 > 145,03 409,1 > 186,06	-

Fonte- DONATO, 2012; ZINI, 2016; CALDAS, 2009. (-) Pesticida não analisado pelo trabalho.

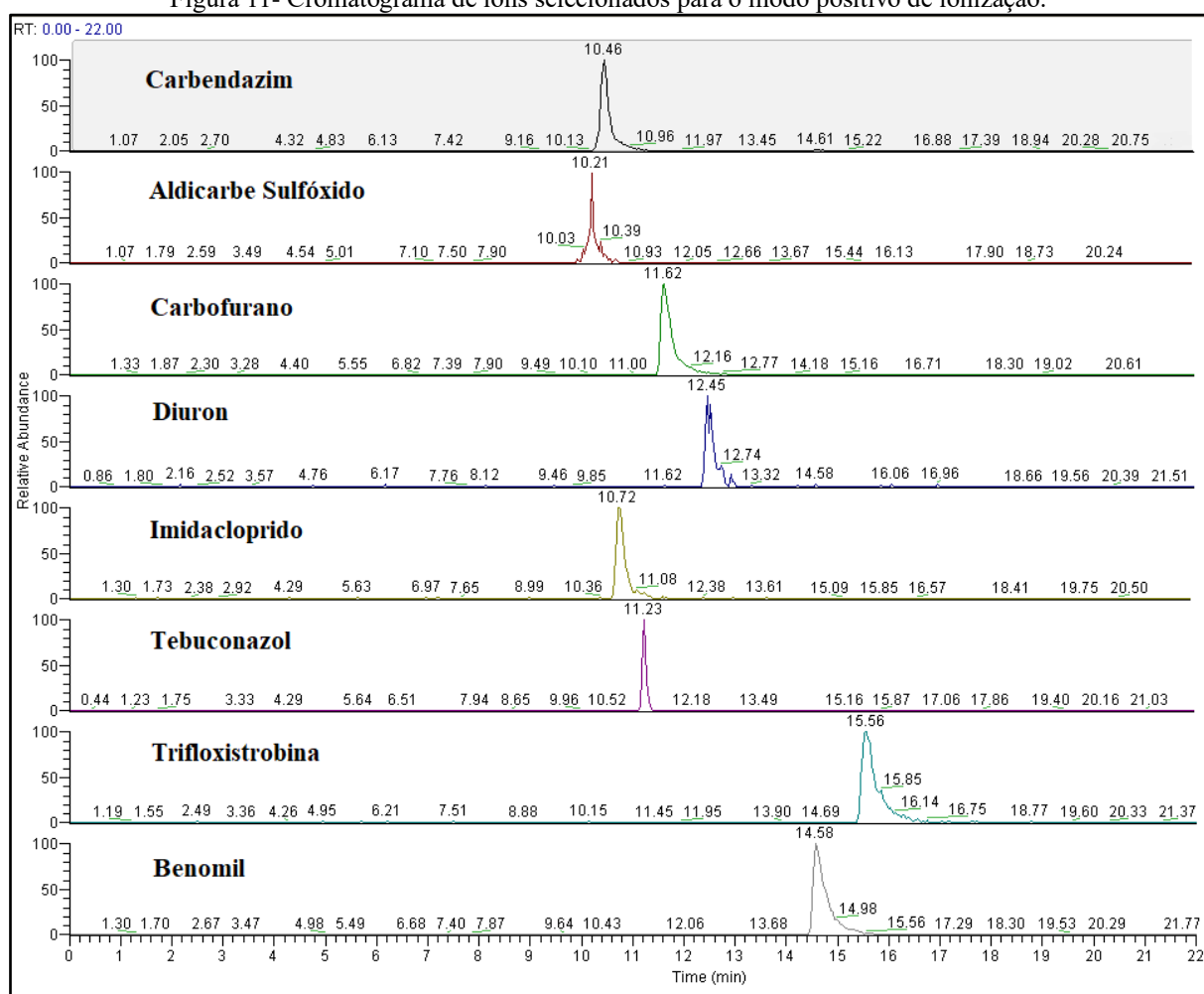
A maior parte dos íons obtidos no estudo foram encontrados, semelhantemente, na literatura, tanto para os íons precursores quanto para os íons produtos, como por exemplo, o Carbofurano, que apresentou semelhante ionização em todos os trabalhos.

5.2 Desenvolvimento do método cromatográfico

Na Figura 11 são apresentados os cromatogramas de íons selecionados para o modo positivo de ionização, os quais monitoram individualmente cada transição m/z , ou seja, é o cromatograma gerado apenas pelos íons de interesse produzido por cada analito.

Pode-se observar que alguns compostos possuem tempos de retenção muito próximos, fazendo com que os mesmos coeluem. No entanto, a separação de todos os analitos não é primordial para métodos analíticos contendo detecção por MS/MS, ainda que com baixa resolução cromatográfica. Entretanto, busca-se sempre a melhor resolução possível para obter melhores métodos com menores possibilidades de interferentes por efeitos de matriz (SHIHOMATSU, 2015).

Figura 11- Cromatograma de íons selecionados para o modo positivo de ionização.



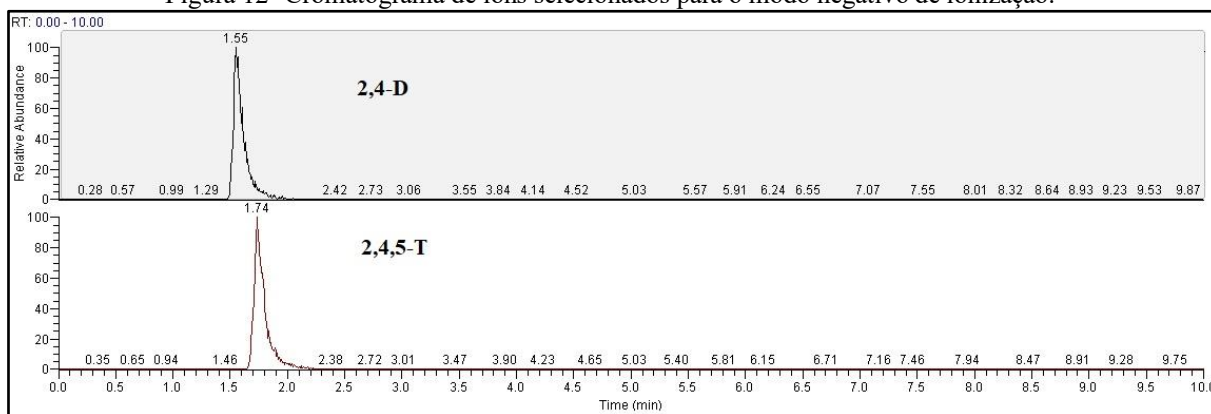
Fonte- Autoria própria.

Para os pesticidas 2,4-D e 2,4,5-T que apresentaram ionização no modo negativo, foi testado o mesmo gradiente do modo positivo (Tabela 3), onde foi verificado a eluição destes compostos quando a fase móvel apresenta concentração de 90-10 (metanol-água). A

partir desse resultado criou-se um método isocrático com a proporção de 90-10 (metanol 0,1% ácido fórmico- água ultrapura 0,1% ácido fórmico) e tempo de corrida de 10 min.

Na figura 12, pode-se observar os cromatogramas de íons específicos para os pesticidas 2,4-D e 2,4,5-T.

Figura 12- Cromatograma de íons selecionados para o modo negativo de ionização.

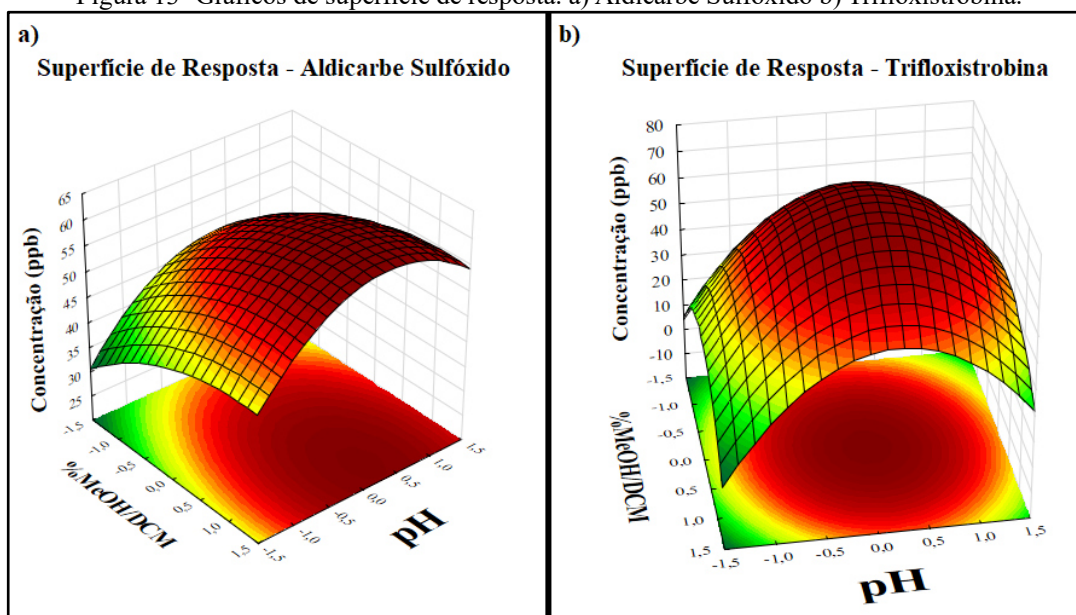


Fonte- Autoria própria.

5.3 Planejamento experimental

No software Statistica 13.5 foram plotados gráficos de superfície para a observação dos resultados dos onze ensaios do planejamento experimental. Em sua maioria os gráficos alternaram em dois tipos de comportamento, como mostrado na Figura 13, onde podemos ver o gráfico de superfície para o aldicarbe sulfóxido e trifloxistrobina, respectivamente.

Figura 13- Gráficos de superfície de resposta. a) Aldicarbe Sulfóxido b) Trifloxistrobina.



Fonte- Autoria própria

Podemos observar que os melhores resultados observados foram com o valor de pH 4, o ponto central para o fator pH. Quanto aos valores para o percentual de solvente de eluição, os resultados alternaram entre 85% Metanol (15% DCM) (+ α) e 50% Metanol (50% DCM) (0). Os pesticidas que apresentaram melhores recuperações no percentual 85% Metanol obtiveram resultados semelhantes com 50% Metanol. Porém, o inverso não foi observado, onde os pesticidas com maior recuperação em 50% Metanol apresentam baixas recuperações em 85% Metanol. Considerando somente o fator percentual do solvente de eluição, a maioria dos compostos apresentaram maior recuperação no ponto central (50%). Essa proporção de solvente de eluição permite boa recuperação para todos os compostos pesticidas, desde os mais polares como o Aldicarbe Sulfóxido aos mais apolares como a Trifloxistrobina.

Os analitos estudados apresentam a tendência de encontrar grande parte das suas espécies na forma protonada em pH 4. Com isso pode-se presumir que o pH tornou o meio mais adequado para uma melhor interação entre os analitos e a fase sorvente do sistema SPE. Alguns pesticidas com características apolares como o 2,4,5-T e o Carbendazim, apresentando baixa solubilidade em água e K_{ow} elevados, encontram em sua estrutura o grupamento hidroxila (OH) desprotonado em pH 4, tendo a maior parte das espécies em solução (>90%) desprotonadas. No entanto, aparentemente a baixa polaridade dos compostos pôde colaborar para uma maior recuperação dos analitos. Uma possível explicação para a melhor recuperação nesse pH, é a de a desprotonação dos compostos com características apolares, ter impedido

que os mesmos ficassem retidos no sorvente por fortes interações apolares. Uma explicação semelhante foi redigida por Wang *et al.* (2019), ao explicar a melhor recuperação do Carbendazim e outros compostos em uma faixa de pH de 3,0-4,5 em água, apresentando o fato de que os compostos estudados se tornam mais hidrofóbicos em soluções mais neutras, resultando em retenção na fase sorvente.

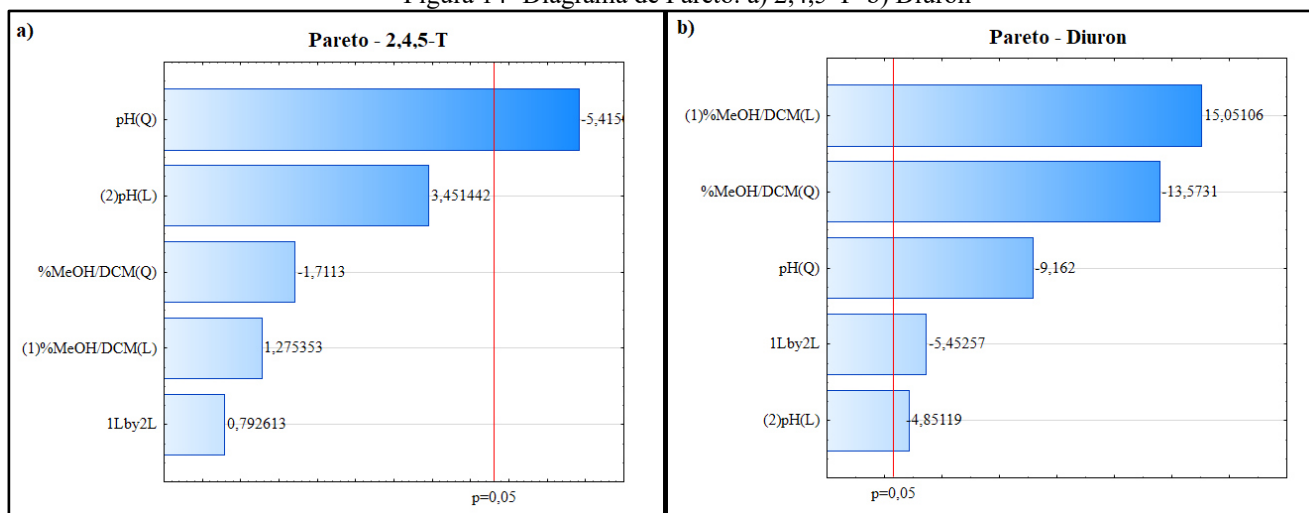
Foram analisados também os diagramas de Pareto para cada pesticida estudado. Dentre eles, apenas o Diuron e o 2,4,5-T apresentaram variáveis significativas a 95% de confiança, os demais pesticidas não atingiram variáveis com esse nível de confiança.

Mateus, Barbin e Conagin (2001), afirmam que o coeficiente de variação, quando superior a 6%, pode interferir na significância dos parâmetros estudados. No entanto, segundo Mendonça (2012), estes prejuízos podem ser contornados aumentando-se o número de experimentos, o que nem sempre é viável devido aos fatores custo e tempo.

Os coeficientes de variação dos experimentos realizados que não apresentaram significância variaram entre 8 e 20%. Estes altos valores de coeficiente de variação contribuem para a falta de significância dos parâmetros estudados devido a interferência direta do coeficiente de variação na confiança estatística do resultado.

Os diagramas de Pareto para os pesticidas Diuron e o 2,4,5-T que apresentaram variáveis significantes são mostrados na Figura 14.

Figura 14- Diagrama de Pareto. a) 2,4,5-T b) Diuron

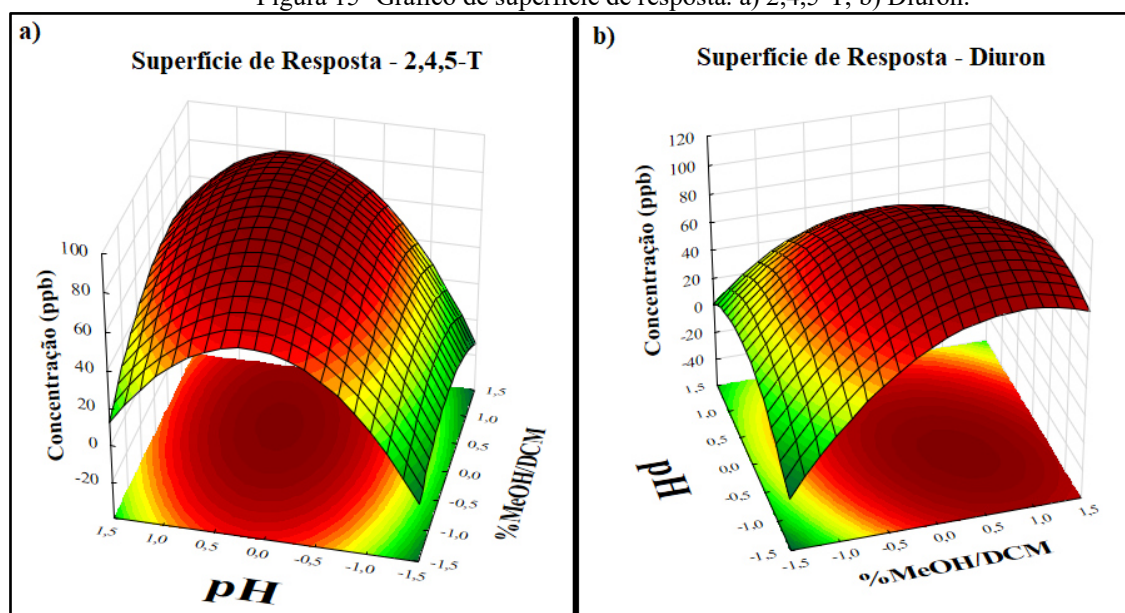


Fonte- Autoria própria

No diagrama de Pareto do item a) da Figura 14, observa-se que apenas a variável pH(Q) se mostrou significativa a 95% de confiança, mostrando um efeito negativo, ou seja contribuindo para a diminuição da recuperação do 2,4,5-T. Para o pesticida Diuron, no item b)

da Figura 14, pode se observar que todas as variáveis foram significativas a 95% de confiança, sendo a %MeOH/DCM(L) a variável mais significativa, influenciando positivamente na recuperação do Diuron, ou seja, porcentagens maiores de metanol no solvente de eluição contribuem para maiores recuperações deste pesticida. Os gráficos de superfície para estes dois pesticidas são mostrados na Figura 15.

Figura 15- Gráfico de superfície de resposta. a) 2,4,5-T; b) Diuron.



Fonte- Autoria própria.

Foi calculada a análise de variância (ANOVA) para os modelos dos pesticidas que apresentaram variáveis significativas no intuito de confirmar a significância dos modelos estudados. Salienta-se que para o cálculo da regressão considerou-se apenas as variáveis apontadas como significativas a 95% de confiabilidade. A Tabela 8 apresenta a ANOVA para o experimento com o 2,4,5-T.

Tabela 8- Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central referente ao modelo para melhor extração do pesticida 2,4,5-T.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{v1/v2}$	F_{tab} (95%)	F_{tab} (90%)	F_{tab} (75%)	F_{tab} (50%)
Regressão	3793,24	5	758,65	1,317	5,05	3,45	1,89	1,00
Resíduo	2879,90	5	575,98					
Falta de ajuste	785,95	3	261,98	2,025	19,16	9,16	3,15	1,13
Erro puro	258,73	2	129,36					
Total SS	6673,14	10						

Fonte- Autoria própria.

O modelo para o 2,4,5-T só foi considerado significativo a 50% de confiança e não foi considerado preditivo. Visto que para ser considerado significativo $F_{v1/v2}$ precisa ser maior que F_{tab} e para ser considerado preditivo $F_{v1/v2}$ precisa ser menor que F_{tab} . Um modelo é considerado significativo quando ele é capaz de descrever o processo e preditivo quando o modelo prediz o resultado a partir dos valores dos parâmetros sem precisar realizar o experimento (SOUSA, 2019). O modelo obtido, representado pela Equação 21 mostrou um coeficiente de correlação (R^2) de 0,84 para um nível de confiança de 50%, ou seja, esse modelo consegue explicar cerca de 84% dos dados em torno da média.

$$\text{Concentração} = 86,57 - 26,02_{pH}^2 \quad (21)$$

A Tabela 9 apresenta a ANOVA para o experimento com o Diuron. Para o Diuron, o modelo foi considerado significativo a 95% de significância. Obtendo valor de $F_{v1/v2}$ (15,20) $> F_{tab}$ (5,05) para a regressão, mostrando que o modelo é capaz de descrever o processo de extração do Diuron. O modelo também foi considerado preditivo obtendo $F_{v1/v2}$ (5,42) da falta de ajuste $< F_{tab}$ (19,16), sendo capaz de predizer os resultados sem a necessidade do experimento. O modelo obtido mostrou um coeficiente de correlação (R^2) de 0,96 para um nível de confiança de 95%, esse modelo consegue explicar cerca de 96% dos dados em torno da média.

Tabela 9- Análise de variância (ANOVA) para o erro puro do planejamento composto central referente ao modelo para melhor extração do pesticida Diuron.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{v1/v2}$	F_{tab} (95%)
Regressão	6132,03	5	1226,41	15,20	5,05
Resíduo	403,40	5	80,68		
Falta de ajuste	181,99	3	60,66	5,42	19,16
Erro puro	22,38	2	11,19		
Total SS	5728,63	10			

Fonte- Autoria própria.

A Equação 22 representa o modelo para a obtenção da concentração do Diuron após o processo de extração.

$$\text{Concentração} = 88,43 - 19,18_{\%MeOH/DCM}^2 + 17,83_{\%MeOH/DCM} - 5,75_{pH} - 12,94_{pH}^2 - 9,12_{pH \times \%MeOH/DCM} \quad (22)$$

Embora nem todos os pesticidas tenham apresentado variáveis significativas ao nível de confiança de 95%, através do gráfico de superfície foi possível observar o melhor

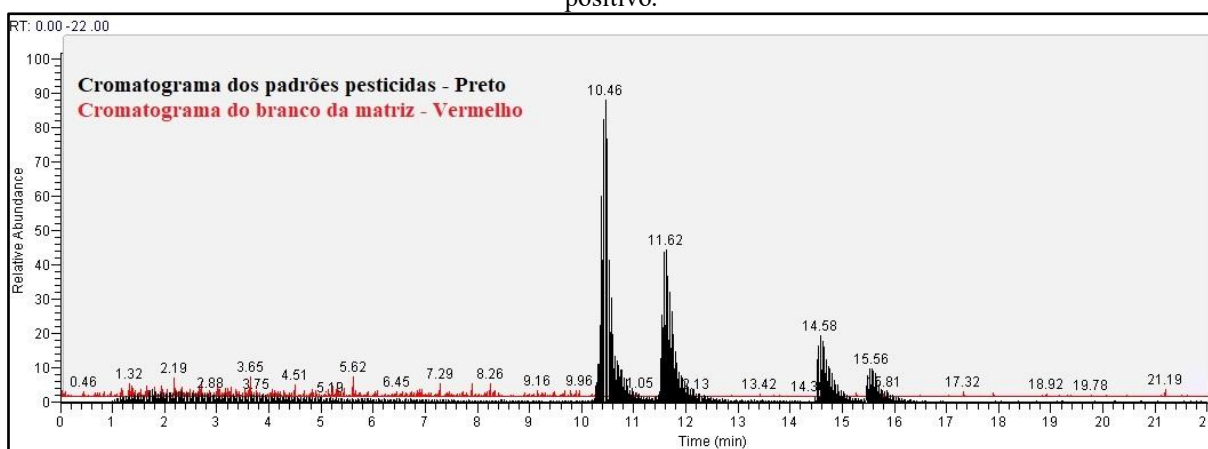
perfil de respostas obtidos. Diante dos resultados apresentados, após o planejamento experimental foi escolhido o método de preparo de amostras SPE, com amostra condicionada a pH 4, sendo posteriormente eluída com uma solução de 50% MeOH/50% DCM.

5.4 Validação do método

5.4.1 Seletividade

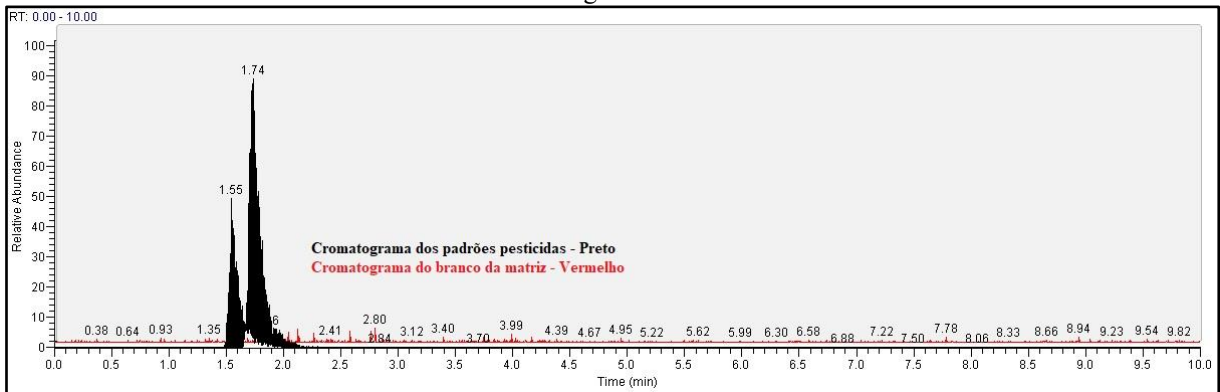
A seletividade do método foi garantida, uma vez que a matriz não apresentou interferentes que dificultassem a quantificação dos padrões, ou seja, a matriz não apresentou compostos que tivessem o mesmo tempo de retenção e/ou a mesma massa dos analitos. Como pode ser observada nas Figuras 16 e 17 a seguir, que mostram a comparação dos cromatogramas de íons totais- matriz isenta de interferentes (matriz branca - linha vermelha), e a matriz com os padrões dos pesticidas estudados (linha preta).

Figura 16- Cromatograma mostrando a seletividade do método para os compostos de ionização no modo positivo.



Fonte- Autoria própria

Figura 17- Cromatograma mostrando a seletividade do método para os compostos de ionização no modo negativo.



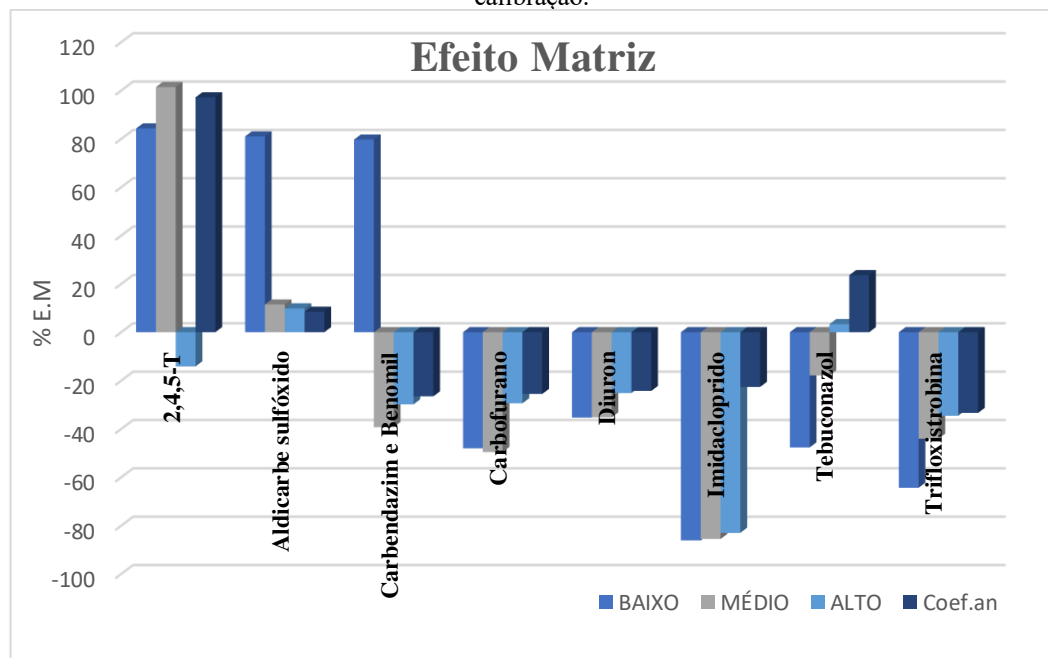
Fonte- Autoria própria.

A satisfatória seletividade observada para os pesticidas estudados permitiu a utilização da amostra de água em branco para a preparação das curvas analíticas na matriz.

5.4.2 Efeito Matriz

A Figura 18 mostra as porcentagens, de efeito matriz, obtidas através de comparação dos coeficientes angulares das respectivas curvas de calibração. Assim como apresenta o efeito matriz nos pontos baixos, médios e altos de cada curva de calibração.

Figura 18- Efeito Matriz considerando os coeficientes angulares e os níveis baixos, médios e altos das curvas de calibração.



Fonte- Autoria própria. %E.M- porcentagem de efeito matriz.

Observa-se que há diferença de porcentagem de efeito matriz entre os pesticidas e os pontos da curva de calibração, assim como o observado por Martins *et al.*, (2018). Não sendo passível compreender todos os efeitos de matriz observados. No entanto, uma predominância de efeitos de matriz é observada nos níveis mais baixos da curva.

A maioria dos compostos pesticidas aqui estudados apresentaram efeito matriz de supressão de sinal, esse fato pode ser relacionado a competição de ionização entre os compostos da matriz e os analitos, durante a adição de carga do analito na fase líquida e/ou durante a transferência de íons para a fase gasosa da superfície das gotículas (Panuwet *et al.*, 2016; Reichert, *et al.*, 2015). Segundo Zrostliková *et al.*, (2002), os componentes orgânicos presentes na amostra da matriz em concentrações superiores a $10^{-5} M$ podem competir com o analito para o acesso a superfície da gotícula na ionização ESI, em alguns casos, causando a redução da formação dos íons do analito.

Zrostliková *et al.*, (2002) ainda observou um efeito menos comum de superposição de sinal no pesticida Carbendazim, o mesmo efeito observado neste trabalho, no nível baixo de concentração. Este efeito foi atribuído a transferência de prótons, visto a natureza básica do pesticida e a presença de interferentes ácidos na matriz, podendo assim promover a formação dos íons $[M+H]^+$ no eletrospray.

Já o 2,4,5-T apresentou um pequeno efeito de supressão de sinal apenas no ponto alto da curva, sendo predominante o efeito de superposição de sinal. Kittlaus *et al.*, (2012), relatou que compostos com ionização no modo negativo, especialmente compostos com grupo carboxila, apresentaram superposição de sinal principalmente em regiões da etapa cromatográficas onde os pesticidas apolares são eluídos. Panuwet *et al.*, (2016) relata que o modo negativo de ionização é menos sujeito a supressão de íons, visto que um menor número de compostos ioniza no modo negativo reduzindo a competição entre os íons para receber a carga.

Apenas o Aldicarbe Sulfóxido apresentou efeito matriz menor que $\pm 20\%$, todos os outros apresentaram valores superiores, indicando a necessidade da escolha correta do método quantitativo na curva da matriz.

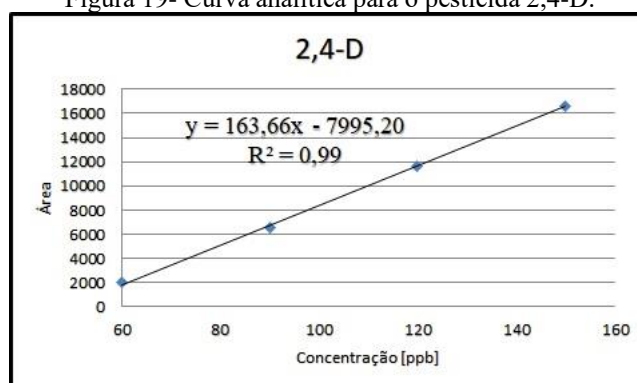
5.4.3 Linearidade

No Apêndice 2 pode-se observar os gráficos das curvas de calibração obtidas e seus respectivos coeficientes de determinação para os pesticidas.

Todas as curvas apresentam coeficiente de determinação (R^2) 0,99, como o recomendado para indicar linearidade dos modelos (ANVISA, 2017). Estes resultados de coeficiente de determinação refletem um bom indicativo da linearidade do modelo. No entanto, não é suficiente para descrever com segurança a adequabilidade do mesmo (INMETRO, 2016).

O pesticida 2,4-D apresentou faixa linear de 60 – 150 $\mu\text{g/L}$, com apenas 4 pontos de concentração da curva analítica, em discordância com as normas de validação, que exigem que a curva analítica contenha no mínimo 5 pontos de concentrações diferentes. Como pode ser observado pela Figura 19. Sendo assim, torna-se necessário estudos futuros para adquirir uma maior faixa linear para a análise desse pesticida.

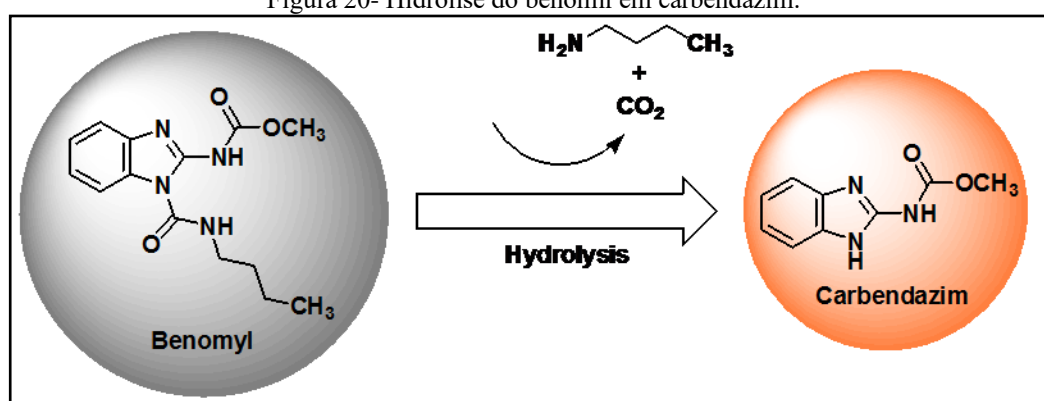
Figura 19- Curva analítica para o pesticida 2,4-D.



Fonte- Autoria própria

Não foi observado nenhum sinal cromatográfico na curva da matriz para o Benomil. No entanto, estudos relatam a instabilidade do pesticida em questão, visto que o mesmo possui uma rápida degradação, resultado de hidrólise (Figura 20), na qual o benomil perde um grupo amida e degrada-se em Carbendazim (Rizzetti *et al.*, 2016). Dessa maneira, o Benomil é quantificado sob a forma de Carbendazim.

Figura 20- Hidrólise do benomil em carbendazim.



Fonte- Rizzetti *et al.*, 2016.

A análise de homocedasticidade realizada através do Teste de Levene (Tabela 10), se mostrou relevante, apresentando valores de $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$. Este comportamento atesta que as variâncias dos erros são estatisticamente iguais, portanto, as equações propostas são adequadas para a utilização do método dos mínimos quadrados, sendo os modelos considerados homocedásticos.

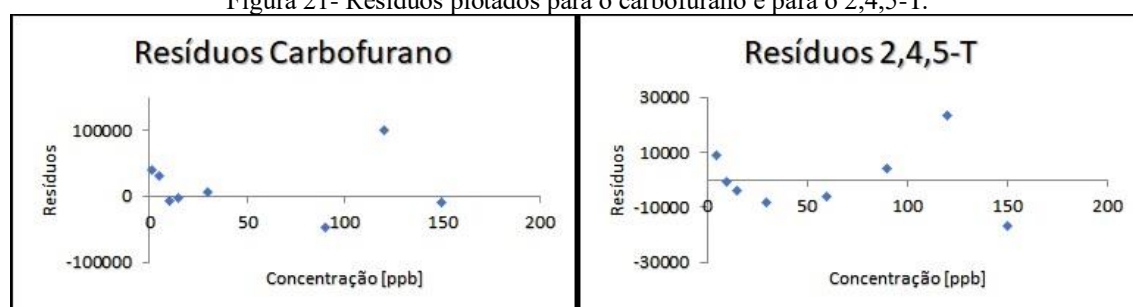
Tabela 10- Resultados para teste de Levene

Pesticida	F calculado	F tabelado	Conclusão
2,4,5-T	1,70	4,07	Modelo ajustado- homocedástico
Aldicarbe Sulfóxido	0,54	3,55	Modelo ajustado- homocedástico
Carbendazim e benomil	2,65	4,77	Modelo ajustado- homocedástico
Carbofurano	0,54	3,55	Modelo ajustado- homocedástico
Diuron	2,41	8,81	Modelo ajustado- homocedástico
Imidacloprido	2,22	4,06	Modelo ajustado- homocedástico
Tebuconazol	9,26	9,28	Modelo ajustado- homocedástico
Trifloxistrobina	6,36	6,39	Modelo ajustado- homocedástico

Fonte- Autoria própria.

A Figura 21 mostra os gráficos de resíduos para o 2,4,5-T e para o Carbofurano. Pode-se observar que não apresentaram nenhum tipo de tendência, como a dispersão de resíduos. Perfis como esses indicam modelos homocedásticos (MARTINS, *et al.*, 2018; BARBOSA, *et al.*, 2018).

Figura 21- Resíduos plotados para o carbofurano e para o 2,4,5-T.



Fonte- Autoria própria.

Para averiguar com segurança a adequabilidade das curvas analíticas em relação a significância da correlação entre a variável independente e dependente. Foi realizado o teste F mostrado na Tabela 11. Para o Teste F os valores calculados foram muito superiores aos valores tabelados, descartando a hipótese nula (H^0) (coeficiente angular = 0), onde não

haveria correlação entre as variáveis, e aceitando a hipótese alternativa (H^a) (coeficiente angular $\neq 0$). Por tanto, a significância foi constatada, mostrando correlação entre as variáveis X e Y, e a adequabilidade do modelo.

Tabela 11- Resultados para Teste F, mostrando F calculado e F tabelado.

Pesticida	F calculado	F tabelado	Conclusão
2,4,5-T	1507,789	5,99	Curva significativa
Aldicarbe Sulfóxido	1093,519	5,59	Curva significativa
Carbendazim e benomil	928,512	7,71	Curva significativa
Carbofurano	1361,571	5,59	Curva significativa
Diuron	1137,032	10,13	Curva significativa
Imidacloprido	845,209	5,99	Curva significativa
Tebuconazol	205,0648	10,13	Curva significativa
Trifloxistrobina	796,3376	7,71	Curva significativa

Fonte- Autoria própria.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 11, é possível concluir que as curvas analíticas são adequados para a previsão de resultados de concentrações, sabendo que há correlação linear entre os valores de concentração e áreas dos picos cromatográficos.

Foi avaliada também a significância dos parâmetros da curva, através do teste t de Student. Os valores de t crítico foram obtidos considerando os graus de liberdade de cada modelo para 95% de confiança.

Na Tabela 12, estão os valores dos coeficientes angulares e lineares, os respectivos desvios-padrões, além dos valores de t de Student calculados para os coeficientes angulares e lineares e os respectivos valores de t crítico.

Tabela 12- Valores dos coeficientes angulares e lineares, seus respectivos desvios e t calculados, P-valor respectivo.

Pesticida	Coef. Angular	s_a	tcal a	Coef. Linear	s_b	tcal b	t crítico
2,4,5-T	3517,68	90,59	38,83	-19511,61	7151,12	2,73	2,45
Aldicarbe Sulfóxido	3535,59	106,92	33,07	-10681,8	7957,28	1,34	2,36
Carbendazim e benomil	80075,55	1807,17	44,31	-37121,12	152466,61	0,24	2,57
Carbofurano	14730,48	399,20	36,90	-29822,45	29710,67	1,00	2,36
Diuron	208,98	6,20	33,72	-406,17	457,32	0,89	3,18

Imidacloprido	1694,07	58,27	29,07	-7175,28	4599,77	1,56	2,45
Tebuconazol	1213,94	84,77	14,32	-25048	8434,69	2,97	3,18
Trifloxistrobina	6004,16	212,77	28,22	-41783,38	19369,38	2,16	2,78

Fonte- Autoria própria.

s_a - desvio padrão do coeficiente angular; s_b - desvio padrão do coeficiente linear; $t_{cal a}$ - t calculado para coeficiente angular; $t_{cal b}$ - t calculado para coeficiente linear.

Todos os coeficientes angulares apresentaram valores significativos, superiores ao t crítico. Já em relação aos coeficientes lineares os pesticidas Aldicarbe Sulfóxido, Carbendazim, Carbofurano, Diuron, Imidacloprido, Tebuconazol e Trifloxistrobina apresentaram valores de t de Student não significativo, afirmando que as mesmas equações podem passar pela origem, podendo ser descartados os coeficientes lineares das equações das retas. O coeficiente linear do pesticida 2,4,5-T não pode ser retirado da equação da reta, pois o mesmo é significativo para a equação.

Para as curvas em que os coeficientes lineares se mostraram não significativos, os valores dos coeficientes angulares foram corrigidos a fim de manter a maior precisão de resultados. O tratamento de ajuste dos coeficientes e cálculo dos intervalos de confiança adotados foram descritos por Silva *et al.* (2017), os quais, ao analisarem pesticidas em água usando o sistema GC-FID, realizaram ajustes nos coeficientes lineares para todas as curvas, pois apresentaram intervalo de confiança passando através da origem.

O intervalo de confiança foi calculado para todos os pesticidas. Porém, as tabelas de dados (Tabelas 13 e 14) ilustram os cálculos para o carbofurano.

Tabela 13- Resultados da curva do carbofurano obtidos para os cálculos de Σxy , Σx^2 , Σy^2 , SS_{resid} , S_{xy} , S_{xx} and S_y

X	Y	\hat{y}_i	Xy	x^2	y^2	$y_i - \hat{y}_i$	$(x - \bar{x})$	$(y - \bar{y})$	$(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})$ S_{xy}	$(x - \bar{x})^2$ S_{xx}	$(y - \bar{y})^2$ S_{yy}
150	2169470	2179750	325420500	22500	4,7066 E12	-10280	97	1412030	136339330	9323	1993828407116
120	1838911	1737836	220669320	14400	3,38159 E12	101075	67	1081471	71977896	4430	1169579283514
90	1247512	1295921	112276080	8100	1,55629 E12	-48409	37	490072	17914850	1336	240170456279
60	746245	854007	44774700	3600	5,56882 E11	-107762	7	-11195	-73390	43	125330513
30	417617	412092	12528510	900	1,74404 E11	5525	-23	-339823	7966964	550	115479746845
15	188012	191135	2820180	225	35348512144	-3123	-38	-569428	21891347	1478	324248373724
10	109479	117482	1094790	100	11985651441	-8003	-43	-647961	28150310	1887	419853601512
5	75248	43830	376240	25	5662261504	31418	-48	-682192	33048418	2347	465386076462
1	24467	-15092	24467	1	598634089	39559	-52	-732973	38440368	2750	537249581612
Σ	481	6816961	719984787	49851	104293605548				355656094	24144	5265920857577
Média	53	757440,11									

Fonte- Autoria própria.

y - sinal obtido experimentalmente; \hat{y}_i - sinal previsto de acordo com a equação da curva; SS_{resid} - soma residual de quadrados; S_{xx} , S_{yy} - soma dos quadrados; S_{xy} - covariância entre as variáveis x e y .

Tabela 14- Intervalo de confiança para 95% de confiança da concentração de carbofurano e faixa de aceitação

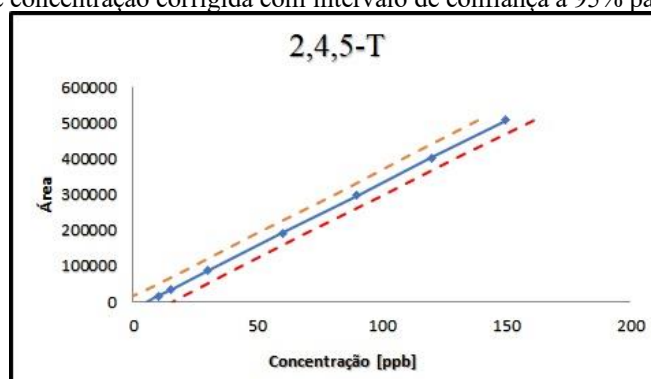
Y	X	± IC 95%	Faixa de Aceitação ±	
2166410	150	13,06	136,94	163,06
1733128	120	12,31	107,69	132,31
1299846	90	11,69	78,31	101,69
866564	60	11,23	48,77	71,23
433282	30	10,94	19,06	40,94
216641	15	10,87	4,13	25,87
144427	10	10,85		20,85
72214	5	10,84		15,84
14443	1	10,84		11,84
0	0	10,84		10,84

Fonte- Autoria própria.

Na Tabela 13 estão todos os dados necessários para os cálculos de intervalo de confiança, tanto os intervalos de confiança de concentração (Tabela 14), como os intervalos de confiança dos coeficientes da curva (Tabela 15).

O intervalo de confiança expresso na Tabela 14 nos diz o quanto da concentração pode variar para mais e para menos, em 95% de confiança, para que os valores sejam considerados verdadeiros. Na Figura 22 está plotado o gráfico de concentração versus área e seu respectivo intervalo de confiança para o pesticida 2,4,5-T. Os gráficos dos demais pesticidas estão plotados no Apêndice 3.

Figura 22- Curva de concentração corrigida com intervalo de confiança a 95% para o pesticida 2,4,5-T.



Fonte- Autoria própria.

Na Tabela 15, estão os valores das equações experimentais inicialmente propostas e as equações finais após os tratamentos estáticos adequados. Assim como os intervalos de confiança para os coeficientes angulares de todas as curvas e os coeficientes lineares das curvas que o mantiveram.

Tabela 15- Resultados das equações experimentais, equações finais e seus limites de confiança para os coeficientes pertencentes as equações finais.

Pesticida	Equações Experimentais	Equação final	± IC (95%)
2,4,5-T	$y = 3517,7x - 19511$	$y = 3517,7 x - 19511$	a- 221,04 b- 17448,73
Aldicarbe Sulfóxido	$y = 3535,6x - 10682$	$y = 3432,53 x$	a- 196,91
Carbendazim e benomil	$y = 80076x - 37121$	$y = 79721,66 x$	a- 2406,04
Carbofurano	$y = 14730x - 29822$	$y = 14442,74 x$	a- 701,26
Diuron	$y = 208,98x - 406,17$	$y = 204,28 x$	a- 11,53
Imidacloprido	$y = 1675,5x - 5176,4$	$y = 1624,98 x$	a- 109,54
Tebuconazol	$y = 1213,94x - 25047,65$	$y = 986,23 x$	a- 228,15
Trifloxistrobina	$y = 6004,2x - 41783$	$y = 5613,43 x$	a- 372,69

Fonte- Autoria própria. ± IC (95%)- Intervalo de confiança a 95%.

É interessante observar que os testes estatísticos se complementam, confirmando os resultados obtidos de diferentes maneiras. Análises estatísticas permitem agregar uma maior confiabilidade aos resultados obtidos experimentalmente. Se observarmos a Tabela 13 para o pesticida 2,4,5-T, veremos que os valores de coeficiente linear possíveis pelo intervalo de confiança não incluem o zero, ou seja, impossibilitam a equação de passar pela origem, como previsto pelo teste t. O tratamento estatístico permitiu validar as curvas de calibração propostas quanto a linearidade das mesmas, gerando resultados com maior confiança.

5.4.4 LD, LQ, faixa linear, precisão e recuperação.

Na tabela 16, são apresentados os resultados para LD, LQ, faixa linear, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e recuperação. Os parâmetros de precisão e recuperação estão expressos nos níveis- baixo, médio e alto.

O nível alto corresponde as concentrações de 120 µg/L (Diuron) e 150 µg/L (demais compostos). O nível médio corresponde as concentrações de 90 µg/L

(Trifloxistrobina e Tebuconazol) e 60 µg/L (demais compostos). O nível baixo corresponde as concentrações 1 µg/L (Aldicarbe Sulfóxido e Carbofurano), 5 µg/L (Imidacloprido e 2,4,5-T), 10 µg/L (Carbendazim e Benomil), 15 µg/L (Diuron e Trifloxistrobina) e 30 µg/L (Tebuconazol).

Tabela 16- Resultado dos parâmetros de LD, LQ, faixa linear, precisão e recuperação.

Pesticidas	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	Faixa Linear (µg/L)	Repetibilidade (RDS%)			Precisão intermediária (RDS %)			Recuperação (%)					
				Alto	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Alto (RSD%)		Médio (RSD%)		Baixo (RSD%)	
2,4,5,-T	0,01	0,05	0,05 – 1,5	18	6,9	4,9	18	15	15	60	20	52	12	68	18
Aldicarbe Sulfóxido	0,005	0,01	0,01 – 1,5	2,8	6,7	2	3	10	5	100	17	91	19	51	10
Carbendazim e benomil	0,05	0,1	0,1 – 1,5	1,4	1,2	1,4	10	5	10	103	3	105	15	116	24
Carbofurano	0,005	0,01	0,01 - 1,5	20,9	6,6	4,8	7	5	18	56	9	85	6	112	20
Diuron	0,1	0,15	0,15 - 1,2	13,3	13,5	5	4	6	18	126	11	98	2	122	6
Imidacloprido	0,01	0,05	0,05 – 1,5	0,7	2,6	4,0	5	14	14	158	15	55	12	129	2
Tebuconazol	0,15	0,3	0,3 – 1,5	6,1	16	9,4	10	2	24	105	30	144	24	158	22
Trifloxistrobina	0,1	0,15	0,15 – 1,5	4,8	10,9	3,1	14	19	24	137	4	99	22	77	6

Fonte- Autoria própria.

Pode-se observar que os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação são muito menores que os VMP's, previamente definidos por lei. Isto foi possível devido a utilização do método de preparação de amostras utilizado (SPE), o qual permitiu concentrar a amostra 100 vezes em relação a concentração original.

A faixa linear fornecida por esse método alcança baixos valores de concentração, acompanhando a tendência de poder monitorar valores cada vez menores de resíduos de pesticidas. No entanto, se os valores obtidos excederem a faixa linear, pode ser realizada a diluição da amostra, para que a concentração caia dentro da faixa de concentração fornecida, e os cálculos de concentração podem ser corrigidos adicionando um fator de diluição.

Em relação aos critérios de precisão e recuperação, a ANVISA (2017), não especifica faixas concretas de aceitação para os resultados. É pedido apenas que se leve em consideração o objetivo ao qual o método é proposto, a variabilidade intrínseca do método e a concentração de trabalho e do analito na amostra. Por isso, levou-se em consideração os valores de precisão e recuperação indicados pelo INMETRO (2016), para a faixa de concentração trabalhada nesse estudo.

Quanto a precisão obtida, apenas os valores para os níveis baixos de precisão intermediária do Tebuconazol e Trifloxistrobina e para o nível mais alto de repetibilidade do Carbofurano, excederam o valor de 20% do coeficiente de variação. No entanto, todos os valores estão de acordo com os recomendados pelo INMETRO (2016), visto que valores de concentrações na faixa de 1 ppb podem apresentar coeficiente de variação de até 30% para serem considerados de boa precisão.

Em relação a recuperação do método, foram obtidos valores de 51-158% de recuperação (com DPR de 2-30%). Enquanto a faixa de recuperação indicada pelo INMETRO (2016), se encontra entre 40-120%. Os pesticidas que apresentaram valores superiores a 120% de recuperação foram o Diuron e Imidacloprido em todos os níveis de concentração testados, o Tebuconazol nos níveis médio e baixo e a Trifloxistrobina nos níveis alto e médio. No entanto, na construção da curva de calibração do método são considerados o efeito matriz e a recuperação de cada composto, fornecendo um resultado corrigido para as concentrações encontradas.

5.5 Aplicação em amostras reais

Das vinte e sete amostras analisadas, 78% estavam contaminadas com pelo menos um agrotóxico em concentrações superiores aos limites de quantificação estabelecidos pelo método proposto. A Tabela 17 mostra a relação das vinte e uma amostras contaminadas e as concentrações ($\mu\text{g/L}$) encontradas em cada uma delas, juntamente com os valores máximos de resíduos indicados pelos órgãos reguladores- Portaria de Consolidação nº5, Conama, União Europeia (EU) e Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US - EPA).

Tabela 17- Relação das amostras reais analisadas que apresentaram contaminação por agrotóxicos e valores máximos de resíduos permitidos por órgãos reguladores.

Amostras / Pesticidas	Am 1	Am 2	Am 3	Am 4	Am 5	Am 6	Am 7	Am 8	Am 9	Am 10	Am 11	Am 12	Am 13	Am 14	Am 15	Am 16	Am 17	Am 18	Am 21	Am 23	Am 26	Limites Permitidos				
																						Portaria (µg/L)	Conama (µg/L)	EU (µg/L)	EPA (µg/L)	
2,4,5-T	-	-	-	-	-	-	0,06	0,06	0,06	0,07	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	30	2	0,1	50
Aldicarbe sulfóxido	0,11	0,49	0,12	0,11	0,17	0,11	0,06	-	0,17	0,05	-	-	0,25	0,13	0,13	0,05	-	-	-	0,01	0,01	10	-	0,1	1	
Carbendazim e Benomil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	120	-	0,1	-	
Carbofurano	0,03	0,05	0,04	0,03	0,06	-	0,02	-	0,01	0,04	-	-	0,02	0,02	-	-	0,03	0,01	-	-	-	7	-	0,1	40	
Diuron	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,54	-	0,26	0,26	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-	90	-	0,1	-	
Imidacloprido	-	0,15	0,16	-	-	0,65	0,13	-	0,18	-	0,12	0,13	0,22	-	-	-	-	-	-	-	0,08	-	-	0,1	-	
Tebuconazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34	-	-	180	-	0,1	-	
Trifloxistrobina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	

Fonte- EPA, 2019; EU, 2018.

A partir da Tabela 17, podemos observar que a legislação mais rígida é a ditada pela EU (*European Commission*). A EU especifica que as concentrações de pesticidas na água potável não podem exceder 0,1 µg/L para um único pesticida e 0,5 µg/L para o total de pesticidas de uma única amostra.

Considerando os limites da EU as amostras 2,6,7,9 e 13, apresentaram concentrações que excederam o total de 0,5 µg/L, estando em desacordo com a lei. Ao que se refere aos valores individuais de pesticidas, vinte e quatro concentrações excederam o limite de 0,1 µg/L. Quando as outras legislações são consideradas, nenhuma das amostras excederam os limites especificados.

Apenas o Carbendazim e a Trifloxistrobina não foram encontradas em nenhuma amostra de água analisada. Salienta-se que esses compostos apresentam baixos valores de solubilidade em água, tornando difícil a detecção dos mesmos em amostras aquosas. No entanto, os mesmos são muito encontrados em frutas, vegetais e seus derivados (Fernandez *et al.*, 2009; Reichert *et al.*, 2015; Guedes, 2014). A Trifloxistrobina foi colocada no escopo deste estudo, por causa da sua grande utilização em algumas regiões do estado do Ceará, devido a isto jugou-se necessário a avaliação da mesma. Já o Carbendazim e o Benomil se encontram no escopo da Portaria de Consolidação nº5, como parâmetro obrigatório na avaliação da qualidade das águas. Enquanto o Imidacloprido que foi detectado em 33% das amostras, não se encontra no escopo de análises solicitadas pela portaria. Indicando a necessidade, de rever a legislação vigente ao que se refere ao parâmetro de análise de agrotóxicos.

Os pesticidas mais detectados nas amostras foram o Aldicarbe Sulfóxido e o Carbofurano, detectados em 56% e 44% das amostras, respectivamente. Ambos pesticidas, pertencem a classe dos carbamatos, essa classe de pesticidas é conhecida pela sua solubilidade em água, trazendo problemas com contaminações de rios e lagos (Pico, Blasco e Font, 2004), podendo causar contaminações em águas de abastecimento como as aqui analisadas.

Os cinco maiores níveis de concentração encontrados foram referentes ao Imidacloprido (Am 6) com 0,65 µg/L, 2,4,5-T (Am 14) com 0,6 µg/L, Diuron (Am 9) com 0,54 µg/L, Aldicarbe Sulfóxido (Am 2) com 0,49 µg/L, Tebuconazol (Am 21) e Diuron (Am 13) com 0,34 µg/L. Vale ressaltar que o pesticida com maior concentração encontrada, não se encontra no escopo dos pesticidas que devem ser obrigatoriamente analisados.

Kussumi (2007), ao analisar amostras de milho do estado de São Paulo por LC-MS/MS, encontrou Aldicarbe Sulfóxido em 20% das amostras analisadas, Carbofurano em

60% das amostras analisadas e Carbendazim em todas as amostras analisadas. É passível de concluir que isso deve-se a solubilidade dos mesmos, visto que o Aldicarbe Sulfóxido dentre os três agrotóxicos é o que possui maior solubilidade em água e o Carbendazim é o mais insolúvel, dificultando a remoção do mesmo em um processo de lavagem simples.

Casado, Santillo e Johnston (2018) ao analisar amostras de águas de rios provenientes do sudoeste da Inglaterra, através de LC-HRMS (cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa de alta resolução) encontrou dentre outros pesticidas Carbendazim, Imidacloprido e Tebuconazol, em concentrações máximas de 1,6 ng/L, 17,5 ng/L, 14,1 ng/L, respectivamente. Fora o MCPA, que foi encontrado em concentrações superiores a 100ng/L, o Imidacloprido foi o pesticida com maior concentração encontrada nas águas dos rios da Inglaterra.

Zini (2016) ao analisar água de abastecimento proveniente do estado do Rio Grande do Sul, utilizando as técnicas de SPE e LC-MS/MS obteve a mesma faixa de LQ do presente estudo (0,01 a 0,3 µg/L), ao analisou dentre outros compostos Carbendazim, Carbofurano, Diuron, Imidacloprido, Tebuconazol e Trifloxistrobina. No entanto, não houve detecção de nenhum pesticida com concentração superior à faixa de LQ estabelecida pelo método.

No presente trabalho houve um total de quarenta e sete detecções, em vinte e uma amostras contaminadas. As amostras 7 e 9 apresentaram um maior número de pesticida por amostra individual, um total de 5 pesticidas, sendo eles 2,4,5-T, Aldicarbe Sulfóxido, Carbofurano, Diuron e Imidacloprido. Apesar do grande número de amostras contaminadas, vale ressaltar que nenhuma amostra ultrapassou os VMP's destinados pela Portaria de Consolidação nº5. Todas as amostras apresentaram concentrações inferiores a 0,7 µg/L.

6 CONCLUSÃO

Um método multiressíduos foi otimizado utilizando a técnica de SPE no preparo de amostras. Essa técnica se mostrou eficiente, devido a sua alta capacidade de pré-concentrar os analitos de interesse, tornando o método mais sensível e com valores de limites de quantificação inferiores aos VMP's especificados pela Portaria de Consolidação nº5.

O planejamento fatorial composto central usado para otimizar a técnica SPE proporcionou eficientes recuperações para cada pesticida avaliado. As melhores condições foram- acidificação da amostra com ácido fórmico (10%) até pH 4 e eluição dos agrotóxicos em 7,5mL da solução (1/1) MeOH/DCM. O método também contou com volume de amostra de 100mL e sorvente polimérico Oasis HLB 500mg.

A técnica LC-MS/MS se mostrou ideal para a análise dos agrotóxicos em relação aos parâmetros sensibilidade e seletividade do método. O modo de aquisição de dados SRM permitiu a identificação e quantificação dos compostos em 22min e 10min, nos modos de ionização positivo e negativo, respectivamente.

Em relação a validação do método. Este foi considerado seletivo para todos os compostos, com boa linearidade (0,01-1,5 µg/L), e coeficientes de determinação superiores a 0,99. Os tratamentos estatísticos confirmam as suas respectivas linearidades, exceto para o 2,4-D.

Os limites de quantificação variaram entre 0,01 e 0,3 µg/L. A precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária apresentaram DPR (%) de 0,7-20,9% e 2-24%, respectivamente, menores que 30% como limite indicado pelo INMETRO para a faixa de concentração trabalhada.

As porcentagens de recuperação para os compostos, Diuron, Imidacloprido, Tebuconazol e Trifloxistrobina apresentaram valores superiores as recomendadas para a faixa de concentração trabalhada (40-120%).

As análises das amostras reais de águas de abastecimento do estado do Ceará, indicaram uma contaminação em 78% das amostras analisadas. Apenas Trifloxistrobina, Carbendazim e Benomil não foram detectados nas amostras, ao passo que os outros agrotóxicos foram detectados em pelo menos uma das amostras.

A detecção de agrotóxicos da classe dos carbamatos, pertencentes ao escopo da Portaria de Consolidação nº5, tais como Aldicarbe Sulfóxido e o Carbofurano foi observada em 56% e 44% das amostras, respectivamente.

O agrotóxico Imidacloprido pertencente a classe dos Neonicotinóides, foi detectado em 33% das amostras analisadas.

O Imidacloprido não compõe a legislação vigente de qualidade das águas, indicando a necessidade de se rever a legislação em relação ao parâmetro de agrotóxicos. No entanto, vale ressaltar que todas as amostras apresentaram valores inferiores a 0,7 µg/L.

Diante do exposto, conclui-se que os objetivos traçados para este trabalho foram satisfeitos, bem como o método proposto pode ser utilizado em análise de rotina laboratorial, podendo ser uma eficiente ferramenta utilizada em programas de monitoramento de agrotóxicos em águas destinadas ao consumo humano do estado do Ceará.

REFERÊNCIAS

ABRASCO - Associação Brasileira de Saúde Coletiva. **Dossiê ABRASCO**- um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Fernando Ferreira Carneiro, Lia Giraldo da Silva Augusto, Raquel Maria Rigotto, Karen Friedrich e André Campos Búrigo (Orgs). Rio de Janeiro- EPSJV; São Paulo- Expressão Popular, 2015.

ALCÂNTARA, D.B.; PAZ, M.S.O.; RODRIGUES, T.H.S.; FERNANDES, T.S.M.; BARBOSA, P.G.A.; LOIOLA, A.R.; GRINBERG, P.; ZOCCOLO, G.J.; BRITO, E.S.; NASCIMENTO, R.F. Organophosphorus Pesticide in Sapodilla (*Manilkara zapota*) Fruit. **J. Braz. Chem. Soc.**, Fortaleza-CE, Brasil. v. 00, n. 00, p. 1-9, 2018.

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- Na overview from the last decade. **Food Chemistry**, Fortaleza-CE, Brasil. v.298, n. 124958, p.14, 2019.

ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2018**- informe anual. Brasília, 2018. 72p. Disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/portal/publicacao/Conjuntura2018.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2019.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Anvisa aprova novo marco regulatório para agrotóxicos**. Brasil, 2019. Disponível em: portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-aprova-novo-marco-regulatorio-para-agrotoxicos/219201 . Acesso em: 05 nov. 2019.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consulta Pública nº 262, de 10 de outubro de 2016**. Brasília – DF, 2016. Disponível em- <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2858730/CONSULTA+P%C3%A9BLICA+N+262+GGTOX.pdf/e01d7f65-5f83-482e-b1e3-685560a029fd>. Acesso em: 16 out. 2019.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Ministério da Saúde, Brasil, 2017. Disponível em- http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 16 out. 2019.

APWR – Associação Park Way Residencial. **Mais veneno na mesa torna o caro ainda mais caro**. Fortaleza – CE, 2019. Disponível em: https://associacaoparkwayresidencial.blogspot.com/2019_08_01_archive.html. Acesso em: 05 nov. 2019.

BARBOSA, P.G.A.; MARTINS, F.I.C.C.; LIMA, L.K.; MILHOME, A.L.; CAVALCANTE, R.M.; NASCIMENTO, R.F. Statistical Analysis for Quality Adjustment of the Analytical Curve for Determination of Pesticide Multiresidue in Pineapple Samples. **Food analytical methods**, Fortaleza-CE, v. 11, n. 2, p. 466-478, 2018.

BARBIERI, M.V.; POSTIGO, C.; GUILLEM-ARGILES, N.; MONLLOR-ALCARAZ, L.S.; SIMIONATO, J.I.; STELLA, E.; BARCELÓ, D.; ALDA, M.L. Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination. **Scienc of the Total Environment**, Barcelona, v. 653, p. 958-967, 2019.

BARRETO, F.M.S. **CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA SUBTERRÂNEA POR PESTICIDAS E NITRATO NO MUNICÍPIO DE TIANGUÁ, CEARÁ**. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Ambiental) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BIELINSKA, A.B.; KUMIRSKA, J.; PALAVINSKAS, R.; STEPNOWSKI, P. Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC-MS/MS. **Talanta**, Polônia, v. 80, p. 947-953, 2009.

BOTITSI, E. ECONOMOU, A. ANTONIOU, S. TSIPI, D. **Determination of Different Classes of Pesticide Residues in Processed Fruits and Vegetables by LC-MS Using the TSQ Quantum Ultra According to EU Directive 91/414 EEC**. Application note- 425. Mass Spectrometry Applications for Food Safety Analysis. Grécia- Thermo Scientific, 2008.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum condition. **Journal of the Royal Statistical Society**, Manchester, v.13, n.1, p.1-45, 1951.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de Experimentos usando o Estatística**. Rio de Janeiro- E-papers Serviços Editoriais, 2003. 260 p.

CALDAS, S.S. **OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGANDO DLLME, SPE, HPLC-DAD E LC—ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA SUBTERRÂNEA**. 2009. Dissertação. (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

CASADO, D.; SANTILLO, J.; JOHNSTON, P. Multi-residue analysis of pesticides in surface water by liquid chromatography quadrupole-Orbitrap high resolution tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, United Kingdom, v. 1024, p. 1-17, set. 2018.

CHEMICALIZE. **Chemicalize Features – Calculation**. ChemAxon. 2019. Disponível em- <https://chemicalize.com>. Acesso em:14 ago. 2019.

CHROMACADEMY. **Sample preparation- Solid Phase Extraction – Overview**. Reino Unido- Crawford Scientific, 2010. Disponível em:<https://www.chromacademy.com/>. Acesso- 05 fev. 2019.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia/ organizadores** – Campinas, SP- Editora da Unicamp, 2006.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005**. Brasil, 2005. Disponível em- <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em:30 ago. 2019.

CROTTI, A.E.M.; VESSECCH, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de Massas com Ionização Por “Electrospray”- Processos Químicos Envolvidos na Formação de Íons de

Substâncias Orgânicas de Baixo Peso Molecular. **Quim. Nova**, Ribeirão Preto - SP, v. 29, n. 2, 287-292, 2006.

CRUZ, D.P.S.R. **Análise de gasolina aditivada por espectrometria de massas e cromatografia líquida com espectrometria de massas sequencial**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

DONATO, F.F. **RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA POTÁVEL USANDO SPE E DETERMINAÇÃO RÁPIDA POR LC-MS/MS E GC-MS/MS**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

DONATO, F.F.; MARTINS, M.L.; MANARETTO, J.S.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Development of a Multiresidue Method for Pesticide Analysis in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Determination by Gas and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, Santa Maria – RS, v. 26, n. 10, p. 2077-2087, 2015.

EPA - Environmental Protection Agency. **PART 141—NATIONAL PRIMARY DRINKING WATER REGULATIONS**. Vol. 23, title. 41, USA, 2019. Disponível em- <https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-03/documents/cfr-2011-title40-vol23-part141.pdf>. Acesso em:30 out. 2019.

EURACHEM. B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) **The fitness for purpose of analytical methods- a laboratory guide to method validation and related topics**. 2.ed. Reino Unido, 2014. Disponível em- https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf. Acesso em:16 out. 2019.

EURACHEM/CITAC. V. Barwick (ed.) **Guide to Quality in Analytical Chemistry- An Aid to Accreditation**. 3.ed. Reino Unido, 2016. Disponível em- https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/Eurachem_CITAC_QAC_2016_EN.pdf. Acesso em:16 out. 2019.

EUROPEAN UNION – EU. **Archive-Agri-environmental indicator pesticide pollution of water**. Eurostat Statistics Explained, 2018. Disponível em- https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Archive-Agri-environmental_indicator_-_pesticide_pollution_of_water. Acesso em:30 out. 2019.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry Process Validation- General Principles and Practices**. Department of Health and Human Services. Rev 1. United States, 2011. Disponível em-<https://www.fda.gov/media/71021/download>>. Acesso em:16 out. 2019.

FERNANDEZ, M.; RODRIGUEZ, R.; PICÓ, Y.; MANES, J. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits. **Journal of chromatography A**, v. 912, p. 301-310, 2001.

FERNANDES, T.S.M.; ALCÂNTARA, D.B.; GORDIANO, P.A.; PAZ, M.S.O.; ZOCCOLO, G.J.; NASCIMENTO, R.F. Matrix effect evaluation and method validation of

organophosphorus pesticide residues in bell peppers (*Capsicum annuum* L.) by GC-MS determination. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Fortaleza-CE, p. 16, 2019. Disponível em- <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03067319.2019.1657854>. Acesso em:05 nov. 2019.

FILHO, F.O.; ALCÂNTRA, D.B.; RODRIGUES, T.H.S.; SILVA, L.M.A.; SILVA, E.O.; ZOCOLO, G.J.; BRITO, E.S. Development and Validation of a Reversed Phase HPLC Method for Determination of Anacardic Acids in Cashew (*Anacardium occidentale*) Nut Shell Liquid. **Journal of Chromatographic Science**, Fortaleza - CE, v. 56, n. 4, p.300-306, Fortaleza, dez. 2017.

FORTALEZA, Prefeitura de Fortaleza. Secretaria Municipal de Urbanismo e Meio Ambiente. **Plano municipal de saneamento básico de fortaleza convênio de cooperação técnica entre companhia de água e esgoto do Ceará – CAGECE e Agência Reguladora de Fortaleza – ACFOR**. Fortaleza, jul. 2014. Disponível em- https://urbanismoemeioambiente.fortaleza.ce.gov.br/images/urbanismo-e-meio-ambiente/infocidade/diagnostico_do_sistema_de_esgotamento_sanitario.pdf. Acesso em:16 out. 2019.

GAMA, A.F.; OLIVEIRA, H.B.; CAVALCANTE, R.M. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. **Quim. Nova**, Fortaleza – CE, v. 36, n. 3, p. 462-467, 2013.

GREENPEACE. **Agricultura tóxica- Um olhar sobre o modelo agrícola brasileiro**. Brasil-Greenpeace Brasil, 2017. Disponível em- <http://greenpeace.org.br/agricultura/agricultura-toxica.pdf>>. Acesso em:05 nov. 2019.

GREENPEACE. **Liberação de agrotóxicos nos primeiros 100 dias de governo Bolsonaro**. Brasil, 2019. Disponível em- <https://www.greenpeace.org.br/hubfs/agrotoxicos-bolsonaro-100dias.pdf>>. Acesso em:05 nov. 2019.

GUEDES, J.A.C. **VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO EMPREGANDO QuEChERS E CG-EM PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS**. 2014. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

GUEDES, J.A.C.; SILVA, R.O.; LIMA, C.G.; MILHOME, M.A.L.; NASCIMENTO, R.F. Matriz effect in guava multiresidue analysis by QuEChERS method and gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, Fortaleza-CE, v.199, p. 380-286, 2016.

HARRIS, D.C. **Quantitative Chemical Analysis**. 7. ed. California- W. H. Freeman and Company, 2007.

HERMANN, A. **Estudo de método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em águas superficiais por SPE e GC-MS/MS**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **DOQ-CGCRE-008. Rev 05 – Ago 2016**- Orientação sobre validação de

métodos analíticos. Brasil, 2016. Disponível em- http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. Acesso em: 16 out. 2019.

IUPAC - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **THE PPDB – Pesticide Properties Database**. Research Triangle Park, 2019. Disponível em- <https://iupac.org/what-we-do/databases/>>. Acesso em: 14/08/19.

JARDIM, I.C.S.F. Extração em Fase Sólida- Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, Campinas – SP, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

KLARICH, K.L.; PFLUG, N.C.; DEWALD, E.M.; HLADIK, M.L.; KOLPIN, D.W.; CWIERTNY, D.M.; LEFEVRE, G.H. Occurrence of neonicotinoid insecticides in finished drinking water and fate during drinking water treatment. **Environ. Sci. Technol. Lett.**, United States, v. 4, n. 5, p. 168-173. 2017.

KITTLAUS, S. SCHIMANKE, J. KEMPE, G. SPEER, K. Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.**, Germany, v. 1218, n. 46, p. 8399–8410, 2012.

KOPPENAAL, D.W.; BARINGA, C.J.; DENTON, M.B.; SPERLINE, R.P.; HIEFTIE, G.M.; SCHILLING, G.D.; ANDRADE. F.J.; BARNES, J.H. Just as laser eye surgery has restored fading human vision, new technologies are needed to improve ion “chemical vision” detection. **Analytical Chemistry**. p. 419A – 427A, nov. 2005.

KUSSUMI, T. A. **Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de pesticidas benzimidazóis, carbamatos e triazinas em milho por cromatografia líquida acoplada á espectrometria de massas em tandem e sua certificação**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LANÇAS, F.M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos, SP- RiMa, 2004. 96p.

LANÇAS, F.M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Paulo- RiMa. 2004, 62 p.

LANÇAS, F.M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas- Finalmente “Compatíveis”?. **Scientia Chromatographica**, São Carlos - SP, 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**, São Carlos – SP, v. 5, n. 1, p. 27-46, 2013.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 5.ed Campinas, São Paulo- Átomo, 2008.

LEVENE, H.; OLKIN, I.; GHURYE, S.G.; Hoeffding, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. **Robust tests for equality of variances**- contributions to probability and statistics. Stanford- Stanford University Press, 1960.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil- um guia para ação em defesa da vida**. 1.ed. Rio de Janeiro- AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

MALIK, A.K.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. **Journal of Chromatography A**, Valência, v. 1217, n. 25, p. 4018–4040, 2010.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de garantia da qualidade analítica- Resíduos e Contaminantes em Alimentos**. Brasília, 2011. 227p.

MARQUES, J.G.C.; LYRA, M.R.C.C.; CARVALHO, R.M.C.M.O.; NASCIMENTO, R.M.; SILVA, J.A.A.; MONTENEGRO, S.M.G.L. Comparação entre índices de potencial de lixiviação para agrotóxicos utilizados na Sub-Bacia do Natuba, Vitória de Santo Antão Pernambuco. **Águas Subterrâneas**, v. 33, n.1, p. 58-67, 2019.

MARTINS, F.I.C.C.; BARBOSA, P.G.A.; ZOCCOLO, G.J.; NASCIMENTO, R.F. Method Validation Using Normal and Weighted Linear Regression Models for Quantification of Pesticides in Mango (*Mangifera indica* L.) Samples. **Chromatographia**, Fortaleza-CE, v. 81, n. 4, p. 677–688. 2018.

MATEUS. N.B.; BARBIN. D.; CONAGIN. A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MENDONÇA, L.A. **Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação**. 2012. Dissertação (Mestrado em Estatística Aplicada e Biometria) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

MILHOME, M.A.L.; SOUSA, D.O.B.; LIMA, F.A.F.; NASCIMENTO, R.F.; Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Eng. Sanit Ambient**, Fortaleza – CE, v.14, n.3, p. 363-372, 2009.

MILHOME, M.A.L.; VIEIRA, S.K.V.; REGES, B.M.; FERNANDES, D.R.; UCHOA, M.L.P.; PINHEIRO, A.I.; CASTRO, R.C.; SILVA, V.P.A.; NOBRE, C.A.; MENEZES. M.G.G.; SILVA, R.O.; NASCIMENTO, R.F. Multiresidue analysis and evaluation of the matrix effect on 20 pesticides in Brazilian maize (*Zea mays* L.) flour. **Journal of Environmental Science and Health B**, Fortaleza – CE, v. 54, n. 11, p. 892-897, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº 5, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017**. Brasil, 2017. Disponível em- <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolidacao-n-5-de-28-de-setembro-de-2017.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2019.

MOAWED, E.A.; RADWAN, A.M. Application of acid modified polyurethane foam surface for detection and removing of organochlorine pesticides from wastewater. **Journal of Chromatography B**, Egypt, v. 1044–1045, p. 95–102, 2017.

MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR “ELECTROSPRAY” APLICADA AO ESTUDO DE ESPÉCIES INORGÂNICAS E ORGANOMETÁLICAS. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MRZILIKAR, M.; HEATH, D.; HEATH, E.; MARKELJ, J.; BOROVSAK, A.K. Investigation of neonicotinoid pesticides in Slovenian honey by LC-MS/MS. **Food Science and Technology**, Slovenia, v. 104, p. 45-52, 2019.

NASCIMENTO, R. F.; MILHOME, M.A.L.; CASTRO, R.C.; SILVA, R.O.; NOBRE, C.A. **Advances in Chromatographic Analysis**. Fortaleza-CE- Avid Science, 2017.

NASCIMENTO, R.F.; LIMA, A.C.A.; BARBOSA, P.G.A.; SILVA, V.P.A. **Cromatografia gasosa- Aspectos teóricos e práticos**. Fortaleza- Imprensa Universitária, 2018.

NETO, A.J.S. **Espectrometria de Massas (MS)**. São Paulo- USP, 2015. 106 slides. Disponível em- https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1696263/mod_resource/content/2/6%20-%20MS%20-%20USP%20-%202015.pdf. Acesso em: 15 out. 2019. ORCID- <https://orcid.org/0000-0003-1719-8458>.

OSHITA, D.E.; JARDIM, I. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA NA DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MORANGOS. **Quim. Nova**, Campinas – SP, v. 38, n. 10, p. 1273-1281, 2015.

PACHECO, S.; BORGUINI, R.G.; SANTIAGO, M.C.P.A.; NASCIMENTO, L.S.M.; GODOY, R.L.O. História da Cromatografia Líquida. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 4, p. 1225-1271, 2015.

PARANÁ, Governo do Estado. Secretaria da Saúde. **Intoxicações agudas por agrotóxicos- atendimento inicial do paciente intoxicado**. Paraná, 2018. Disponível em- <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/IntoxicacoesAgudasAgrotoxicos2018.pdf>. Acesso em: 16 out. 2019.

PANUWET, P.; HUNTER Jr. R.E.; D’SOUZA, P.E.; CHEN, X.; RADFORD, S.A.; COHEN, J.R.; MARDER, M.E.; KARTAVENKA, K.; RYAN, P.B.; BARR, D.B. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods- Advancing Biomonitoring. **Crit Rev Anal Chem.**, USA, v. 46, n. 2, p. 93–105, 2016.

PATEL, H.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y.K. A newly emerging trend of chitosan-based sensing platform for the organophosphate pesticide detection using Acetylcholinesterase- a review. **Trends in Food Science & Technology**, India, v. 85, p. 78–91, 2019.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. ENVIRONMENTAL AND FOOD APPLICATIONS OF LC-TANDEM MASS SPECTROMETRY IN PESTICIDE-RESIDUE ANALYSIS- AN OVERVIEW. **Mass Spectrometry Reviews**, Valência, v. 23, n.1, p. 45– 85, 2004.

PEREIRA, A.R.; PEREIRA, R.O.; BOTTREL, S.E.C. Remoção dos agrotóxicos incluídos na portaria 2914/2011 em ETAs. **Revista DAE**, Ouro Preto - MG, v. 66, n. 210, p. 35-50, 2018. Disponível em- http://revistadae.com.br/artigos/artigo_edicao_210_n_1711.pdf. Acesso em: 29 ago. 2019.

POOLE, C.F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, USA, v. 1158, n.1-2, p. 241-250, 2007.

REICHERT, J.F.; PIZZUTTI, I.R.; DIAS, J.V.; CARDOSO, C.D. Determinação de nove fungicidas em suco de laranja por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas tandem e extração mini-Luke. **Scientia Chromatographica**, Santa Maria - RS, v. 7, n. 4, p. 251-259, 2015.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIZZETTI, T.M.; KEMMERICH, M.; MARTINS, M.L.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, Santa Maria – RS, v. 196, p. 25–33, 2016.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas, SP- Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SABIN, G.P. **Desenvolvimento e validação de método utilizando SPE e GC-MS para a determinação multirresíduo de pesticidas em água potável**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, 2007.

SAMPAIO, V.C.S. **Pré-tratamento de água para abastecimento humano utilizando processo eletrolítico por corrente contínua pulsada**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Ambiental) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SAMSIDAR, A.; SIDDIQUEE, S.; SHAARAN, S.M. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. **Trends in Food Science & Technology**, Sabah, v. 71, p. 188-201, 2018.

SARAVI, S.S.S.; DEHPOUR, A.R. Potential role of organochlorine pesticides in the pathogenesis of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neurobehavioral disorders- A review. **Life Sciences**, Iran, v. 145, p. 255–264, 2016.

SHAMSIPUR, M.; YAZDANFUR, N.; GHAMBARIAN, M. Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid–liquid micro extraction followed by GC–MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice. **Food Chemistry**, Iran, v. 204, p. 289-297, 2016.

SHIHOMATSU, H.M. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia SPE-LC-MS/MS Para a Determinação de Fármacos e Drogas de Abuso nas Águas da Represa Guarapiranga – São Paulo/SP, Brasil**. 2015. Tese. (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SILVA, M.A. **Critérios compostos para delineamentos ótimos robustos**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biometria) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2014.

SILVA, R.O.; MENEZES, M.G.G.; CASTRO, R.C.; NOBRE, C.A.; MILHOME, M.A.I.; 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**, Fortaleza – CE, v. 297, n. 124934, p.7, 2019.

SILVA, S.M.S. **Intoxicações por inibidores da acetilcolinesterase- etiologia, diagnóstico e tratamento**. 2015. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade de Coimbra, Portugal, 2015.

SILVA, V.P.A.; PAZ, M.S.O.; CAVALCANTE, R.M.; NASCIMENTO, R.F. Strategy for Correction of Matrix Effect on the Determination of Pesticides in Water Bodies Using SPME-GC-FID. **J. Braz. Chem. Soc.**, Fortaleza - CE, v. 28, n. 6, p. 1081-1090, 2017.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução de Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro- LTC, 2013.

SKOOG.; WEST.; HOLLER.; CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo- Thomson, 2006.

SOUSA, P. L. R. **NOVAS ESTRATÉGIAS CROMATOGRÁFICAS VISANDO A RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DE SANGUE HUMANO E DO LEITE BOVINO**. 2019. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

SOUZA, M.C.S.A.; ARMADA, C.A. **Sustentabilidade meio ambiente e sociedade- reflexões e perspectivas**. Umuarama- Universidade Paranaense – UNIPAR, 2015. E-book. Disponível em:http://pos.unipar.br/files/publicacao_academica/9d5a3a3d7ba6979f415c36893428525d.pdf. Acesso em: 16 out. 2019.

TOFFOLI, A.L.; LANÇAS, F.M. Recentes avanços da microextração em fase sólida no tubo (in-tube SPME) e sua aplicação em análises ambientais e alimentícias. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 7, n. 4, p. 297-315, 2015.

VIDAL, C.B.; FEITOSA, A.V.; PESSOA, G.P.; RAULINO, G.S.C.; OLIVEIRA, A.G.; SANTOS, A.B.; NASCIMENTO, R.F. Polymeric and silica sorbents on endocrine disruptors determination. **Desalination and Water Treatment**, Fortaleza – CE, v. 54, p. 156-165, 2015.

WANG, X.; JIA, R.; SONG, Y.; WANG, M.; ZHAO, Q.; SUN, S. Determination of pesticides and their degradation products in water samples by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. **Microchemical Journal**, China, v. 149, p. 7, 2019.

WATERS. **Waters Quality Parts, Chromatography Columns, and Supplies Catalog**. Catalog 2017/18. U.S.A- Waters Corporation, Jan. 2017. Disponível em- [https-](https://)

[//www.analytics-shop.com/media/Hersteller/Kataloge/waters-de/Waters_product_catalogue_2017-2018.pdf](http://www.analytics-shop.com/media/Hersteller/Kataloge/waters-de/Waters_product_catalogue_2017-2018.pdf). Acesso em: 16 out. 2019.

WIKIPÉDIA. **Schematic of a triple quadrupole mass spectrometer**. Enciclopédia online. 19 Mar. 2015. Disponível em- https://en.wikipedia.org/wiki/Triple_quadrupole_mass_spectrometer#/media/File:Triple_quadrupole_schematic.jpeg. Acesso em: 25 dez. 2017.

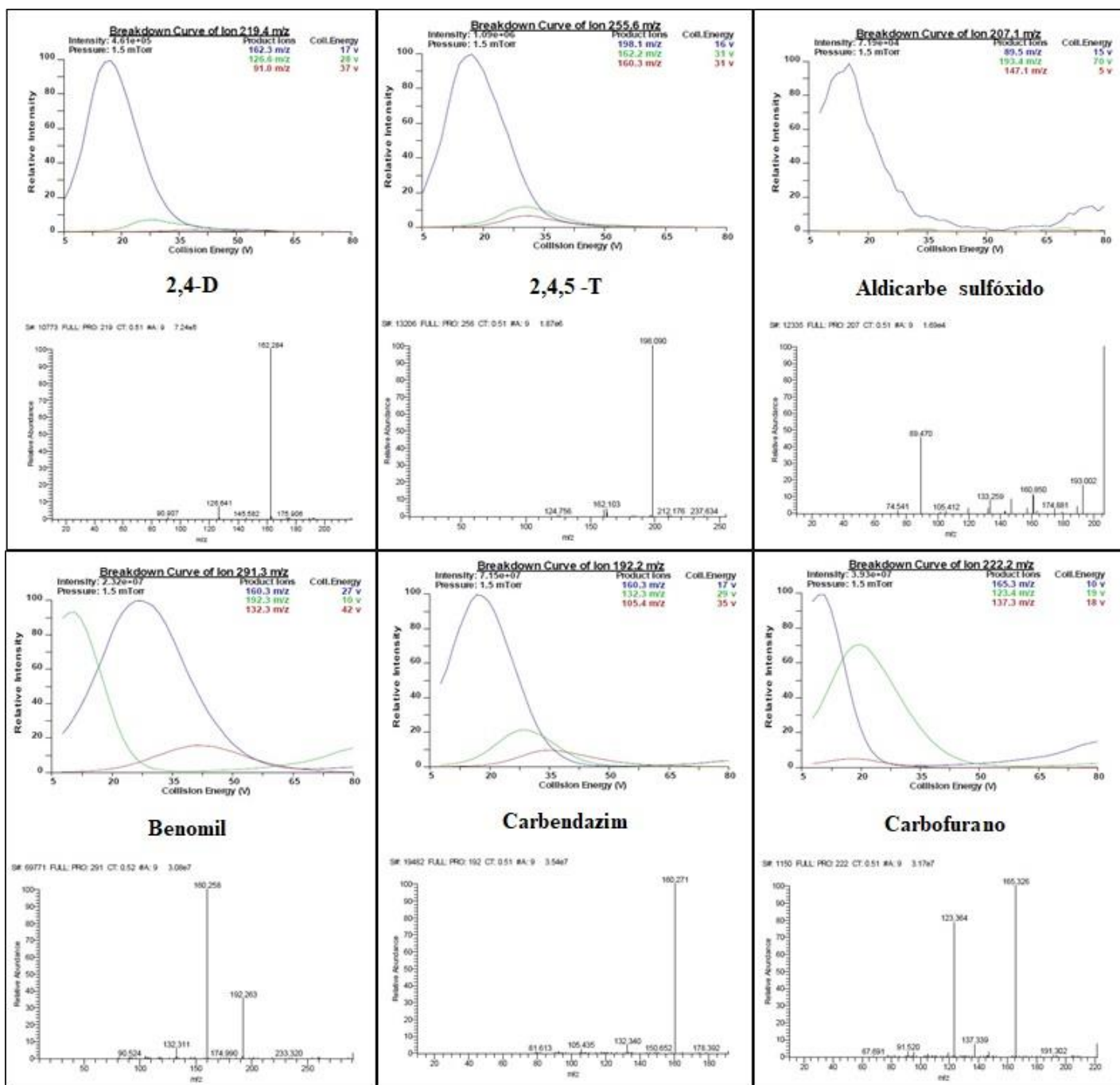
YOSHIMURA, K.; WAKI, H.; OHASHI, S. MICRO DETERMINATION OF CHROMIUM, IRON, COPPER AND COBALT IN WATER. **Talanta**, Great Britain, v.23, n. 6, p. 449-454, 1976.

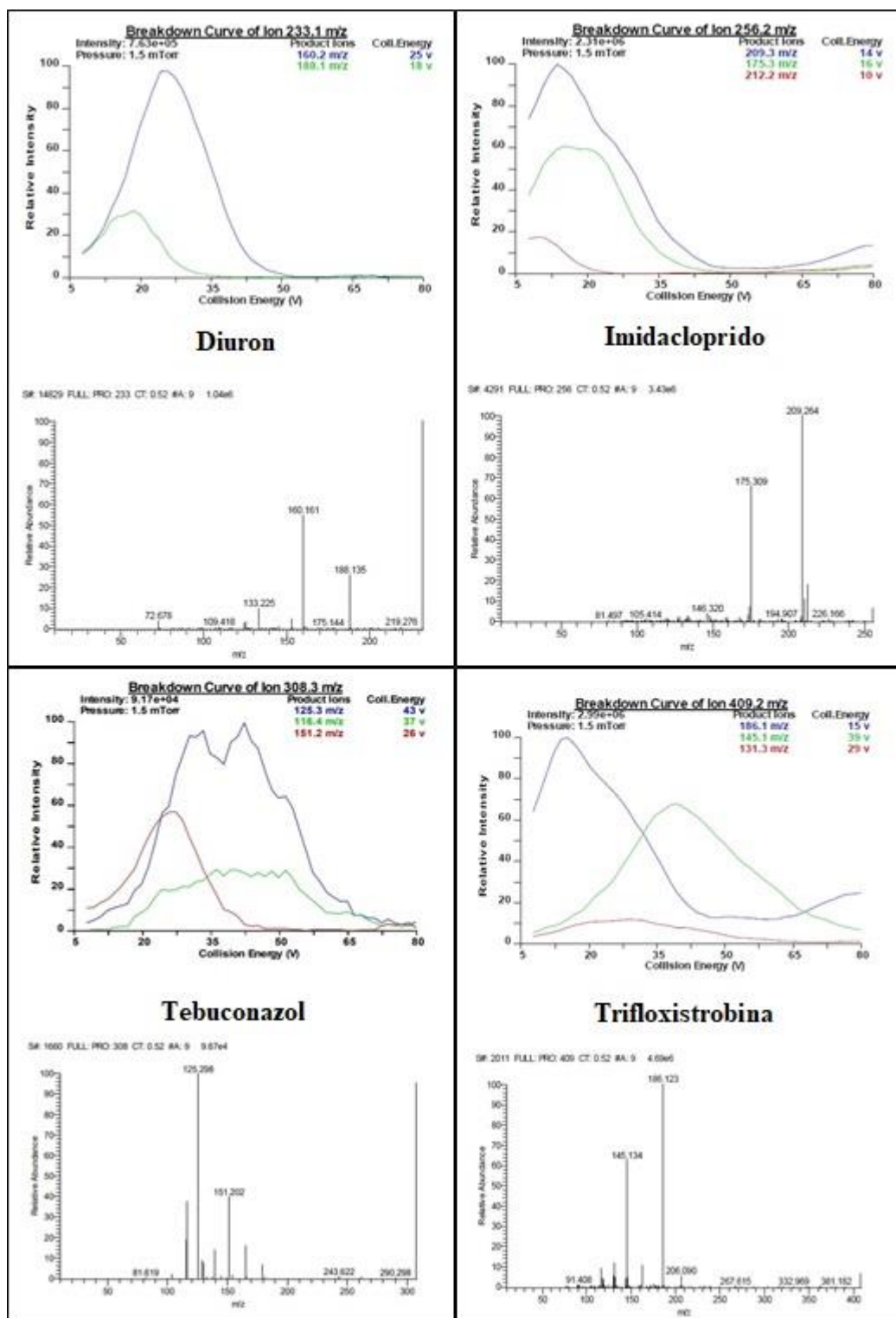
ZHENG, Y.; LI, M.; LIU, X.; DONG, F.; XU, J.; KONG, Z.; LI, Y. Simultaneous determination of cyflumetofen and its main metabolite residues in samples of plant and animal origin using multi-walled carbon nanotubes in dispersive solid-phase extraction and ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, China, v. 1300, p. 95–103, 2013.

ZINI, L.B. **Contaminação de agrotóxicos na água para consumo humano no RS-** Avaliação de riscos, desenvolvimento e validação de método empregando SPE e LC-MS/MS. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

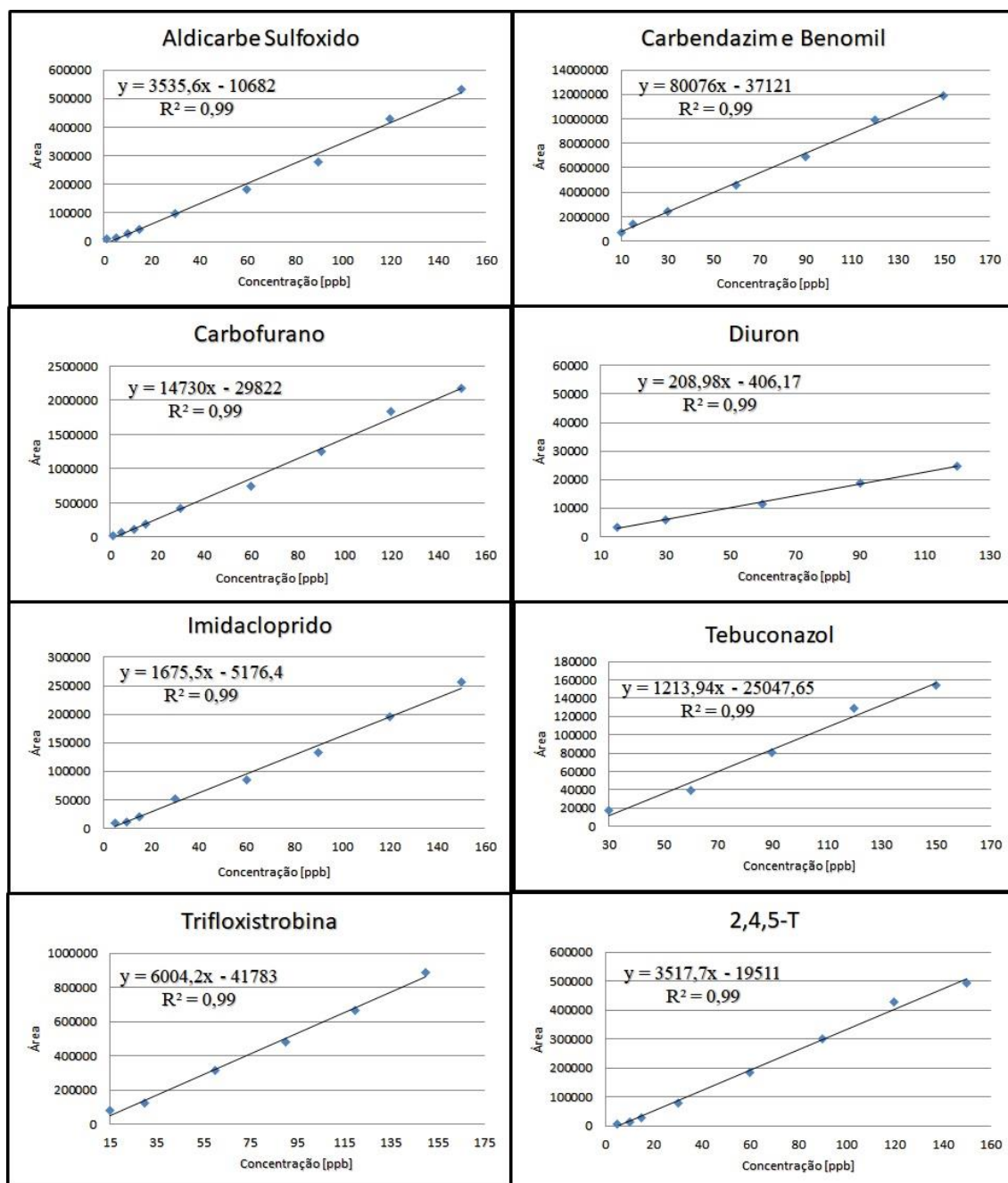
ZROSTLIKOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J.; POUŠTKA, J.; BEGANY, P. Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. **Journal of Chromatography A.**, Czech Republic, v. 973, p. 13-26, 2002.

APÊNDICE A - ESPECTROS DE MASSAS E GRÁFICOS DE ENERGIA DE COLISÃO POR INTENSIDADE RELATIVA PARA CADA PESTICIDA ESTUDADO



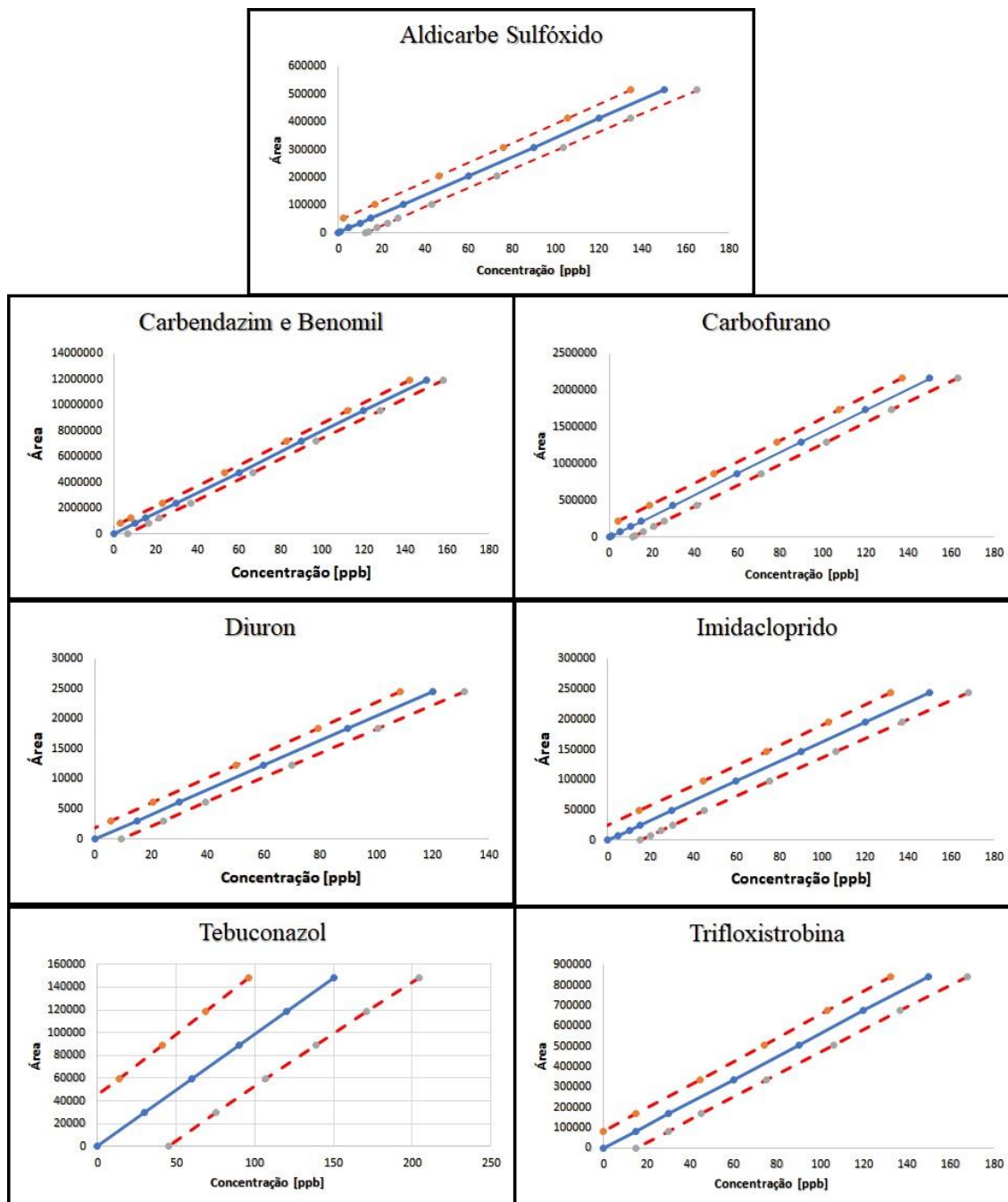


APÊNDICE B- GRÁFICOS REFERENTES AS CURVAS ANALÍTICAS DOS PESTICIDAS ESTUDADOS.



Fonte- Autoria própria

APÊNDICE C- CURVAS FINAIS CONTENDO O INTERVALO DE CONFIANÇA A 95%.



Fonte- Autoria própria.