

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDREY MARTINEZ REBELO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO, VIA LC-ESI-MS/MS, PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM ARROZ IRRIGADO (*Oryza sativa*, L.)**

CURITIBA
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDREY MARTINEZ REBELO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO, VIA LC-ESI-MS/MS, PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM ARROZ IRRIGADO (*Oryza sativa*, L.)**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutorado.**

**Orientador: Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi
Co-orientadores: Prof. Dr. Gilberto Abate
Dr. Francisco Carlos Deschamps**

**CURITIBA
2014**

Rebello, Andrey Martinez

Desenvolvimento e validação de método analítico, via LC-ESI-MS/MS, para determinação de agrotóxicos em arroz irrigado (*Oryza sativa*, L.)/
Andrey Martinez Rebello – Curitiba, 2014.

220 f.: il. tab. graf.

Orientador: Professor Dr. Marco Tadeu Grassi

Coorientadores: Professor Dr. Gilberto Abate, Pesquisador Dr. Francisco Carlos Deschamps

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutorado.

Inclui bibliografia

1. química analítica. 2. espectrometria. 3. resíduos. 4. análise de alimentos.
5. química ambiental. 6. I. Grassi, Marco Tadeu. II. Abate, Gilberto. III.
Deschamps, Francisco Carlos. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO, VIA LC-ESI-MS/MS,
PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ARROZ IRRIGADO (*Oryza sativa*, L.)**

por

ANDREY MARTINEZ REBELO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutorado.

Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi - Orientador – DQ UFPR

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke – DQ UFSC

Prof. Dr. Willian Ferreira da Costa – DQ UEM

Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta-Zamora – DQ UFPR

Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva - DQ UFPR

Curitiba, 28 de agosto de 2014.

Dedicatória

A meus filhos Sarah e Heitor Câmara Rebelo pelo amor, carinho e força devotados incondicionalmente, frutos de um amor que nasceu há 12 anos.

AGRADECIMENTO

À minha família, esposa Aline Câmara da Silva Rebelo pelo amor, paciência e ajuda na extração de inumeráveis dados que, mesmo sem a exata compreensão do que significavam, sabia o quanto eram essenciais; à minha filha Sarah Câmara Rebelo, pela compreensão e carinho; ao meu filho Heitor Câmara Rebelo que com sua vinda trouxe alegria e mais motivação para minha vitória; a meus pais Janete Damasceno Rebelo e José Angelo Rebelo, sempre presentes e a postos para me apoiar, uma força que se ausente em qualquer momento de minha vida tornariam minhas conquistas muito mais difíceis; à minha irmã Katiyuscia Rebelo por sempre valorizar meu esforço e trazer alegria aos nossos encontros, e aos meus sogros Maria Helena Baptista da Silva e Osny Câmara da Silva Filho pela torcida e apoio nos momentos de meu afastamento do lar;

Ao professor Gustavo Amadeu Micke da UFSC, que sempre dispôs seu conhecimento e amizade, colaborando para o desenvolvimento deste trabalho e tornando esse caminhar possível antes mesmo do ingresso nesta jornada;

Aos colegas da Epagri Airton Rodrigues Salerno, Angela Guedes Marques, Antônio Amaury da Silva Júnior, Fabiano Cleber Bertoldi, Giovani Porto, Henry Stuker, Jorge Malburg, José Alberto Noldin, Luciane Lehmkuhl, Marilene C. de Miranda Kahl, Maria Aparecida Schmitt, Moacir Antônio Schiocchet, Paulo Roberto da Silva e Suzette Marilú Rovaris Brasil pelo apoio ao ingresso nesta jornada. A Eduardo Hickel e Domingos Sávio Eberhardt pelo apoio profissional, assim como a José Angelo Rebelo, Klaus Konrad Scheuermann, Maximiliano Vogel, Antonio Milton Cypriano, Fernando Fernandes Costa, Cláudio Cunhaco e Samuel Batista dos Santos que muito se dedicaram para fornecer as amostras de arroz isentas de resíduos de agrotóxicos, fundamentais a este estudo;

Aos meus orientadores Francisco Carlos Deschamps, Gilberto Abate que, na medida que foram demandados estiveram dispostos a colaborar, especialmente a Marco Tadeu Grassi que, graças a seu acompanhamento e voto de confiança, possibilitou meu doutoramento;

Aos colegas do LabEC-UFSC, em especial à Melina Heller que me repassou seus conhecimentos para uso do LC-MS/MS, Filipe Cardoso e Maressa Dolzan pelo apoio

dado à execução dos experimentos e, pelo companheirismo, a Jacqueline Vistuba, Luciano Vitali, Daniel Spudeit e Juliana Bastos;

Aos colegas da UFPR do LabQAm, especialmente aos do GQA, Mônica Campos, Simone Braga da Silva, Kelly Cavalcanti Machado, Emerson Luis Yoshio Hara, Rafael Soares, Ana Brum, Beatriz Cestaro, grandes amigos que, ao me acolherem, atenuaram minha ausência da família, assim como a Cristiano Chostak e Aline Garus pela colaboração durante as prévias de apresentações, nos estudos das disciplinas cursadas e na confecção dos relatórios e da tese, favorecendo meu crescimento intelectual. À colega Ana Cristina Cursino que, representando os alunos no colegiado, colaborou na validação de disciplinas anteriormente cursadas;

Ao professor Dr. Faruk José Nome Aguirela por permitir o uso do espectrômetro de massas, fundamental para execução dos trabalhos, por meio do INCT Catálise;

Aos professores das disciplinas cujo o ensinamento serão muito bem aproveitados durante minha vida profissional;

Ao membros da banca de qualificação Bruno José Gonçalves da Silva, Luiz Pereira Ramos e Patrício Guilherme Peralta-Zamora que, com as suas arguições, ajudaram para a melhor condução das tarefas finais de doutorado;

Aos membros da banca de tese, Patrício G. Peralta-Zamora, Bruno J. G. da Silva, Gustavo A. Micke e Willian Ferreira da Costa que enriqueceram ainda mais este trabalho;

Ao secretário do PPGQ da UFPR, Marcelino Câmara, pela pronta disposição em atender as constantes exigências de documentos;

Ao professor Renato Zanella da UFSM que, graças a seus contatos encontramos o único fornecedor brasileiro de PSA, empregado no método de extração QuEChERS;

Aos amigos de república Frederico Mazziero e Diego Souza, assim como aos muitos amigos destes, pelo bom papo e momentos de descontração;

À Epagri pela confiança e apoio financeiros, na certeza de que este apoio me tornaria ainda mais apto a servir aos interesses da ciência agrícola;

À Embrapa pela bolsa concedida;

À Fapesc pelo custeio da pesquisa;

A todos que se alegram comigo por esta vitória.

“Mais cedo ou mais tarde, por caminhos longos ou curtos, contornando ou atravessando obstáculos, as águas do rio sempre se encontrarão com as do mar”.

(autor indefinido).

“Perder ou ganhar não importa, importante é viver! E não quero mais falar sobre isso.”

(Sarah Câmara Rebelo, 2014).

RESUMO

O arroz é um dos alimentos de maior consumo no mundo sendo responsável por fornecer 21% das necessidades calóricas e 14% protéicas para cerca de seis bilhões de pessoas. Para garantir a produção, o uso de agrotóxicos ainda é necessário para que as pragas, doenças e plantas daninhas não ocasionem graves perdas de produtividade. Para o arroz irrigado no Brasil, existem mais de 70 princípios ativos de agrotóxicos recomendados. Apesar da importância do arroz na alimentação mundial, a pesquisa de resíduos para este produto é pouco avançada. Isto se dá pela maior preocupação com a água de irrigação deste cultivo, em face dos impactos ambientais que pode causar. Para detecção de resíduos de agroquímicos em arroz existe a necessidade da aplicação de múltiplas análises pois das poucas técnicas multirresíduos existentes estas não se aplicam a maioria dos agrotóxicos empregados na rizicultura. Apesar dos limitados métodos disponíveis, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em seu relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimento (PARA) constatou que 27,2% das amostras, de arroz coletadas em supermercados, foram consideradas insatisfatórias por apresentarem agrotóxicos acima do limite máximo de resíduo (LMR) ou resíduos de produtos não autorizados. Técnicas analíticas instrumentais precisas e sensíveis a baixas concentrações de resíduos devem ser utilizadas para análise destes alimentos, haja visto que os LMR toleráveis tem sido menores que $\mu\text{g/mL}$. Através da cromatografia em fase líquida, acoplada ao espectrômetro de massas no modo tandem (LC-MS/MS) associada ao método de extração QuEChERS, desenvolveu-se protocolos analíticos capazes de quantificar resíduos de agrotóxicos aplicados na rizicultura em uma única injeção em curto período de tempo. Sendo assim, após otimização da técnica cromatográfica, espectrométrica e de extração foi possível detectar 35 ativos por LC-MS/MS no modo ESI (+). Destes após avaliação dos parâmetros de mérito utilizados na validação de metodologias analíticas foi possível estabelecer protocolo para determinação de resíduos de agrotóxicos em concentração abaixo dos LMR em apenas 15 minutos de análise, sendo que por calibração externa com adição de padrão interno foi possível determinar 20 diferentes compostos simultaneamente com recuperação média entre 83,10 e 113,8 % sendo que, por calibração por superposição de matriz a recuperação média foi mais precisa ficando entre 93,6-104,3% no qual foi possível aplicar o método para determinação de 28 compostos recomendados no cultivo de arroz.

Palavras-chave: espectrometria, multirresíduos, alimentos, química analítica

ABSTRACT

Rice is one of the most consumed foods in the world and it is responsible for providing 21% of caloric needs and 14% protein for about six billion people. To ensure the production, pesticide use is still required to pests, diseases and weeds do not cause serious yield losses. In Brazil, irrigated rice uses about 70 active recommended. Despite the importance of rice in the global food, residue testing for this product is rather advanced. It is due to greater concern for water irrigation of this crop in the face of environmental impacts that may result. For detection of pesticide residues in rice is needed applying multiple analysis and the few existing multiresidues these techniques do not apply to assets of interest for this crop. Despite the limited methods available, the National Health Surveillance Agency (ANVISA), in its report about Analysis of Pesticide Residues in Food Program (PARA) found over 25% of rice samples collected in supermarkets were deemed inadequate for presenting pesticides above the maximum residue or residue levels (MRL) of unauthorized products. Instrumental accurate and sensitive at low concentrations of waste to be used analytical techniques for analysis of feed, since there has been tolerable smaller than MRL/mL. By liquid chromatography coupled with mass spectrometry in tandem mode (LC-MS/MS) associated with the QuEChERS extraction method, we sought to develop analytical technique to quantify the maximum number of active interest in a single injection in the lower possible time. Thus, after optimization of the chromatographic technique was possible to detect 35 assets by LC-MS / MS ESI (+) mode. After evaluation of these parameters of merit used in the validation of analytical methods was possible to develop a method capable of determining pesticide residues in concentrations of at least seven times below the MRL at 15 minutes of analysis, and by calibration with added internal standard was possible obtain mean recovery between 83.10 and 113.8% and to determine 20 different compounds simultaneously, and calibration matrix superposition the average recovery was closer to getting 100% from 93.6 to 104.3% capacity where the method presented to determine 28 compounds recommended in rice cultivation through a single injection.

Keywords: spectrometry, multiresidues, food, analytical chemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Panícula de arroz <i>Oryza sativa</i>	20
Figura 2. Fenótipos de grãos de arroz sem casca (pardo-claro, pardo, vermelho e preto).....	21
Figura 3. Investimento mundial na compra de agrotóxicos, por região, em milhões de dólares, no período de 2000 a 2012. Fonte: (SCIENCE, 2013).....	24
Figura 4. Ilustração dos percentuais de amostras de alimentos que apresentaram resíduos acima dos LMR autorizados pela Anvisa.	25
Figura 5. Ilustração dos componentes do MS quadrupolar em tandem. (Q0, Q1, Q2, Q3: estruturas compostas por quadrupolos) (DP, EP, CEP, CE, CXP: energias de filtração, focalização e fragmentação) (CAD Gás: Gás de colisão (Ar, He N2) para promoção da CID).....	35
Figura 6. Distribuição das moléculas em função da polaridade, volatilidade e massa molar em função da possibilidade de determinação por LC/MS x método de ionização e CG/MS.	36
Figura 7. Fonte de ionização Turbo V da AB Sciex (espectrômetro de massas API 3200).....	37
Figura 8. Representação da fonte de ionização ESI com os íons sendo focalizados para dentro do espectrômetro de massas. Fonte: Adaptado (MOSONACO, 1999).	38
Figura 9. Formação simulada do Cone de Taylor e do desprendimento de uma gota pela instabilidade de Rayleigh, princípio da formação do aerossol que ocorre na FI por eletrospray. Fonte: Adaptado de (HILTON; VAN DER NET, 2009).....	39
Figura 10. Imagem do processo de formação do aerossol por eletrospray similar ao da fonte de ionização do tipo ESI. (A) Capilar; (B) Cone de Taylor; (C) Spray. Fonte: (USF, 2013).	39
Figura 11. Deformação e fissão da gota, desprendida do cone de Taylor, submetida a um elevado campo elétrico. (I) gota recentemente desprendida do cone de Taylor; (II) início do processo de deformação; (III) Deformação acentuada da região com maior densidade de carga em direcionada pelo campo elétrico; (IV) formação das gotas descendentes de menor massa e elevada carga. Fonte: (MORAES; LAGO, 2003).....	40
Figura 12. Modelo de ionização por eletrospray com ocorrência simultânea dos modelos de carga residual (CRM(A)) e de desorção de íons (IDM(B)).	41
Figura 13. Representação dos eixos x, y e z no quadrupolo com pares de barras dispostos perpendicularmente e da filtração com a trajetória de um íon focalizado e um eliminado.....	42
Figura 14. Esquema de um triplo quadrupolo operando de forma a detectar apenas um fragmento oriundo do íon quasi-molecular (modo MRM (Monitoramento Múltiplo de Reações)).....	43
Figura 15. Desenho esquemático da fragmentação por CID. Fonte: (BRISTOL, 2014).	45
Figura 16. Fragmentos mais frequentes que dependem da função química do precursor obedecendo o rearranjo McLafferty gerado por CID.....	47
Figura 17. Representação das condições de operação no modo varredura dos íons-produto.....	48
Figura 18. Representação das condições de operação no modo varredura dos íons-precursor.	48
Figura 19. Representação das condições de operação no modo varredura de fragmentos neutros....	49
Figura 20. Representação das condições de operação no modo de monitoramento seletivo de reações.....	50
Figura 21. Representação das condições de operação no modo de monitoramento múltiplo de reações.....	50
Figura 22. Esquema do compartimento da fonte de ionização destacada e acoplada ao MS. (A) ponta da agulha; (B) canal de passagem do curtain gas; (C) orifice plate; (D) saída de gás 1; (E) turbospray®; (F) saída do gás 2 (turbo heaters); (G) aerossol da nebulização.....	52
Figura 23. Estrutura da multiplicadora de elétrons do tipo não contínua.....	53
Figura 24. Esquema e foto de um multiplicador de elétrons do tipo contínuo.	53
Figura 25. Ilustração da técnica de MSPD, empregando uma seringa.....	55

Figura 26. Fluxograma representando o método QuEChERS original.	56
Figura 27. Ilustração de uma amostra vegetal pulverizada, com rompimento parcial das células onde poderiam mais intimamente se encontrar armazenados os analitos (resíduos de agrotóxicos).....	57
Figura 28. À esquerda cultivo de arroz em vasos para obtenção de material isento de agrotóxicos e à direita amostra de arroz moído com partículas de granulometria entre 0,2 a 1 mm. EEI/Epagri. Autor: José Angelo Rebelo.	84
Figura 29. Ilustração do endcapping polar da coluna Synergy polar-RP (Phenomenex).....	91
Figura 30. Fluxograma representando o método QuEChERS com modificações.	93
Figura 31. Esquema representando a análise de amostras, contendo concentrações iguais de padrões de agrotóxicos, para determinação da precisão instrumental, repetibilidade e precisão interensaio, na validação de metodologia analítica.....	99
Figura 32. Sítios de moléculas do grupo da ureias, onde pode haver fragmentação prematura na fonte de ionização no modo ESI (+).	106
Figura 33. Sítio de moléculas de tiofosfatos com radical aromático, onde pode haver fragmentação prematura na fonte de ionização no modo ESI (+).....	106
Figura 34. Sítio de moléculas de carbamatos, onde pode haver fragmentação prematura na fonte de ionização no modo ESI (+).....	107
Figura 35. Estrutura molecular de piretroides correspondentes àquelas que não foram passíveis de ionização no modo ESI(+) para obtenção de íons quasi-molecular precursores do tipo [M+H+].	109
Figura 36. Estrutura molecular da trifluralina, uma dinitroanilina.	111
Figura 37. Picos do carbendazim obtidos em função dos diferentes tempos de residência (dwell times) empregandos, para o monitoramento do íon de quantificação m/z 160 (QT).....	113
Figura 38. Espectro de massas do fungicida azoxistrobina, após ionização no modo ESI(+).	114
Figura 39. Espectro de massas do herbicida bentazon, após ionização no modo ESI(+).	115
Figura 40. Espectro de massas herbicida bispiribac-sódio, após ionização por ESI (+).	115
Figura 41. Espectro de massas do fungicida carbendazim após ionização por ESI (+).	116
Figura 42. Espectro de massas do inseticida carbofuram, após ionização por ESI (+).	117
Figura 43. Espectro de massas do carbofuram obtido em estudo de determinação de resíduos em água de abastecimento.	117
Figura 44. Espectro de massas do fungicida ciproconazol, após ionização por ESI (+).	118
Figura 45. Espectro de massas do herbicida clomazone, após ionização por ESI (+).	119
Figura 46. Espectro de massas do herbicida imazapic, após ionização por ESI (+).	120
Figura 47. Espectro de massas do herbicida imazapir, após ionização por ESI (+).	121
Figura 48. Espectro de massas do herbicida imazetapir, após ionização por ESI (+).	121
Figura 49. Espectro de massas do inseticida malaoxon, após ionização por ESI (+).	122
Figura 50. Espectro de massas do inseticida malationa, após ionização por ESI (+).	122
Figura 51. Espectro de massas do herbicida triclopir, após ionização por ESI(+).	123
Figura 52. Espectro de massas do sulfametoxazol, composto escolhido como padrão surrogado (PS).	124
Figura 53. Exemplo de cromatograma obtido por LC-MS/MS dos fragmentos de quantificação, inicialmente obtido, utilizando-se os parâmetros da tabela 24. Linha azul indica a proporção do eluente mais polar presente na fase móvel (95 a 5%) e a linha vermelha indica a proporção de eluente menos polar presente na fase móvel (5 a 95%).	127
Figura 54. Cromatograma obtido por LC-MS/MS dos fragmentos de quantificação, nas condições da tabela 25 para cromatografia líquida. Linha azul indica a proporção (%) do eluente mais polar presente na fase móvel (80 – 5 - 80%) e a linha vermelha indica a proporção (%) de eluente menos polar presente na fase móvel (20 – 95 - 20%).	129

<i>Figura 55. Cromatogramas agrupados e separados dos compostos analisados. O primeiro cromatograma corresponde aos fragmentos de quantificação (QT); o segundo, dos fragmentos de qualificação (QL) ou confirmação. Os demais correspondem aos cromatogramas individuais dos fragmentos de quantificação de cada um dos analitos detectados no método aqui estudado, em ordem de detecção ou tempo de retenção.....</i>	<i>139</i>
<i>Figura 56. Cromatograma das transições (fragmentos m/z 38,5, 41,7 e 39,1) do ácido fórmico obtidas para determinar tempo morto da coluna em LC-MS/MS, sob parâmetro cromatográficos da tabela 25, por ionização ESI(-), sem adição de ácido fórmico na fase móvel. Linha pontilhada indica tempo onde o primeiro analito (carbendazim) foi encontrado na análise através do método aqui desenvolvido. ..</i>	<i>140</i>
<i>Figura 57. Curva analítica da trifloxistrombina.....</i>	<i>142</i>
<i>Figura 58. Gráfico de resíduos da trifloxistrombina.....</i>	<i>143</i>
<i>Figura 59. Curva analítica do bispiribac-sódio obtida de calibração por superposição de matriz. (PS: padrão sub-rogado).....</i>	<i>148</i>
<i>Figura 60. Gráfico de resíduos do bispiribac-sódio obtido após calibração por superposição de matriz.</i>	<i>148</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes nutricionais principais presentes no arroz integral e polido.	21
Tabela 2. Componentes minerais majoritários presentes no arroz integral e polido.	22
Tabela 3. Componentes minerais minoritários presentes no arroz integral e polido.	22
Tabela 4. Área produzida, produtividade e produção de arroz na safra de 2012/2013 nas regiões geográficas do Brasil, com destaque para os estados da região sul.	23
Tabela 5. Parâmetros para classificação da toxicidade dos agrotóxicos e normas para identificação em função da DL50 determinada em ratos.	27
Tabela 6. Limites máximos de resíduos de agrotóxicos em arroz (ANVISA, 2009a, 2011b, 2014)	32
Tabela 7. Características e performances de alguns espectrômetros de massa em tandem.	44
Tabela 8. Mecanismos de fragmentação mais comuns (MENET, 2011).	46
Tabela 9. Fragmentos neutros mais comuns dissociados dos íons quasi-molecular.	49
Tabela 10. Estudos que empregaram QuEChERS e modificações na determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz (2003-2014).	63
Tabela 11. Grau de pureza e origem dos padrões empregados no preparo das soluções estoque a partir de herbicidas, inseticidas e fungicidas autorizados pelo Mapa no manejo da cultura de arroz e suas respectivas concentrações e solventes empregados, após seu preparo.	85
Tabela 12. Concentrações dos padrões de agrotóxicos em água contidos na solução estoque da mistura de padrões (250 mL).	88
Tabela 13. Parâmetros ajustáveis e sugeridos pelo fabricante para alcançar a otimização automática de MRM utilizando turbo Ion Spray API-ESI 3200 no modo positivo.	89
Tabela 14. Composição e gradiente da fase móvel inicialmente testada.	92
Tabela 15. Soluções para estudo de linearidade por calibração externa com padrão interno.	94
Tabela 16. Concentração de padrões adicionada nas soluções empregadas no estudo de linearidade por calibração externa com padrão interno.	94
Tabela 17. Soluções para estudo de linearidade por superposição de matriz.	96
Tabela 18. Concentração dos padrões presentes nas soluções empregadas no estudo de linearidade por superposição de matriz.	96
Tabela 19. Parâmetros ajustáveis otimizados para o monitoramento automático das reações múltiplas dos analitos estudados, utilizando a fonte turbolon Spray API-ESI 3200.	101
Tabela 20. Parâmetros otimizados em MS/MS para análise de 41 compostos, para emprego de MRM com ionização por ESI (+).	112
Tabela 21. Exemplo de parâmetros de separação fixados para separação dos agrotóxicos por cromatografia líquida e que serão empregados na validação do método.	128
Tabela 22. Tempo de retenção (T_R) cromatográfica dos compostos detectados neste trabalho.	131
Tabela 23. Parâmetros de mérito obtidos após análise estatística, para os 35 agrotóxicos que foram aprovados de acordo com parâmetros de precisão, repetibilidade, desvios e coeficientes angular, linear e de determinação.	144
Tabela 24. Apresentação dos menores Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela Anvisa entre 2009 e 2010 e os limites de determinação (LD) e quantificação (LQ) na amostra, após avaliação estatística do método, utilizando-se uma mistura de soluções padrão.	145
Tabela 25. Dados de recuperação por meio de adição de padrão em amostras de arroz isentas de agrotóxicos, determinadas com emprego de calibração externa com adição de padrão.	147
Tabela 26. Parâmetros de mérito obtidos após obtenção da curva analítica por superposição de matriz para os 28 agrotóxicos que apresentaram parâmetros de precisão, repetibilidade, desvios e coeficientes angular, linear e de determinação aceitáveis.	150

<i>Tabela 27. LMR permitidos pela Anvisa para o arroz destinado ao consumo humano relacionado com os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) na amostra obtidas pelo método, cuja curva analítica foi construída por superposição de matriz.</i>	<i>153</i>
<i>Tabela 28. Dados de recuperação utilizando superposição de matriz na obtenção da curva analítica.</i>	<i>155</i>
<i>Tabela 29. Resultados das análises de resíduos de agrotóxicos em amostras reais de arroz adquiridas no comércio, empregando o método para determinação de agrotóxicos com calibração com adição de padrão interno, segundo os limites de detecção e quantificação.....</i>	<i>157</i>
<i>Tabela 30. Resultados das análises de resíduos de agrotóxicos em amostras de arroz adquiridas no comércio, empregando método para determinação de agrotóxicos com calibração por superposição de matriz, segundo os limites de detecção e quantificação.....</i>	<i>158</i>

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIV
SUMÁRIO	XVI
1. OBJETIVOS	18
1.1. OBJETIVO GERAL	18
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. ARROZ	19
2.1.1. HISTÓRICO	19
2.1.2. CARACTERÍSTICAS BOTÂNICO-MORFOLÓGICAS E NUTRICIONAL	19
2.1.3. IMPORTÂNCIA MUNDIAL ECONÔMICA	22
2.1.4. ARROZ IRRIGADO E A PRODUÇÃO NO BRASIL	23
2.2. AGROTÓXICOS	23
2.2.1. CONCEITOS	25
2.2.2. CLASSIFICAÇÃO	26
2.2.3. ATIVOS AGROTÓXICOS APLICADOS NA RIZICULTURA	28
2.3. MÉTODOS DE ANÁLISE DE MULTIRRESÍDUOS EM ALIMENTOS	33
2.3.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	33
2.3.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	34
2.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS	54
2.4.1. QUÊCHERS (<i>QUICK, EASY, CHEAP, EFFECTIVE, RUGGED, AND SAFE</i>)	55
2.5. PONTOS CRÍTICOS NA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	67
2.5.1. EFEITO DA MATRIZ.....	67
2.5.2. INTRÍNSECOS A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	68
2.6. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DE TÉCNICA PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS EM ALIMENTOS.....	69
2.6.1. SELETIVIDADE.....	69
2.6.2. CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE	69
2.6.3. SENSIBILIDADE	71
2.6.4. EXATIDÃO	72
2.6.5. PRECISÃO	73
2.6.6. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	75
2.7. DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS	78

3. MATERIAIS E MÉTODOS	83
3.1. INSTRUMENTAÇÃO E OUTROS	83
3.2. MATRIZ DE ARROZ ISENTA DE AGROTÓXICOS	83
3.3. SOLVENTES, SOLUÇÕES E REAGENTES	84
3.3.1. SOLUÇÕES ESTOQUE ANALÍTICAS	85
3.3.2. SOLUÇÃO ESTOQUE CONTENDO TODOS OS PADRÕES	87
3.3.3. PADRÃO CONTROLE DO TIPO PADRÃO SUB-ROGADO (PS) OU PADRÃO INTERNO (PI)	87
3.4. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE DETECÇÃO (MS-MS)	89
3.4.1. PARÂMETROS DE FRAGMENTAÇÃO, FILTRAGEM E FOCALIZAÇÃO	89
3.5. AJUSTES RELACIONADOS AO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	91
3.5.1. FASE ESTACIONÁRIA	91
3.5.2. AJUSTE DA FASE MÓVEL (FM)	91
3.5.3. OUTROS AJUSTES	92
3.6. MÉTODO DE EXTRAÇÃO QUECHERS MODIFICADO	93
3.7. PARÂMETROS DE MÉRITO PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO	94
3.7.1. CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE	94
3.7.2. LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E DETECÇÃO	97
3.7.3. EXATIDÃO	98
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	100
4.1. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA IONIZAÇÃO E FRAGMENTAÇÃO DOS COMPOSTOS EM MS/MS.	100
4.1.1. PARÂMETROS DE IONIZAÇÃO E DESSOLVATAÇÃO	100
4.1.2. ESTUDOS DA IONIZAÇÃO E OBTENÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO	103
4.2. SISTEMA CROMATOGRÁFICO DE SEPARAÇÃO	125
4.3. PARÂMETROS DE MÉRITO	141
4.3.1. CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE POR ADIÇÃO DE PADRÃO	141
4.3.2. CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE POR SUPERPOSIÇÃO DE MATRIZ	147
4.4. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS	157
4.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	161
5. CONCLUSÕES	163
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164
APÊNDICES	182
APÊNDICE A: CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DOS AGROTÓXICOS ESTUDADOS	182
APÊNDICE B: ESPECTROS DE MASSAS DOS AGROTÓXICOS IONIZADOS POR ESI(+).	207

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

Desenvolver e otimizar método analítico rápido para a determinação de múltiplos resíduos de agrotóxicos, autorizados para a rizicultura brasileira, por meio de única injeção e em período mínimo de tempo, utilizando LC-ESI(+)-MS/MS como meio de quantificação e QuEChERS como forma de extração e *clean-up* das amostras.

1.2. Objetivos Específicos

- Selecionar, entre os agrotóxicos autorizados e empregados na cultura do arroz irrigado do Brasil, os que comporão a lista de multirresíduos, foco deste trabalho;
- Determinar as condições de fragmentação do íon de cada agrotóxico, que se deseja analisar, por meio do monitoramento de reações múltiplas (MRM) usando como fonte de ionização ESI (+);
- Estabelecer e caracterizar os fragmentos no modo MS/MS que devem ser acompanhados para qualificar e quantificar os agrotóxicos de interesse para estabelecer um método analítico;
- Estabelecer os parâmetros instrumentais cromatográficos na busca de uma metodologia rápida e capaz de quantificar e detectar o maior número de multirresíduos de agrotóxicos autorizados e utilizados na cultura do arroz irrigado do Brasil;
- Empregar o método QuEChERS para extração dos agrotóxicos, na matriz arroz;
- Otimizar os métodos de extração e análise por LC-MS/MS na determinação de multirresíduos de agrotóxicos autorizados para o cultivo de arroz, utilizando como referência os parâmetros de mérito;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de arroz disponibilizadas comercialmente para o consumo humano.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ARROZ

2.1.1. Histórico

O cultivo de arroz iniciou-se há mais de 6.500 anos na Ásia e de lá para a Europa, de onde foi trazido até as Américas (GOMES, A.S. & MAGALHÃES, 2004). O Brasil é considerado o primeiro país a cultivá-lo nas Américas pelo fato de os indígenas, que o chamavam de milho d'água, cultivá-lo em solos alagados, antes dos portugueses (EMBRAPA, 2005).

O arroz cultivado no Brasil pertence à espécie *O. sativa*, diferenciando-se em duas subespécies principais, indica e japônica (F.A.O., 2004).

2.1.2. Características botânico-morfológicas e nutricional

A planta de arroz é dividida morfológicamente em raízes, colmos (caule), folhas e flores agrupadas em panícula (Figura 1), onde são formados os grãos que darão origem à parte comestível. Pertence à família botânica das poáceas e é adaptada a ambientes alagados pela presença de aerênquimas em seu colmo e raízes.



Figura 1. Panícula de arroz *Oryza sativa*.
Autor: José Angelo Rebelo, 2014.

O ciclo de produção da planta de arroz varia de 100 a 140 dias (SOSBAI, 2012). O grão sem casca é a cariopse ou fruto-semente envolto pelo pericarpo onde são depositados os pigmentos que diferem os fenótipos de arroz pardo-claro, pardo, vermelho e preto (Figura 2).



Figura 2. Fenótipos de grãos de arroz sem casca (pardo-claro, pardo, vermelho e preto).

O arroz é considerado pela FAO (do inglês, *Food and Agriculture Organization*) o alimento mais importante por ser fator mundial de segurança alimentar. Principal componente da base da pirâmide alimentar, caracteriza-se por fornecer cerca de 20% da energia e 15% das proteínas necessárias à população mundial. Na Ásia, seu consumo atende até 70% da energia consumida por 2 bilhões de habitantes, que consomem mais de 80 kg/hab/ano, superior à média mundial de 50 kg/hab/ano (FAO, 2006). A composição nutricional do grão de arroz pode apresentar variação em função do processamento (VIEIRA; SANTOS; SANT'ANA, 1999). Nas tabelas 1, 2 e 3 estão apresentados a composição nutricional principal, a mineral majoritária e a minoritária do arroz, em função do processamento empregado no seu beneficiamento.

Tabela 1. Componentes nutricionais principais presentes no arroz integral e polido.

CONSTITUINTES (%)		ARROZ	
		INTEGRAL	POLIDO
Amido		74,12	87,58
Proteínas		10,46	8,89
Lipídeos		2,52	0,36
Cinzas		1,15	0,30
Fibras	Totais	11,76	2,87
	Insolúveis	8,93	1,05
	Solúveis	2,82	1,82

Fonte: Adaptado de (JULIANO, 1985).

Tabela 2. Componentes minerais majoritários presentes no arroz integral e polido.

CONSTITUINTES		ARROZ	
		INTEGRAL	POLIDO
MINERAIS (mg/g)	Cálcio	0,1-0,5	0,1-0,3
	Magnésio	0,2-1,5	0,2-0,5
	Fósforo	1,7-4,3	0,8-1,5
	Potássio	0,6-2,8	0,7-1,3
	Silício	0,6-1,4	0,1-0,4
	Enxofre	0,3-1,9	0,8

Fonte: Adaptado de (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008).

Tabela 3. Componentes minerais minoritários presentes no arroz integral e polido.

CONSTITUINTES		ARROZ	
		INTEGRAL	POLIDO
MINERAIS (µg/g)	Alumínio	0,3-26,0	0,1-2,2
	Cádmio	0,02-0,16	0,025
	Cloro	210-560	200-300
	Cobalto	0,03-0,04	0,017
	Cobre	1-6	2-3
	Iodo	0,03	0,02
	Ferro	2-52	2-28
	Manganês	2-36	6-17
	Níquel	0,2-0,5	0,14
	Selênio	0,3	0,3
	Sódio	17	5,86
	Zinco	6-28	6-23

Fonte: Adaptado de (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008)

2.1.3. Importância mundial econômica

A produção mundial de arroz aloca 158 milhões de hectares, onde são produzidos 662 milhões de toneladas (SOSBAI, 2012), superior à área territorial do Estado do Amazonas (156 milhões de hectares), ou a área dos estados do Sul e Sudeste (150 milhões de hectares) (IBGE, 2013), sendo 75% oriundas do cultivo irrigado (EMBRAPA, 2005; GOMES, A.S. & MAGALHÃES, 2004). O aumento da produção mundial de arroz de 1% ao ano não acompanha o crescimento da população que é de 1,32% e o consumo anual de 1,27% (WANDER, 2006). Embora seja um dos cereais mais produzidos no mundo depois do milho, que é destinado principalmente para o consumo animal, e eventualmente depois do trigo, o comércio internacional de arroz é pouco expressivo. Isto se dá, pois, os três maiores produtores, China, Índia e Indonésia, consomem até 93% do arroz por eles produzido, e poucos países exportam sua produção. A Tailândia, que vende cerca de 48,2% da sua produção, é o maior exportador mundial (USDA, 2012).

2.1.4. Arroz irrigado e a produção no Brasil

O Brasil passou de 11º colocado em 2002, para 9º em 2006, ficando entre os 10 maiores produtores que respondem em mais de 85% da produção mundial (Wander, 2006). Em 2013, a região sul do Brasil passou a produzir 76% do arroz brasileiro (CONAB, 2013) quando o país ocupou a 8º posição mundial, mantendo-se como maior produtor não asiático (FAO, 2012). Na tabela 4 estão listados os dados da produção de arroz da safra de 2012/2013 no Brasil.

Tabela 4. Área produzida, produtividade e produção de arroz na safra de 2012/2013 nas regiões geográficas do Brasil, com destaque para os estados da região sul.

Regiões do Brasil	Área Produzida		Produtividade kg/ha	Produção	
	1000 ha	%		mil t	%
Brasil	2.396,00	100	4.977	11.924,20	100
SUL	1.249,7	52,2	7.308	9.132,9	76,6
RS	1.066,6	44,5	7.438	7.933,4	66,5
SC	150,1	6,3	6.828	1.024,9	8,6
PR	33,0	1,4	5.291	174,6	1,5
SUDESTE	44,6	1,9	3.106	138,5	1,2
CENTRO-OESTE	216,5	9,0	3.223	697,7	5,8
NORDESTE	586,9	24,5	1.523	893,8	7,5
NORTE	298,3	12,4	3.558	1.061,3	8,9

Fonte: (CONAB, 2013; IBGE, 2013)

2.2. AGROTÓXICOS

Historicamente, a humanidade combate agentes nocivos à agricultura. Contra insetos, em 2500 a.C., os sumérios empregavam enxofre e 1600 anos depois os piretros. Os chineses, no século XIV, empregavam o perigoso arsênio. Compostos orgânicos para uso como agrotóxicos foram sintetizados e empregados após a segunda guerra mundial (BARBOSA, 2004).

Mundialmente, cerca de seis empresas atendem 68% do mercado de agrotóxicos com movimentação de 48 bilhões de dólares/ano. Na Figura 3, observam-se os dados do consumo mundial de agrotóxicos em diferentes regiões.

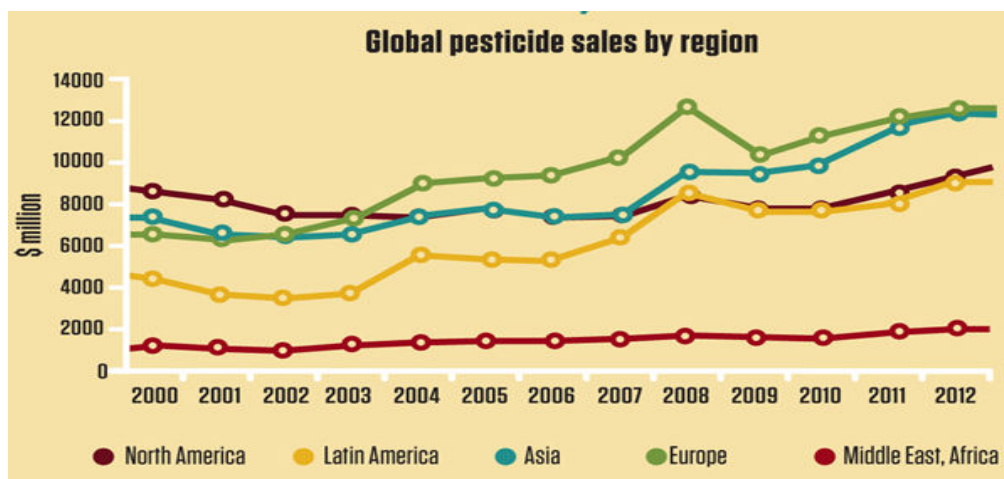


Figura 3. Investimento mundial na compra de agrotóxicos, por região, em milhões de dólares, no período de 2000 a 2012. Fonte: (SCIENCE, 2013)

No Brasil, um dos primeiros agrotóxicos empregados foi o DDT (1943) um inseticida organossintético. A partir daí o emprego de agrotóxicos tem crescido em proporções incompatíveis com aumento da produção. Entre os anos 1964 e 1998 (34 anos), enquanto a área agrícola aumentara 78%, a quantidade de agrotóxicos empregada aumentou 700% (SPADOTTO et al., 2004). Entre os anos 2000 e 2009 houve crescimento da área cultivada em 26,6% e o consumo de agrotóxicos em mais de 139%. Apesar de entre 2007 e 2012 o consumo de agrotóxicos crescer proporcionalmente ao da área cultivada, o Brasil, juntamente com os Estados Unidos disputam a colocação dos maiores mercados de agrotóxicos do mundo, em valor de mercado. No Brasil, em 2010, Mato Grosso do Sul (20,4%), São Paulo (15,5%), Paraná (12,35%), Rio Grande do Sul (10,4%), Goiás (10,3%) e Minas gerais (8,8%) consumiram 77,7% dos agrotóxicos usados no país que empregou 33% como herbicida, 32% como inseticida, 29% como fungicida e 5% para os demais agrotóxicos (SINDAG, 2013). Dada à grande quantidade de agrotóxicos empregados no cultivo de alimentos é de se esperar que estes possam estar contaminados. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por meio do seu Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (Para), monitora sistematicamente para verificar se os limites máximos de resíduos (LMR) vêm sendo respeitados na produção de alimentos. Na figura 4 apresenta-se o resumo dos resultados do monitoramento de agrotóxicos da Anvisa executado em 2010.

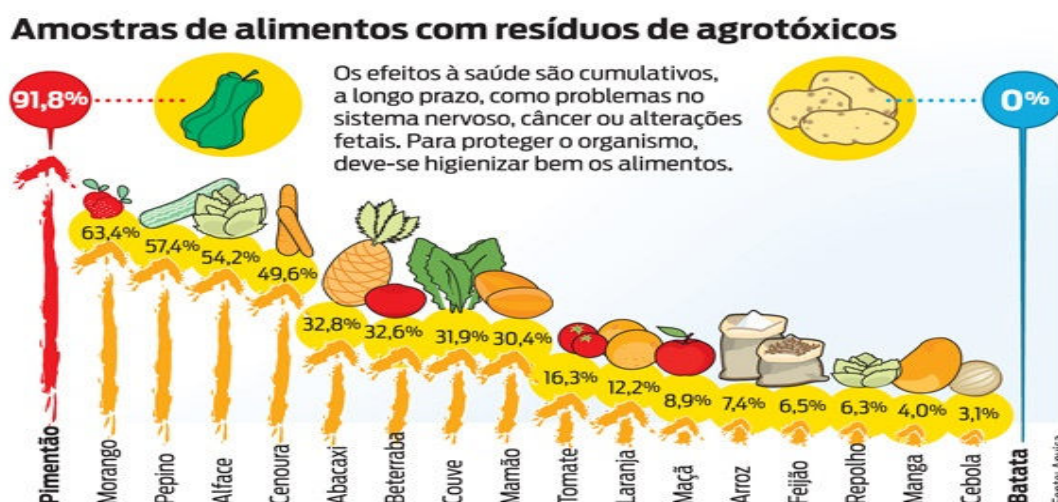


Figura 4. Ilustração dos percentuais de amostras de alimentos que apresentaram resíduos acima dos LMR autorizados pela Anvisa.

Fonte: (ANVISA, 2011a).

2.2.1. Conceitos

Diversos são os termos que denominam substâncias sintéticas ou naturais utilizadas para o controle de insetos, doenças, plantas invasoras, etc. Os mais comuns são praguicidas, pesticidas, biocidas, venenos, “remédios de plantas”, defensivos agrícolas e agrotóxicos. O uso de uma ou de outra nomenclatura depende tanto da conotação desejada como do interesse de quem trata do assunto, como do grau de esclarecimento e experiência daquele que a usa. Os termos, defensivos agrícolas e agroquímicos são muito amplos pois incluem qualquer outra substância como fertilizantes e hormônios. Quando empregado o termo defensivo agrícola, fica claro quais seus benefícios, porém, vela os perigos advindos do mau uso, tanto para o meio ambiente, como àqueles que os manipulam. Praguicidas nos remetem a agentes controladores de insetos, ácaros ou outros macro-agentes como roedores. Pesticidas, que apesar de ser amplamente empregado e aceito, além de apresentar semelhança com o termo “*pesticides*” do inglês, pode levar a uma interpretação literal, algo que pode destruir pestes, restringindo sua ação contra doenças epidêmicas graves (LARINI, 1999). Termos como “remédio de plantas” e veneno, apesar de populares, são inapropriados e pouco específicos, sendo o primeiro empregado pelos vendedores deste produto e o segundo pelos agricultores, em função das suas experiências após exposição ao produto (PERES; MOREIRA, 2003). Finalmente, o emprego do termo agrotóxico é mais aceito e regulamentado

pelo decreto nº 4.074, regulamentado pela lei 7802/1989. Em seu artigo 1º, parágrafo IV definiu:

“...produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos...” (BRASIL, 2002)

Em atenção à referida lei, empregou-se neste trabalho o termo agrotóxico, pois permite que se entenda que existe um perigo real em sua aplicação (ALVES; SILVA, 2003).

2.2.2. Classificação

Dos mais de 1.000 componentes ativos de agrotóxicos disponíveis em mais de 10 mil formulações, podem-se classificá-los nos seguintes parâmetros:

(I) *abrangência de ação*: **de contato ou não sistêmicos** - não se transloucam pelo sistema vascular da planta, sendo facilmente degradados, agindo diretamente por contato com o organismo alvo; e **sistêmicos** – transloucam-se pelo sistema vascular da planta, com ação prolongada (SILVA; FAY, 2004), podendo levar ao comprometimento da segurança pela contaminação alimentar;

(II) *tempo de persistência*: dada em função do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) dos compostos, ou seja, o tempo necessário para o decaimento exponencial da metade de sua eficácia. São classificados como de persistência curta, média e longa, correspondendo a um $t_{1/2}$ menor ou igual a 90, entre 90 e 180 e maior que 180 dias, respectivamente (LOPES, 2013);

(III) *deslocamento*: classifica os agrotóxicos de acordo com sua propriedade de se deslocar no ambiente. Esta classificação é dividida em compostos de

pequeno, médio e grande deslocamento, correspondendo a uma distância menor ou igual a 20, de 21 a 60 e maior que 60 cm, respectivamente (LOPES, 2013);

(IV) *função*: classificam os agrotóxicos levando em conta o organismo alvo de controle, **herbicidas, fungicidas, inseticidas, acaricidas, moluscocidas, nematocidas, rodenticidas, bacteriostáticos**, etc;

(V) *grupo químico*: dos mais de 100 grupos químicos de agrotóxicos existentes, há aqueles que incluem os principais ativos empregados no manejo do arroz: ácido ariloxialcanoico, ácido piridinocarboxílico, ácido quinolinocarboxílico, acilalaninato, anilida, antranilamida, benzimidazol, benzoilureia, benzotiadiazinona, benzotiazol, carboxanilida, ciclohexanodiona, dinitroanilina, estrobilurina, éter difenílico, glicina, imidazolinona, isoxazolidinona, metilcarbamato de benzofuranila, metilcarbamato de oxima, neonicotinoide, organofosforados, oxadiazolona, pirazol, piretroide, sulfoniureia, tiocarbamato, triazol;

(VI) *toxicidade*: nesta classificação é possível estabelecer os parâmetros que identificam o grau de risco dos agrotóxicos em função da DL50 determinada em ratos. Na tabela 5 estão a classificação dos produtos em função da DL50.

Tabela 5. Parâmetros para classificação da toxicidade dos agrotóxicos e normas para identificação em função da DL50 determinada em ratos.

CLASSE TOXICOLÓGICA	TOXICIDADE	DL50 mg kg ⁻¹	IDENTIFICAÇÃO NO RÓTULO (cor da faixa)
I	Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelha
II	Altamente tóxico	5 a 50	Amarela
III	Medianamente tóxico	50 a 500	Azul
IV	Pouco tóxico	500 a 5000	Verde
-	Muito pouco tóxico	≥ 5000	-

Fonte: (W.H.O., 2010).

Esta classificação permite a interpretação do grau de periculosidade dos agrotóxicos e facilita aos usuários a certificação do risco a que estarão expostos ao manusearem tais produtos. (LEVIGARD, 2001).

2.2.3. Ativos agrotóxicos aplicados na rizicultura

2.2.3.1. Herbicidas

Controladores de plantas não desejadas na lavoura por diminuírem a produtividade pela competição por espaço, luz, CO₂ e nutrientes (FLECK et al., 2008). O mecanismo de ação dos herbicidas ocorrem, principalmente, por inibição de enzimas, hormônios ou interferência no processo de fotossíntese. Dentre os principais grupos, as sulfonilureias: o mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de acetolactato, enzima responsável pela biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada (HAY, 1990). São ácidos fracos (pKa entre 2 e 5) de alta solubilidade em água ($\log K_{ow} < 1$), meia vida de 5 a 70 dias no solo, e podem persistir no solo por até três anos (HOLLAWAY et al., 2006) resultando em contaminação inclusive de águas (ALMIVIK et al., 2011). As imidazolinonas, cujo mecanismo de ação se assemelha aos do grupo das sulfonilureias (WEBSTER; MASSON, 2001), mas possuem persistência maior no solo por não ficarem expostos à fotohidrolização como ocorre com aquele grupo. De natureza anfotérica, apresentam pKa de 1 a 4, propenso à lixiviação. O tempo de meia-vida é de 30 a 150 dias e prolongado efeito residual nas plantas (BATTAGLIN et al., 2000; CURRAN; LIEBL; SIMMONS, 1992). No apêndice A1 estão apresentados os herbicidas autorizados para emprego na rizicultura irrigada no Brasil, onde é possível identificar estes e outros grupos químicos, assim como suas características físico-químicas, tempo de carência e demais informações para sua identificação.

2.2.3.2. Inseticidas

O aumento da resistência dos insetos aos ativos disponíveis justifica a incessante busca de alternativas e atualizações para controlá-los. No entanto, com as evidências de contaminação ambiental, tem-se enfatizado, desde os anos 1970, a necessidade do desenvolvimento de moléculas efetivas, seletivas e de baixa persistência no meio ambiente.

Os piretroides correspondem a quase 1/3 dos inseticidas no mundo. Obtidos inicialmente pela trituração de flores de plantas do gênero *Chrysanthemum*, apresentam amplo espectro de ação, eficiência, praticidade e baixa toxicidade a mamíferos, em comparação a outros inseticidas (HIRATA, 1985). Difundiu-se como alternativa aos organoclorados, muito persistentes no ambiente, carbamatos e organofosforados, altamente tóxicos, especialmente para o sistema nervoso central. Apesar da vantagem dos piretroides, sabe-se que estão entre os agrotóxicos mais nocivos a organismos aquáticos como os peixes (RADHAIHAH; RAO, 1990) e crustáceos (ZIDAR et al., 2012) e às abelhas (BOUNIAS; DUJIN; POPESKOVIC, 1985). Recentemente, ao contrário do que se sabia, está comprovado que causam nefro e hepatotoxicidade em ratos (LIANG et al., 2013). Estudos com urina de pessoas responsáveis por desinfecções, comprovaram alterações que sugerem avaliação desta exposição ocupacional (WEI; MOHAN; WEISEL, 2012). A ação em insetos ocorre no sistema nervoso interferindo na bomba de sódio, matando-os. A permanência no ambiente varia de 17 a 400 dias (LASKOWSKI, 2002). Além dos piretroides, outros grupos de grande importância são empregados como inseticidas. Os carbamatos e organofosforados inibem a acetilcolinesterase, porém este último de maneira irreversível, o que impede a transmissão sináptica, paralisando músculos e o sistema nervoso central (EYER, 2003), matando insetos e humanos. Estes agrotóxicos apresentam maior número de intoxicação humana. Sua lipofilicidade facilita a absorção pela pele. Podendo incitar a doença de Parkinson e outros distúrbios neurológicos, e afetar a reprodução ao promover defeitos congênitos e infertilidade (CHOWDHARY; BHATTACHARYYA; BANERJEE, 2014).

No manejo do cultivo de arroz, alguns inseticidas como carbossulfano, diflubenzurom, malationa, parationa-metílica e pirimifós-metílico são indicados contra aracnídeos, em especial os ácaros. Estes e outros agrotóxicos utilizados no controle de insetos no cultivo de arroz estão listados no apêndice A2, assim como suas propriedades físico-químicas, e dados para a respectiva identificação.

2.2.3.3. Fungicidas

São antimicrobianos essenciais para a manutenção da produção de alimentos, em especial lavouras extensivas como a do arroz. A brusone (*Pyricularia grisea*) é uma das mais importantes doenças que acometem o arroz. Além desta, há diversas outras causadas por fungos como *Gerlachia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Drechslera oryzae*, etc. Assim, um arsenal de fungicidas busca controlar fungos e mediar a resistência adquirida (EMBRAPA, 2005). Um dos grupos com mais ativos disponíveis para combater os fungos no arroz é o triazol. Tem como mecanismo de ação a destruição da membrana plasmática pela inibição da síntese do ergosterol e que também é tóxico a roedores (WARD et al., 2006). Tem, ainda, promovido alterações metabólicas em morcegos (MACHADO, 2010). O potencial tóxico justifica sua inclusão nas classes I e II de toxicidade. Os triazóis apresentam tempo de meia vida ($t_{1/2}$) médio de 10 dias, com persistência no solo de até 300 dias (BOTTREL, 2012). Outro grupo importante é o benzimidazol, que inibe a biossíntese das tubulinas e interfere na divisão celular do fungo, matando-o. Apresenta menor toxicidade pois possui baixa absorção dérmica, diminuindo a intoxicação durante aplicação. Estudos com carbendazim indicaram que em solo, com lençol freático abaixo de um metro, e não alagado, dificilmente resultaria em contaminação de água subterrânea, já que sofrem degradação microbiana em até 28 dias (PASZKO, 2014), catalisada em pH básicos (ACIEGO PIETRI; BROOKES, 2008).

Nos anos 1990, o grupo da estrobirulina foi empregado na agricultura (MCCARTNEY et al., 2007), extraído do fungo *Strobilurus tenacellus*. Estes inibem a respiração mitocondrial e são aplicados no combate a fungos resistentes a outros fungicidas (SUDISHA et al., 2005). Apesar de tóxico a peixes e invertebrados (RODRIGUES; LOPES; PARDAL, 2013) tem sido preferido, pois apresenta menor impacto ambiental (ROSENZWEIG et al., 2008). Além deste, existem outros fungicidas pertencentes a grupos químicos distintos empregados na rizicultura. No apêndice A3 estão listadas as propriedades físico-químicas dos agrotóxicos que, em associação ou isolados, são ferramentas de controle fúngico.

3.1.5.2. Limites máximos de resíduos (LMR)

No Brasil, a Anvisa define os LMR de agrotóxicos para os alimentos disponibilizados para consumo. Estes limites podem ser expressos em, $\mu\text{g g}^{-1}$ ou mL^{-1} e mg kg^{-1} ou L^{-1} . A presença de resíduo depende do manejo, das boas práticas agrícolas e respeito ao tempo de carência. Alimentos que contenham agrotóxicos além dos LMR apresentam risco de contaminação, pois podem levar ao consumo de substâncias acima do limite de ingestão diária aceitável (IDA) e/ou extrapolam a dose de referência aguda (DR_f), que são parâmetros empregados na determinação dos LMR. A avaliação toxicológica, recomendações de IDA e cálculos de LMR são recomendados por órgão como Food and Agricultural Organization (FAO), World Health Organization (WHO) e CODEX Alimentarius Mundial. A IDA é estabelecida por meio de experimentos de avaliação toxicológica em animais e determina a relação massa corpórea e a quantidade de substância que pode ser ingerida diariamente durante o tempo de vida humana (W.H.O., 2010). Os LMR são revisados em função das descobertas relacionadas à toxicidade via oral e proibição de uso, assim como a inclusão ou exclusão da aplicação de algum dos princípios ativos em outros alimentos, o que resulta na necessidade de estabelecer novos LMR pela redistribuição deste na ingestão diária. Os LMR permitidos no arroz para os anos de 2009, 2010 e 2014 estão na tabela 6.

Tabela 6. Limites máximos de resíduos de agrotóxicos em arroz (ANVISA, 2009a, 2011b, 2014)
(continua)

AGROTÓXICO	LMR ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			AGROTÓXICO	LMR ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	2009	2010/11	2014		2009	2010/11	2014
Ciflutrina ⁽ⁱ⁾	0,01	0,01	0,01	Esfenvalerato ⁽ⁱ⁾	1	1	1
Fipronil ⁽ⁱ⁾	0,01	0,01	0,01	λ -cialotrina ⁽ⁱ⁾	1	1	1
Metalaxil-metil ^(f)	0,01	0,01	0,01	Tetraconazol ^(f)	1	1	1
Kresoxim-metil ^(f)	0,02	0,02	0,02	Tiametoxam ⁽ⁱ⁾	1	1	1
β -cipermetrina ⁽ⁱ⁾	0,3	0,03	0,3	Clorotalonil ^(f)	2	2	2
Ciproconazol ^(f)		0,03	0,4	Ditiocarbamatos ^(f)		3	3
Furatiocarbe ⁽ⁱ⁾	0,03	0,03	0,03	Etofemproxi ⁽ⁱ⁾	3	3	3
Acetamiprido ⁽ⁱ⁾	0,05	0,05	0,3	Malationa ⁽ⁱ⁾	8	8	8
β -ciflutrina ⁽ⁱ⁾	0,05	0,05	0,05	Pirimifós-metilico ⁽ⁱ⁾	10	10	5
Cipermetrina ⁽ⁱ⁾	0,05	0,05	0,05	Imidacloprida ⁽ⁱ⁾	0,05	NA	0,05
Oxyfluorfem ^(h)	0,05	0,05	0,05	Malaoxon ⁽ⁱ⁾		NE	NE
Pendimetalina ^(h)	0,05	0,05	0,05	Paraoxon-metil ⁽ⁱ⁾		NE	NE
Tiobecarbe ^(h)	0,05	0,05	0,05	Azinsulfuron ^(h)	0,1		
Trifluralina ^(h)	0,05	0,05	0,05	Benfuracarbe ⁽ⁱ⁾	0,05		
Picoxistrobina ^(f)	0,07	0,07	0,07	Bentazon ^(h)	0,02		
Azoxistrombina ^(f)	0,1	0,1	0,7	Bispiribac-sódio ^(h)	0,05		
Clomazone ^(h)	0,1	0,1	0,1	Clorantraniliprole ⁽ⁱ⁾	0,2		
Diflubenzurom ⁽ⁱ⁾	0,1	0,1	0,1	Ciclossulfamurom ^(h)	0,1		
Permetrina ⁽ⁱ⁾	0,1	0,1	0,1	Cicloxidim ^(h)	0,5		
Picloram ^(h)	0,1	0,1	0,1	Cihalofop-butil ^(h)	0,01		
Propiconazol ^(f)	0,1	0,1	0,1	Etoxissulfurom ^(h)	0,05		
Tebuconazol ^(f)	0,1	0,1	0,1	Fenoxaprop-p-etil ^(h)	0,05		
Tiodicarbe ⁽ⁱ⁾	0,1	0,1	0,1	Glifosato ^(h)	0,2		
2-4 D ^(h)		0,2	0,2	Imazapic ^(h)	0,05		
Carbofurano ⁽ⁱ⁾	0,2	0,2	0,2	Imazapir ^(h)	0,05		
Carboxina ^(f)	0,2	0,2	0,2	Imazetapir ^(h)	0,05		
Parationa-metilica ⁽ⁱ⁾	0,2	0,2	0,2	Metsulfurom-metil ^(h)	0,02		
Tiabendazol ^(f)	0,2	0,2	0,2	Oxadiazom ^(h)	0,05		
Trifloxistrobina ^(f)	0,2	0,2	0,2	Penoxsulam ^(h)	0,01		
Epoxiconazol ^(f)	0,3	0,3	0,3	Propanil ^(h)	2		
Carbendazim ^(f)	0,05	0,5	0,5	Pyrazosulforom-etil ^(h)	0,01		
Carbossulfano ⁽ⁱ⁾		0,5	0,5	Quinclorac ^(h)	0,05		
Miclobutanil ^(f)	0,5	0,5	0,5	Tiofanato metílico ^(f)	0,5		
Bifentrina ⁽ⁱ⁾	0,7	0,7	0,7	Triciclazol ^(f)	0,3		
Deltametrina ⁽ⁱ⁾	1	1	1	Triclopir ^(h)	0,05		
Difenoconazol ^(f)	1	1	1				

Fonte: (ANVISA, 2009b, 2011b, 2014). (h) herbicida; (i) inseticida; (f) fungicida; NE: não estabelecido; NA: não autorizado.

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISE DE MULTIRRESÍDUOS EM ALIMENTOS

2.3.1. Métodos cromatográficos

A cromatografia é uma técnica que busca a separação de componentes presentes em uma amostra, pela distribuição entre uma fase estacionária (FE) e uma fase móvel (FM), em função de suas propriedades físico-químicas. Esta técnica é ideal para separação e auxílio na identificação de componentes de uma mistura, principalmente por meio da maioria dos detectores onde a determinação deles necessita ser impreterivelmente inferida individualmente para se evitar interferências. Além disso, existe uma tendência para que os métodos analíticos instrumentais tenham cada vez mais capacidade de detectar compostos em traços, principalmente na determinação de contaminantes em matrizes ambientais e de alimentos. É por isso que os métodos cromatográficos são os mais indicados para atingir estas exigências.

2.3.1.1. Cromatografia em fase gasosa

A cromatografia em fase gasosa (GC) tem como base o emprego de uma FM gasosa, que transporta os componentes da mistura através da FE líquida ou sólida. Os componentes da mistura que podem ser separados por GC devem possuir algumas propriedades como termo-estabilidade, volatilidade, dissolução na FM e apresentar temperatura de ebulição de até 300°C (HARRIS, 2008).

2.3.1.2. Cromatografia em fase líquida

A cromatografia em fase líquida (LC) é uma técnica de separação consagrada e bem estabelecida, que possibilita a determinação de moléculas termolábeis e não voláteis, diferentemente da GC. Estas condições viabilizam que e os analitos alvo da separação possam permanecer solubilizados, o que permite a determinação de 80% dos compostos sintéticos (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

2.3.2. Espectrometria de massas

2.3.2.1. Definições e instrumentação

A MS é uma técnica instrumental capaz de identificar e quantificar compostos pela determinação indireta da massa molecular, e pode ser aplicada mesmo quando a separação cromatográfica não é completa, ou seja, quando há co-eluição de compostos (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

Por meio de um campo elétrico ou magnético é possível selecionar um íon pela sua razão massa carga (m/z – “*mass to charge ratio*”), identificando o analito de origem. Assim, pela m/z se estabelece a composição química elementar e estrutural de compostos, pela formação do íon *quasi*-molecular e pelas fragmentações controladas e reprodutíveis na cela de colisão por dissociação induzida por colisão (CID). É possível obter fragmentos neutros como H₂O, MeOH, CO e CO₂, quando CID é realizada com baixas energias, valiosa na determinação de grupos funcionais presentes na molécula. No entanto, quando empregado energia em excesso, a fragmentação é descontroladamente e de pouco interesse.

Na análise quantitativa, a MS é uma ferramenta poderosa, especialmente no modo tandem, pois é possível gerar um íon característico de uma molécula, detectando-a e quantificando-a a partir do íon e fragmentos. Mesmo quando em uma mistura se encontram moléculas de mesma massa molar nominal, é possível diferenciar os analitos (THURMAN et al., 2013), uma vez que esta determinação envolve a filtragem, fragmentação e focalização individual e específica estabelecida em uma janela de tempo denominada “*dwell time*”, que ocorre em milissegundos (ms), dedicada para cada íon precursor de interesse e seus respectivos fragmentos, reduzindo o ruído e elevando a detectabilidade.

Os processos de ionização, filtragem, focalização, fragmentação e detecção que ocorrem no MS dependem de alguns componentes principais:

(I) **Fonte de ionização (FI)**: interface de interação instrumental de separação e detecção de massas, além de promover a ionização dos analitos;

(II) **Analisadores de massa individual (MS) ou em sequência (tandem):** responsáveis por filtrar e focalizar íons e fragmentos, além de compor a cela de colisão para condução ao detector dos fragmentos formados;

(III) **Cela de colisão:** local onde ocorre dissociação induzida do íon quasi-molecular por colisão com gás inerte (Ar, He, N₂), para formação dos fragmentos;

(IV) **Detector propriamente dito:** local onde os íons quasi-molecular e seus fragmentos são quantificados e detectados. Na figura 5, o esquema para identificação dos componentes principais do MS.

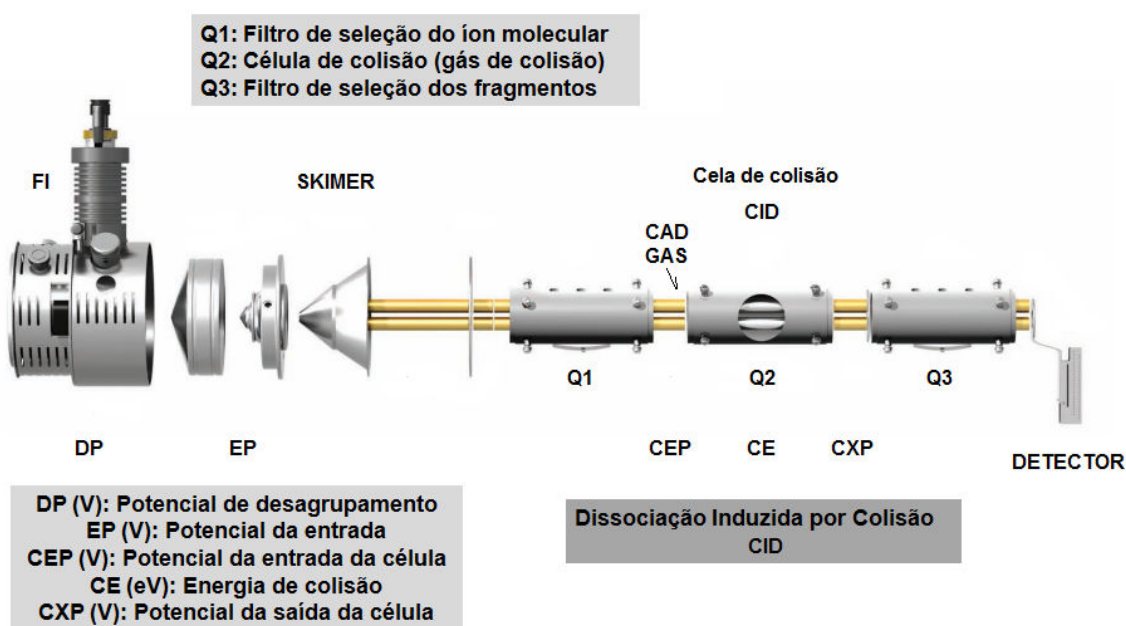


Figura 5. Ilustração dos componentes do MS quadrupolo em tandem. (Q0, Q1, Q2, Q3: estruturas compostas por quadrupolos) (DP, EP, CEP, CE, CXP: energias de filtração, focalização e fragmentação) (CAD Gás: Gás de colisão (Ar, He N₂) para promoção da CID).
Fonte: Adaptado de (ABSCIEX, 2012)

2.3.2.2. Fontes de ionização (FI)

O processo de detecção por MS inicia com a ionização dos compostos alvo. Uma energia é aplicada de acordo com o agente de ionização e transferida direta ou indiretamente à amostra para promoção da ionização do composto. Como existem inúmeros tipos de amostras e espécies químicas, diferentes estratégias de ionização têm sido desenvolvidas para adaptar o sistema a cada situação. O sucesso da

análise depende da formação do íon *quasi*-molecular livre, em gota ou em fase gasosa, onde é determinada a relação m/z do íon. O alcance e a utilidade do método de MS são proporcionais aos resultados obtidos pelo processo de ionização. Os agentes ionizantes das fontes de ionização empregados em MS devem ser escolhidos de acordo com as características da amostra e do analito. Ao contrário de amostras gasosas, onde os analitos já se encontram disponíveis, nas amostras sólidas ou líquidas os analitos devem sofrer dessorção na forma de íons *quasi*-molecular. Em amostras líquidas os analitos não precisam ser voláteis ou termoestáveis, o que é vantajoso. Na figura 6 estão identificados as principais fontes de ionização que, dependendo da massa molar, volatilidade e da polaridade dos analitos de interesse pode-se empregar diferentes métodos instrumentais cromatográficos e de ionização.

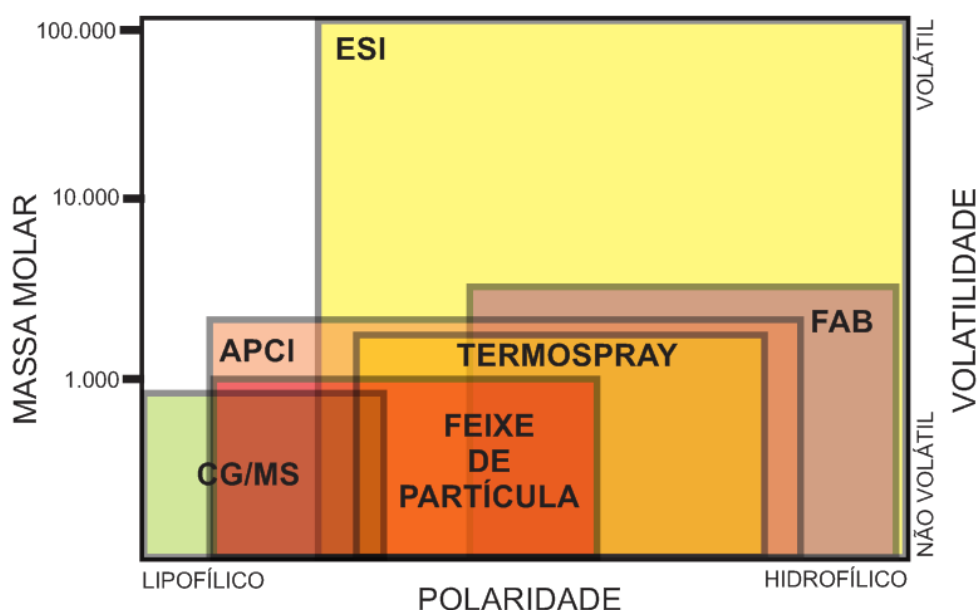


Figura 6. Distribuição das moléculas em função da polaridade, volatilidade e massa molar em função da possibilidade de determinação por LC/MS x método de ionização e CG/MS.
 Fonte: (SILVA; COLLINS, 2011; SLOBODNFK; BRINKMAN, 1999)

A FI por spray de elétrons (ESI – Electrospray Ionization) foi a técnica empregada neste estudo. A descrição mais detalhada das suas características, assim como dos processos e teorias que envolvem a ionização por este método está colocada a seguir.

2.3.2.2.1. Ionização por spray de elétrons (ESI – Electrospray Ionization)

Esta técnica, que ocorre em pressão atmosférica (API – atmospheric pressure ionization) foi sugerida por Marcolm Dole e colaboradores em 1968 (DOLE, 1968) para determinação da massa de macromoléculas de poliestireno, mas já em 1917 a nebulização por eletrospray foi citada e pela primeira vez (ZELENY, 1917). Apesar de aqueles autores não conseguirem bons resultados em função das técnicas a eles disponíveis, foram eles que definiram muito do que se sabe hoje na aplicação da ESI. A partir de 1984, Masamichi Yamashita e John Beneth Fenn demonstraram que era possível empregá-la na determinação de massas associada a um MS (FENN, 2002; FENN et al., 1989).

Na figura 7, uma foto da FI Turbo V da AB Sciex acoplada ao MS do tipo API 3200, empregado neste trabalho.



Turbo V™

Figura 7. Fonte de ionização Turbo V da AB Sciex (espectrômetro de massas API 3200).
Fonte:(ABSCIEX, 2012).

A FI, apesar de promover a ionização por eletrospray, pode se comportar apenas como um sistema de interface entre o cromatógrafo (LC) e o MS. Nestes casos ocorre a transferência das moléculas pré-ionizadas em solução para uma fase gasosa dessolvatada (BERKEL; MCLUCKEY; GLISH, 1992).

O solvente da FM envolve os íons ou a molécula a ser ionizada em uma esfera de transporte. Este processo endotérmico sob baixa energia viabiliza a determinação de substâncias termolábeis não voláteis, reproduzivelmente. Isto se dá por ocorrer em condições que permite aos íons presentes na forma gasosa serem os mesmos oriundos da forma líquida, sem ocorrência de fragmentação prematura.

O spray, originado pela nebulização do solvente, é formado pelo bombeamento da FM através de um capilar metálico, com diâmetro de 50 a 100 μm , submetido à alta voltagem. O capilar ejeta um aerosol da FM que contém os analitos, em direção a um eletrodo que conduz os íons até o orifício de entrada do MS (YAMASHITAT; FENN, 1984). Este orifício é o ponto de menor potencial e por isso ocorre a menor repelência dos íons quasi-molecular o que permite a entrada deles, num processo denominado eletroforético (MORAES; LAGO, 2003). A FM evapora (dessolvata) pela ação dos gases secantes e aumenta a densidade de carga das gotículas pela redução da massa (COLE, 1997). A dessolvatação favorece a ionização das moléculas que serão focalizadas para dentro do MS de acordo com sua carga positiva ou negativa, em função da configuração estabelecida (Figura 8).

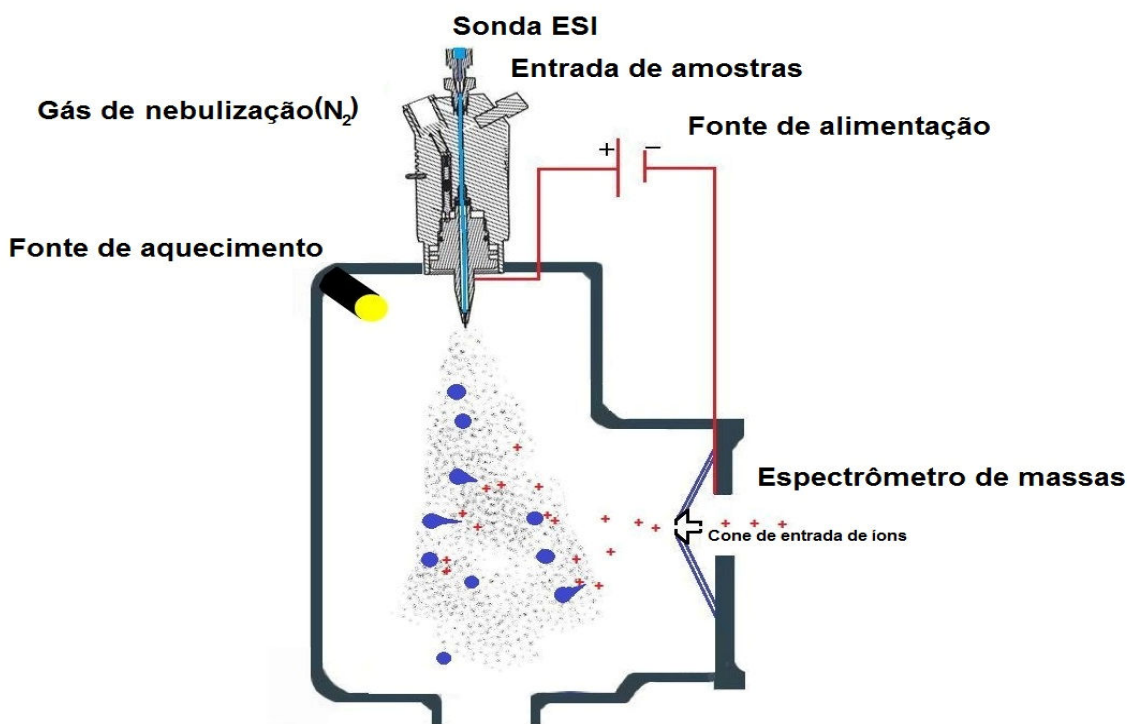


Figura 8. Representação da fonte de ionização ESI com os íons sendo focalizados para dentro do espectrômetro de massas. Fonte: Adaptado (MOSONACO, 1999).

2.3.2.2.1.1. Dessolvatação e formação dos íons

Quando a molécula não se encontra espontaneamente pré-ionizada na solução da FM, a ionização começa a ocorrer com a formação do cone de Taylor (Figura 9 e 10) originado na ponta do capilar, descrito por Geoffrey Ingram Taylor em 1964, baseado nos trabalhos pioneiros de Zeleny.

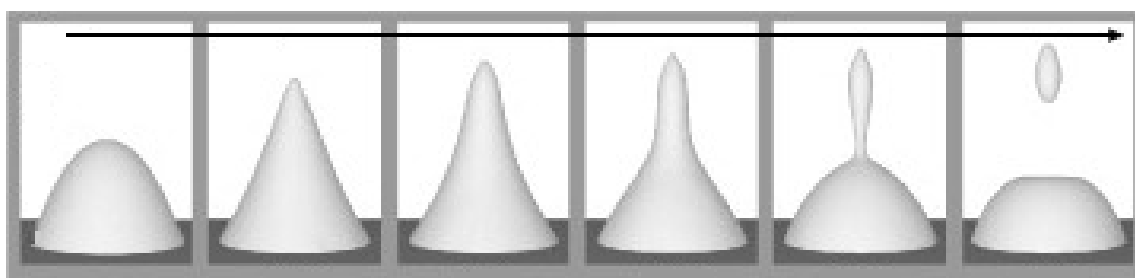


Figura 9. Formação simulada do Cone de Taylor e do desprendimento de uma gota pela instabilidade de Rayleigh, princípio da formação do aerossol que ocorre na FI por eletrospray. Fonte: Adaptado de (HILTON; VAN DER NET, 2009).

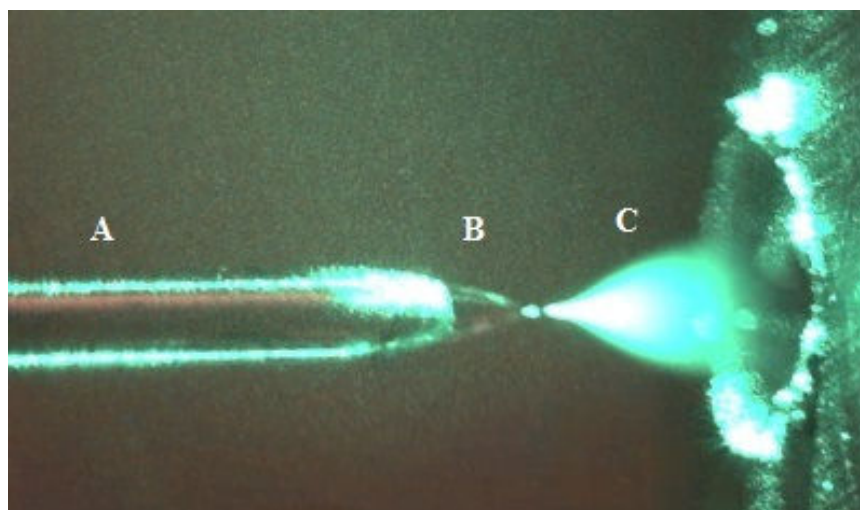


Figura 10. Imagem do processo de formação do aerossol por eletrospray similar ao da fonte de ionização do tipo ESI. (A) Capilar; (B) Cone de Taylor; (C) Spray. Fonte: (USF, 2013).

Então, com a formação deste cone um aerossol é produzido pela liberação de gotas com alta densidade de carga, favorecendo a dessolvatação sob ação do fluxo de N_2 aquecido. Assim, dois mecanismos distintos de ionização começam a ocorrer:

(I) Modelo de carga residual (CRM – charged residual model): de acordo com esta teoria, proposta por Dole em 1968, gotas carregadas contendo solvente sofrem evaporação e perdem sua massa e aumentando a carga superficial até o limite de Rayleigh, onde a força de repulsão é tal que, por ação coulômbica, a gota é rompida e forma gotículas de menor massa e mais carregadas. Este processo se repete até que as gotas atinjam aproximadamente 1nm contendo um íon na fase gasosa ou uma carga associada a uma molécula neutra. A dessolvatação, que reduz o tamanho da gota, promove a transferência de suas cargas para as moléculas (analitos) (DOLE, 1968; KONERMANN, 2009).

A carga máxima que uma gota pode suportar depende do raio desta gota e leva à fissão explicada pela equação deduzida por Rayleigh (1882), abaixo:

Equação: $Q=8\pi \cdot (\epsilon_0 \cdot \gamma \cdot R^3)^{1/2}$; onde: Q = carga máxima; ϵ_0 = permissividade livre no espaço; γ = tensão superficial da gota; R = raio da gota.

A figura 11 representa a formação das gotas de menor raio e elevada carga. Este processo ocorre em condições onde existe um campo elétrico muito alto. As gotas descendentes passarão pelo mesmo processo.

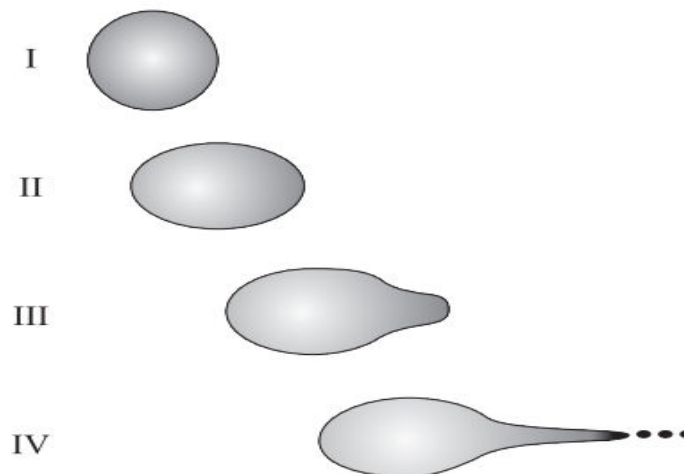


Figura 11. Deformação e fissão da gota, desprendida do cone de Taylor, submetida a um elevado campo elétrico. (I) gota recentemente desprendida do cone de Taylor; (II) início do processo de deformação; (III) Deformação acentuada da região com maior densidade de carga em direcionada pelo campo elétrico; (IV) formação das gotas descendentes de menor massa e elevada carga. Fonte: (MORAES; LAGO, 2003).

(II) Modelo da evaporação do íon (IDM – íon desorption model): Julio Victor Iribarne (1916-2012) e Bruce A. Thomson em 1979 propuseram um modelo onde a formação dos íons ocorre quando as gotículas atingem 10 a 20 nm. Neste momento são obtidos os íons quasi-molecular que imediatamente evaporam. Estes íons são formados pela carga das gotas da nebulização eletrostática originada da ponta do capilar do eletrospray, sem atingir o limite de Rayleigh e sem que ocorresse a ruptura da gota pela expulsão coulômbica (IRIBARNE; THOMSON, 1976; WANG; COLE, 2000). Atualmente, ainda não foi possível estabelecer as condições que definem se a ionização está sendo realizada exclusivamente por CRM ou IEM. O que parece mais provável é que os dois mecanismos ocorrem simultaneamente e o processo de ionização por eletrospray possibilita a ocorrência destes dois processos indistintamente (BLADES et al., 2004; KATTA; ROCKWOOD; VESTAL, 1991). Para ilustração da ocorrência simultânea destes processos observe-se a figura 12. Há estudos que apontam uma tendência para que moléculas hidrofílicas sejam ionizadas por CRM e moléculas hidrofóbicas pelo processo IDM (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

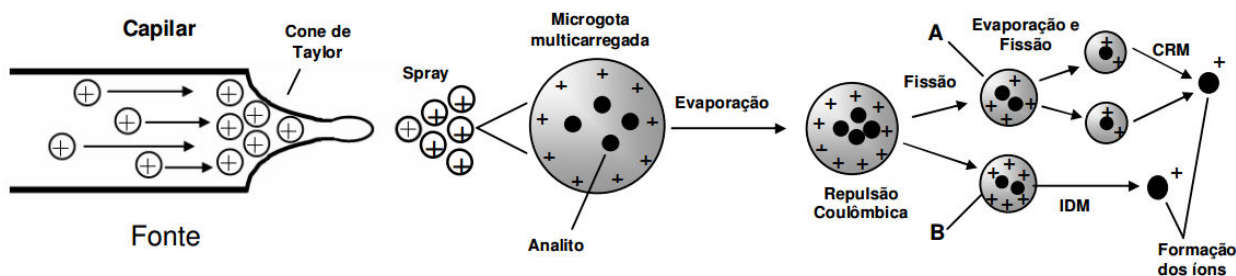


Figura 12. Modelo de ionização por eletrospray com ocorrência simultânea dos modelos de carga residual (CRM(A)) e de desorção de íons (IDM(B)).

Fonte: (SOUZA, 2008)

2.3.2.3. Analisador de massas

Os analitos após ionizados são levados da interface ou FI para dentro dos analisadores de massa sob alto vácuo. Os íons são filtrados, selecionados, focalizados e fragmentados de acordo com seu valor de m/z . Existem vários tipos de analisadores de massas cuja função básica é garantir a chegada dos íons *quasi-*

molecular ou fragmentos de interesse até o detector propriamente dito, através da aplicação de campo elétrico ou magnético.

Os analisadores quadrupolares, usados neste estudo, são compostos por dois pares de barras cilíndricas (eletrodos) dispostos paralelamente em um eixo x e y (Figura 13), onde um campo elétrico é aplicado alternadamente entre os pares de eletrodos conectados. Este campo garante a trajetória do íon através do eixo z de acordo com sua relação massa/carga descrito pela equação de Mathieu que estabelece as condições pelo qual o íon seguirá uma trajetória helicoidal estável até o detector (MAKAROV, 2000). Estas condições estão relacionadas ao potencial de corrente direta (DC- direct-current) e a uma rádio frequência (RF) do campo elétrico capazes de focalizar íons com m/z específicos. Esta relação DC e RF, específica para cada m/z , garante a seleção dos íons para sua posterior fragmentação e detecção. Este mecanismo foi descrito por Paul & Steinwedel em 1953 e mais tarde por Peter Dawson no livro “Quadrupole mass and its applications” em 1976. Em 1984 Glish & Goeringer, associaram o quadrupolo a um analisador do tipo Tempo de Voo (TOF – Time of flight), onde postularam as vantagens da utilização do quadrupolo pelo baixo consumo de energia e fragmentação controlada de íons por dissociação induzida por colisão (CID – collision induced dissociations) denominada, na época, como dissociação ativada por colisão (CAD – collision-activated dissociations).

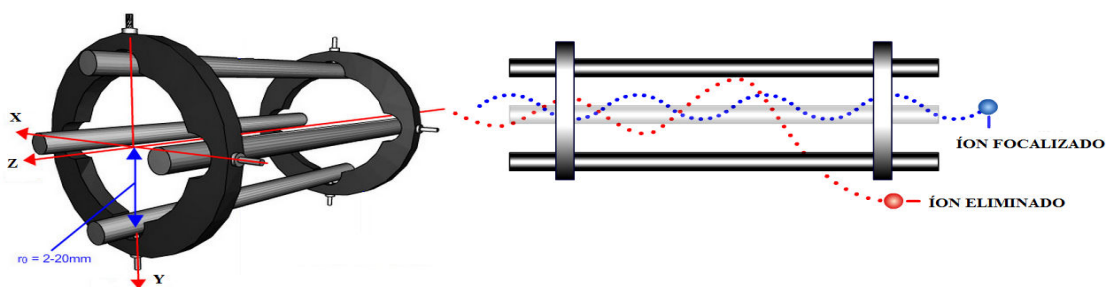


Figura 13. Representação dos eixos x, y e z no quadrupolo com pares de barras dispostos perpendicularmente e da filtração com a trajetória de um íon focalizado e um eliminado.

Fonte: (CHROMACADEMY, 1999)

Além dos analisadores de massa do tipo quadrupolo existem outros tipos de analisadores que dependendo da amostra a ser analisada ou da seletividade necessária para determinar compostos de m/z muito próximas podem ser requeridos

ou ainda associados no modo tandem (Figura 14), ou seja analisadores dispostos em sequência.

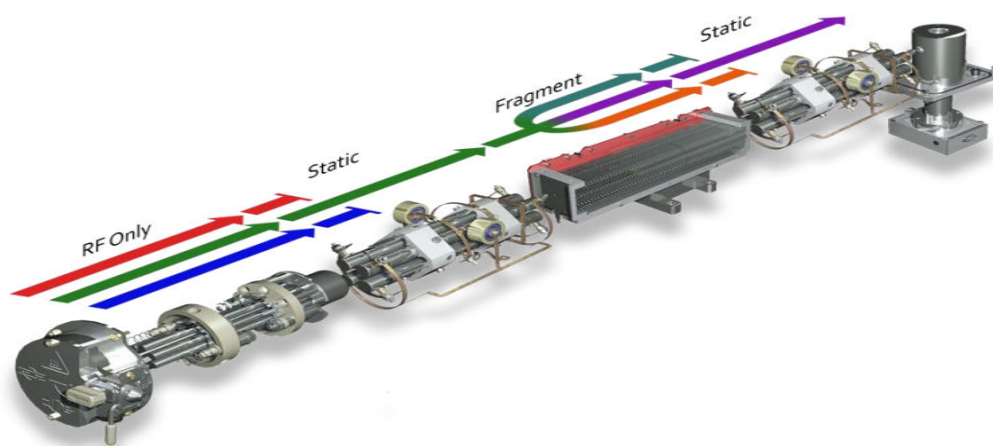


Figura 14. Esquema de um triplo quadrupolo operando de forma a detectar apenas um fragmento oriundo do íon quasi-molecular (modo MRM (Monitoramento Múltiplo de Reações)).
Fonte: (IGLESIAS, 2014).

2.3.2.4. Analisadores de massas em sequência (*tandem*)

Em equipamentos onde os analisadores de massa são dispostos em sequência, estes são chamados de tandem-ms, MS/MS ou MSⁿ. Na década de 1960, Gustafsson e Lindholm empregaram tandem nos estudos de troca de carga entre íons positivos e pequenas moléculas; Futrell e Miller (1966) empregaram dois analisadores de setor estático com duplo foco (BEEB) em estudos de reações íon-molécula (FUTRELL; MILLER, 1966; GUSTAFSSON; LINDHOLM, 1960).

Diversas são as possibilidades de combinações em tandem, tais como: (I) quadrupolo ciclotron-quadrupolo íon trap (ICR-Trap) (STINGL et al., 2006); (II) analisadores de setores magnético (B) e elétrico (E), obtendo tandem do tipo EB, B²E; (III) associando os de setores as cela de colisão (q) e/ou analisador quadrupolo (Q), BQQ, BEQ, EBQ, QB, EQ, BEqQ (Schoen et al., 1985 Guanyi et al., 2013); (IV) associações ao TOF, como BE-TOF, B-TOF, Q-TOP, TOF-TOF (HARNISCH et al., 2014; WANG et al., 2014), etc. Segundo Domon & Aebersold os tandem apresentam diferenças no seus princípios físicos, padrões de desempenho, modo de

funcionamento e capacidades limitantes ou adequadas para apoiar diferentes estratégias analíticas específicas (Tabela 7) (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

As configurações tandem mais comuns agrupam três MS: (I) quadropolos (QqQ), criado por Yost e Enke (1978); (II) quadropolo associado ao de tempo de voo (QToF) apresentado por Glish e colab. (GLISH; MCLUCKEY; MCKOWN, 1987); (III) e duplo TOF (ToF-ToF) (ALDERDICE *et al.*, 1993), ambos desenvolvidos graças aos trabalhos do grupo de Beynon e Cooks (COOKS *et al.*, 1973) viabilizando a CID (JENNINGS, 1968; MCLAFFERTY *et al.*, 1973).

Tabela 7. Características e performances de alguns espectrômetros de massa em tandem.

	IT-LIT	Qq-ToF	ToF-ToF	FT-ICR	QqQ	Qq-LIT
Precisão (massas)	-	++	++	++++	+	+
Poder de resolução	-	++	+++	++++	-	-
Sensibilidade (LD)	++		+++	+	+++	+++
Faixa dinâmica	-	+	+	+	+++	+++
ESI	✓	✓		✓	✓	✓
MALDI	✓	✓	✓			
MS/MS	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Capacidades adicionais				Precursor, Neutral, MRM		
Identificação	++	++	++	+++	+	+
Quantificação	+	+++	++	++	+++	+++
Vazão	+++	++	+++	++	++	++
Deteção de modificações	+	+	+	+		+++

Nota: (IT) íon trap; (LIT) Linear Ion trap; (FT-ICR) Transformada de Fourier Orbitrap; (ICR) ciclotron; (Qq) quadropolo e célula de colisão; (-) baixa; (+) moderada; (++) boa (+++) muito boa; (++++) excelente. Fonte: Adaptado de (DOMON; AEBERSOLD, 2006).

Na maioria dos casos os equipamentos possuem um MS para seleccionar o íon precursor (Q1); uma cela de colisão responsável pela fragmentação do íon (Q2); e um analisador (Q3) que permite a passagem de íons precursores remanescentes e a seleção dos fragmentos até o detector.

2.3.2.4.1. Analisador de massas (Q1(MS¹))

O MS¹ é responsável pela seleção, da molécula ionizada advinda da fonte. Cada íon é selecionado, em uma janela de tempo de ms. Quando MS¹ é do tipo quadropolar, a seleção depende de um potencial DC associada a uma RF do campo

elétrico, capaz de focalizar íons com m/z específicos; quando se trata de analisador de setor um campo magnético e/ou elétrico é aplicado; se do tipo Íon Trap, aplica-se RF; nos do tipo TOF emprega-se uma voltagem específica; se for um ICR, é uma DC baixa, até a liberação do íon com ação de uma RF.

2.3.2.4.2. Câmara de colisão (Q2)

Nesta câmara, célula ou cela de colisão, apenas uma RF é aplicada para que o analisador de massas conduza o íon quasi-molecular do MS^1 através da cela, e obtenha os fragmentos por colisão (CID (Figura 15), encaminhamento dos íons precursores remanescentes ou para varredura no modo íon precursor.

A função principal desta câmara é submeter os íons quasi-molecular a colisões com um gás, induzindo a fragmentação daqueles, formando íons produto que servirão para quantificação e confirmação da presença da molécula de interesse.

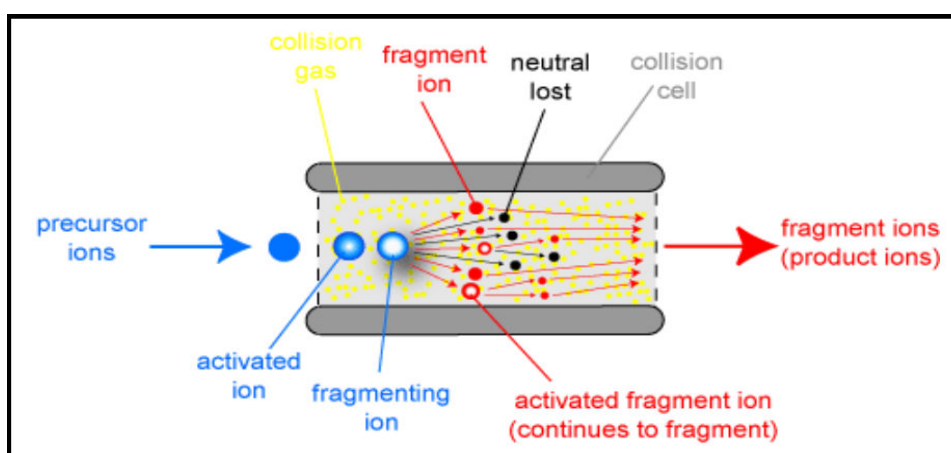


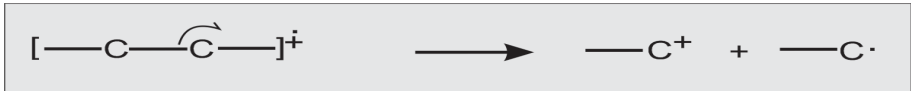
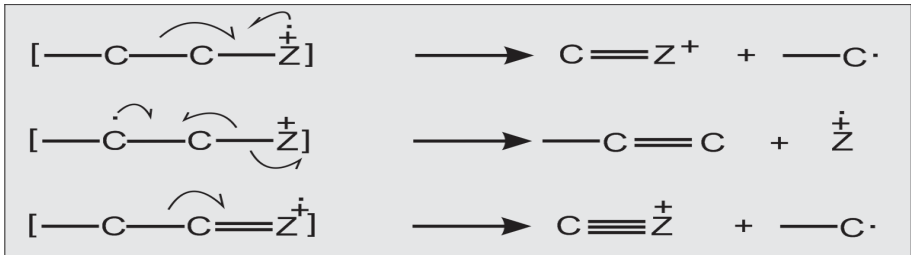


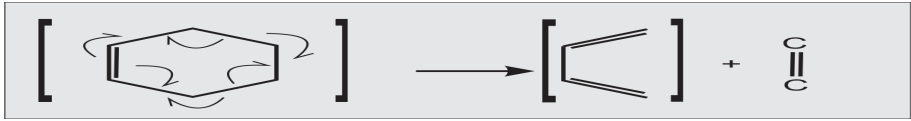
Figura 15. Desenho esquemático da fragmentação por CID. Fonte: (BRISTOL, 2014).

A CID divide-se em duas etapas; (I) ativação do íon precursor pela colisão com gás, onde parte da energia cinética é convertida em energia interna; (II) dissociação unimolecular do íon precursor excitado.

2.3.2.4.2.1. Fragmentação do íon quasi-molecular

A fragmentação do íon acontece após sua colisão com um gás, que resulta na formação de dois ou mais fragmentos onde pelo menos um deles é um íon. As principais reações que levam a esta fragmentação ocorrem de acordo com alguns dos mecanismos (MENET, 2011) (Tabela 8 e Figura 16).

Tabela 8. Mecanismos de fragmentação mais comuns (MENET, 2011).

TIPO	MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO
Clivagem σ:	<p>Iniciada em uma ligação C-C.</p> 
Clivagem α	<p>Iniciada pelo sítio radicalar vizinho. A reatividade segue a ordem dos sítios de Lewis (N > S, O, C₆H₅ > F, Cl, Br, I).</p> 
Clivagem i	<p>Inicia pela carga do íon em uma ligação C-Heteroátomo. Do tipo heterolítica, inicia pela quebra da ligação de carga, com a carga em movimento. O efeito indutivo é mais pronunciada à medida que o átomo de Y é electronegativo (F > Cl > Br > I > S, S >> N, C).</p> 
Rearranjo e extrusão	<p>Eliminação de H vicinal e de heteroátomo.</p> 
Rearranjo de retro-Diels-Alder (RDA)	<p>Ocorre quando existe uma ligação dupla em um anel com seis átomos de carbono.</p> 
Rearranjo McLafferty	<p>Presença de hidrogênios γ com relação ao centro de carga, e geração de um íon radical a partir do cátion radical M^{+•}. Ocorre com a transferência de um átomo de hidrogênio em um grupo polar, exigindo a presença de uma dupla ligação e um átomo de hidrogênio (Figura 21).</p>

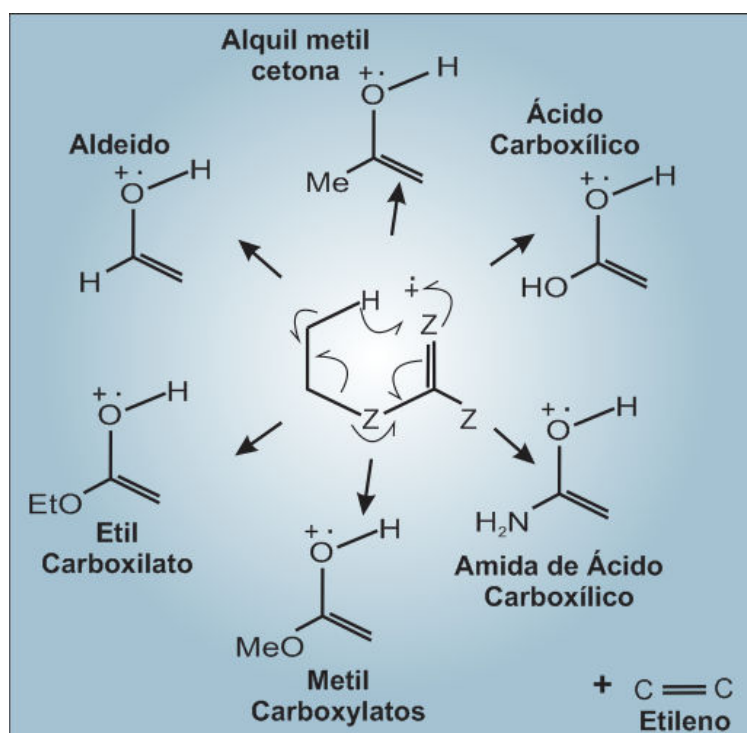


Figura 16. Fragmentos mais frequentes que dependem da função química do precursor obedecendo o rearranjo McLafferty gerado por CID.
 Fonte: Adaptado de (MENET, 2011).

2.3.2.4.3. Analisador de massas (Q3(MS²))

Opera de forma idêntica ao MS¹, no entanto, de acordo com o modo de operação selecionado (varredura ou monitoramento) tem a função de focalizar o íon quasi-molecular e/ou os fragmentos.

2.3.2.5. Modos de operação

2.3.2.5.1. Varredura completa (*Full scan*)

Esta varredura é empregada quantitativamente para verificar ou confirmar a presença de íon *quasi*-molecular advindo da amostra ou padrão antes da infusão direta no MS. Antes da obtenção da biblioteca MS, feita por infusão direta do padrão, é indicado fazer a varredura completa de qualquer m/z ou dentro de uma faixa esperada, para detecção do íon correspondente ao padrão infundido.

2.3.2.6.2. Varredura dos íons produzidos (*product-ion scan*)

Nesta varredura, estabelece-se qual íon precursor deve ser selecionado pelo MS¹ para ser submetido à fragmentação por CID em MS² e identificar seus íons-produto característicos, o que possibilita determinar a estrutura do íon precursor (Figura 17).

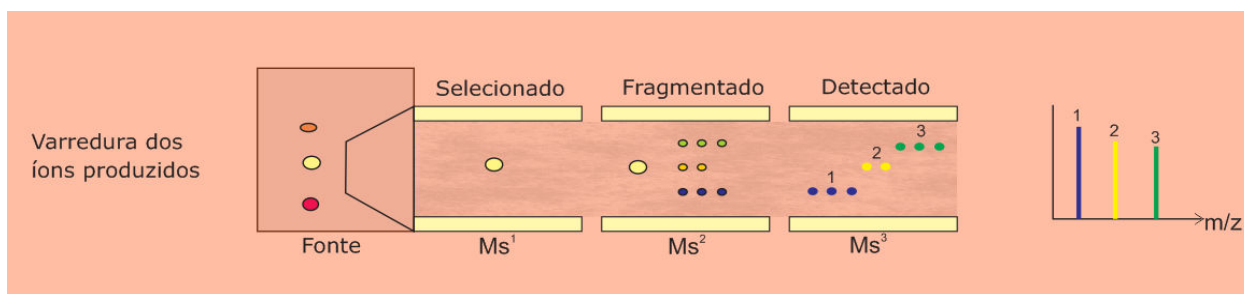


Figura 17. Representação das condições de operação no modo varredura dos íons-produto.

2.3.2.6.3. Varredura do íon precursor (*precursor-ion scan*)

Esta varredura é empregada, principalmente, quando diferentes íons-precursores podem gerar fragmentos iguais. Assim, os íons-precursor que formarem o mesmo fragmento serão auto-identificados e formando espectros dos íons-precursor que possuem os mesmos fragmentos (Figura 18).

Nos casos onde diferentes íons-precursor geram fragmentos iguais, existe a possibilidade de geração de ruído químico. Este ruído advém de fragmentos oriundos de outras moléculas presentes na amostra, porém é minimizado pela seleção que ocorre no MS¹.

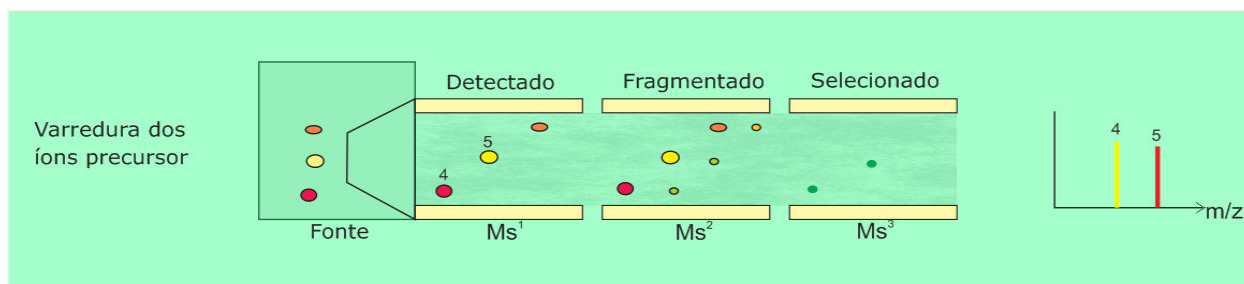


Figura 18. Representação das condições de operação no modo varredura dos íons-precursor.

2.3.2.6.4. Varredura da constante perda de fragmentos neutros (*constant-neutral-loss scan*)

Neste modo busca-se determinar quais grupos funcionais poderiam compor a molécula que está sendo analisada. Os fragmentos neutros são quase sempre moléculas pequenas (Tabela 9), subprodutos da dissociação que ocorre na formação dos fragmentos-produto (Figura 19) permitindo verificar se os componentes da mistura possuem elementos com funções químicas específicas.

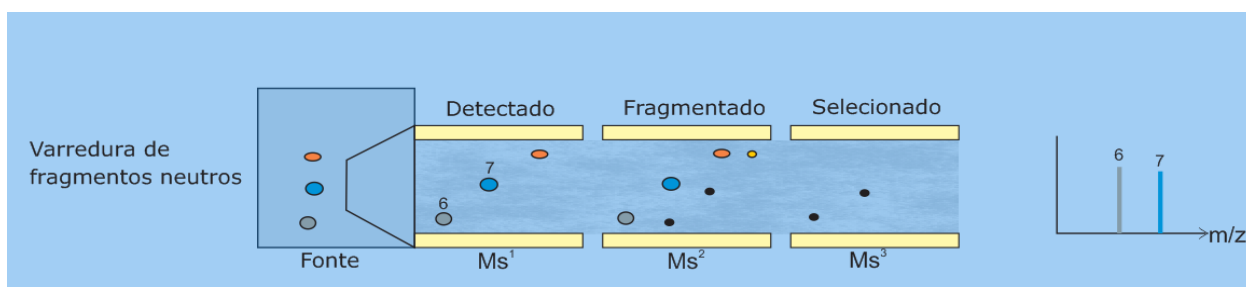


Figura 19. Representação das condições de operação no modo varredura de fragmentos neutros.

Tabela 9. Fragmentos neutros mais comuns dissociados dos íons *quasi*-molecular.

Massa	Natureza	Origem
1	H	Radical hidrogênio
15	CH ₃	Radical metila
18	H ₂ O	Álcool, ácido
19	H ₂ O + H	Álcool, ácido
27	HCN	Amina aromática simples
28	CO	Quinona, Fenol, Oxigênio heterocíclico
29	C ₂ H ₅	Derivado de etila
29	CO + H	Quinona
31	OCH ₃	Éter metílico
33	HS	Derivados de enxofre
34	H ₂ S	Tióis
35	³⁵ Cl	Cloreto de alquila, Cloridrato
36	H ³⁵ Cl	Cloreto de alquila, Cloridrato

2.3.2.6.5. Monitoramento seletivo de reações (SRM - *selected-reaction monitoring*)

Neste modo (Figura 20), é possível selecionar o íon-precursor em Q1, fragmentá-lo no Q2 e selecionar fragmentos específicos em Q3 e fazer correlação direta da concentração da molécula inicial com a intensidade do sinal de um ou mais íons-fragmento detectados.

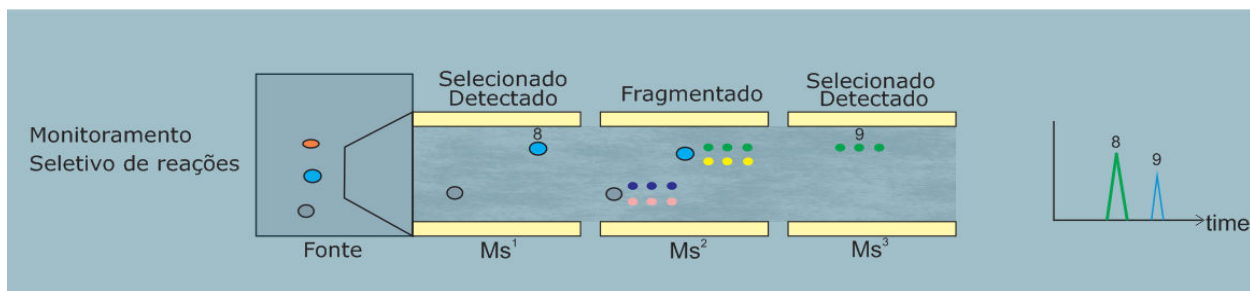


Figura 20. Representação das condições de operação no modo de monitoramento seletivo de reações.

2.3.2.6.6. Monitoramento seletivo de íons (SIM – *selected ion monitoring*)

É o monitoramento em que a abundância dos íons de um ou mais valores específicos de m/z é registrada sem a necessidade de obter-se um espectro de massas específico a uma molécula inicial.

2.3.2.6.7. Monitoramento de múltiplas reações (MRM – *multiple reaction monitoring*)

Neste modo (Figura 21), é possível selecionar mais de um íon-precursor em MS^1 , fragmentá-los no MS^2 e selecionar fragmentos específicos em MS^3 e fazer correlação direta da concentração das moléculas iniciais com a intensidade do sinal de um ou mais íons-fragmento detectados. Este monitoramento, apesar de múltiplo, é feito de modo que em um período de tempo em ms (*dwell time*), a varredura seja exclusiva para cada íon-precursor e seus fragmentos.

O MRM é utilizado para detecção de analitos onde sua fragmentação é conhecida em amostras complexas.

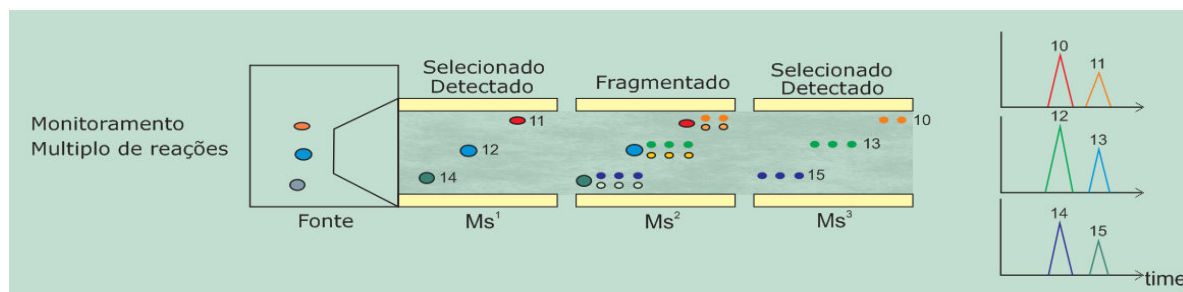


Figura 21. Representação das condições de operação no modo de monitoramento múltiplo de reações.

2.3.2.7. Parâmetros para obtenção da fragmentação, filtragem e focalização

(I) Potencial de desagrupamento (DP(V) – *de-clustering potential*): é a diferença de potencial entre a superfície *skimmer* e o orifício de entrada no MS (*orifice plate*). É empregado para minimizar os *clusters* de íons de solventes, que pudessem entrar no MS com a amostra. Neste processo, quando se aplicam altas energias (V) pode-se induzir a fragmentação precoce;

(II) Potencial da entrada (EP(V) – *entrance potential*): controla a diferença de potencial entre a voltagem do quadrupolo zero (Q0) e o *skimmer*. Isto ocorre em uma região de interface com a área sem vácuo e de alto vácuo. EP é a energia que focaliza todos os íon positivos ou negativos para dentro do MS e depende do modo (+ ou -) como foi configurado o equipamento;

(III) Potencial de entrada na célula (CEP(V) – *collision cell entrance potential*): é o potencial aplicado para encaminhar os íons *quasi-molecular* selecionados de Q1(MS¹) para dentro da cela de colisão Q2(MS²);

(IV) Energia de colisão (CE(eV) – *collision energy*): utilizada nos experimentos de fragmentação do íon-molecular (íon-precursor). É a energia necessária para acelerar o íon para que sofrerá colisão com o gás dentro da cela de colisão Q2(MS²);

(V) Potencial da saída da célula (CXP (V) – *collision cell exit potential*): é potencial de energia responsável por conduzir e focalizar os íons provenientes da cela de colisão através de Q3(MS³), até o detector.

(VI) Outros parâmetros relacionados:

- CAD gás: controla a pressão do gás na cela de colisão durante os experimentos de fragmentação (Figura 22);
- *Íon spray voltage* (IS): voltagem aplicada na ponta do capilar da fonte de ionização (Figura 22 – item A), onde a FM é eliminada e os analitos dessolvatados e ionizados;
- Gás 1 (GS1): é o gás (N₂) aplicado paralelamente à saída da agulha de entrada na fonte de ionização (Figura 22 – item D) participando da formação da nebulização (Figura 22 – item G) da FM e para auxiliar a dessolvatação;

- Gás 2 (GS2): é o gás (N_2) do turbo-aquecimento (*turbo heaters*) (Figura 22 – item E, F) que auxilia na dessolvatação da FM injetada na fonte de ionização;
- Temperatura (TEM): é a temperatura do *Turbospray*® (Figura 22 – item E) para dessolvatação da FM na fonte de ionização;
- *Curtain Gas* (CUR): é o fluxo de gás (N_2) que passa pela interface do *curtain gas* (Figura 22 – item B) com o *skimmer* e que sairá pelo orifício (*orifice plate*) evitando a entrada de solvente no MS¹.

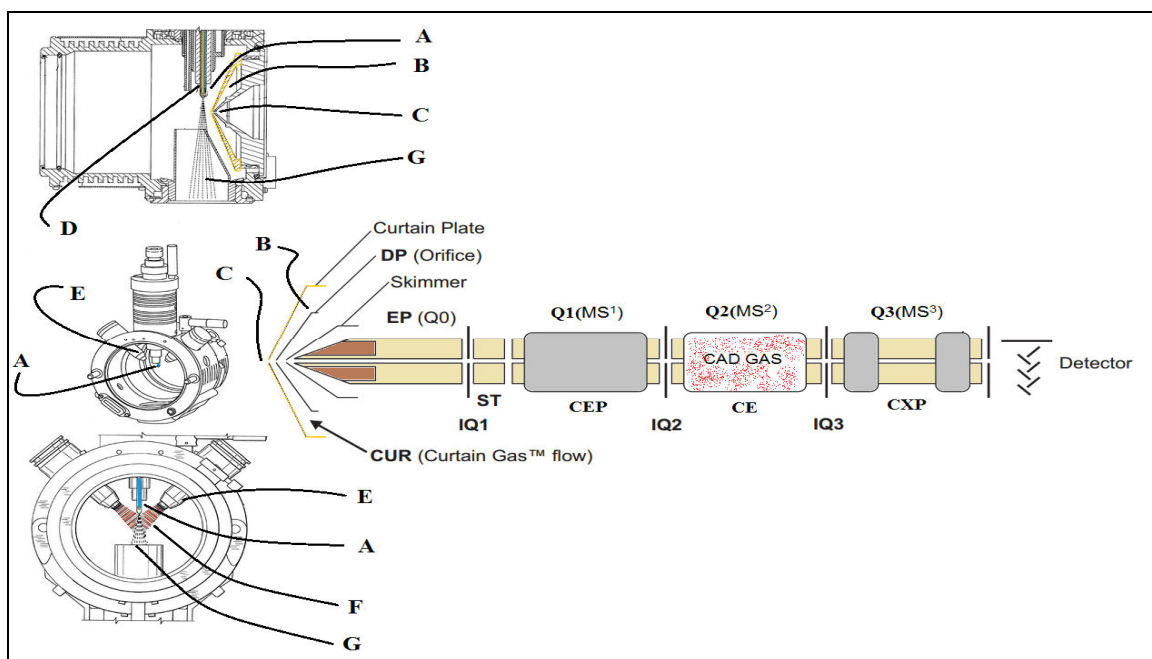


Figura 22. Esquema do compartimento da fonte de ionização destacada e acoplada ao MS. (A) ponta da agulha; (B) canal de passagem do *curtain gas*; (C) *orifice plate*; (D) saída de gás 1; (E) *turbospray*®; (F) saída do gás 2 (*turbo heaters*); (G) aerossol da nebulização.

Fonte: Adaptado de (ABSCIEX, 2011; COVEY; JAVAHERI; JONG, 2003).

2.3.2.6. Detector

Existem alguns tipos básicos de detectores, todos buscam apresentar algum mecanismo de ampliar o sinal emitido pelo analito. O multiplicador de elétrons (EM – *Electron Multiplier*) foi o modelo que compunha o equipamento empregado no presente estudo, neste detector, há uma multiplicadora de elétrons que tem a função de promover a amplificação do sinal emitido pelo íon do analito. Quando aquele

atinge o diodo ou eletrodo, gera uma emissão secundária pela remoção de elétrons que se dá em função da partícula primária incidente nas paredes do multiplicador. É um processo contínuo de choques com o dinodo ou eletrodo contínuo, dependendo do tipo de multiplicadora. (I) *discrete-dynodo*, composto de dinodos em sequência que conduzem e refletem os elétrons até o coletor (ALLEN, 1939) (Figura 23); (II) *continuos-dynodo*, onde os elétrons percorrem um tubo e multiplicando o sinal pelo choque direto dos elétrons com a parede considerada um eletrodo contínuo (Figura 24) chegando a ampliações na ordem de 10^4 a 10^8 (RICHTER et al., 2001).

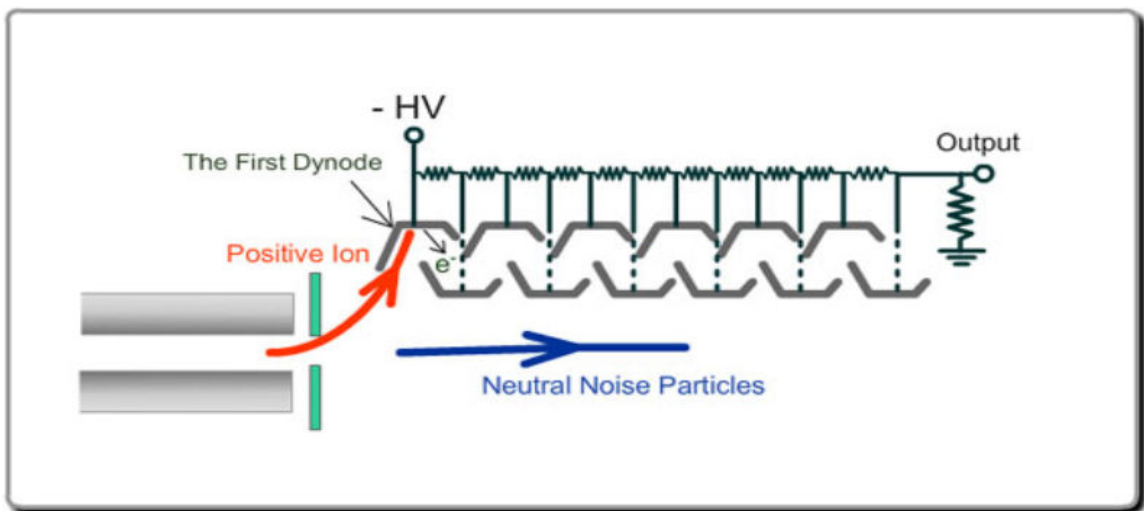


Figura 23. Estrutura da multiplicadora de elétrons do tipo não contínua.
Fonte: Shimadzu (2014).

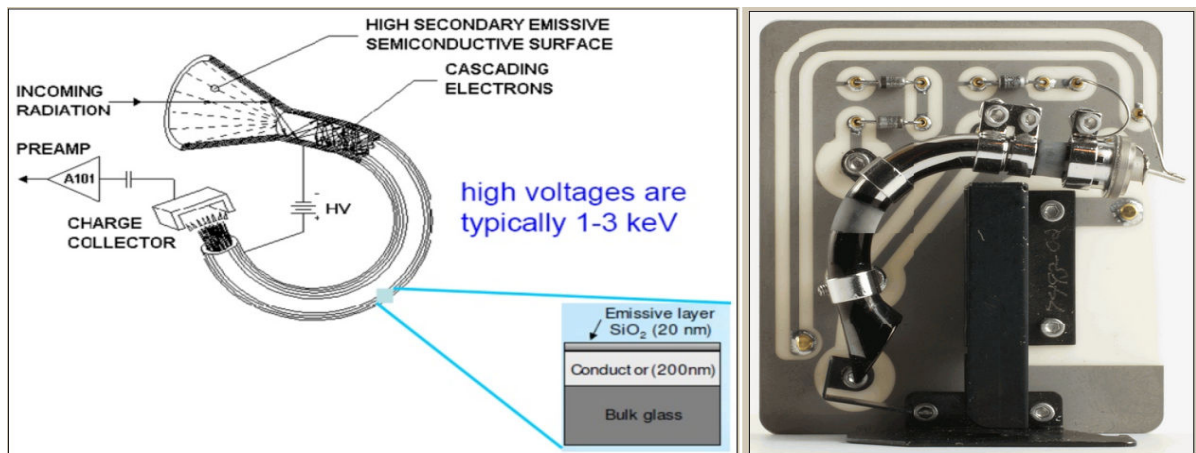


Figura 24. Esquema e foto de um multiplicador de elétrons do tipo contínuo.
Fonte: Lamps e Tubes (2014).

2.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

A principal função do método de extração é o de isolar a maior quantidade de compostos de interesse e com a menor concentração de interferentes da matriz. A extração é uma etapa da análise que é morosa, além de produzir resíduos indesejáveis. Diante disso, estudos se fazem para buscar técnicas que minimizem os referidos problemas e dificuldades. A determinação de agrotóxicos em alimentos deve empregar técnicas capazes de identificar múltiplos resíduos resultantes dos inúmeros ativos aplicados na sua produção. Associado a isso, os alimentos são considerados matrizes complexas e variam tanto em quantidade como em diversidade na sua composição, sendo os principais interferentes na análise a clorofila, lipídeos e esteróis. Serão descritas a seguir as técnicas existentes mais aplicadas recentemente e apropriadas para extração de agrotóxicos em alimentos. Assim, é de se esperar que estas atendam total, ou parcialmente à maioria das qualidades a seguir: rapidez, reprodutibilidade, fácil execução, robustez, boa recuperação, baixo custo operacional e de implantação, possibilidade de automação, redução de resíduos, extração de múltiplos compostos e eliminação de interferentes (HERCEGOVÁ; DÖMÖTÖROVÁ; MATISOVÁ, 2007). Recentemente foi desenvolvido uma técnica de extração chamada QuEChERS que é um método de extração de multirresíduos criado por Anastassiades e colab. (2003), cuja nomenclatura é o acrônimo dos termos em inglês: **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe** (Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto e Seguro). Este método, do tipo Dispersão de matriz em fase sólida (MSPD – *matrix solid-phase dispersion*), foi desenvolvido com o propósito de superar as vantagens atribuídas a outros métodos e para ser aplicado em amostras de alimentos contaminados com agrotóxicos analisados em cromatografia acoplada a um MS. A MSPD foi uma alternativa apresentada por Barker e colab. em 1989 (BARKER, 2000) para extração em matrizes sólida e semi-sólidas que combina diretamente a matriz a um dispersante adsorvente. A amostra é misturada com o adsorvente sólido colocado em uma coluna (ou seringa) e eluído com solvente (Figura 25).

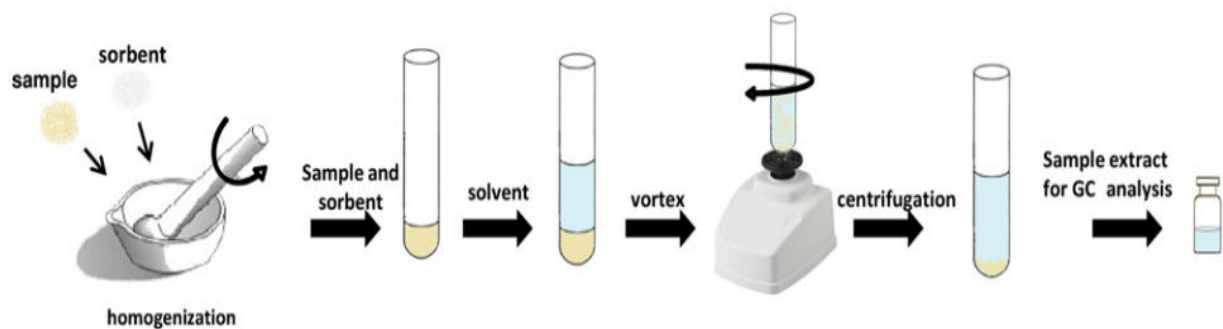


Figura 25. Ilustração da técnica de MSPD, empregando uma seringa.

Fonte: (SOUZA CALDAS et al., 2013).

O adsorvente tanto tem função de adsorver os interferentes da matriz, possuindo propriedade física capaz de romper e abrir a amostra para penetração do eluente, e é base para empacotamento da coluna (BARKER et al., 1989). É possível adicionar modificadores na mistura com o adsorvente para melhorar o particionamento, diminuir a extração interferentes ou evitar a degradação dos analitos. As fases sólidas, assim como os eluentes, seguem os princípios da polaridade do analito e da natureza da matriz (DÓREA; LOPES, 2004). Apresentam como características principais versatilidade, baixo consumo de solvente, baixo custo, simplicidade instrumental e necessita de apenas pequena quantidade de amostra. Apesar de inúmeras vantagens, em alguns casos, tem baixa recuperação, dificuldade em processar amostras com baixa umidade e na presença de gordura (VALSAMAKI et al., 2006).

2.4.1. QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*)

Em seu desenvolvimento, buscou-se adequá-lo às características dos contaminantes, como a presença em traços, multirresíduos e propriedades físico-químicas e da matriz quanto à sua complexidade, características físicas, composição química e sua susceptibilidade à extração de resíduos. Os métodos de extração devem disponibilizar os resíduos para análise e serem capazes de eliminar interferentes da matriz. QuEChERS foi criado de tal maneira que sua simplicidade dispensa automação ou grandes investimentos para sua implantação, comuns a métodos modernos como ASE e SFE. Pode ser executado sob condições mínimas (PRESTES et al., 2009) e é de fácil aprendizado (Figura 26).

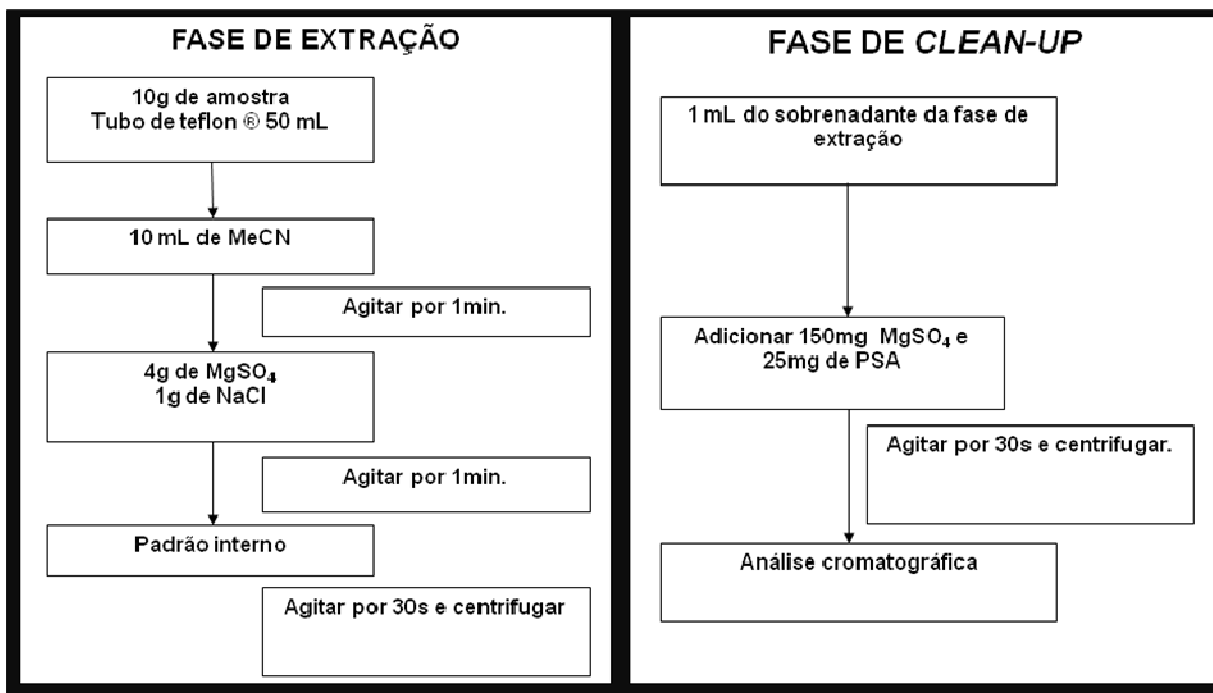


Figura 26. Fluxograma representando o método QuEChERS original.
 Fonte: Adaptado de (ANASTASSIADES et al., 2003)

Este método possui duas etapas (Figura 26), a da extração, que tem por finalidade extrair e recuperar a maior quantidade possível dos analitos presentes; e a de *clean-up*, que deve eliminar do extrato qualquer substância que não foi excluída na fase de extração para não causar interferências na análise ou prejudicar a vida útil da coluna cromatográfica. Na fase de extração, a quantidade e tipo de amostra, solvente, agente secante, promotor de efeito *salting out*, assim como pH, tampão e forma de agitação e centrifugação são fatores que podem interferir no processo de extração. Na fase de *clean-up*, dependendo dos interferentes característicos da matriz, como esteróis e clorofila, são escolhidos os agentes que eliminarão estes e outros interferentes, sem contudo prejudicar a recuperação e determinação dos analitos pela eliminação cruzada.

Em alguns casos, possibilita a redução da quantidade de amostra sem perda da detectabilidade a eficiência do método (ANASTASSIADES et al., 2003), além do mais, menores quantidades de amostras requerem menores quantidades de reagentes, em especial os solventes orgânicos. Amostras líquidas e semi-sólidas tendem a disponibilizar mais facilmente os resíduos para a fase líquida de extração, ao contrário das sólidas, que devem ser pulverizadas para promover a ruptura da

parede celular externa ou epidérmicas, normalmente mais rígidas (BUCKERIDGE et al., 2000) e de difícil penetração do solvente extrator. A pulverização excessiva destrói todos os compartimentos celulares internos (Figura 27) eliminando no processo analitos voláteis durante a maceração, como por exemplo, bitertanol, heptenofós, isofenfós e tolilfluanida. Esta conseqüência da maceração pode ser minimizada pelo congelamento da amostra (FUSSELL et al., 2002). Benfuracarbe, carbossulfano, tolilfluanida, probenazol, entre outros, apresentaram recuperações aceitáveis quando empregada a técnica de criogenia para eliminar a água no processo de extração por QuEChERS, diminuindo a perda destes analitos pela volatilização (LEE et al., 2011), assim como pela eliminação do MgSO₄ como agente extrator de água, onde sua hidratação resultaria em uma reação exotérmica (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003).

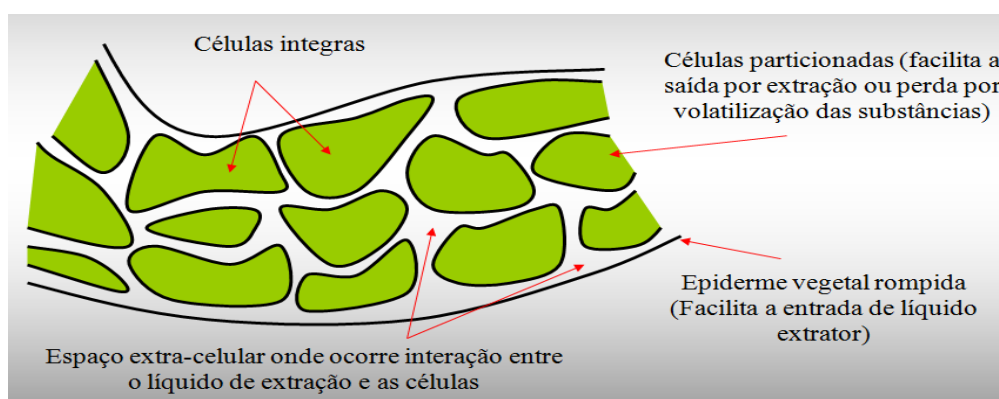


Figura 27. Ilustração de uma amostra vegetal pulverizada, com rompimento parcial das células onde poderiam mais intimamente se encontrar armazenados os analitos (resíduos de agrotóxicos).

Em estudos, visando à determinação de resíduos por QuEChERS, na determinação em frutas e verduras ainda se têm mantido a relação 1:1 como no método original (KIRCHNER et al., 2008; LEHOTAY et al., 2005a; LESUEUR et al., 2008). No entanto, este volume de 1:1 não é adequado a qualquer amostra, como as secas, sólidas e/ou de baixa densidade, pois necessitam de mais solvente para que toda a amostra entre em contato com ele. Na determinação de resíduos em grãos, a relação mais comum é de 1:2,2; 1:4; 1:5 (DÍEZ et al., 2006; NGUYEN et al., 2007; WALORCZYK, 2007); em óleos, 1:6; 1:2 (HERNANDO et al., 2007); em raízes, 1:2 (LIU et al., 2006) e em farinhas, 1:2 (PAYÁ et al., 2007). Com estas proporções e

com quantidades de amostra relativamente pequenas, em média entre 5 a 15g, confirma-se a sensibilidade e eficiência quanto à representatividade da amostra.

O solvente é o componente mais importante na extração e *clean-up*. É por meio dele que os analitos são transportados da matriz para o detector, por isso deve-se empregar aquele que apresente os seguintes aspectos: amplo espectro para extração dos analitos, possibilite a retirada de água de forma direta ou com auxílio de aditivos, seja eficiente na promoção da partição e *clean-up*, e possa ser empregado na injeção evitando troca de solventes (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004), garantindo a estabilidade e manutenção dos analitos. Entre os solventes mais indicados para extração de múltiplos resíduos em alimentos, destacam-se: acetato de etila (EtAc), acetona, acetonitrila (MeCN).

Buscando aferir a estabilidade de agrotóxicos em diferentes solventes, um estudo com 89 compostos em metanol (MeOH), etanol (EtOH), 2-propanol, acetato de etila (EtAc); hexano e acetona, indicaram que ocorre degradação de alguns compostos quando diluídos em acetona, MeOH e EtOH (NEMOTO et al., 1997). Em estocagem por quatro a oito semanas constatou-se a degradação de organofosforados diluídos em EtAc (HOLADOVA et al., 1998). Na avaliação de MeOH, EtAc e acetona, como agentes extratores de agrotóxicos, o MeOH conseguiu extrair maior número de agrotóxicos, em ampla faixa de polaridade, que os demais, além de menor extração de interferentes (LEHOTAY et al., 2001). Soluções dos agrotóxicos instáveis em MeOH (dicofol, clorotalonil, folpet, diclofluanida e captan), foram preparadas contendo concentrações de ácido acético na faixa de 0 a 0,1%, neste solvente. Após 24h verificou-se aumento na estabilidade de agrotóxicos com até 100% de estabilidade para todos na concentração máxima. Para efetiva extração com acetona, foi necessário a adição de solventes apolares para que ocorresse a separação entre as fases orgânica e aquosa, além disso, a adição de ácido em acetona não interferiu na melhora da estabilidade para alguns analitos (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004) como o que ocorreu com acetonitrila. Com o emprego de acetato de etila ocorreu a degradação dos analitos de caráter básico, sendo necessária a adição de hidróxido de sódio para minimizar estes efeitos. Diante dos resultados, reforçou-se a preferência pela MeOH como líquido extrator para análise em LC. No entanto, em função de sua grande expansão na câmara de

vaporização e interferências nos detectores termo iônicos, nem sempre é indicado para injeção direta em cromatógrafo a gás (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004), sendo necessário reconstituição do extrato, antes de sua injeção (LEHOTAY et al., 2005b).

A adição de aditivos na extração e *clean-up* tem garantido sucesso no método QuEChERS para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Aditivos com função secante têm a capacidade de remover água da solução. No método QuEChERS o uso de MgSO₄ apresentou grande eficiência, além de favorecer a extração de compostos apolares, pela elevação branda da temperatura do meio, resultante das reação de hidratação exotérmica, com aquecimento entre 40 a 50°C (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003). Outros aditivos estudados e presente neste método foram os sais promotores de *salting out*, (equivalente vernácula em português: relargagem) (USÓ et al., 2013), que favorecem a extração de compostos polares pela diminuição da solubilidade destes em meio aquoso, agora com maior força iônica e retentores de água que estaria presente na fase orgânica, além de evitar a emulsificação (GURE et al., 2014; NOCHE et al., 2011). Inicialmente, o aditivo de escolha para obter o efeito *salting out* era o NaCl, que foi substituído pelo CH₃COONa. Esta substituição, associada a adição de ácido acético 1%, evita a degradação de compostos sensíveis a pHs extremos. O efeito tampão de CH₃COONa mantém o meio em pH entre 4 e 5, sem adição de novas etapas ao procedimento de extração e com adição de compostos, naturalmente presentes em amostras de alimentos. Além da preservação de compostos sensíveis a meios muito ácidos, diminui a co-extração de gorduras e ácidos graxos (LEHOTAY et al., 2005b). Mais recentemente, foi proposto uma nova alternativa ao tamponamento do pH para uma faixa mais restrita (5 a 5,5) com emprego de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado (PAYÁ et al., 2007), sendo adotado no ano seguinte como método oficial da União Europeia pelo Comité Européen de Normatização (CEN, 2008).

A adição de um padrão de controle ou sub-rogado (PS) na fase de extração possibilita minimizar efeitos que resultem em erros propagados na extração, diminuindo as incertezas (CAVALCANTE et al., 2012). A escolha deste padrão exige que ele apresente as características preconizadas pelos procedimentos de validação, tais como possuir resposta cromatográfica similar aos analitos de

interesse, não existir previamente na amostra e não interagir com os aditivos de forma a prejudicar sua detectabilidade. Originalmente, o trifenilfosfato foi o padrão controle empregado no método QuEChERS por Anastassiades e colab. (2003).

Após adição da amostra, solvente, sais e padrão controle, é necessário promover a interação dos componentes presentes, tanto na fase de extração como na de *clean-up*, para efetiva expressão das funções a eles atribuídas. Todos os métodos de extração têm, em seu procedimento, algum momento onde é necessário o emprego de agitação para promoção desta interação. Alguns métodos necessitam de agitação mecanizada e por longos períodos de tempo. Os estudos com o método QuEChERS têm apresentado sucesso tanto com agitação manual quanto com agitação por vortex, seguido de centrifugação para eliminação dos sais e sorbente em suspensão e que permite a execução do procedimento dentro e fora do laboratório (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003).

Na fase de *clean-up* do QuEChERS, a adição do $MgSO_4$ é repetida, porém em proporção menores que 10% do que foi empregado na fase de extração, onde a presença de água é provável e muito mais elevada. Nesta fase, a função principal é a de eliminar os interferentes co-extraídos. Para isso, é necessário o emprego de aditivos que eliminem interferentes de acordo com as características da amostra, sem, contudo, diminuir a recuperação das moléculas de interesse. No método original foi empregado como agente de clean-up o PSA, uma mistura de aminas primárias e secundárias capaz de eliminar ácidos graxos e ácidos orgânicos, além disso, este sorbente tem sido bem sucedido na eliminação de açúcares, fenóis e pigmentos antocianinos comuns em amostras de vinhos (WANG; TELEPCHAK, 2013).

Modificações no método original associaram PSA e carbono grafitado (GCB - *Graphitized Carbon Black*) com intuito de eliminar, também, clorofila, comum em alimentos de origem vegetal, especialmente as hortaliças. Associando-se PSA a C18, pode-se incrementar a eliminação de gorduras em alimentos com teores superiores a 2% como leite, ovos, abacate e ração para animais (LEHOTAY et al., 2005b; WALORCZYK, 2007). Entre PSA, GCB e C18, a adição de PSA tem sido constante em todos os trabalhos com QuEChERS. A adição de C18 não tem interferido negativamente, mas a adição de GCB, por reter moléculas planares,

como os agrotóxicos tiabendazol, clorotalonil, hexaclobenzeno, triciclazol e terbufós, deve ser restrita a alimentos com alto teor de clorofila (HAN; SAPOZHNIKOVA; LEHOTAY, 2014; LEHOTAY et al., 2005a). A retenção dos referidos agrotóxicos dá-se via interação π - π , iônica e não polar ou hidrofóbica (CAVALIERE et al., 2006) e potencializada pela grande área superficial disponível de GCB.

2.4.1.1. QuEChERS na determinação de agrotóxicos em arroz

O método QuEChERS caracteriza-se por apresentar o maior avanço metodológico no preparo de amostras para análise de resíduos de agrotóxicos em alimento. A partir da sua criação em 2003 por Anastassiades e colaboradores, variações deste método foram estudadas para efetiva extração dos analitos em matrizes com diferentes características em função da sua composição (Figura 33B). Entre estas matrizes está a do arroz, na qual estudos buscaram formas de adaptar o emprego do QuEChERS na determinação de múltiplos resíduos de agrotóxicos. Na tabela 11 apresentam-se os principais trabalhos disponíveis nas bases de dados *Science Direct* e/ou *Pub Med*, onde a matriz de arroz foi alvo da determinação de resíduos com emprego dos princípios do método QuEChERS até 2014 (Tabela 10).

Nestes trabalhos, a extração ocorreu empregando de dois a 10g de amostra numa proporção que variou de 1:1 e 1:10, em relação ao solvente, que na maioria das vezes era MeCN puro ou diluído em água, mais recentemente acidificada. Na fase de separação, o $MgSO_4$ foi empregado em todos os métodos como agente secante e facilitador do particionamento. O agente promotor do *salting out* empregado foi o NaCl ou NaAc, mesmo que apenas com este último é que se poderia dispor de ação tamponante, responsável por proteger compostos lábeis em meios com pHs extremos. Na operação final desta fase é necessário agitar e centrifugar para posterior tratamento do sobrenadante na fase de *clean-up*. Findado a fase de extração, uma porção do sobrenadante (1 a 10mL) recebe $MgSO_4$ para eliminação da água restante. À porção adiciona-se ainda agente responsável pelo *clean-up* propriamente dito que, para amostras compostas por interferentes graxos ou pigmentos em baixas concentrações, como o arroz não pigmentado, o PSA parece ser o mais indicado. Em amostras ricas em compostos graxos, a adição de

C18 pode ser chave para o sucesso desta fase e em casos de amostras contendo clorofila, a adição de GCB não deve ser dispensada, mas pela possibilidade de reter resíduos de agrotóxicos de características planares pode prejudicar a recuperação de alguns analitos de interesse. Findada esta fase, a agitação é necessária para íntima interação dos componentes da fase com os interferentes, que são retidos e separados após centrifugação. O sobrenadante é, então, na maioria das vezes, diretamente injetado no cromatógrafo. O momento da adição do padrão controle varia de estudo para estudo, pois não possui uma tendência clara. Alguns autores preferem adicioná-lo, na forma de padrão sub-rogado (PS), já no início da extração submetendo o mesmo às interferências originadas em todo o procedimento; outros optam por adicioná-lo após a extração, na forma de padrão interno (PI), para suprimir as interferências do procedimento de análise instrumental. Finalmente, o número de compostos analisados não é fator determinante na forma e composição das fases de extração e *clean-up*.

Tabela 10. Estudos que empregaram QuEChERS e modificações na determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz (2003-2014).

N.	FASE DE EXTRAÇÃO					FASE DE CLEAN-UP			INST.	LIMITES mg KG ⁻¹		RECUPER.%	REF.
	AM	m:(V)	SOLVENTE	ADITIVOS	OPER.	SOBR.	ADITIVOS	OPER.		LD	LQ	DESvio MÁX.	
12	10g (PS)	1:(1)	10 mL MeCN	4 g MgSO ₄	Agit. manual	1mL	150 mg MgSO ₄	Agit. vortex 30s	CG MS/MS		0,5	60-113 s≤28	(LEANDRO; FUSSELL; KEELY, 2005)
				1 g NaCl	Centrif.		200 mg C18	Centrif.	PTV EI				
							50mg PSA						
97	10g	1: (1:1)	10 mL H ₂ O	4 g MgSO ₄	Agit. vortex 1min	1mL	150mg MgSO ₄	Agit. vortex 1min	CG/MS	6 a 90	20 a 297	70 a 120 s≤10	(LIU et al., 2006)
			10 mL MeCN	1 g NaCl	Cent.		50 mg PSA	Centrif.	EI SIM				
			Vortex 1 min										
109	10g	1: (1,2:1)	12 mL H ₂ O agit. 2x1min (intervalo de 15 min)	4 g MgSO ₄	Vortex 1min	2mL	300 mg MgSO ₄	Vortex 1min	CG/MS		2 a 100	80-115 s≤15	(NGUYEN et al., 2007)
			10 mL MeCN 0,5% HAc	1 g NaCl	Centrif.		50 mg PSA	Centrif. 1,8mL	EI SIM				
			Vortex 1min freezer 30 min (4 °C) (PS)				20 mg GCB	Reconst. com 0,5 mL MeCN					
13	10g	1: (0,5:1)	5 mL H ₂ O	4 g MgSO ₄	Agit. manual 1min	1mL	150mg MgSO ₄	Agit. manual 1min	LC MS/MS	0,5		45-104 s≤13,3%	(KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW; LEEPIPATPIBOON, 2008)
			10 mL MeCN	1 g NaCl	Centrif. 3800 rpm 1min		25 mg PSA	Centrif. 3800 rpm 1min	ESI MRM				
			Agit. manual 1min										
203	5g	1:(1:2)	5 mL H ₂ O	4 g MgSO ₄	Agit. vortex 1min	2mL	300mg MgSO ₄	Agit. vortex 1min	GC-MS		2 a 50	75-115 s≤17%	(NGUYEN et al., 2008)
			10 mL MeCN 0,5% HAc	1 g NaCl	Centrif. 4000 rpm 5min		50 mg PSA	Centrif. 4000 rpm 5min	SIM				
			Agit. manual 2x1 min com intervalo 15min descansando 30 min (até 4 °C) (PS)				20 mg GCB	Reconst. MeOH e TPP agitação vortex					

Nota: AM: amostra; m:(v): m=massa de amostra e (v) volume dos solventes empregados; **OPER:** operação; **SOBR:** sobrenadante; **INST:** instrumental; **(PS)** padrão sub-rogado; **(PI)** padrão interno; HAc: ácido acético; AcNa: Acetado de sódio; Centrif.: centrifugação; Agit.: agitação; Reconst.: reconstitucionamento. **Fonte:** (ELSEVIER, 2014; PUBMED, 2014)

Tabela 10. Estudos que empregaram QuEChERS e modificações na determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz (2003-2014).

N.	FASE DE EXTRAÇÃO					FASE DE CLEAN-UP			INST.	LIMITES mg KG ⁻¹		RECUPER.%	REF.
	AM	m:(V)	SOLVENTE	ADITIVOS	OPER.	SOBR.	ADITIVOS	OPER.		LD	LQ		
98	10g	1:(1,4)	14 mL MeCN (HAc 1%) (PS)	6 g MgSO ₄	Agit. manual 4min	6mL	900mg MgSO ₄	Agit. manual	LC MS/MS	10	70-120% s≤20%	(CHUNG; CHAN, 2010)	
				4 g NaCl									Centrif. 8500 rpm 5min
				1,5g NaAc	filtrada e adicionado MeCN ácido fórmico 5%		MRM						
1	5g	1:(1:3)	5mL H ₂ O agitado 1min	4 g MgSO ₄	Agit. vortex 1min	2mL	150mg MgSO ₄	agitação vortex 5min	LC MS/MS	20	77,9-93,6 s≤15%	(LI et al., 2010)	
			15mL MeCN	1 g NaCl	Centrif. 4000 rpm 5min		50 mg PSA	Centrif. 8000 rpm 5min	MRM				
180	2,5 a 5g	1:(6:4) 1:(3:2)	15mL H ₂ O	4 g MgSO ₄	Agit. vortex 1min	1mL	150mg MgSO ₄	Agit. vortex 30s	CG TOF/MS	70-120 s≤20%	(MASTOVSKA et al., 2010)		
			10mL MeCN (PS)				1 g NaCl					Centrif. 3000 rpm 10min	150 mg PSA
				Agit. vortex 1h	50 mg C18								
1	5g	1:(3)	15mL MeCN	4 g MgSO ₄	Agit. manual 1min	10mL	Seco	Reconst. com acetato de etila	CG-ECD	10	82,9-84,8% s≤2,7%	(SHI et al., 2010)	
			1 g NaCl	Centrif. 2000 rpm 5min									
1	20g	1: (0,5:1)	10 mL H ₂ O	5 g MgSO ₄				Cartucho Pest-Carb/PSA	CG-MS/MS	0,9	87,9-98,8 s≤1,6	(LI et al., 2011)	
				1 g NaCl				20 mL eluente secagem					
			20 mL MeCN	cartucho C18	Reconst. com 1mL acetona / hexano (1:1)			EI MRM					
			Vortex 1 min	10mL MeCN	filtragem								

Nota: AM: amostra; m:(v): m=massa de amostra e (v) volume dos solventes empregados; OPER.: operação; SOBR.: sobrenadante; INST.: instrumental; (PS) padrão sub-rogado; (PI) padrão interno; HAc: ácido acético; AcNa: Acetado de sódio; Centrif.: centrifugação; Agit.: agitação; Reconst.: reconstitucionamento. Fonte: (ELSEVIER, 2014; PUBMED, 2014)

Tabela 10. Estudos que empregaram QuEChERS e modificações na determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz (2003-2014).

N.	FASE DE EXTRAÇÃO					FASE DE CLEAN-UP			INST.	LIMITES mg KG ⁻¹		RECUPER.%	REF.
	AM	m:(V)	SOLVENTE	ADITIVOS	OPER.	SOBR.	ADITIVOS	OPER.		LD	LQ	DESVIO MÁX.	
42	5 - 7,5g (PS)	1:(3:3) 1:(2:2)	15 mL H ₂ O	7 g MgSO ₄	Agit. manual 1min	5mL	1g MgSO ₄	agit. manual 20s	LC QqQ/MS		10	66-110,6 s≤20%	(PAREJA et al., 2011b)
			15 mL MeCN (HAc 1%)	1,8 g NaAc	Centrif. 3700 rpm 5min			Centrif. 3700 rpm 5min					
								seco e Reconst. com MeCN					
151	5g (PS)	1:(3:3)	15 mL H ₂ O (HAc 1%)	6 g MgSO ₄	Agit. manual 45s	6mL	900mg MgSO ₄	agit. manual 45s	LC MS/MS		5 a 500	81-110%	(WANG; CHOW; CHEUNG, 2011)
							Centrifug. 3000 rpm 3min						
			15 mL MeCN	1,5 g NaAc	Centrif. 3000 rpm 3min		300 mg PSA	3mL sobr. Reconst. com metanol	ESI MRM				
							150 mg C18	Agit. com vortex 30s					
38	7,5g	1:(3:2)	22mL H ₂ O	6 g MgSO ₄	Agit. manual 1 min	8 mL	1,2g MgSO ₄	Agit. vortex 30s centrif. 3250 rpm 2min (PI)	LC- MS/MS				(KWON; LEHOTAY; GEIS- ASTEGGIANTE, 2012)
			15mL MeCN	1,5 g NaCl	Centrif. 10 min 3250rpm		1,2g PSA						
			Agit. 1 h				0,4g C18						
							0,006g GCB						
15	5g	1:(2:3)	10 mL H ₂ O	4 g MgSO ₄	Agit. manual 1min (PS)	10mL	MgSO ₄	Extrator axial automático	LC- MS/MS CG MS		5- 250	30-124% s≤20%	(PAREJA et al., 2012)
			15mL MeCN	1,5 g NaCl	Centrif.		C18						
							PSA						

Nota: AM: amostra; m:(v): m=massa de amostra e (v) volume dos solventes empregados; **OPER:** operação; **SOBR:** sobrenadante; **INST:** instrumental; **(PS)** padrão sub-rogado; **(PI)** padrão interno; HAc: ácido acético; AcNa: Acetado de sódio; Centrif.: centrifugação; Agit.: agitação; Reconst.: reconstitucionamento. **Fonte:** (ELSEVIER, 2014; PUBMED, 2014)

Tabela 10. Estudos que empregaram QuEChERS e modificações na determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz (2003-2014).

N.	FASE DE EXTRAÇÃO					FASE DE CLEAN-UP			INST.	LIMITES mg KG ⁻¹		RECUPER.%	REF.	
	AM	m:(V)	SOLVENTE	ADITIVOS	OPER.	SOBR.	ADITIVOS	OPER.		LD	LQ			DESvio MÁX.
124	5g	1:(2:2)	10 mL H ₂ O	4 g MgSO ₄	Agit. manual 1min	5mL	750 mg MgSO ₄	Agit. vortex 20s	CG MS/MS	1,2 a 26,3	70-122,7% s≤20%	(HOU et al., 2013b)		
			10mL MeCN (PI)		Centrif. 4000 rpm			357 mg PSA					Centrif. 4000 rpm -10 °C	
			Refrig. 30 min.	1 g NaCl	-10°C		adicionou-se 100µL HAc 1%							
39	5g	1:(1:3)	5 mL H ₂ O	5g MgSO ₄	Agit. manual 1 min (PS)	2mL		2mL H ₂ O Ac. fórmico 0,1% 5mM Acetato Amônia	LC-MS/MS ESI	0,2 a 29,7	70-120% s≤20%	(ZHANG et al., 2013)		
			15mL MeOH		Centrif. 8000 rpm 3min								1g NaCl	
			(1% HAc)											
1	2g	1: (2,5:2,5)	5 mL H ₂ O	2g NaCl	agit. mecân. 1h	1mL	50mg PSA	Agit. vortex 30s Centrif. 14000 rpm 3min	LC-MS/MS	2	74,7-108% s≤13%	(ZHANG et al., 2013)		
			5mL MeCN		Centrif. 3800 rpm 5min									
16	10g	1: (1:1)	10 mL H ₂ O	6 g MgSO ₄	Agit. manual	1,5mL	150mg MgSO ₄	Agit. manual 20s	CG-MS	1 a 5	70-106% s≤16%	(ESCARRONE et al., 2014)		
			10mL MeCN (1% HAc)		Centrif. 5000 rpm 1 min			50mg PSA					Centrif. 5000 rpm 5min (PI)	
			Agit. manual 1 min	1,5g AcNa										
14	10g (PS)	1: (1:1)	10 mL H ₂ O (1% Ac fórmico)	4 g MgSO ₄	Agit. manual 1min	8mL	1,2g MgSO ₄	Agit. manual 1min	LC-MS/MS	0,5 a 15	70-98% s≤7%	(KOESUKWIWAT; SANGUANKAEW; LEEPIPATPIBOON, 2014)		
			10mL MeCN					1g AcNa					Centrifug. 3400 rpm 5 min	0,25g C18
				1g tri-Na (citrato)	0,25g Alumina									
							1g di-Na (citrato)							
agitação manual 1 h														

Nota: AM: amostra; m:(v): m=massa de amostra e (v) volume dos solventes empregados; **OPER:** operação; **SOBR:** sobrenadante; **INST:** instrumental; **(PS)** padrão sub-rogado; **(PI)** padrão interno; HAc: ácido acético; AcNa: Acetado de sódio; Centrif.: centrifugação; Agit.: agitação; Reconst.: reconstitucionamento. **Fonte:** (ELSEVIER, 2014; PUBMED, 2014)

2.5. PONTOS CRÍTICOS NA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

2.5.1. Efeito da matriz

Este efeito é, sem dúvida, um dos maiores problemas na determinação de múltiplos resíduos em alimentos. Deve ser minimizado durante a extração, para obter os melhores resultados para determinação, já que a fase instrumental analítica se encontra em estágio avançado no estado da arte, quando empregado a MS.

Dependendo do tipo de cromatografia empregada, interferentes da matriz podem gerar problemas diferentes. Em CG interferentes podem sofrer degradação ou serem retidos no injetor, coluna ou detector, além de obstruírem os sítios ativos que deveriam ser ocupados pelos analitos, diminuindo a detectabilidade. O emprego de agentes protetores pode ser uma alternativa, porém não existe efetividade para todos os casos (ANASTASSIADES et al., 2003; ČAJKA et al., 2005). Na LC os efeitos da matriz estão mais diretamente relacionados à FI, onde componentes da matriz podem interferir na formação do *spray* ou na ionização (KING et al., 2000).

Matrizes ricas em gorduras (HUERTA et al., 2013) necessitam de maior número de etapas de limpeza e emprego de técnicas de extração trabalhosas, que outras, o que dificulta análises de rotina, pois a extração de compostos de elevada massa molar como piretroides e de características apolares possuem alta afinidade por interferentes graxos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; MORENO et al., 2006). Para reduzir o efeito da matriz, além da execução de método de extração apropriado, pode-se empregar a calibração por superposição de matriz (*matrix-matched*) com adição de padrão interno, principalmente com marcadores isotópicos. Por superposição de matriz, a curva analítica é obtida pela adição dos padrões em uma matriz real e isenta de contaminantes e o padrão interno normaliza possíveis interferências (KWON; LEHOTAY; GEIS-ASTEGGIANTE, 2012).

2.5.2. Intrínsecos a espectrometria de massas

2.5.2.1. Compostos interferentes

Apesar da seletividade da MS, a co-eluição de compostos interferentes pode prejudicar o sinal do analito em equipamentos que não empregam MS no modo tandem, o que impossibilita a eliminação de sinais isobáricos de íons moleculares originados de compostos diferentes (THURMAN et al., 2013) previstos ou não.

2.5.2.2. Supressão de íons

Ocorre principalmente no *spray* da FI antes da dessolvatação, onde interferentes impedem desprendimento dos analitos da fase gasosa, reduzindo a focalização até interior do MS (KING et al., 2000). Modificações nas propriedades superficiais, interfaciais da gotícula e formação de micelas, por interferentes com propriedades surfactantes, podem impedir tal desprendimento (CECH; ENKE, 2000). Interferentes com maior afinidade por prótons competem pela ionização (KEBARLE; TANG, 1993). A origem dos interferentes pode ser endógena como proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, eletrólitos, pigmentos, lipídeos, etc (MÜLLER et al., 2002), ou exógena, oriundos de contaminações no processo de análise como polímeros, ftalatos, alquifenóis, etc (MEI et al., 2003). Estes fatores que afetam a formação dos íons podem prejudicar a detectabilidade, repetibilidade e na seletividade do método (CHICO; VAN HOLTHOON; ZUIDEMA, 2012; KRUIVE; LEITO; HERODES, 2009).

2.5.2.3. Formação de adutos e espécies iônicas

Subprodutos formados na ionização (adutos) e espécies iônicas (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , HCOO^- e CH_3COO^-), oriundas da FM, provenientes dos modificadores, podem se tornar interferentes (NÚÑEZ; MOYANO; GALCERAN, 2005). Adutos são moléculas protonadas com espécies diferentes de H^+ . Esta protonação, quando não prevista ou induzida pela adição de modificadores específicos, pode ser originada da matriz ou de solventes contaminados, formando picos de base que elevam o ruído.

2.6. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DE TÉCNICA PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS EM ALIMENTOS

2.6.1. Seletividade

A seletividade é o primeiro parâmetro avaliado no desenvolvimento de um método analítico. É monitorada em todas as etapas da validação e aplicação, pois amostras e padrões podem sofrer degradação que geram compostos que não foram observados inicialmente e podem co-eluir com a substância de interesse.

A seletividade permite que um analito seja avaliado de forma inequívoca, mesmo na presença de componentes que interfeririam na sua determinação. Métodos seletivos garantem que o sinal obtido pela detecção seja específico da espécie que se está a determinar (RIBANI et al., 2004).

2.6.2. Curva analítica e linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração (INMETRO, 2003). A proporcionalidade pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. São necessários, dependendo das normas de referência, pelo menos, de cinco a sete pontos que representem diferentes concentrações de soluções padrão, que não inclua zero, para definir adequadamente a relação entre concentração e a resposta (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Esta equação permite estimar os coeficientes angular (a), linear (b), e o de correlação R^2 , sendo desejável que estes assumam valores próximos de 1, 0 e 1, respectivamente. Tais valores evidenciam que a resposta é proporcional à concentração do analito de acordo com os pontos experimentais executados com menor incerteza (CHUI; ZUCCHINI, 2001). A Anvisa (ANVISA, 2003) recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e o Inmetro (INMETRO, 2003, 2011) um valor acima de 0,90. A equação da reta $y = ax + b$ só é válida no intervalo que a gerou, ou seja, a faixa linear dinâmica. A lupac especifica que os pontos da curva analítica devem ser igualmente espaçados sobre

a faixa de concentração de interesse e que esta faixa compreenda 0 a 150% ou 50 a 150% do valor esperado (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O ICH (*International Conference on Harmonisation*) recomenda uma variação de $\pm 20\%$ do valor declarado ou esperado (ICH, 1995) especificando em comum com a Anvisa um mínimo de cinco níveis de concentração, diferentemente da Iupac (IUPAC, 2002) que recomenda seis ou mais níveis de concentração. A quantificação do composto de interesse em validação pode ser obtida por meio dos seguintes métodos: calibração externa; calibração interna; superposição de matriz e adição de padrão.

2.6.2.1. Calibração Externa

Neste método é feita uma correlação direta entre a concentração do analito dissolvido em um solvente puro e a área do pico cromatográfico obtido após sua análise, que em cromatografia é expresso pela área do pico. Por esta correlação é possível construir um gráfico e obter sua respectiva equação. Sendo que pelo pico obtido da análise de uma amostra real pode-se determinar a concentração do analito nela contido. No entanto, pela complexidade de amostras como as de alimentos e biológicas, os analitos determinados nestes meios podem sofrer interferências que não ocorrem quando estão dissolvidos em solventes puros levando a determinações equivocadas quanto a sua real concentração (GIRAUDEAU et al., 2013).

2.6.2.2. Calibração Interna

Na calibração interna, faz-se, após a análise, uma correlação entre a concentração do analito dissolvido em um solvente puro e a razão área do pico cromatográfico correspondente ao analito pela área do pico do composto denominado padrão interno. Este padrão interno, adicionado na mesma concentração em todos os pontos da curva, deve ser similar à substância a ser quantificada, possuir tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra (CUADROS-RODRÍGUES et al., 2001). Este método é empregado para compensar modificações experimentais e incertezas do método em função da técnica instrumental.

2.6.2.3. Superposição de matriz (*matrix-matched*)

O método de superposição de matriz é uma variação do método de calibração externa, onde diferentes concentrações de soluções padrão são adicionadas a uma matriz pura real ou representativa, a fim de compensar o efeito de matriz, comuns na determinação de compostos em traços em matrizes complexas.

2.6.2.4. Adição de padrão

A adição de padrão é correlata ao da superposição de matriz. Este método é executado quando existe um efeito de matriz conhecido e não se dispõe de uma matriz pura. Assim, adicionam-se diferentes concentrações do analito na matriz real para obtenção da curva analítica, quando é feita uma correlação direta entre a concentração do analito dissolvido na matriz (amostra) e a área do pico obtido após sua análise. O procedimento de adição padrão é considerado demorado e pouco adequado para estudos que envolvem um grande número de amostras. No entanto, é extremamente preciso, pois os analitos alvo estão em um meio real que possibilita respostas reais durante a análise (GIRAUDEAU et al., 2013).

2.6.3. Sensibilidade

A sensibilidade é definida pela distinção confiável de duas concentrações próximas. Matematicamente esta propriedade é representada pelo coeficiente angular da equação da reta da curva analítica e obtido pela equação:

$a = \Delta y / \Delta x$; onde, a: coeficiente angular; Δy : variação de y; Δx : variação de x. Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação na área do pico cromatográfico do analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico em gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida e causada por incremento na concentração ou quantidade do analito. Apesar da sensibilidade do método ser empregado na determinação dos limites de quantificação e detecção (FEINBERG & RAGUÈNÈS,

1999; CURRIE (IUPAC), 1999), baixos limites de quantificação não qualificam se o método é ou não mais sensível (AMARANTE JR et al., 2001).

2.6.4. Exatidão

A exatidão de um método qualifica-o quanto a sua capacidade de concordância percentual entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo método (ISO, 1994) acrescido dos intervalos de confiança (USP, 2000). Para definir a exatidão de um método sugere-se a aplicação de, pelo menos, um dos seguintes processos: (I) estudo comparativo com material de referência certificado (MRC); (II) comparação com um método de referência; (III) estudos inter-laboratoriais; e (IV) ensaios de recuperação (GONZÁLEZ; HERRADOR; ASUERO, 1999). É consenso que o emprego de MRC é a forma preferida de controle por se tratar de padrões certificados. Nele se avalia um número suficiente de replicatas do material e comparam-se os resultados obtidos com o valor certificado. Entretanto, o alto custo do MRC e até mesmo a inexistência de muitos materiais certificados de matrizes e analitos impossibilitam seu emprego (MESLEY; POCKLINGTON; WALKER, 1991). A comparação entre os valores obtidos pelo método proposto com os valores obtidos para as mesmas amostras com um método já validado possibilita a utilização das diferenças encontradas em cada amostra e compara-se com o valor desejado. Estabelece-se, então, o nível de confiança de acordo com o intervalo de concentração (AMARANTE JR et al., 2001). Apesar de eficiente, este método pode não ser possível de ser empregado se não houver um método similar validado. Avaliações inter-laboratoriais implicam na aceitação de outros laboratórios em desenvolver determinado método e devem ser conduzidas com o mínimo de cinco participantes (ISO, 1994). Neste processo de validação usa-se a análise de variância (ANOVA), para determinar diferenças estatísticas significativas entre os valores obtidos pelos laboratórios envolvidos (GONZÁLEZ; HERRADOR; ASUERO, 1999). O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito recuperado no processo em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual e

é inerente ao processo (BRITO et al., 2003a). A perda da substância em virtude da baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra, entre outros, resultam em erros sistemáticos ou determinado (SKOOG et al., 2007). Assim é que o estudo da recuperação é o processo mais empregado na avaliação de exatidão, pois envolve o emprego de padrões de relativa facilidade de aquisição, assim como a execução dos testes, dependem apenas do trabalho e do método executados pelo laboratório onde estão sendo realizados os estudos.

2.6.4.1. Ensaio de Recuperação

O ensaio de recuperação define a capacidade de um método em determinar uma quantidade conhecida do analito adicionado. Quando adicionado a uma matriz, é possível avaliar também a interferência dela na análise (WALTON; ACVP, 2001).

A recuperação é estimada considerando-se que análises de elementos majoritários costumam apresentar erros sistemáticos relativos muito inferiores àqueles obtidos de analitos em concentrações muito pequenas (AOAC, 1993). O cálculo de recuperação consiste na adição, de pelo menos, três diferentes concentrações de padrão do analito à amostra (fortificação) para determinação da sua concentração. Desta forma, é possível calcular a quantidade determinada pelo método e estabelecer o grau de recuperação percentual (INMETRO, 2011), usando a fórmula:

$$\text{Rec\%} = [C_A - C_R] \times 100 / C_R$$
; onde, Rec%= recuperação percentual; C_A = concentração amostra; C_R =concentração real.

2.6.5. Precisão

A definição da precisão de um método permite avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas, onde quanto maior a proximidade dos resultados maior a precisão. Esta precisão pode ser expresso pelo estimativa do desvio padrão (DPR) e/ou coeficiente de variação (RSD%), pois é

normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse (INMETRO, 2007) e pode definir repetibilidade e reprodutibilidade. Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD de até 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas são aceitos RSD de até 20%, dependendo da concentração do analito na amostra, segundo AOAC (AOAC, 1993), ou ainda, segundo recomendações mais recentes da União Europeia para métodos que visem determinar um único resíduo e, principalmente, se forem utilizados padrões internos, marcados com isótopos estáveis, é aceitável precisão inter-laboratorial com RSD de até 25%. Ainda, dependendo da complexidade, e em métodos que visem a determinação de múltiplos resíduos, RSD próximos de 30% podem ser considerados em amostras onde a determinação não se aproxime do LMR permitido (EC (SANCO/12571/2013), 2013). O Inmetro (INMETRO, 2003) recomenda no mínimo sete repetições de uma mesma concentração enquanto que a ICH (ICH, 1995) e a Anvisa (ANVISA, 2003) sugerem no mínimo seis determinações ou três níveis de concentração em triplicata.

2.6.5.1. Precisão Instrumental

Representa a precisão intra-amostra que busca verificar a concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra com um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições, mesmo local e com repetições executadas em curto intervalo de tempo em um mesmo equipamento. A precisão instrumental pode ser expressa pela estimativa do desvio padrão (RSD%) e indica se existe a possibilidade de algum erro de caráter instrumental fora da faixa de precisão.

2.6.5.2. Repetibilidade

Representa a precisão intra-corrída e envolve várias medições da mesma amostra e sob as mesmas condições da precisão instrumental, porém em diferentes preparações com a mesma concentração. Pode ser expressa pela estimativa do

estimativa do desvio padrão (RSD%) e indica se o método pode apresentar erros fora da faixa de precisão (ANVISA, 2003).

2.6.5.3. Inter-ensaio

É a precisão conhecida por intermediária ou intra-laboratorial. O teste pode ser executado em dias, analistas e equipamentos diferentes, ou outras diferenças no mesmo laboratório. Assim, como os ensaios de precisão anteriores, pode ser expressa pela estimativa do desvio padrão (RSD%) e indica a variabilidade dos resultados em um único laboratório (RIBANI et al., 2004).

2.6.5.4. Reprodutibilidade

Representa a consagração de um método em termos de precisão e facilita torná-lo um método de referência. Neste tipo de ensaio, medições de uma mesma amostra são executadas em colaboração entre laboratórios. Nesta fase é muito comum encontrar desacordo nos métodos analíticos. A IUPAC não aconselha tirar conclusões com menos de cinco laboratórios e recomenda até oito laboratórios (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Além disso, tais laboratórios devem possuir competência e habilidades similares àqueles que usarão o método em rotina. A documentação que apoia os estudos de precisão da reprodutibilidade deve incluir estimativa do desvio padrão absoluto, estimativa do desvio padrão e intervalo de confiança (RIBANI et al., 2004).

2.6.6. Limite de detecção e limite de quantificação

2.6.6.1. Limite de detecção (LD)

LD representa a menor concentração do analito que pode ser detectada pelo método. O LD pode ser definido pela: relação sinal/ruído; parâmetros da curva; métodos estatísticos; e por desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular.

Em métodos analíticos instrumentais que exibem linha de base, o sinal/ruído pode ser uma forma de determinar o LD. Neste caso, a determinação da relação sinal-ruído é feita comparando a medição dos sinais das amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção (RIBANI et al., 2004).

Empregando parâmetros da curva, esta determinação é realizada também por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado. A razão de s/S multiplicado por três é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção.

$LD = (3 \times s)/S$; onde: s = desvio padrão da resposta; e S = coeficiente angular da equação da reta da curva de calibração (ICH, 1996). Estatisticamente, utiliza-se o teste de hipótese para estimar o LD com valores obtidos de várias medidas do branco pela seguinte equação: $LD = (2 \times t_{n,95\%} \times S_B)/S$; onde: $t_{n,95\%}$ = valor tabelado em função de n (número de análises); S_B = desvio-padrão do branco; S = coeficiente angular da equação da reta da curva de calibração (AMARANTE JR et al., 2001). Por meio de dados obtidos em experimentos de recuperação, o LD pode ser estimado pela substituição de S_b por S_{com} na fórmula, onde se estima estatisticamente o LD. Para obter S_{com} deve-se empregar a seguinte fórmula:

$S_{com}^2 = [(m-1)S_A^2 + (n-1)S_B^2]/m+n-2$; onde: m = o número de determinações do menor nível de fortificação; n = o número de determinações do branco; S_A = desvio-padrão da amostra do menor nível de fortificação; S_B = desvio-padrão do branco (BRITO et al., 2003b; THIER; ZEUMER, 1987).

2.6.6.2. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação estabelece a menor concentração possível de ser quantificada de um analito em uma determinada amostra por um método específico, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais descritas (HUBER; GMBH, 1999; ICH, 1996). Da mesma forma e condições para o LD, o LQ pode ser estimado pelo sinal-ruído, porém, numa relação 10:1 sinal:ruído (RIBANI et al., 2004), assim, empregando-se os parâmetros da curva onde multiplica por 10 a razão s/S ; sendo s = desvio padrão da resposta; e S = coeficiente angular da equação da reta da curva de calibração (ICH, 1996). Por métodos estatísticos, o LQ pode ser estabelecido empiricamente. O menor nível de fortificação onde se obtenha recuperação entre 70 e 100% com RSD% menor ou igual a 20 o LQ pode ser estabelecido (BRITO et al., 2003b; THIER; ZEUMER, 1987).

2.7. DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

Diante da necessidade do desenvolvimento de métodos para determinação de resíduos em alimentos e em função do desafio de empregá-los em matrizes complexas, determiná-los em concentrações em traços, além da necessidade de métodos rápidos, seletivos e sensíveis a múltiplos compostos simultaneamente, grupos de pesquisa têm buscado desenvolver metodologias que possam ser aplicadas a esta situação. Estes estudos apresentam possibilidades para a aplicação de metodologia instrumental que associa a cromatografia à MS e alia a preparação de amostras por QuEChERS, que viabilizam a determinação de resíduos de agrotóxicos em arroz. Portanto, faz-se necessário conhecer os avanços e soluções obtidos nestes trabalhos, para obtenção de resultados adequados em nossos estudos.

Durden (2007) utilizou a LC acoplada à espectrometria em tandem (LC-MS/MS) (QqQ) para determinar resíduos de sete nematicidas no leite. Os modos de ionização por eletrospray positivo (ESI(+)) e negativo (ESI(-)) foram utilizados, pois alguns compostos analisados contêm apenas átomos de C, H e O, ionizando, preferencialmente, no modo ESI(-), enquanto que outros possuem átomos de nitrogênio, de maneira que são ionizados, preferencialmente, no modo positivo. Constataram que compostos apresentaram sinais mais intensos quando utilizado tampão ácido fórmico/formiato de amônio e acetonitrila como FM para ionização no modo positivo, num intervalo linear de 0,5 a 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Entretanto, os sinais obtidos no modo positivo foram mais largos que os obtidos no modo negativo e, conseqüentemente, levaram à obtenção de LD menores e respostas com baixa linearidade (DURDEN, 2007).

Picó e colab. (2007) utilizaram a LC-ESI(+)-MS/MS (QToF) para a determinação de resíduos de carbendazim, imazalil e etoxiquim em peras. Comparando técnicas de detecção por MS e MS/MS empregando imazalil como referência, não foram encontradas diferenças significativas entre as técnicas, nas necessidades e condições existentes e testadas (PICÓ; KOZMUTZA, 2007).

Payá e colab. (2007) realizaram a determinação de 42 resíduos de agrotóxicos em alimentos, bebidas e frutas, empregando LC-ESI(+)-MS/MS_

QuERChERS (Qtrap). Os ensaios de recuperação foram realizados nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ tendo sido obtidas recuperações entre 70% e 110% com CV inferiores a 10%. Além disso, foi constatado que amostras do mesmo tipo apresentam diferentes efeitos de matriz, em função da maturação da amostra, assim como da sua origem (PAYÁ et al., 2007).

Pico & Kozmutza (2007) utilizaram a LC-ESI(+)-MS/MS (QqQ) para determinar 12 resíduos incluindo aldicarbe, demetom-S-metil, fenamifós e metiocarbe e seus produtos de degradação em suco de uva. Empregaram a extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos C18 e diclorometano na etapa de eluição para o preparo das amostras. Obtiveram recuperações superiores a 80% para todos os agrotóxicos estudados, com CV inferiores a 15%, num intervalo linear de concentração de 5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limites de quantificação entre 0,1 e 4,6 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados mostraram que a degradação dos agrotóxicos é mais lenta quando estão presentes no suco de frutas do que quando em meio aquoso mais diluído. Em 12% das amostras reais foram encontrados metiocarbe, fenamifós e demetom-S-metil, porém abaixo dos LMR (PICÓ; KOZMUTZA, 2007).

Kmellár e colab. (2008) desenvolveram um método empregando (LC-ESI(+)-MS/MS_QuEChERS) para a determinação de resíduos de 160 agrotóxicos em vegetais para verificar a influência da matriz nos valores de recuperação e na ionização dos analitos. Para a calibração, os autores utilizaram o método de padronização externa com superposição de matriz, com sete níveis de concentração (5 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Empregaram tomate como matriz de elevado teor de água, pera como matriz de elevado teor de açúcar e laranja como matriz de elevada concentração de ácidos. Dez dos agrotóxicos avaliados apresentaram baixa intensidade de sinal, problemas de linearidade ou detectabilidade apresentando R^2 abaixo de 0,99%. Numa escala de efeitos de matriz brandos (< 20%), médios (20-50%) e fortes (> 50%) ocorreram 69%, 20% e 11% dos compostos estudados, respectivamente. Mais de 90% dos agrotóxicos estudados apresentaram LD menores ou iguais a 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e foram obtidos CVs maiores que 20% em poucos casos, assim como problemas de recuperação, onde as exceções foram fipronil, ciromazina e fluazifop. Na análise de 50 amostras reais, 33 diferentes contaminantes foram detectados, todos a baixo do LMR (KMELLÁR et al., 2008).

Pan e colab. (2008) realizaram a determinação de resíduos de monocrotófos, dimetoato, imidacloprido, carbendazim, carbaril e simazina em hortaliças ao empregar ultrassom no preparo das amostras e LC-ESI(+)-MS/MS. Empregando uma coluna C18 (150mm), operando a 40°C com eluente A de formiato de amônia e B composto de metanol. Os compostos foram todos detectados entre os seis e nove minutos sem co-eluição. Obtiveram recuperações maiores que 83% e LQ menores que 1,4 µg kg⁻¹ para os agrotóxicos estudados. Os autores encontraram resíduos de carbendazim em amostras de alface e mostarda, carbaril em espinafre e monocrotófos em couve-flor (PAN; XIA; LIANG, 2008).

Ticha e colab. (2008) determinaram variações na concentração de resíduos de 21 agrotóxicos em maçãs durante o período de estocagem, empregando a MSPD para o preparo das amostras analisadas por LC-ESI(+)-MS/MS (QqQ). Verificaram uma diminuição sucessiva da concentração dos resíduos durante o período de estocagem, sendo que após cinco meses somente dodim e fosadona foram detectados. Nenhum dos agrotóxicos foi encontrado em concentrações acima dos LMR durante a etapa de estocagem. A dinâmica de resíduos antes e depois da colheita é dependente de fatores que devem ser conhecidos nos experimentos de validação, pois estas condições devem ser comparadas para que diferentes resultados possam ser compreendidos (TICHA et al., 2008).

Frenich e colab. (2008) utilizaram a Cromatografia Líquida de ultra eficiência (UPLC)_ESI(+)-MS/MS-QuEChERS (QqQ) para a determinação de 53 agrotóxicos em alimentos. Distintas matrizes foram escolhidas para avaliar o efeito nos valores de recuperação e na precisão. Foi utilizada uma coluna com C18 com partículas de 1,7 µm. Obtiveram recuperações entre 70% e 109% com CVs inferiores a 20% para todos os agrotóxicos. O método desenvolvido foi aplicado na análise de mais de 200 amostras de vegetais de matrizes semelhantes às empregadas no desenvolvimento do método e foi encontrado com maior frequência o imidacloprida e em concentrações entre 0,01 e 1,00 mg kg⁻¹ (GARRIDO-FRENICH et al., 2008).

Kruve e colab. (2008) verificaram que os efeitos de matriz na análise de resíduos de 14 agrotóxicos, em diversas frutas e legumes, são menores quando empregado QuEChERS como método de extração quando determinados por LC-ESI(+)-MS/MS (KRUIVE et al., 2008).

Nguyen e colab. (2008), empregando GC-MS, desenvolveram método para determinar em 30 min de análise, 203 resíduos de agrotóxicos em arroz com baixos LQ. Apesar dos ótimos resultados apenas 11 destes compostos analisados são de interesse direto para o atual monitoramento de resíduos de compostos autorizados e indicados para o cultivo deste cereal (NGUYEN et al., 2008).

Kanrar e colab. (2010) na determinação de 42 resíduos de agrotóxicos em 28 min puderam empregar a técnica na análise de chás, mesmo com grande número de elementos co-eluído. Trinta e oito destes compostos tinham seu tempo de retenção entre 2,5 e 8 min, no qual mais de 50% destes estavam concentrados numa faixa de tempo de 2 min (KANRAR; MANDAL; BHATTACHARYYA, 2010).

Chung & Chan (2010) para determinação de 98 resíduos que incluem organofosforados e carbamatos. O tempo de corrida foi de 19 min, sendo que 95 deles apresentaram tempo de retenção entre 8 e 19 min (CHUNG; CHAN, 2010).

Nguyen e colab. (2010) na análise de ervas determinaram 234 compostos em um tempo de 45 minutos. Para garantir a identificação dos compostos, um terceiro fragmento foi monitorado como forma de confirmar o analito de interesse (NGUYEN et al., 2010).

Pareja e colab. (2011) empregaram quatro versões do QuEChERS na determinação de agrotóxicos em arroz. Elegeram a versão que possuía aminas primárias e secundárias (PSA) na fase de clean-up por apresentar menor efeito de matriz na recuperação e possibilitar a análise de 47 resíduos em amostras reais com LQ inferior a $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (PAREJA et al., 2011a).

Sinha e colab. (2012) desenvolveram um método para análise de 18 resíduos em amostras reais de hortaliças por LC-ESI(+)-MS/MS_QuEChERS, com validação da metodologia muito acima das exigências europeias (SINHA; VASUDEV; RAO, 2012).

Hou e colab. (2013) utilizando GC/QuEChERs puderam determinar em aproximadamente 44 min, 124 agrotóxicos em arroz. Apesar do grande número de compostos passíveis de serem determinados por este método e os LQs menores que $27 \mu\text{g kg}^{-1}$, apenas 15 destes são empregados na rizicultura, o tempo de análises poderia ser menor se trabalhassem apenas em busca destes (HOU et al., 2013b).

De acordo com o que foi exposto, tanto técnicas de extração de múltiplos resíduos contaminantes de alimentos, quanto técnicas instrumentais para determiná-los estão disponíveis e apresentam grau adequado de desenvolvimento.

Entre as técnicas de determinação e extração mais adequadas, a cromatografia em fase líquida (LC) acoplada à espectrometria de massas em tandem (MS/MS) e QuEChERS como técnica de extração, constituem método de escolha para determinação de traços de agrotóxicos em alimentos.

Na determinação de agrotóxicos em arroz os estudos se encontram em avançado desenvolvimento, no entanto, pouco são os trabalhos que visam a determinação, neste cereal, de agrotóxicos indicados para a rizicultura e que possuem LMR estabelecidos pela ANVISA.

A seguir, com base no conhecimento em LC, MS e QuEChERS para análise de alimentos, apresentar-se-ão os estudos de desenvolvimento de método analítico específico para determinação de múltiplos resíduos dos agrotóxicos autorizado pelo Ministério da Agricultura (MAPA) para a rizicultura e que possuem LMR estabelecidos pela Anvisa, com vista ao monitoramento destes compostos e garantia da segurança alimentar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. INSTRUMENTAÇÃO E OUTROS

- ✓ Sistema de separação instrumental: cromatógrafo em fase líquida da marca Agilent Technologies (modelo: 1200 series);
- ✓ Sistema de amostragem: de bandeja dupla com para 54 frascos cada;
- ✓ Seringa de infusão direta: 1000µL Hamilton (Modelo: Gastight #1001);
- ✓ Sistema de ionização e interface;
- ✓ Sistema de vácuo: bomba de vácuo Pump Status (modelo: HS602);
- ✓ Sistema de detecção: espectrômetro de massas quadrupolar duplo linear 3200 Q Trap da AB Sciex Instruments (Modelo: 1031491 C);
- ✓ Sistema de aquisição: software Analyst 1.5.1.;
- ✓ Sistema de tratamento de dados: software Microsoft Office Excel 2007;
- ✓ Sistema de pesagem: balança analítica Shimadzu (modelo: AX200) com precisão entre 200g – 0,1mg;
- ✓ Sistema de purificação de água: millipore (modelo: Milliplus)
- ✓ Vidraria analítica:
- ✓ Frascos âmbar de 10 mL com tampa e septo de teflon.

3.2. MATRIZ DE ARROZ ISENTA DE AGROTÓXICOS

Os grãos de arroz utilizados como matriz empregada no desenvolvimento do método foram obtidos da Estação Experimental de Itajaí/Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EEI/Epagri). As plantas foram cultivadas em vasos com substrato compostos por diferentes solos oriundos de cultivo em sistema orgânico de produção e misturados a subsolo sem histórico de qualquer cultivo nos últimos 30 anos. Os vasos com as plantas foram mantidos em abrigos com telas anti-insetos nas laterais e coberto com polietileno agrícola (Figura 28) e sem acesso a pessoas estranhas ao serviço e ainda provido de pedilúvio para descontaminação dos calçados antes da entrada no abrigo. Todo o cultivo e colheita foi rigorosamente acompanhado por pesquisadores da área da fitossanidade da

referida empresa, o que garantiu que a matriz deste estudo fosse isenta de compostos exógenos, especialmente os agrotóxicos. Após a colheita, descascamento e moagem, foram selecionadas para os estudos as partículas de granulometria entre 0,2 e 1mm.



Figura 28. À esquerda cultivo de arroz em vasos para obtenção de material isento de agrotóxicos e à direita amostra de arroz moído com partículas de granulometria entre 0,2 a 1 mm. EEI/Epagri. Autor: José Angelo Rebelo.

3.3. SOLVENTES, SOLUÇÕES E REAGENTES

- ✓ Água MilliQ;
- ✓ Ácido fórmico 50% (CH_2O_2) Fluka;
- ✓ Metanol 99,8% ($\text{MeOH} - \text{CH}_4\text{O}$) Vetec;
- ✓ Acetonitrila 99,98% ($\text{ACN} - \text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) J.T. Baker;
- ✓ Nitrogênio (N_2);
- ✓ Padrões listados na tabela 12;
- ✓ Sulfato de magnésio 99,8% (Mg_2SO_4);
- ✓ Acetado de sódio 99% (CH_3COONa);
- ✓ Aminas primárias e secundárias 4 μm ($\text{PSA} - (\text{NH}_2\text{R}_1)_n (\text{NH}_1\text{R}_1\text{R}_2)_n$) (Agilent);

3.3.1. Soluções estoque analíticas

Os resíduos de agrotóxicos determinados pelo método desenvolvido foram aqueles que compunham a lista de ativos que possuem registro no MAPA para emprego como herbicida, fungicida e inseticida na cultura do arroz irrigado e com LMR estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009c) e recomendados pela Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado (SOSBAI, 2010) (Tabela 11).

As soluções estoque dos analitos foram preparadas pesando-se os padrões de agrotóxicos em frascos de vidro âmbar, e individualmente, em balança analítica buscando atingir concentrações próximas a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 10 mL de solvente (Tabela 11) que possibilitasse a obtenção de soluções límpidas e estáveis à temperatura ambiente no momento de seu uso e a 4°C durante o armazenamento. Todas as concentrações e solventes empregados na obtenção de cada solução estoque, assim como grau de pureza e seus fornecedores, estão listados para cada uma delas (Tabela 11).

Tabela 11. Grau de pureza e origem dos padrões empregados no preparo das soluções estoque a partir de herbicidas, inseticidas e fungicidas autorizados pelo Mapa no manejo da cultura de arroz e suas respectivas concentrações e solventes empregados, após seu preparo.

	Agrotóxico	Grau de pureza	Empresa de origem	Concentração da solução estoques de padrões (mg kg^{-1})/solvente empregado
1	2-4 ácido diclorofenoxiacético	99,8	FA	1120/ACN
2	Acetamiprido	Não encontrado		
3	Alfa-cipermetrin (cas 67375-30-8)	99,7	FA	1090/MeOH
4	Azimsulfurom	99,7	FA	1343/MeOH
5	Azoxistrombina	99,9	FA	1180/ACN
6	Benfuracarb	98,0	FA	1009/MeOH
7	Bentazon	99,9	FA	1099/MeOH
8	Beta-ciflutrina	99,8	FA	1118/MeOH
9	Bifentrina	98,6	FA	1000/ACN
10	Bispiribac-sódio	99,9	FA	1199/MeOH
11	Carbendazim	97,0	SA	1130/ACN
12	Carbofuram	99,9	FA	1089/MeOH
13	Carbosulfano	98,3	CS	1430/ACN
14	Carboxina	99,9	FA	1010/ACN
15	Cialofop-p-butil	98,4	FA	1108/MeOH

16	Ciclosulfamurom	99,4	FA	1193/MeOH
17	Cicloxidim	98,1	FA	1040/MeOH
18	Ciflutrina	98,0	CS	1490/ACN
19	Beta-cipermetrina (cas 52315-07-8)	98,0	SA	935/MeOH
20	Ciproconazol	99,8	FA	960/ACN
21	Clomazone	98,1	FA	1001/MeOH
22	Clorantraniliprole	96,1	FA	1197/MeOH
23	Cloratalonil	99,3	CS	1110/ACN
24	Cresoxim-metil	96,6	RH	1111/MeOH
25	Deltametrina	98,0	SA	1000/ACN
26	Difenoconazol	97,0	FA	1160/ACN
27	Diflubenzurom	98,6	CS	1100/ACN
28	Ditiocarbamato de ZN (ZIRAM)	98,1	FA	5/ACN10%
29	Epoxiconazol	99,0	FA	1188/MeOH
30	Esfenvarelato	99,5	CS	1010/ACN
31	Etofenproxi	97,7	FA	1000/ACN
32	Etoxisulfamurom	97,7	FA	1190/ACN
33	Fenoxaprop-p-etil	98,9	FA	1108/MeOH
34	Fipronil	97,5	FA	1141/MeOH
35	Furatiocarb	99,6	FA*	1110/ACN
36	Glifosato	99,2	FA	1102/MeOH
37	Imazapic	99,9	FA	1309/MeOH
38	Imazapir	99,9	FA	1229/MeOH
39	Imazatapir	99,9	FA	1009/MeOH
40	Imidacloprida	99,9	FA	1139/MeOH
41	Lambda-cialotrim	97,4	FA	1050/ACN
42	Malaoxon	95,2	FA	1430/ACN
43	Malationa	97,2	FA	1070/ACN
44	Metalaxil-M	Não encontrado		
45	Metsulfamuron-metil	99,0	FA	1050/ACN
46	Miclobutanil	99,3	FA	1270/ACN
47	Oxadiazon	99,9	FA	1479/MeOH
48	Oxifluorfem	98,1	RH	1548/MeOH
49	Paraoxon-metil	96,0	FA	1040/ACN
50	Parationa-metfílica	99,7	FA	1150/ACN
51	Pendimetalim	98,8	FA*	998/MeOH
52	Penoxsulam	Não encontrado		
53	Permetrina	98,3	FA	1000/ACN
54	Picloram	99,4	FA	1100/ACN
55	Picoxistrobina	Não encontrado		
56	Pirazosulfamurom	99,1	FA*	1823/MeOH
57	Pirimifós-metfílico	98,2	FA	3900/ACN
58	Propanil	99,6	FA	1315/MeOH

59	Propiconazol	98,4	FA*	1240/ACN
60	Quinclorac	99,7	FA	1017/MeOH
61	Tebuconazol	99,6	FA	1145/MeOH
62	Tetraconazol	Não encontrado		
63	Tiabendazol	99,0	SA	1010/MeOH
64	Tiametoxam	99,7	FA	1007/MeOH
65	Tiobecarbe	99,9	FA	1259/MeOH
66	Tiodicarbe	99,9	FA*	1000/ACN
67	Tiofanato metílico	99,3	FA	1013/MeOH
68	Triciclazol	98,9	FA	1230/ACN
69	Triclopir	99,9	FA	1069/MeOH
70	Trifloxistrombina	99,5	FA	1343/MeOH
71	Trifluralina	99,2	FA	1110/ACN

Nota: Solventes das soluções: acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH). Origem: FA: Fluka Analytical; CS: Chem Service; RH: Riedel-de-Haën; SA: Sigma-Aldrich; *material cedido por terceiros.

3.3.2. Solução estoque contendo todos os padrões

Para emprego na obtenção das curvas analíticas e na fortificação dos testes de recuperação, preparou-se uma mistura em água contendo todos os padrões de agrotóxicos onde foi possível obter o espectro de massas após ionização no modo positivo por meio da fonte de ionização por eletrospray (ESI+). Nos testes preliminares de extração, a amostra de arroz foi diluída em até cinco vezes. Assim, a mistura dos padrões foi preparada para que a concentração correspondente à quinta parte da concentração permitida pelo LMR, para cada um dos compostos, estivesse entre os pontos da curva analítica que foi composta de até sete (07) pontos. Desta forma, poder-se-ia dispor de um método com faixa de aplicação relacionando o LMR e a diluição empregada no processo de extração (Tabela 12).

3.3.3. Padrão controle do tipo padrão sub-rogado (PS) ou padrão interno (PI)

Inicialmente, 14,25 mg do padrão (sulfametaxazol) foram diluídas em 10 mL de acetonitrila. Desta solução, diluiu-se 1 mL em 9 mL de acetonitrila para adição na amostra e preparo das curvas analíticas onde o PS se encontraria na concentração 14,25 mg L⁻¹.

Tabela 12. Concentrações dos padrões de agrotóxicos em água contidos na solução estoque da mistura de padrões (250 mL).

Padrões em 250 mL da solução mistura estoque	
Agrotóxicos	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Azoxistrobina	0,047
Bentazon	0,220
Bispiribac-sódio	0,240
Carbendazim	0,226
Carbofuram	0,109
Carboxina	0,101
Ciclossulfamurom	0,238
Cicloxidim	0,208
Ciproconazol	0,019
Clomazone	0,040
Clorantraniliprole	0,343
Difenoconazol	0,464
Epoxiconazol	0,238
Etoxissulfurom	0,238
Fenoxaprop-P-ethyl	0,222
Imazapic	0,262
Imazapir	0,246
Imazetapir	0,202
Imidacloprida	0,228
Malaoxon	0,286
Malationa	1,070
Metsulfuron-metil	0,210
Miclobutanil	0,254
Oxadiazon	0,296
Paraoxon-metil	0,208
Picloram	0,044
Pirimifós-metílico	0,390
Quinclorac	0,330
Tebuconazol	0,046
Tiabendazol	0,101
Tiametoxam	0,403
Tiobencarbe	0,025
Tiofanato metílico	0,208
Triciclazol	0,246
Triclopir	0,214
Trifloxistrombina	0,134

3.4. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE DETECÇÃO (MS-MS)

3.4.1. Parâmetros de fragmentação, filtragem e focalização

Para o desenvolvimento de metodologia baseada na análise instrumental, que utiliza como detector o espectrômetro de massas (MS), deve-se conhecer quais fragmentos são formados a partir do íon *quasi*-molecular de cada analito.

Este estudo foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Catálise em Sistemas Moleculares e Nanoestruturados do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Existem parâmetros ajustáveis para permitir a otimização das condições de fragmentação e que seguem a indicação do fabricante. Alguns ajustes devem ser testados para se alcançar o sucesso na fragmentação do íon. Aqueles parâmetros possuem faixas de trabalho pré-determinadas e que podem ser configuradas de acordo com o fluxo de injeção e da prática do operador. Na tabela 13 estão listadas as faixas de trabalho permitidas e ou sugeridas.

Tabela 13. Parâmetros ajustáveis e sugeridos pelo fabricante para alcançar a otimização automática de MRM utilizando turbo Ion Spray API-ESI 3200 no modo positivo.

TIPO	UNIDADE	FAIXA DE TRABALHO
Injeção direta de padrão	Concentração	Inicialmente 200 $\mu\text{L L}^{-1}$
Fluxo de injeção	Vazão	5 a 3000 $\mu\text{L min}^{-1}$
Estabilização	Tempo	2 minutos
Gás de dessolvatação - N_2 (CUR)	Pressão	10 a 20 Psi
Voltagem do TurboSpray (IS)	Voltagem	+ 4000 a 5500 V
Turbo Spray (TEM) (CUR)	Temperatura	0 a 750 $^{\circ}\text{C}$
Gás de nebulização - ar sintético (GAS1)	Pressão	20 a 50 Psi
Gás secante - ar sintético (GAS2)	Pressão	0 a 50 Psi
Gás de colisão - N_2 (CAD)	Pressão	Baixo/médio/alto
<i>Dwell Time</i> (tempo de residência)	Tempo	Indicado até 200 ms

O fluxo de injeção trabalhado variou de 10 a 30 $\mu\text{L min}^{-1}$. Nesta faixa, a concentração infundida variou de 1 a 5 mg L^{-1} ; e, segundo o fabricante, o gás de nebulização (GAS1) deve estar em torno de 20 Psi, o gás secante (GAS2) deve estar desabilitado (OFF), ou seja, com 0 Psi, o ajuste de temperatura do gás de

dessolvatação (TEM (CUR)) deve estar desligado e sob temperatura ambiente. Os demais parâmetros podem ser testados de acordo com a tabela 13.

Os parâmetros ajustáveis foram estabelecidos dentro das faixas de ajuste (Tabela 13), com vista à condição geral de promoção da fragmentação da maioria dos íons testados para o modo ESI (+). Fixado tais parâmetros, foram realizadas injeções diretas no MS de cada padrão no modo positivo, ou seja, com promoção e avaliação da protonação da molécula, ainda com variação das concentrações infundidas de 1 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e vazão de 10 a 30 $\mu\text{L min}^{-1}$. As soluções-padrão ($\sim 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram diluídas em solução de acetonitrila a 50% contendo ácido fórmico a 0,1% para facilitar a protonação do analito, antes mesmo de alcançar a fonte de ionização, para posterior formação dos fragmentos.

Além dos parâmetros ajustáveis (Tabela 13), os parâmetros de filtragem e fragmentação são configuradas após testes automáticos realizados pelo MS e avaliados para garantir maior intensidade de sinal e a formação estável do íon. Estas energias são: a voltagem do cone (DP - do inglês *Declustering Potential*) para melhor seleção dos íons precursores; a energia de colisão (CE - do inglês *Collision Energy*), que promove a fragmentação do íon precursor e gera íons-produto; o potencial de saída da cela de colisão (CXP - do inglês *Collision Cell Exit Potential*), todas em função da fonte empregada para gerar a ionização (ESI (eletrospray ionization)).

Com a conclusão desta etapa, pode-se eleger os fragmentos que foram monitorados para qualificar e quantificar os compostos de interesse.

3.5. AJUSTES RELACIONADOS AO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

3.5.1. Fase estacionária

No processo de separação cromatográfica, a fase estacionária utilizada foi a coluna cromatográfica Synergy polar-RP (Phenomenex HPLC Synergi RP; partículas de 4µm; poros de 80Å; 150 x 2,0 mm - comprimento x diâmetro), estável em pH 1,5 a 7,0, baixa hidrofobicidade, alta polaridade, seletividade para compostos aromáticos em função da ligação por éter (Figura 29) para interação π - π , apropriada para o aumento da retenção de compostos polares pela existência de *end capping* polar.

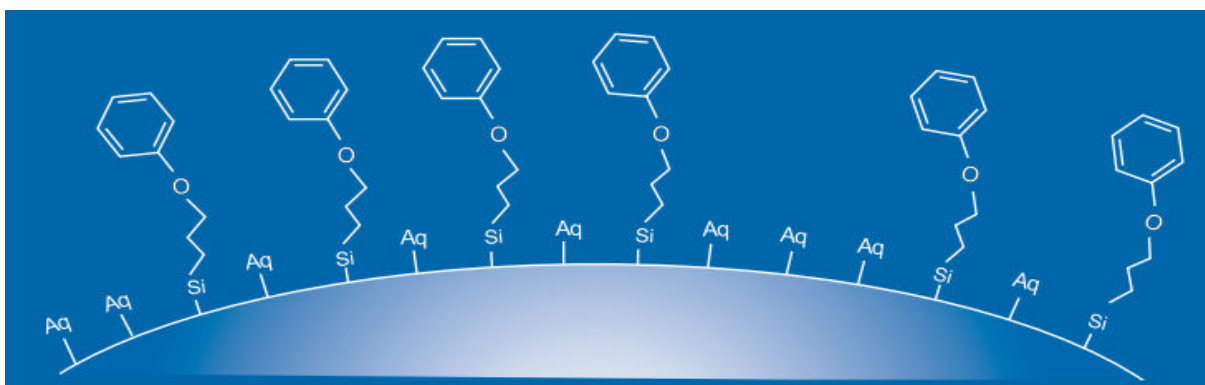


Figura 29. Ilustração do *endcapping* polar da coluna Synergy polar-RP (Phenomenex).
Fonte: (PHENOMENEX, 2014).

3.5.2. Ajuste da fase móvel (FM)

A fase móvel foi constituída por um gradiente de soluções de diferentes polaridades. A solução **A** era a mais polar e continha ácido fórmico a 0,1% em água, e a solução **B**, menos polar, acetonitrila a 95%. Empiricamente, iniciou-se os testes com acondicionamento da coluna por seis minutos com a adição de 95% da solução **A** e 5% da solução **B**. Durante a análise diminuiu-se a concentração da solução **A** até 25 minutos de análise e retornando, gradativamente, à condição inicial da coluna após mais 5 minutos de análise (Tabela 14), totalizando 36 minutos.

Tabela 14. Composição e gradiente da fase móvel inicialmente testada.

TEMPO (min)	VAZÃO ($\mu\text{L min}^{-1}$)	SOLUÇÃO A (ÁCIDO FÓRMICO 0,1%)	SOLUÇÃO B (ACETONITRILA 95%)
6 (condicionamento)	200	95,0	5,0
1	200	95,0	5,0
15	200	5,0	95,0
25	200	5,0	95,0
30	200	95,0	5,00

A partir destas condições (Tabela 15), buscou-se reduzir o tempo de análise aumentando a concentração da solução **B** e reduzindo o tempo de condicionamento inicial da coluna. Este tempo de condicionamento pode ser útil também para eliminar resíduos de padrões retidos na coluna. Assim, a cada redução do tempo de condicionamento, entre as injeções com padrões analisava-se uma amostra contendo apenas água para verificar se alguns destes resíduos permaneciam retidos na fase estacionária evitando-se, assim, superestimação das determinações.

3.5.3. Outros ajustes

Nos testes iniciais, o forno da coluna ficou desligado de modo que a coluna ficou à temperatura ambiente, ou seja, sem controle. Quando sob controle, a temperatura foi mantida em 40°C estabilizando a temperatura da coluna com aumento da velocidade de separação cromatográfica por meio da esperada diminuição da viscosidade da fase móvel.

A vazão da FM foi contínua durante todo o procedimento de separação. Esta vazão foi testada para se obter melhoria na separação dos compostos para detecção por MS/MS. Buscou-se reduzir o tempo inicial e final de detecção dos compostos empregando-se vazões de 200 a 600 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Com aumento da vazão da FM, maior é o volume de solvente que chega na fonte de ionização. Assim, é necessário aumentar a temperatura da fonte para que ocorra maior dessolvatação e evitar interferência nos analisadores de massa pela presença de solvente. Nesta providência, a temperatura de dessolvatação foi de 400 °C para vazões menores e de 600 °C para vazão de 600 $\mu\text{L min}^{-1}$.

3.6. MÉTODO DE EXTRAÇÃO QuEChERS MODIFICADO

Os resíduos de agrotóxicos foram extraídos de amostras das partículas dos grãos de arroz moídos (granulometria entre 0,2 e 1,0 mm), baseando-se em procedimento de extração QuEChERS (ANASTASSIADES et al., 2003) modificado (LEHOTAY; MAŠTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005) (Figura 36). As amostras para análise continham 5 g colocados em um tubo de polipropileno do tipo falcon de 50mL, com 14 mL acetonitrila (ácido acético 1%) e 1 mL de solução-padrão de sulfametaxazol. Após 30 minutos (PAREJA et al., 2011b) adicionaram-se 2 g de sulfato de magnésio e 0,5g de acetato de sódio. Os tubos foram agitados por 1 min em vortex e centrifugados por 1 min a 4.000 rpm. Para executar o *clean-up*, extraiu-se 1,5 mL do sobrenadante, que foi colocado em um tubo de 15 mL e ao qual foram adicionados 150 mg de sulfato de magnésio e 50 mg de PSA (aminas primárias e secundárias). Os tubos foram agitados por 1 min em vortex e centrifugados por 1 min a 4.000 rpm. Extraiu-se 1 mL do sobrenadante, que foi colocado diretamente em vials para injeção automática no cromatógrafo (LC-MS/MS). Todos os procedimentos foram executados em triplicata (Figura 30).

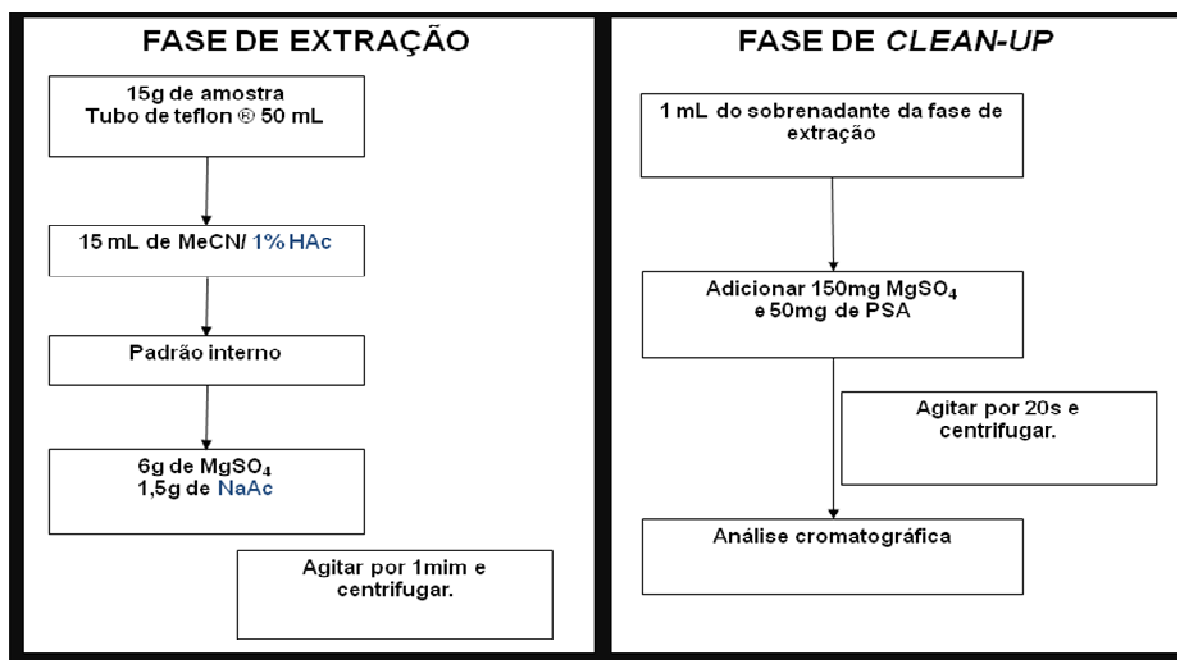


Figura 30. Fluxograma representando o método QuEChERS com modificações.

Fonte: Adaptado de (LEHOTAY; MAŠTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005).

3.7. PARÂMETROS DE MÉRITO PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Dos 71 agrotóxicos indicados na rizicultura, aqueles onde foi possível obter os espectros de massa, pelo métodos anteriormente citados, foram empregados nos experimentos para obtenção das curvas analíticas.

3.7.1. Curva analítica e linearidade

3.7.1.1. Calibração com adição de padrão interno

Para estudo de linearidade por calibração externa com calibração interna foram preparadas soluções-amostra adicionando-se padrão interno (PI) (sulfametaxazol), mistura de soluções padrão e água com auxílio de uma micropipeta de 100 μL , em cada um dos 8 tubos de 15 mL. Na tabela 15 pode-se verificar a composição de cada amostra, que corresponde aos sete pontos da curva analítica e a amostra-branco.

Tabela 15. Soluções para estudo de linearidade por calibração externa com padrão interno.

Componentes das soluções (padrões/solvente)	Soluções para estudo de linearidade por calibração externa							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Padrão interno (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100
Solução de mistura de padrões (μL)*	0	100	200	300	400	500	600	700
Acetonitrila (μL)	900	800	700	600	500	400	300	200

* A concentração final de cada padrão empregado na construção da curva está na tabela 17.

Cada ponto da curva foi obtido com triplicata (INMETRO, 2003; IUPAC, 2002). As concentrações dos agrotóxicos estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16. Concentração de padrões adicionada nas soluções empregadas no estudo de linearidade por calibração externa com padrão interno.

Agrotóxicos	Concentrações dos pontos da curva analítica obtida por calibração externa com padrão interno						
	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
	1	2	3	4	5	6	7
Azoxistrobina	0,0047	0,0094	0,0142	0,0189	0,0236	0,0283	0,0330
Bentazon	0,0220	0,0440	0,0659	0,0879	0,1099	0,1319	0,1539
Bispiribac-sódio	0,0240	0,0480	0,0719	0,0959	0,1199	0,1439	0,1679
Carbendazim	0,0226	0,0452	0,0678	0,0904	0,1130	0,1356	0,1582
Carbofuran	0,0109	0,0218	0,0327	0,0436	0,0545	0,0653	0,0762

Carboxina	0,0101	0,0202	0,0303	0,0404	0,0505	0,0606	0,0707
Ciclossulfamuro	0,0238	0,0476	0,0714	0,0952	0,1190	0,1428	0,1666
Cicloxim	0,0208	0,0416	0,0624	0,0832	0,1040	0,1248	0,1456
Ciproconazol	0,0019	0,0038	0,0058	0,0077	0,0096	0,0115	0,0134
Clomazone	0,0040	0,0080	0,0120	0,0160	0,0200	0,0240	0,0280
Clorantraniliprole	0,0343	0,0687	0,1030	0,1373	0,1717	0,2060	0,2403
Difenoconazol	0,0464	0,0928	0,1392	0,1856	0,2320	0,2784	0,3248
Epoxiconazol	0,0238	0,0475	0,0713	0,0950	0,1188	0,1426	0,1663
Etoxisulfuro	0,0238	0,0476	0,0714	0,0952	0,1190	0,1428	0,1666
Fenoxaprop-P-ethyl	0,0222	0,0443	0,0665	0,0886	0,1108	0,1330	0,1551
Imazapic	0,0262	0,0524	0,0785	0,1047	0,1309	0,1571	0,1833
Imazapir	0,0246	0,0492	0,0737	0,0983	0,1229	0,1475	0,1721
Imazetapir	0,0202	0,0404	0,0605	0,0807	0,1009	0,1211	0,1413
Imidacloprida	0,0228	0,0456	0,0683	0,0911	0,1139	0,1367	0,1595
Malaoxon	0,0286	0,0572	0,0858	0,1144	0,1430	0,1716	0,2002
Malationa	0,1070	0,2140	0,3210	0,4280	0,5350	0,6420	0,7490
Metsulfuron-metil	0,0210	0,0420	0,0630	0,0840	0,1050	0,1260	0,1470
Miclobutanil	0,0254	0,0508	0,0762	0,1016	0,1270	0,1524	0,1778
Oxadiazon	0,0296	0,0592	0,0887	0,1183	0,1479	0,1775	0,2071
Paraoxon-metil	0,0208	0,0416	0,0624	0,0832	0,1040	0,1248	0,1456
Picloram	0,0044	0,0088	0,0132	0,0176	0,0220	0,0264	0,0308
Pirimifós-metílico	0,0390	0,0780	0,1170	0,1560	0,1950	0,2340	0,2730
Quinlorac	0,0330	0,0660	0,0990	0,1320	0,1650	0,1980	0,2310
Tebuconazol	0,0046	0,0092	0,0137	0,0183	0,0229	0,0275	0,0321
Tiabendazol	0,0101	0,0202	0,0303	0,0404	0,0505	0,0606	0,0707
Tiametoxam	0,0403	0,0806	0,1208	0,1611	0,2014	0,2417	0,2820
Tiobencarbe	0,0025	0,0050	0,0076	0,0101	0,0126	0,0151	0,0176
Tiofanato metílico	0,0208	0,0416	0,0624	0,0832	0,1040	0,1248	0,1456
Triciclazol	0,0246	0,0492	0,0738	0,0984	0,1230	0,1476	0,1722
Triclopir	0,0214	0,0428	0,0641	0,0855	0,1069	0,1283	0,1497
Trifloxistrombina	0,0134	0,0269	0,0403	0,0537	0,0672	0,0806	0,0940

3.7.1.2. Superposição de matriz

Para estudo de linearidade por superposição de matriz, as amostras foram preparadas adicionando-se padrão sub-rogado (sulfametaxazol), acetonitrila, ácido acético e mistura de soluções-padrão, com auxílio de uma micro pipeta de 1000 µL, em cada um dos 8 tubos de 50 mL em 5 g de arroz moído com granulometria de 0,2 a 1mm. Na tabela 17 estão apresentadas as quantidades de arroz (matriz), solventes e padrões adicionados para preparo das amostras para posterior extração, análise e obtenção da curva analítica.

Tabela 17. Soluções para estudo de linearidade por superposição de matriz.

Componentes das soluções (matriz/padrões/solventes)	Soluções para estudo de linearidade por calibração com adição de padrão interno							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Arroz (matriz) (g)	5	5	5	5	5	5	5	5
Padrão sub-rogado (x1000µL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Solução de mistura de padrões (x1000µL)*	0	1	2	3	4	5	6	7
Acetonitrila (x1000µL)	13	12	11	10	9	8	7	6
Solução de ácido acético 15% (x1000µL)**	1	1	1	1	1	1	1	1

* A concentração final de cada padrão empregado na construção da curva estão na tabela 19.

** A concentração final de ácido acético nas amostra foi de 1%.

Cada ponto da curva foi obtido por triplicata (INMETRO, 2003; IUPAC, 2002). As concentrações dos agrotóxicos estão apresentados na tabela 18.

Tabela 18. Concentração dos padrões presentes nas soluções empregadas no estudo de linearidade por superposição de matriz.

Concentrações dos pontos da curva analítica por superposição de matriz							
Agrotóxicos	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
	1	2	3	4	5	6	7
Azoxistrobina	0,0031	0,0063	0,0094	0,0126	0,0157	0,0189	0,0220
Bentazon	0,0147	0,0293	0,0440	0,0586	0,0733	0,0879	0,1026
Bispiribac-sódio	0,0160	0,0320	0,0480	0,0639	0,0799	0,0959	0,1119
Carbendazim	0,0151	0,0301	0,0452	0,0603	0,0753	0,0904	0,1055
Carbofuran	0,0073	0,0145	0,0218	0,0290	0,0363	0,0436	0,0508
Carboxina	0,0067	0,0135	0,0202	0,0269	0,0337	0,0404	0,0471
Ciclossulfamurum	0,0159	0,0317	0,0476	0,0635	0,0793	0,0952	0,1111
Cicloxdim	0,0139	0,0277	0,0416	0,0555	0,0693	0,0832	0,0971
Ciproconazol	0,0013	0,0026	0,0038	0,0051	0,0064	0,0077	0,0090
Clomazone	0,0027	0,0053	0,0080	0,0107	0,0133	0,0160	0,0187
Clorantraniliprole	0,0229	0,0458	0,0687	0,0916	0,1144	0,1373	0,1602
Difenoconazol	0,0309	0,0619	0,0928	0,1237	0,1547	0,1856	0,2165
Epoconazol	0,0158	0,0317	0,0475	0,0634	0,0792	0,0950	0,1109
Etoxisulfurum	0,0159	0,0317	0,0476	0,0635	0,0793	0,0952	0,1111
Fenoxaprop-P-ethyl	0,0148	0,0295	0,0443	0,0591	0,0739	0,0886	0,1034
Imazapic	0,0175	0,0349	0,0524	0,0698	0,0873	0,1047	0,1222
Imazapir	0,0164	0,0328	0,0492	0,0655	0,0819	0,0983	0,1147
Imazetapir	0,0135	0,0269	0,0404	0,0538	0,0673	0,0807	0,0942
Imidacloprida	0,0152	0,0304	0,0456	0,0607	0,0759	0,0911	0,1063
Malaoxon	0,0191	0,0381	0,0572	0,0763	0,0953	0,1144	0,1335
Malationa	0,0713	0,1427	0,2140	0,2853	0,3567	0,4280	0,4993
Metsulfuron-metil	0,0140	0,0280	0,0420	0,0560	0,0700	0,0840	0,0980
Miclobutanil	0,0169	0,0339	0,0508	0,0677	0,0847	0,1016	0,1185
Oxadiazon	0,0197	0,0394	0,0592	0,0789	0,0986	0,1183	0,1380
Paraoxon-metil	0,0139	0,0277	0,0416	0,0555	0,0693	0,0832	0,0971
Picloram	0,0029	0,0059	0,0088	0,0117	0,0147	0,0176	0,0205
Pirimifós-metílico	0,0260	0,0520	0,0780	0,1040	0,1300	0,1560	0,1820
Quinclorac	0,0220	0,0440	0,0660	0,0880	0,1100	0,1320	0,1540
Tebuconazol	0,0031	0,0061	0,0092	0,0122	0,0153	0,0183	0,0214
Tiabendazol	0,0067	0,0135	0,0202	0,0269	0,0337	0,0404	0,0471
Tiametoxam	0,0269	0,0537	0,0806	0,1074	0,1343	0,1611	0,1880

Tiobencarbe	0,0017	0,0034	0,0050	0,0067	0,0084	0,0101	0,0118
Tiofanato metílico	0,0139	0,0277	0,0416	0,0555	0,0693	0,0832	0,0971
Triciclazol	0,0164	0,0328	0,0492	0,0656	0,0820	0,0984	0,1148
Triclopir	0,0143	0,0285	0,0428	0,0570	0,0713	0,0855	0,0998
Trifloxistrombina	0,0090	0,0179	0,0269	0,0358	0,0448	0,0537	0,0627

Para otimização de um método que pudesse ser empregado no controle de qualidade de amostras de arroz por meio da verificação do LMR de agrotóxicos, a concentração correspondente ao menor limite determinado pela Anvisa de 2009 a 2010, diluído cinco (05) vezes, está presente na faixa de concentração da curva analítica, para cada composto, a fim de que seja possível determinar resíduos de agrotóxicos nestas concentrações.

Com os dados resultantes da construção da curva, por calibração externa com adição de padrão interno e superposição de matriz, foi possível obter informações de erro aparente ou resíduo que, em função da concentração de cada analito, deve ser o mais aleatório possível para não caracterizar a existência de erro sistemático. Além disso, obteve-se os coeficientes angulares, lineares e de determinação (R^2), sendo este último responsável pela confirmação da exatidão do método ao apresentar um valor igual ou superior a 0,99.

3.7.2. Limites de quantificação e detecção

Para determinação do limite de detecção e quantificação utilizaram-se os parâmetros resultantes da obtenção das curvas analíticas (RIBANI et al., 2004).

Para cálculo do limite de detecção (LD) utilizou-se a seguinte fórmula:

$$LD = 3 \times s/S;$$

Para cálculo do limite de quantificação (LQ) utilizou-se a seguinte fórmula:

$$LQ = 10 \times s/S;$$

onde, s é a estimativa do desvio padrão da resposta regressiva e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

3.7.3. Exatidão

3.7.3.1. Ensaio de Recuperação

Duas formas de avaliação da recuperação foram feitas: (I) Calibração externa com adição de padrão interno (sulfametaxazol) construindo a curva de acordo com o item 3.7.1.1. Pode-se, assim, obter o percentual de correlação ao que foi adicionado à água na construção da curva analítica e ao que foi fortificado na amostra de arroz (KIOUSSI et al., 2011; RUBIO-DIAZ; FRANCIS; RODRIGUEZ-SAONA, 2011); (II) Superposição de matriz (“matrix-matched”), com adição de padrão sub-rogado (sulfametaxazol), a fim de suprimir os efeitos de matriz. Outra curva foi então construída adicionando-se concentrações de padrões dos analitos de acordo com o item 3.7.1.2. Neste caso, fez-se uma relação das concentrações adicionadas e naquela obtida teoricamente pela curva analítica visando eliminar o efeito de matriz na hipótese de obter melhora nos resultados de recuperação para cada um dos analitos (HOU et al., 2013b; RIBANI et al., 2004; RUBERT; SOLER; MAÑES, 2012). As concentrações empregadas na fortificação foram as mesmas utilizadas na construção das curvas analíticas para cada um dos analitos e de acordo com o método de calibração. Os testes foram realizados com sete níveis de concentração e executados em triplicata.

3.7.4. Precisão

3.7.4.1. Precisão Instrumental

A precisão instrumental foi determinada analisando e comparando estatisticamente o resultado da análise da mesma amostra por 10 vezes consecutivas (Figura 31). A amostra continha a concentração do ponto central da curva analítica para cada um dos compostos. Esta precisão foi inicialmente considerada satisfatória quando o desvio relativo obtido foi menor ou igual a 20% (EC (SANCO/12571/2013), 2013; INMETRO, 2003).

3.7.4.2. Repetibilidade (intra-ensaio)

A repetibilidade foi determinada analisando e comparando estatisticamente 8 amostras diferentes (Figura 31), contendo concentração igual a do ponto central da curva analítica para cada um dos compostos. A repetibilidade foi inicialmente considerada satisfatória quando o desvio relativo obtido foi menor ou igual a 20% (EC (SANCO/12571/2013), 2013).

3.7.4.3. Interensaio (interday)

A precisão interensaio foi determinada analisando e comparando estatisticamente oito amostras diferentes, e comparada com outras oito amostras diferentes preparadas em data diferente da anterior (Figura 31), contendo a concentração do ponto central da curva analítica para cada um dos compostos. A precisão interensaio foi inicialmente considerada satisfatória quando o desvio relativo obtido entre as análises, feitas em dias diferentes, foi menor ou igual a 20% (EC (SANCO/12571/2013), 2013; GUSTAVO GONZÁLEZ; ÁNGELES HERRADOR, 2007; ICH, 1995).

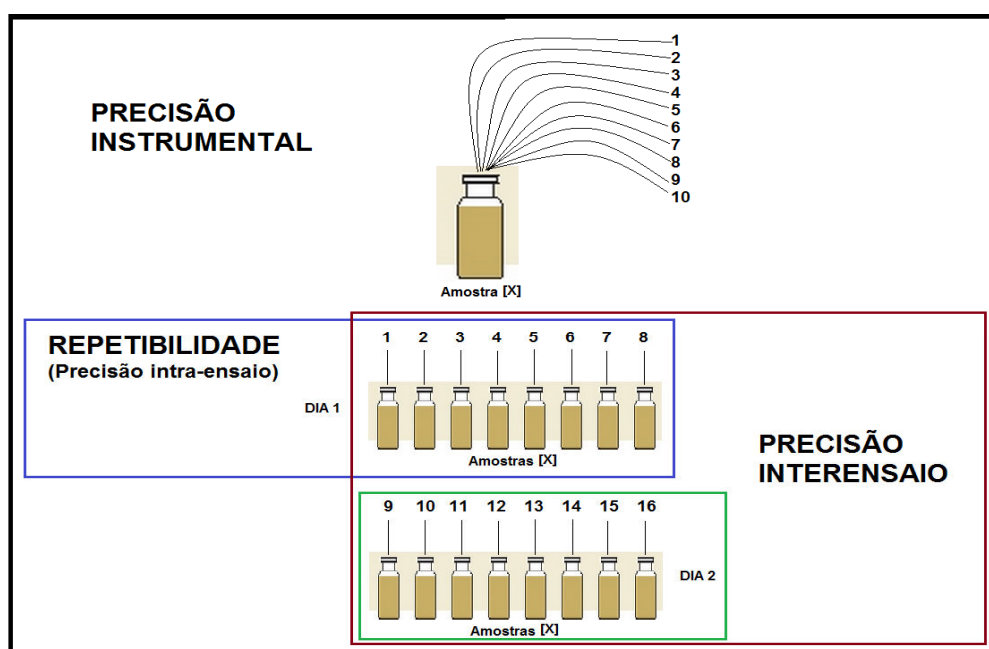


Figura 31. Esquema representando a análise de amostras, contendo concentrações iguais de padrões de agrotóxicos, para determinação da precisão instrumental, repetibilidade e precisão interensaio, na validação de metodologia analítica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA IONIZAÇÃO E FRAGMENTAÇÃO DOS COMPOSTOS EM MS/MS.

4.1.1. Parâmetros de ionização e dessolvatação

Considerando-se que a maioria agrotóxicos que se pretendeu determinar apresentam instabilidade térmica, empregou-se ESI como fonte de ionização. Por se tratar do desenvolvimento de um método para múltiplos resíduos com aquelas características, esta fonte é capaz de ionizar compostos em uma ampla faixa de massa molar e polaridade, voláteis ou não (SILVA; COLLINS, 2011).

Para promover a diminuição do tempo de análise e apropriada dessolvatação, fizeram-se testes preliminares de configuração básica da fonte de ionização avaliada por meio da reprodutibilidade dos sinais dos analitos. Entre as configurações, a vazão do solvente está diretamente ligada à organização das camadas elétricas formadas na interface entre o capilar e a solução, quando ocorre a transferência de elétrons do capilar para a solução e a separação de cargas na superfície das gotas, que irão dar origem aos íons em fase gasosa. Quanto maior a vazão menor é o tempo de residência das espécies neutras na interface, o que diminui a possibilidade de reações de oxidação do analito e de outras espécies contaminantes (BERKEL; ZHOUT, 1995; CROTTI et al., 2006) (BERKEL & ZHOU, 1995; CROTTI *et al.*, 2006).

Entre as vazões testadas de 200 a 600 μ L/min, elegeu-se aquela que permitiu melhor reprodutibilidade dos sinais dos analitos observada por meio dos espectros de massa deles, ou seja, 400 μ L/min.

Além da escolha da vazão, fixou-se a temperatura do gás de dessolvatação (N_2) do turbo *spray* em 600°C que garantia plena evaporação do solvente na câmara de ionização, oriundo da fase móvel, necessária à excelência dos resultados dos analisadores de massas.

Os demais parâmetros para ionização e fragmentação dos compostos em MS/MS foram fixados de acordo com a determinação do fabricante para ionização de compostos no modo ESI (+) (Tabela 19).

Tabela 19. Parâmetros ajustáveis otimizados para o monitoramento automático das reações múltiplas dos analitos estudados, utilizando a fonte turbolon Spray API-ESI 3200.

TIPO	Unidade	VALOR
Fluxo de injeção	Vazão	10 ou 20 $\mu\text{L min}^{-1}$
Estabilização	Tempo	2 minutos
Gás de dessolvatação - N_2 (CUR)	Pressão	10 PSI
Voltagem do TurboSpray (IS)	Voltagem	+ 5500V
Gás de nebulização - Ar sintético (GAS1)	Pressão	18 PSI
Gás secante - Ar sintético (GAS2)	Pressão	0 PSI (off)
Gás de colisão - N_2 (CAD)	Pressão	alto

Por ionização é possível obter três formas ionizadas: (I) íons moleculares, por reações redox (oxidação/redução), produzindo íons moleculares do tipo (M^{++}) ou (M^{-}); (II) moléculas protonadas/desprotonadas (íons *quasi*-moleculares) por reações ácido-base de Brønsted-Lowry (protonação/desprotonação), produzindo moléculas protonadas ($[\text{M}+\text{H}]^+$ ou desprotonadas $[\text{M}-\text{H}]^-$); e moléculas cationizadas ou anionizadas, coordenação com íons metálicos como cátions (geralmente os da família 1A) formando moléculas cationizadas ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$) ou ânions (principalmente cloretos), originando moléculas anionizadas ($[\text{M}+\text{Cl}]^-$, etc) (CROTTI et al., 2006). Em substâncias que apresentam sistemas π conjugados, e que não apresentam funções básicas como aminas e carbonilas, ocorrem mais facilmente a redução e/ou oxidação que a protonação. Em compostos policíclicos aromáticos com potencial de oxidação inferior a 1,0 V (vsECS), foi facilmente observada a formação de espécies radicalares (BERKEL; ZHOUT, 1995). Nestes casos, a presença de íons moleculares (M^{++}) é predominante nos espectros de massas, enquanto que a molécula protonada ($[\text{M}+\text{H}]^+$) aparece em menor abundância relativa (CROTTI et al., 2006). É esperado que compostos heterocíclicos contendo N ou O sejam protonados (VUKOVIĆ et al., 2012) apresentando grupamentos básicos como aminas, amidas e ésteres, por isso devem ser analisados preferencialmente no modo positivo.

Algumas moléculas são mais susceptíveis à desprotonação. Moléculas que possuem pka superior a 3 (PAES, 2012) ou grupo ácido funcional como um fenol ou

carboxila, costumam doar prótons, sendo relativamente incomum nos agrotóxicos (ROZENTAL & HOZ, 2009), enquanto que compostos contendo exclusivamente C, H e O são suscetíveis à aceitação e doação de prótons (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; VESTAL, 2001).

Substâncias orgânicas, como os agrotóxicos, costumam não apresentar potencial redox ou sistemas com densidade eletrônica que favoreçam reações redox em ESI ((M^{+}) ou (M^{-})). Assim, reações ácido-base e coordenação com íons metálicos, principalmente Na^{+} e K^{+} são mais prováveis, gerando principalmente íons de moléculas protonadas, $[M+H]^{+}$; desprotonadas, $[M-H]^{-}$; cationizadas $[M+Na]^{+}$, $[M+K]^{+}$, $[M+NH_4]^{+}$; e/ou anionizadas $[M+Cl]^{-}$ (COLE, 1997).

Em estudo que buscava determinar 50 resíduos de agrotóxicos em alimentos para crianças menores de dois anos verificou que na análise por LC-MS/MS comparando o uso de fonte de ionização do tipo ESI no modo positivo e negativo, o modo positivo apresentou maior sensibilidade (DURDEN, 2007).

Outro teste similar foi feito na análise de 42 agrotóxicos em arroz, sendo que destes apenas azinsulfamurom, imazossulfamurom e bensussulfurom-metil puderam ser analisados em ambos os modos. Empregaram apenas o método de ionização positiva na análise de amostras por apresentar maior sensibilidade na detecção e quantificação dos fragmentos referentes aos íons advindos dos analitos ionizados positivamente e negativamente (PAREJA et al., 2011b).

Muitos são os trabalhos que buscam determinar resíduos de agrotóxicos em alimentos empregando LC $_{(ESI+)}$ MS/MS. Como exemplo tem-se a análise de inseticidas e herbicidas em amostras vegetais, onde o método pode determinar 18 resíduos (SINHA; VASUDEV; RAO, 2012). Em método capaz de determinar 98 tipos de organofosforados, envolvendo diversos tipos de alimentos, empregou-se também a fonte ESI(+) pela sua versatilidade e abrangência (CHUNG; CHAN, 2010).

Baseado nas informações acima e nos compostos que se queriam determinar, que possuem suscetibilidade maior à aceitação de prótons, e nas condições do teste, este monitoramento foi feito por meio da fonte electrospray no modo positivo (ESI(+)), que gerou íons protonados na forma $[M+H]^{+}$.

4.1.2. Estudos da ionização e obtenção da fragmentação

Para que o detector de massas faça a identificação dos compostos separados por Cromatografia Líquida é necessário que se indique quais íons e fragmentos são formados na fonte e no MS, respectivamente. Para tal, fez-se a infusão direta dos padrões no MS. Com a obtenção de íons $[M-H]^+$ e fragmentos das moléculas, registrou-se a intensidade do valor de m/z , verificando se esta era reprodutível sob as mesmas condições. Além disso, foram ajustadas e registradas as energias que promovem a ionização, fragmentação e seleção dos íons que serão detectados pelo MS. A primeira energia ajustável que entra em contato com o analito é a do potencial de desagrupamento (DP). Esta é responsável por focalizar o íon protonado ou desprotonado para o interior do orifício de entrada do cone, presente na fonte de ionização do espectrômetro. Outra energia configurada foi a do potencial de entrada (EP). Esta energia é responsável por focalizar e encaminhar o íon até o primeiro analisador de massas quadrupolar (Q1) do detector MS/MS. Para que o íon possa chegar à célula de colisão (Q2) e seja fragmentado foi configurada a energia do potencial de entrada e seleção do íon *quasi*-molecular na célula (CEP). Na célula de colisão (Q2) ocorre a fragmentação do íon que foi conduzido até este compartimento pelas energias através dos filtros (Q0 e Q1) anteriores. Esta energia deve ser tal que os fragmentos de quantificação (QT) e qualificação (QL) apresentem sinal intenso e reprodutível. Com os fragmentos formados, aqueles que forem selecionados para quantificação e qualificação do analito devem ser focalizados e direcionados até o detector propriamente dito. Para esta focalização, a energia do potencial de saída da célula (CXP) foi configurada para que os fragmentos fossem detectados e quantificados de forma intensa e constante, sob as mesmas condições.

Pretendia-se iniciar os trabalhos com 71 compostos que tinham os limites máximos de resíduos estabelecidos pela Anvisa para o arroz nos anos de 2009 e 2010. No entanto, não foram encontrados fornecedores para cinco (05) padrões dos agrotóxicos acetamiprido, metalaxil-m, penoxulam, picoxistrombina e tetraconazol. Além disso, para outros 25 compostos não foi possível otimizar os parâmetros no

modo ESI positivo (+), ou seja, conseguiu-se otimizar os parâmetros para ionização e detecção de 41 agrotóxicos aplicados na cultura do arroz irrigado, assim como o sulfametoxazol que fora escolhido como padrão controle do tipo padrão sub-rogado (PS), pois é um composto que dificilmente estaria no arroz e que pode ser encontrado e quantificado por este método apresentando intensidade idêntica à da maioria dos compostos que estão sendo investigados. Na escolha de um padrão controle do tipo padrão interno (PI) ou sub-rogado (PS) deve-se observar que o pico referente a este esteja bem resolvido e elua próximo aos picos dos analitos. O padrão controle não deve reagir com nenhum dos componentes da amostra e ser quimicamente similar aos analitos de interesse. Padrões internos são essenciais para análise que se utiliza do LC-MS/MS, especialmente quando há gradiente de eluição. Estes padrões servem para compensar alguns dos efeitos advindos de variações instrumentais, na solução eluente, nos preparos e dos efeitos de matriz (DIAO et al., 2013; WANG; CYRONAK; YANG, 2007).

Muitos trabalhos indicam o uso de padrões deuterados ou isótopos. Esta indicação está no fato de que isótopos como padrão controle sofreriam os mesmo efeitos que os analitos de interesse facilitando a correção dos resultados obtidos na análise das amostras (WOLSKA et al., 2009). No entanto, como na análise de múltiplos resíduos é difícil dispor de compostos deuterados para cada um dos analitos, sugere-se que o composto eleito como PI atenda às especificações do seu emprego. O uso de compostos deuterados poderia apresentar limitações, pois tendem a co-eluir com seus isótopos e gerar espectros de massa idênticos, resultando em supressão da ionização e diminuição da área do pico.

Em certo estudo em que se empregou LC-MS/MS para encontrar, em urina, resíduos de produtos que reduzem o colesterol, o ácido mevalônico foi determinado pois este é usado como marcador para estes produtos. Como padrão interno (PI) fora utilizado o ácido mevalônico deuterado, onde constatou-se elevado grau de efeito de matriz, com atenuação da resposta absoluta e variações da relação analito/PI (JEMAL; SCHUSTER; WHIGAN, 2003).

Como já foi mencionado, buscou-se obter o espectro de massas por meio da infusão direta no espectrômetro de massas. Dos compostos testados, de 25 não se conseguiu obter um espectro de massas reproduzível, após infusão direta na fonte

de ionização no modo positivo para íons do tipo $[M+H]^+$. A não obtenção do espectro de massas para estes compostos pode estar relacionada a diversos fatores. Moléculas do grupo químico dos ácidos ariloxialcanoico como 2-4 ácido diclorofenoxiacético (CARNEIRO et al., 2013) e o cialofop-p-butil possuem maior suscetibilidade a doar prótons, assim como o glifosato, que em pH superior a 2,6 inicia a dissociação do ácido carboxílico e, além disto, é facilmente degradado em ácido aminometilfosfônico (AMPA) (MARTINS JR, 2005). Segundo Demoliner em trabalho que se buscou desenvolver um método multirresíduos para determinação de agrotóxicos em água por LC MS/MS, dos 20 compostos ionizados, sete deles só foram possíveis no modo negativo, justificando a não ionização no modo positivo ocorrido em nosso estudo, como nos casos do 2-4 ácido diclorofenoxiacético e fipronil, além da bentazona, penoxulam, pirazossulfamurom, quinclorac, metsulfamurom-metílico (DEMOLINER, 2008).

No desenvolvimento de método para determinação de 44 herbicidas em arroz polido para o propanil e bentazona só foi possível obter ionização no modo negativo. Azimsulfuron, bensulfamurom, bromacil e imazossulfamurom em ambos os modos (+ e -) e os demais apenas no modo positivo (CARNEIRO et al., 2013; PAREJA et al., 2011a). No entanto, aqui não se obteve ionização em ESI(+) para azimsulfamurom. Este fenômeno pode ser justificado pela eventual fragmentação precoce da molécula na fonte. Em um estudo que trata da interpretação de espectros de massa obtidos após ionização por ESI(+), verificou-se que moléculas dos grupos das ureias podem sofrer fragmentação na fonte, impedindo a detecção, filtragem e fragmentação corretas pelos analisadores de massa, o que também pode ser a causa da não detecção do composto diflubenzurom. Na figura 32, estão indicados os possíveis sítios onde compostos dos grupos químicos das ureias podem sofrer esta fragmentação “prematura” (WEISSBERG; DAGAN, 2011). Além disso, diflubenzurom só pode ser determinado em estudos para determinação de resíduos em café pela ionização, em modo negativo, do tipo $[M - H]^-$ (PAES, 2012).

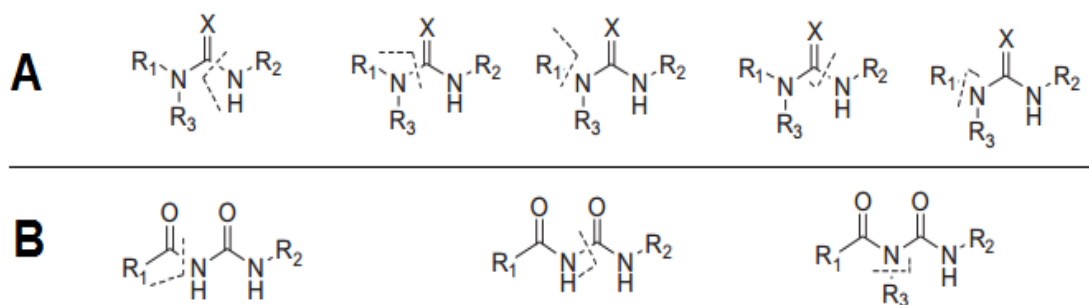


Figura 32. Sítios de moléculas do grupo da ureias, onde pode haver fragmentação prematura na fonte de ionização no modo ESI (+).

A: sítios correspondentes à molécula de azimsulfuron; B: sítios correspondentes à molécula de diflubenufom. **Fonte:** Adaptado de (WEISSBERG; DAGAN, 2011).

Fragmentações prematuras na fonte podem ocorrer com moléculas do grupo dos tiofosfatos como em alguns organofosforados. Neste trabalho não houve sucesso na ionização da parationa-metílica no modo ESI (+), apesar de, segundo KMELLÁR e colab. (2011), ser suscetível a esta ionização. No entanto, por ser esta molécula um tiofosfato poderia ser fragmentada na fonte durante a ionização ESI(+) (KMELLÁR et al., 2011; WEISSBERG; DAGAN, 2011). Na figura 33 está apresentado o sítio onde é possível ocorrer esta fragmentação e o fragmento mais comum gerado.

Sítio de fragmentação	Fragmento mais comum	Exemplos
	R= Aromático ou alquil	Etrimfos Fenitrothion

Figura 33. Sítio de moléculas de tiofosfatos com radical aromático, onde pode haver fragmentação prematura na fonte de ionização no modo ESI (+).

Fonte: Adaptado de (WEISSBERG; DAGAN, 2011).

Outro caso estudado de fragmentação prematura na fonte ocorre com moléculas do grupo dos carbamatos impedindo sua detecção ou perda da sensibilidade para estes compostos. Durante o processo de obtenção dos espectros neste trabalho, dois carbamatos não apresentaram espectro de massas no modo positivo por ESI, o carbossulfano e o benfuracarbe. De acordo com a figura 34,

existe suscetibilidade para promoção do rompimento da ligação entre o carbono ligado por uma dupla ligação com oxigênio e o oxigênio ligado ao radical R₂.

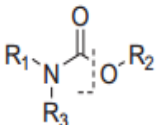
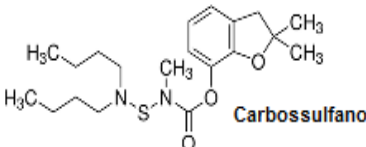
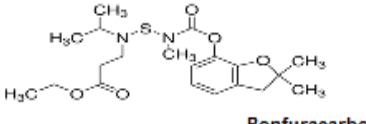
Sítio de fragmentação	Moléculas do presente estudo	Exemplos
	$R_1, R_3 \neq H$  	Pirimicarb Isoproturon

Figura 34. Sítio de moléculas de carbamatos, onde pode haver fragmentação prematura na fonte de ionização no modo ESI (+).

Fonte: Adaptado de (WEISSBERG; DAGAN, 2011)

Na análise de agrotóxicos em pimenta, por LC MS/MS, estudos determinaram a presença de hexaconazol, isazafos, isaxation, triazofos e kresoxim-metil cujas moléculas, exceto cresoxim-metil, foram ionizadas positivamente na forma $[MH^+]$, com ionização efetiva na forma $[MNa^+]$ (THURMAN et al., 2013).

Em estudo para determinar oito herbicidas éter difenílicos em águas, empregou-se a cromatografia em fase líquida acoplada ao espectrômetro de massa em tandem. Nesta determinação, independente da fonte utilizada, a ionização no modo negativo foi a forma empregada com sucesso (LAGANÀ et al., 2000a). Entre estes herbicidas éter difenílicos estava o oxifluorfem, um dos compostos utilizados no cultivo do arroz e que aqui não se conseguiu obter o espectro de massas por ESI (+), assim como também não o do etofemproxi.

Neste trabalho não se obteve o espectro de massas do clorotalonil após tentativa de ionização por ESI(+). Mas, no modo negativo poderia obter-se tal espectro. Buscando determinar simultaneamente fungicidas por diversas técnicas analíticas, certo estudo provou ser possível desenvolver método para determinação do clorotalonil por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS), cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodo (210nm) (LC-DAD) e detecção por espectrometria de massas (LC-MS), onde a ionização só foi possível no modo negativo do tipo $[M+COO]^-$ (SALAU et al., 1994), assim como para

determinação deste composto como um micro poluente em águas residuais (HUG et al., 2014).

Vários agrotóxicos do grupo dos piretroides são autorizados para aplicação no cultivo do arroz. Muitas destas moléculas não apresentaram suscetibilidade para ionização no modo positivo ($[M+H^+]$). Assim, não se obteve íons precursores para bifentrina, ciflutrina, beta-ciflutrina, alfa-cipermetrina, beta-cipermetrina, deltametrina, esfenvalerato, lambda-cialotrim e permetrina. Este resultado pode ser justificado por meio do estudo para determinação de 128 contaminantes em banana de CARNEIRO e colab. (2013), onde bifentrina e deltametrina só foram ionizados positivamente no modo $[M+NH^+]$, o que não poderia ser possível por nosso método pelos motivos anteriormente citados em relação ao aditivo facilitador de ionização. Na figura 35 pode-se observar a similaridade entre as estruturas das moléculas de piretroides utilizadas neste estudo e que não resultou na formação de íons *quasi*-molecular precursores do tipo $[M+H^+]$ (CARNEIRO et al., 2013).

Na determinação de piretroides em amostras ambientais, discutiram-se os aspectos relacionados a metodologias analíticas para determinação de mais de 20 destes agrotóxicos e constatou que a maioria dos métodos que viabiliza esta análise está relacionada à cromatografia gasosa associada ao detector ECD, principalmente pelo fato de os piretroides possuírem átomos halogenados (FEO; ELJARRAT; BARCELÓ, 2010). No entanto, o emprego de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas resulta na obtenção de método mais sensível e seletivo que emprega, principalmente, na ionização no modo negativo, pois resulta em melhoria nos processos de fragmentação (BONDARENKO; SPURLOCK; GAN, 2007; FEO; ELJARRAT; BARCELÓ, 2010). Outra dificuldade comum na determinação de piretroides é a conversão em isômero, que pode ocorrer tanto pela temperatura como por estar em contato com solventes polares como a água (LIU; QIN; GAN, 2005). Técnicas que empregam cromatografia líquida poderiam resolver problemas de isomerização dos piretroides, mas apresentam baixa detecção dos analitos prejudicando a determinação destes em níveis relevantes (FEO; ELJARRAT; BARCELÓ, 2010).

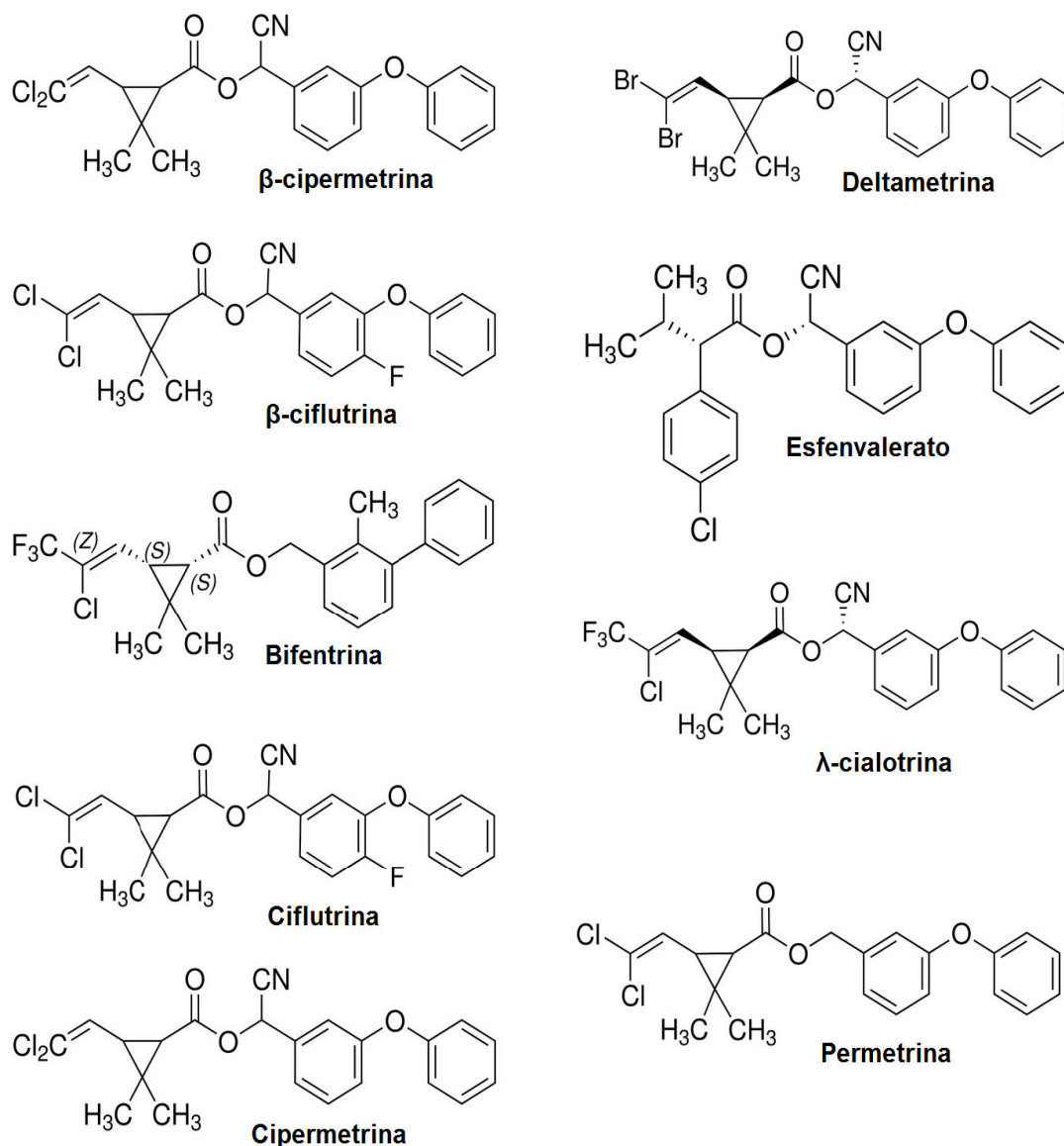


Figura 35. Estrutura molecular de piretroides correspondentes àquelas que não foram passíveis de ionização no modo ESI(+) para obtenção de íons *quasi*-molecular precusores do tipo $[M+H]^+$.

O fipronil, um pirazol, em estudos que se empregou MS/MS com ionização positiva, somente se obteve íons apenas na forma $[M+NH]^+$ (CARNEIRO et al., 2013; PAES, 2012), o que confere com o insucesso para obtenção de um íon do tipo $[M+H]^+$ neste trabalho.

Durante a preparação das soluções individuais padrão dos agrotóxicos, o ditiocarbamato (Ziram) foi o menos solúvel. Resolveu-se tal dificuldade preparando uma solução de 5µg/mL em acetonitrila a 10%, no entanto a solução apresentava turbidez quando retirada da refrigeração.

Além da baixa solubilidade, estes podem formar quelatos poliméricos ou complexos metálicos estáveis, insolúveis tanto em água como em solventes orgânicos (IRTH *et al.*, 1986; CALDAS *et al.*, 2009), apresentando K_{ow} extremamente baixo (1,23). Apesar de preferível, o desenvolvimento de métodos para multirresíduos, algumas classes de compostos necessitam de métodos específicos devido às suas desfavoráveis propriedades físicas e químicas. Os ditiocarbamatos são, na maioria das vezes, determinados em conjunto e expressos como CS_2 (produto da hidrólise ácida dos ditiocarbamatos), utilizando-se espectrofotometria ou cromatografia gasosa (CONCEIÇÃO, 2002) ou determinados individualmente por HPLC (MORIWAKI; YAMAGUCHI; FUKUSHIMA, 2001)

Finalmente, aqui não se conseguiu obter sucesso na execução da ionização da trifluralina, tão pouco na obtenção dos fragmentos. Em outros estudos, a trifluralina tem sido ionizada por meio de ESI(+) por protonação $[M+H^+]$, Apesar deste resultado, naqueles estudos esta tarefa tem apresentado um grande desafio, já que na determinação de 101 agrotóxicos em alimento e água, a trifluralina estava entre os oito compostos que apresentaram níveis elevados de LD devido à baixa resposta a ionização por ESI(+), onde o espectro de massas não registrou a formação de fragmentos e sim apenas a presença do íon *quasi*-molecular de m/z 336,11 (FERRER; THURMAN, 2007). Este resultado foi similar em recente trabalho que visava determinar nove poluentes orgânicos em água, onde a trifluralina foi único composto ionizado sem formação dos fragmentos (MASIÁ *et al.*, 2013). A estrutura química da trifluralina (Figura 36) parece tonar-se estável a dissociação induzida por colisão (CID) principalmente após protonação, sendo necessário maior energia para sua fragmentação. A fonte de ionização eletrônica (EI – Electron Ionization), empregada na cromatografia gasosa muitas vezes são inadequadas em função da grande energia aplicada, prejudicial a compostos facilmente fragmentados, porém, permite a obtenção de fragmentos de moléculas mais estáveis. Assim, ao contrário da cromatografia líquida, a cromatografia gasosa tem possibilitado a análise da trifluralina com monitoramento tanto do íon *quasi*-molecular como de seus fragmentos, a exemplo de estudos para determinação de múltiplos poluentes orgânicos em estações de tratamento por CG-MS (ROBLES-MOLINA *et al.*, 2013).

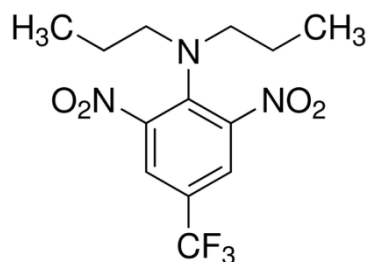


Figura 36. Estrutura molecular da trifluralina, uma dinitroanilina.

Para os compostos onde foi possível gerar um íon precursor após otimização dos parâmetros de ionização e detecção com obtenção dos espectros de massa reprodutíveis, determinou-se as transições monitoradas do modo de aquisição MRM com ESI (+), assim como potencial de desagrupamento (DP), potencial de entrada (EP), potencial de entrada na célula (CEP), as energias de colisão (CE) e o potencial de saída da célula de colisão (CXP), para 41 dos 66 compostos trabalhados. A partir daí, foram selecionados os fragmentos QT e QL para cada um dos composto (Tabela 20). A intensidade de sinal do fragmento QT é diretamente relacionada com a quantificação do analito. Este fragmento QT deve apresentar intensidade de sinal reprodutível sob as mesmas condições e, preferencialmente, possuir maior intensidade que os demais fragmentos e o íon *quasi*-molecular. QL, por sua vez, possui a função de confirmar a origem de QT, ou seja, deve ser detectado simultaneamente para que o detector confirme que QT é um fragmento do íon *quasi*-molecular que, por sua vez, advém do analito e que, preferencialmente, QL gere um sinal de grande intensidade ou maior que o de QT.

O tempo de residência para monitoramento de cada transição (tempo de permanência ou *Dwell Time*) deve ser o menor possível para que informações de outras transições não sejam perdidas. Assim, em casos extremos, a cada 2s ou 2000ms, todas as transições devem ser monitoradas. Além disso, quanto maior o tempo de dedicação alocada à transição de quantificação (QT) menor a resolução dos picos cromatográficos. Por outro lado, caso o tempo seja inadequadamente reduzido, a quantificação pode ser prejudicada. Assim, busca-se empregar a menor duração possível para atender as necessidades de monitoramento de cada composto, sem afetar a quantificação ou a resolução.

Tabela 20. Parâmetros otimizados em MS/MS para análise de 41 compostos, para emprego de MRM com ionização por ESI (+).

PESTICIDAS	MRM transição (m/z)		DP (V)	CE (eV)		EP (V)	CEP (V)	CXP (V)		Dwell Time (ms)
	QT (m/z)	QL (m/z)		QT	QL			QT	QL	
Azoxistrombina	404,03>372,10	404,03>329,10	246	19	31	4.500	34.000	6	6	10
Bentazona	241,05>199,10	241,05>107,10	51	13	35	3.000	8.000	6	4	10
Bispiribac-sódio	431,03>275,00	431,03>413,00	21	19	19	5.000	18.000	6	6	10
Carbendazim	192,10>160,00	192,10>132,10	36	23	39	5.000	12.000	4	4	50
Carbofuran	222,17>123,10	222,17>165,10	21	27	15	6.500	12.000	4	4	10
Carboxina	236,14>143,10	236,14>43,10	36	19	51	4.000	14.000	4	6	10
Ciclosulfamuron	422,03>260,90	422,03>218,00	31	21	31	5.000	18.000	6	4	10
Cicloxidim	326,11>280,10	326,11>180,00	31	17	25	4.000	16.000	6	4	10
Ciproconazol	293,09>70,00	293,09>125,10	36	35	37	4.500	14.000	4	4	10
Clomazone	241,15>126,00	241,15>125,00	36	25	25	7.000	14.000	4	4	10
Cloranantiprole	483,85>452,90	483,85>286,00	161	21	23	6.000	20.000	6	6	10
Difenoconazol	407,22>251,90	407,22>251,00	41	33	29	5.000	18.000	4	6	10
Epoconazol	331,06>101,10	331,06>102,10	61	67	69	4.500	16.000	4	4	10
Etoxisulfamuron	399,05>260,70	399,05>218,00	41	23	39	2.500	34.000	4	4	10
Fenoxaprop	363,06>289,00	363,06>77,10	106	19	79	4.000	18.000	6	4	10
Furatiocarb	383,14>194,90	383,14>162,20	316	21	19	5.000	16.000	4	4	10
Imazapic	276,12>231,10	276,12>163,00	56	21	39	4.500	14.000	4	4	50
Imazapir	262,15>217,00	262,15>69,10	41	21	39	6.500	14.000	4	4	50
Imazetapir	290,12>86,10	290,15>245,00	46	41	21	5.000	16.000	4	4	10
Imidacloprida	257,09>210,10	257,09>176,00	26	17	19	6.500	16.000	4	4	10
Malaoxon	315,04>127,00	315,04>98,90	26	17	31	4.000	16.000	4	4	10
Malationa	331,04>127,00	331,04>98,90	26	17	31	3.000	18.000	4	4	10
Metsulfuron-metil	382,10>167,00	382,10>141,00	31	19	21	5.500	28.000	4	4	10
Microbutanil	290,04>70,00	290,04>125,00	41	37	39	4.500	14.000	4	4	10
Oxadiazon	346,06>304,00	346,06>184,90	31	17	37	6.500	28.000	6	4	10
Paraoxom-metil	248,02>202,00	248,02>109,00	46	19	35	6.500	14.000	4	4	10
Picloram	242,97>224,90	242,97>196,90	31	15	21	6.500	14.000	4	4	10
Pirazosulfamuron	415,01>182,00	415,01>83,00	31	23	71	4.500	22.000	4	4	10
Pirimifós-metilico	305,93>108,10	305,93>164,20	21	41	23	12.000	16.000	4	4	10
Quinclorac	243,00>162,00	243,00>224,90	26	15	43	3.000	14.000	6	4	10
Pendimentalin	282,00>211,90	282,00>91,20	26	15	31	4.000	15.000	4	4	(*)
Propiconazol	242,80>158,9	242,80>41,00	41	36	55	4.000	15.000	4	6	(*)
Tebuconazol	309,11>70,00	309,11>71,00	36	41	39	4.500	16.000	4	4	10
Tiabendazol	202,08>175,00	202,08>131,00	56	33	43	4.000	10.000	4	4	50
Tiametoxam	292,03>211,10	292,03>132,10	26	15	27	3.500	16.000	6	4	50
Tiobecarb	259,05>126,00	292,03>125,00	26	21	21	5.500	14.000	4	4	10
Tiodicarb	355,03>88,00	355,03>108,10	26	21	19	3.500	18.000	4	4	10
Tiofanato metílico	343,08>151,00	343,08>93,00	26	23	67	6.000	16.000	4	4	10
Triciclazol	190,08>136,10	190,08>162,90	51	35	31	10.000	12.000	4	4	10
Triclopir	257,99>211,80	257,99>147,90	41	17	37	3.000	12.000	4	4	10
Trifloxitrombina	409,07>186,10	409,07>145,00	21	21	59	9.500	16.000	4	4	10
Sulfametoxazol (PS)	254,02>156,00	254,02>108,10	31	19	33	5.500	14.000	4	4	10

QT: Quantificação; QL: Qualificação. DP: potencial de desagrupamento; CE: energia de colisão; EP: potencial de entrada; CEP: potencial de entrada na célula; CXP: potencial de saída da célula; Dwell time (tempo de residência). (*) Dwell-time não foi estabelecido, pois não havia padrão para dar continuidade aos trabalhos; PS: padrão controle do tipo surrogado.

Neste trabalho, e após testes, e na maioria dos casos, um tempo de residência de 10ms foi apropriado, porém, para tiametoxam, tiabendazol, imazapir, imazapic e carbendazim teve-se que dedicar um tempo maior. Para obter sucesso no processo de monitoramento dos referidos fragmentos de QT, 50ms foi o tempo necessário. Na figura 37 a comparação dos picos cromatográficos obtidos em função da influência com emprego de tempo de residência de 10 (A), 20 (B), 50 (C) e 70ms (D) para monitoramento da transição de quantificação de m/z 192>160 do carbendazim.

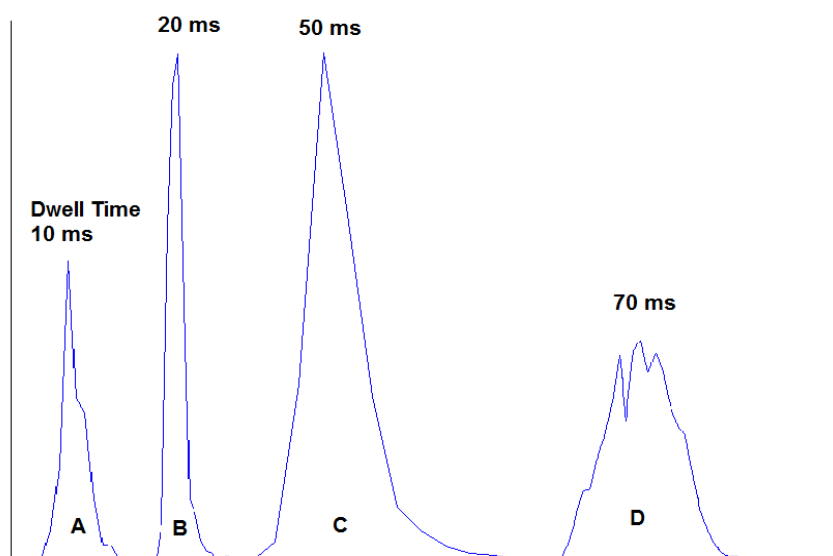


Figura 37. Picos do carbendazim obtidos em função dos diferentes tempos de residência (*dwell times*) empregados, para o monitoramento do íon de quantificação m/z 160 (QT).

A seguir os espectros de massas onde se identifica os íons *quasi*-molecular e os fragmentos de alguns dos analitos ionizados no método aqui desenvolvido.

4.1.2.1. Azoxistrombina

Azoxistrombina possui massa de 403,03g/mol. Após protonação passa a possuir massa de 404,03g/mol. Com a fragmentação foram gerados íons, sendo os de m/z 372,10 [M-OCH₃] e 329,10 [M-OCH₃-CO-CH₃] eleitos fragmentos QT e QL em função da intensidade e reprodutibilidade do sinal no espectro de massas. Segundo outros estudos o fragmento 344,60 [M-CO₂CH₃] poderia ser empregado

como fragmento QL (POLATI *et al.*, 2006), porém aqui neste trabalho este fragmento apresentou intensidade variável, por isso foi preciso selecionar o fragmento com a terceira maior intensidade (Figura 38), identicamente a outros estudos (RODRIGUES, 2010).

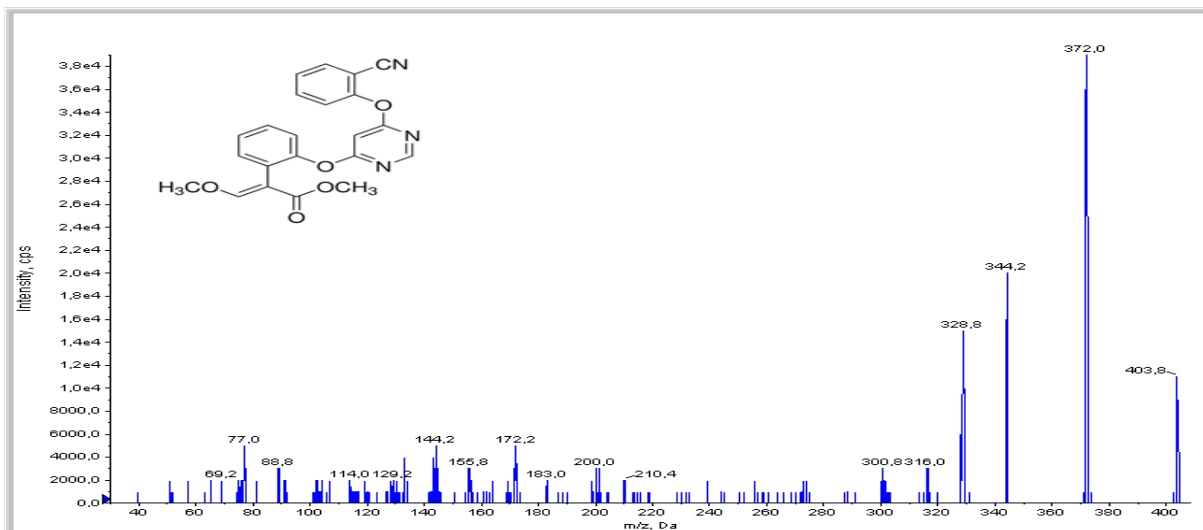


Figura 38. Espectro de massas do fungicida azoxistrombina, após ionização no modo ESI(+).

4.1.2.2. Bentazona

Bentazona é um herbicida com massa de $240,28 \text{ g mol}^{-1}$. Por meio do método aqui estudado conseguiu-se obter um íon protonado $[M+H]^+$, no qual os fragmentos com m/z 199,10 e 107,10 foram selecionados como fragmentos QT e QL (Figura 39). Estudos demonstram que a ionização por protonação da bentazona, apesar de possível, é menos estável e reprodutível que a ionização no modo negativo $[M+H]^-$, onde os fragmentos formados são 197 e 175 (KOPPEN; SPLIID, 1998; WODE *et al.*, 2012), sugerindo a ionização via ESI(-).

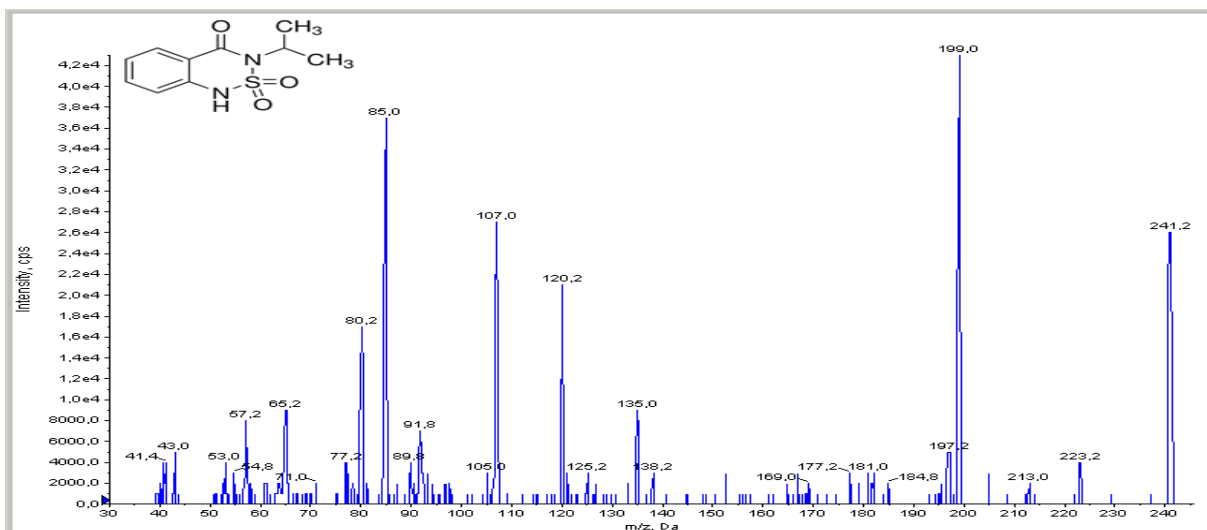


Figura 39. Espectro de massas do herbicida bentazon, após ionização no modo ESI(+).

4.1.2.3. Bispiribac-sódio

A massa do bispiribac-sódio é de $452,36 \text{ g mol}^{-1}$, no entanto, durante o monitoramento de íons encontrou-se apenas o íon *quasi*-molecular com m/z de 431,03. Este fato pode ser explicado pela dissociação do bispiribac-sódio que leva a perda de 23 g mol^{-1} da massa e posterior adição de um hidrogênio. A partir desta molécula é que se obtêm os fragmentos de bispiribac sendo o de quantificação (QT) com massa igual a 275 ($[M-C_6H_7O_3N_2]$) e de confirmação (QL) com valor de m/z 413 $[M-18]$ (Figura 40).

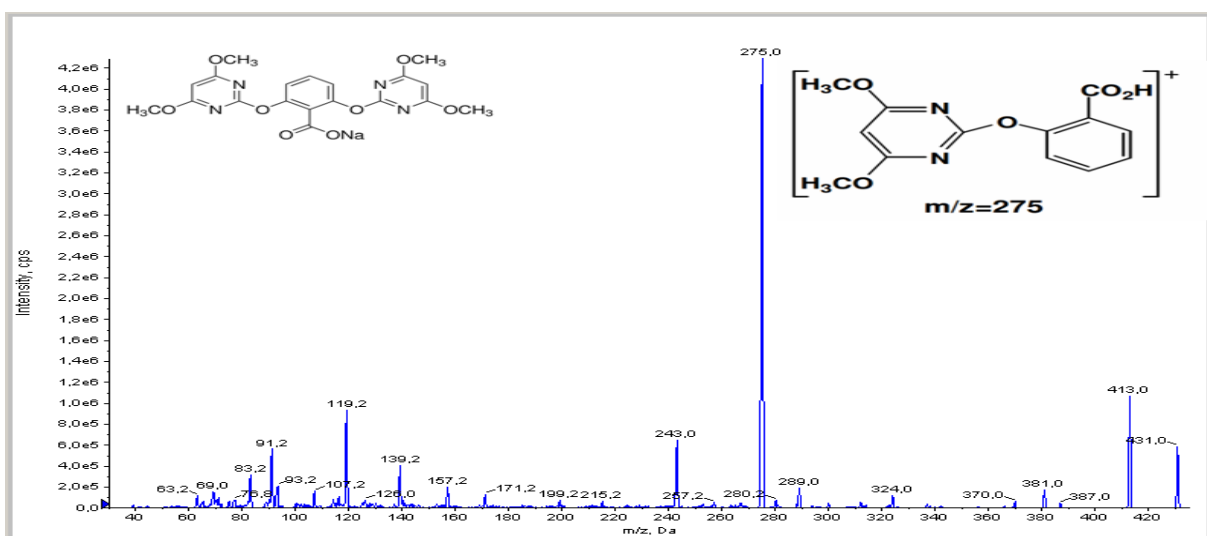


Figura 40. Espectro de massas herbicida bispiribac-sódio, após ionização por ESI (+).

4.1.2.4. Carbendazim

Neste estudo, tanto a forma de ionização como os íons de que compõem a transição de quantificação (160 [M-31] [OCH₃]) e qualificação (132,10 [M-57] [M-CO₂-CH₃]) (Figura 41), do carbendazim conferem com os resultados de KUSSUMI (2007) em seu estudo para determinação de fungicidas benzimidazólicos em milho (KUSSUMI, 2007).

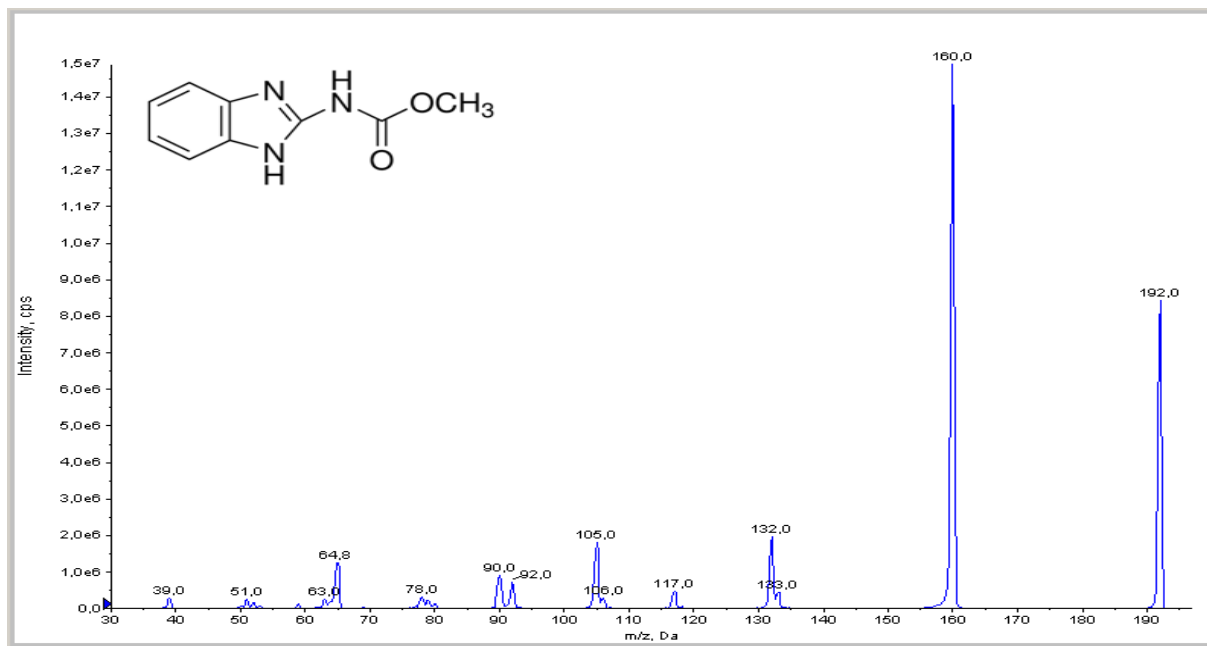


Figura 41. Espectro de massas do fungicida carbendazim após ionização por ESI (+).

4.1.2.5. Carbofuram

Carbofuram é um inseticida do grupo dos carbamatos que possui massa de 221,26g/mol e ionizado por ESI(+) apresenta m/z de 222,17. Os fragmentos formados nas condições empregadas neste estudo geraram fragmentos de m/z 123 e 165 bastante definidos e que foram eleitos como fragmentos QT e QL, respectivamente (Figura 42). Em estudo que desenvolveu método para determinação de resíduos em água de abastecimento, o carbofuram apresentou os mesmos fragmentos de QT e QL (Figura 43) (DEMOLINER, 2008).

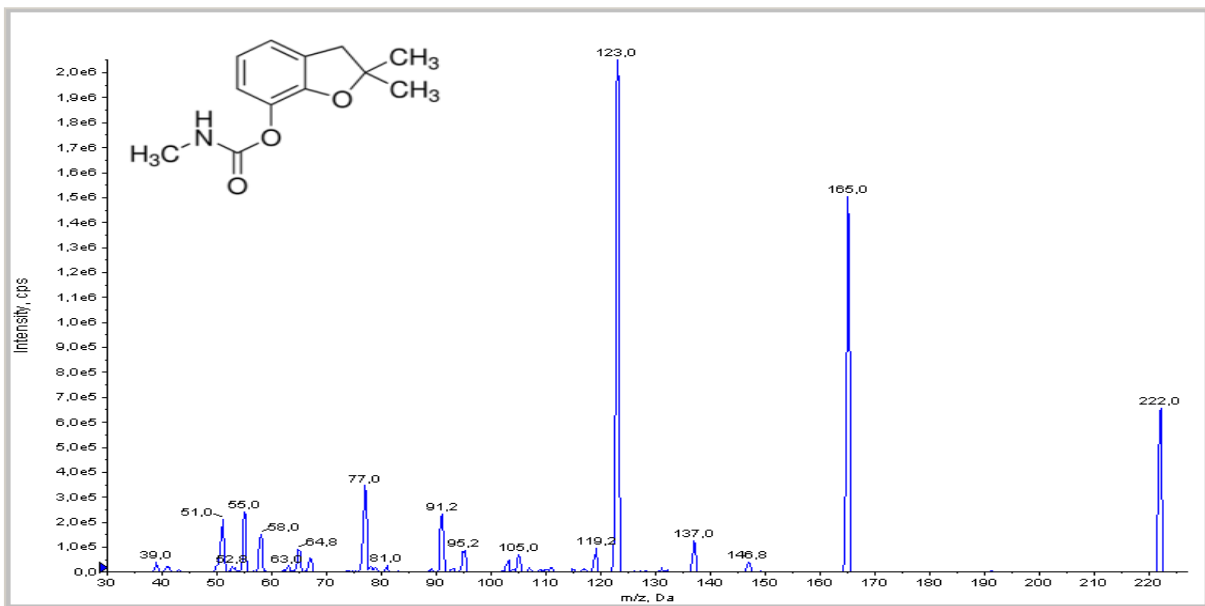


Figura 42. Espectro de massas do inseticida carbofuran, após ionização por ESI (+).

Nota-se que no espectro de massas da figura 43 existe um fragmento com m/z 74 de maior intensidade que os demais. O referido fragmento não foi selecionado para identificação ou quantificação desta molécula por corresponder a fragmento de qualquer anel aromático de vários compostos (DEMOLINER, 2008).

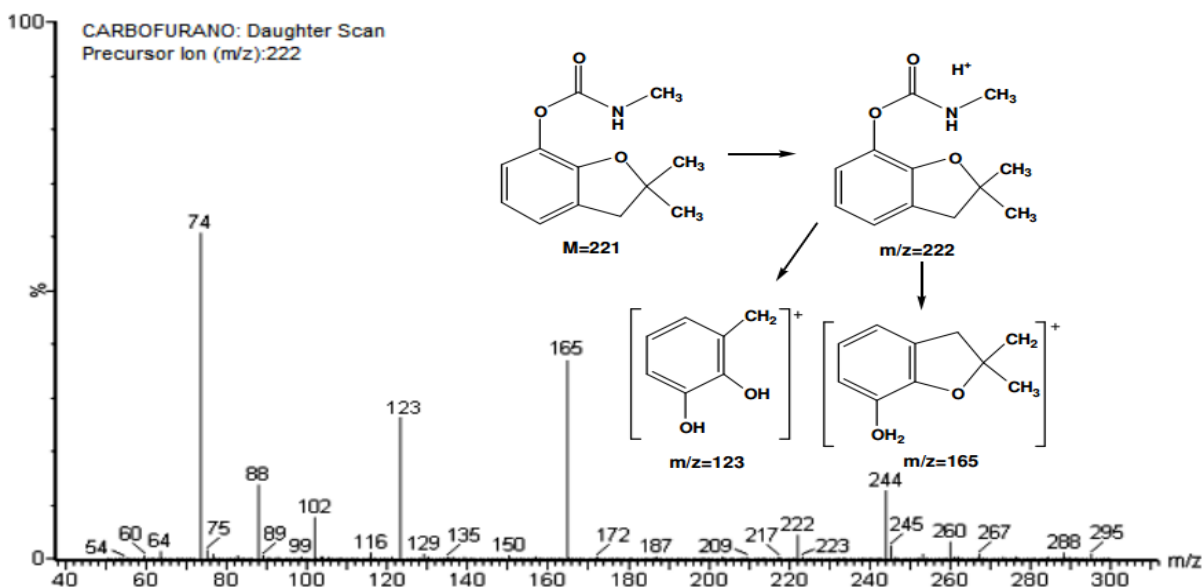


Figura 43. Espectro de massas do carbofuran obtido em estudo de determinação de resíduos em água de abastecimento. Fonte: (DEMOLINER, 2008).

4.1.2.6. Ciproconazol

O ciproconazol ($291,78 \text{ g mol}^{-1}$) ionizado apresentou m/z 293,09. Após dissociação induzida por colisão os fragmentos selecionados como fragmentos de QT e QL no método deste estudo para o monitoramento de reações múltiplas na determinação do ciproconazol foram os de valor m/z 70 e 125 (Figura 44).

Em estudo que desenvolveu método para determinação de 20 resíduos de agrotóxicos em caju, os fragmentos monitorados para determinação do ciproconazol foram os mesmos que os aqui estudados, porém 125 foi o de QL e 70 o de QT, empregando equipamento e energia de colisão (CE) diferentes (SILVA et al., 2014). Em outro trabalho, onde Soler e colab. (2007) determinaram 12 resíduos em alimentos, o ciproconazol foi determinado em função das transições contendo os mesmos fragmentos de quantificação e qualificação que aqui neste trabalho, mas empregando equipamento diferente e energia próxima à empregada no estudo anteriormente citado, e diferente do aqui estudado (SOLER; JAMES; PICÓ, 2007).

A obtenção de fragmentos é dependente do modelo do equipamento, como das energias de colisão (CE) empregados.

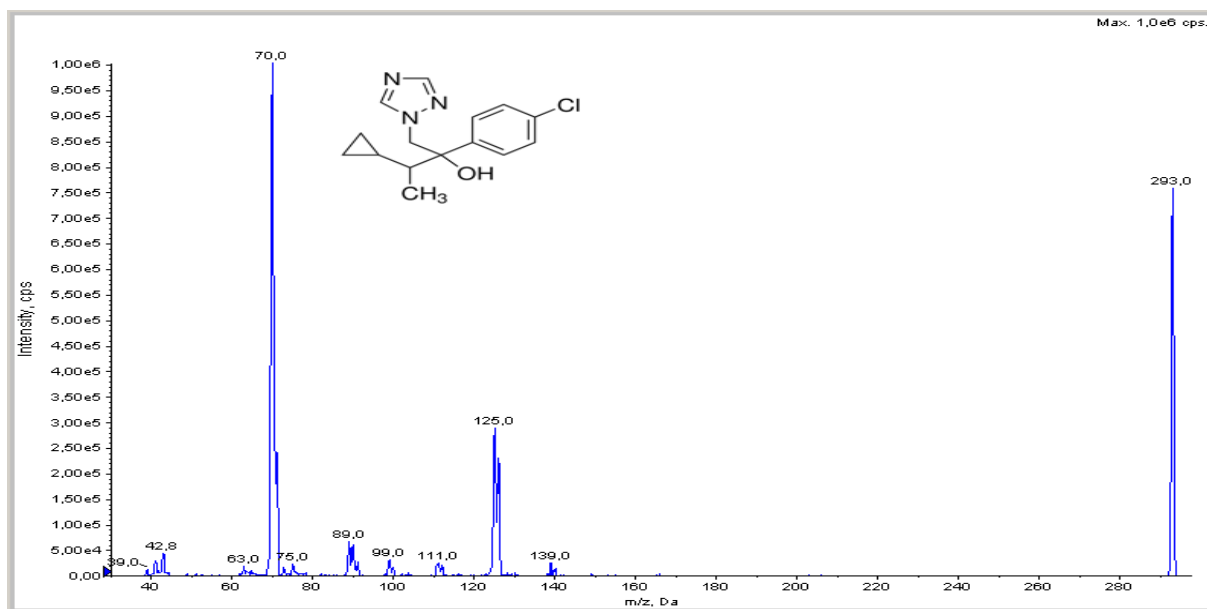


Figura 44. Espectro de massas do fungicida ciproconazol, após ionização por ESI (+).

4.1.2.7. Clomazone

Clomazone que em ESI(+) apresentou íon de m/z de 241,15 e após CID fragmentos de m/z 126 ([M-C₅H₈O₂N]) e 125 [M-C₆H₈O₂N] (Figura 45) comportou-se de forma similar ao que foi apresentado em outros trabalhos, a não ser pelo de íon de QL onde foram formados fragmentos de grande intensidade com m/z de 100 (DEMOLINER, 2008; DEMOLINER et al., 2010).

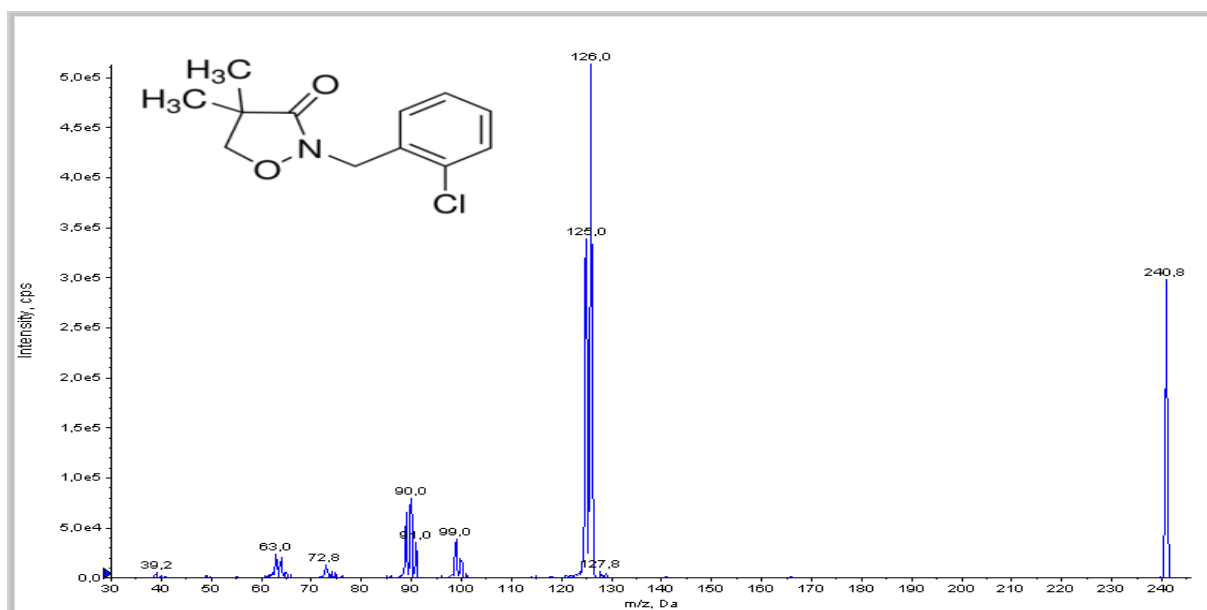


Figura 45. Espectro de massas do herbicida clomazone, após ionização por ESI (+).

4.1.2.8. Imazapic, imazapir e imazetapir

Após ionização por ESI(+) e fragmentação, os espectros de massa para imazapic (fragmentos de QT m/z 231 e QL 163) (Figura 46), imazapir (fragmentos de QT m/z 217 e QL 69,10) (Figura 47) e imazetapir (fragmentos de QT m/z 86,1 e QL 245) (Figura 48), mesmo após testadas diversas energias de colisão (CE), obteve-se baixo nível de fragmentação. Fato este evidenciado tanto pela alta intensidade do sinal do íon *quasi*-molecular (sinal de maior m/z), quanto pela baixa intensidade dos demais sinais correspondentes aos fragmentos. Isto pode ter ocorrido em função da estabilidade da molécula e sua possível ampliação após a protonação decorrente da ionização.

Em estudo para estabelecer método para determinar compostos emergentes em solos, o fragmento formado tanto para imazapir como para imazetapir foram gerados a partir da quebra da ligação entre o anel aromático contendo nitrogênio e a carboxila desprotonada ($[-COO^-]$), produto da ionização no modo ESI(-) (LAGANÀ et al., 2000b), possivelmente responsável pela geração da instabilidade desta e consequente fragmentação, o que resultaria na maior formação de fragmentos em relação ao método aqui estudado, onde os fragmentos são idênticos mas a carboxila na forma $[-COOH]$, ou seja, o íon quasi-molecular se encontrava mais estável e menos susceptível à fragmentação, gerando poucos fragmentos, mesmo que a quebra tenha ocorrido com a subtração da carboxila ($[M-COOH]$). Para imazapir, o fragmento do tipo $[M-COOH]$ foi o 231, para o imazetapir, 217 e para o imazetapir, 245 m/z. O baixo nível de fragmentação pode resultar na obtenção de limites de quantificação (LQ) maiores e, portanto, o método pode apresentar baixa sensibilidade aos analitos envolvidos.

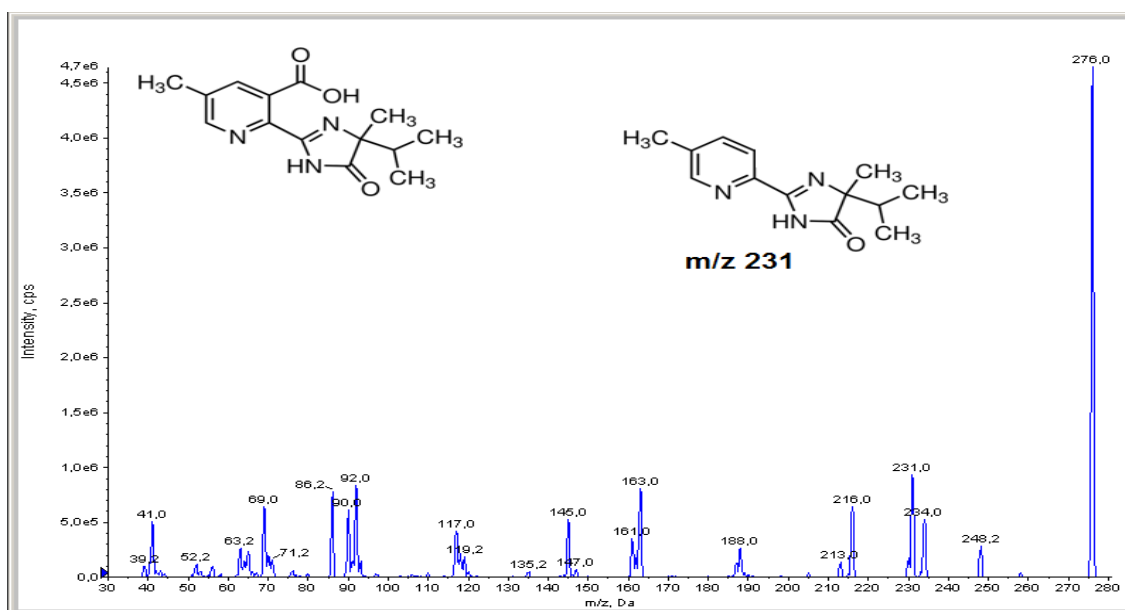


Figura 46. Espectro de massas do herbicida imazapir, após ionização por ESI (+).

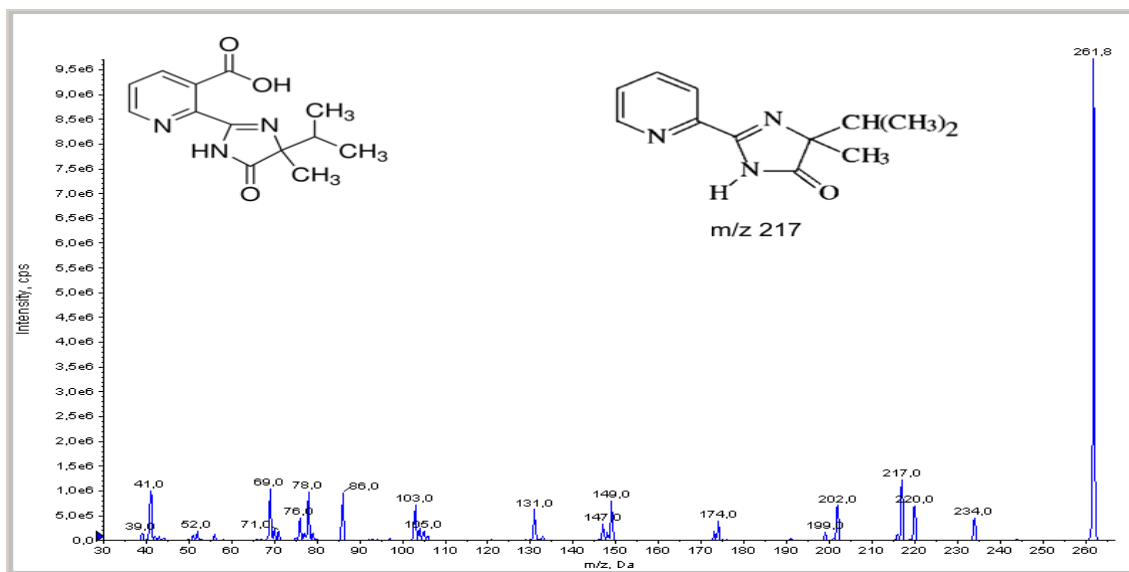


Figura 47. Espectro de massas do herbicida imazapir, após ionização por ESI (+).

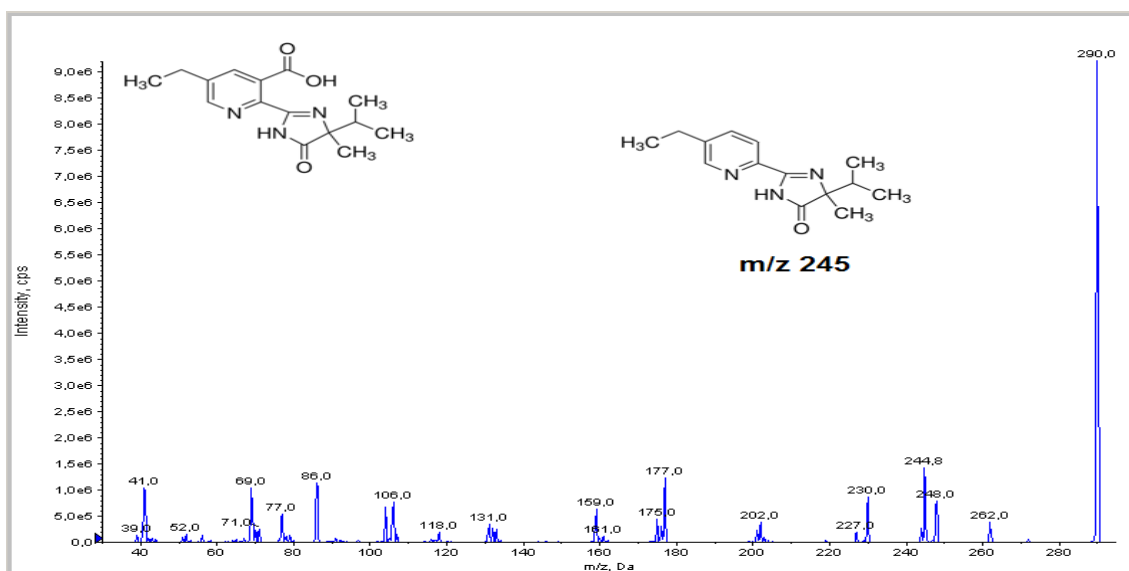


Figura 48. Espectro de massas do herbicida imazetapir, após ionização por ESI (+).

4.1.2.9. Malaoxom e Malationa

Os inseticidas malaoxom (dietil-éster) e malationa (organofosforado), apesar de possuírem diferentes massas, 314,19 e 330,36g/mol, respectivamente, após otimização dos parâmetros, apresentaram fragmentos de QT ($C_6H_7O_3^+$) e QL ($C_4H_3O_3^+$) (GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ; FERNANDEZ-ALBA, 2007) com m/z idênticos. Estes fragmentos foram mantidos, pois em espectrometria de massa o conceito de pontos de identificação (IPs), que possibilita a diferenciação de uma

molécula se as transições de quantificação, e de confirmação ou o tempo de retenção for diferente de uma molécula para outra. Assim, como no método de separação aqui estudado, o malaoxon e malationa apresentaram tempos de retenção distintos, permitindo garantir a identificação inequívoca destes analitos (EC (SANCO/12571/2013), 2013). Nas figuras 49 e 50 os espectros de massa do malaoxon e malationa.

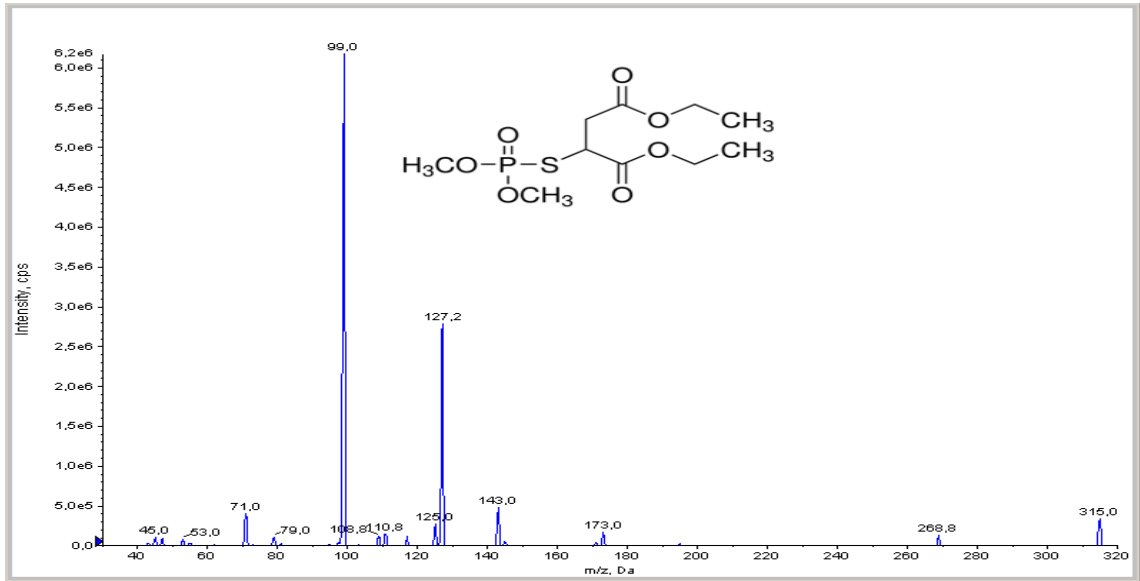


Figura 49. Espectro de massas do inseticida malaoxon, após ionização por ESI (+).

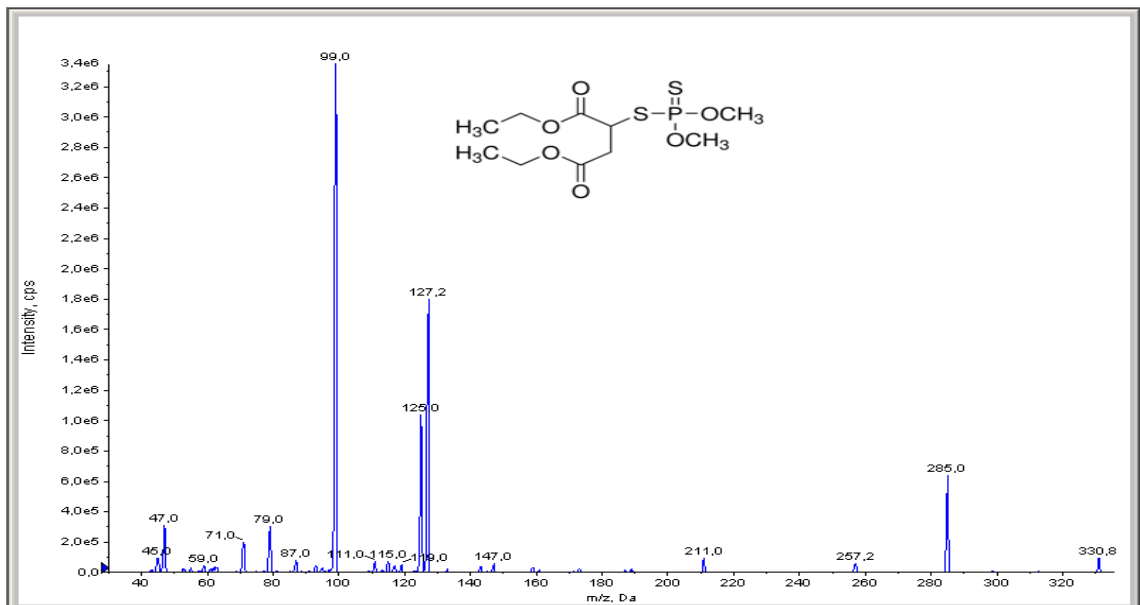


Figura 50. Espectro de massas do inseticida malationa, após ionização por ESI (+).

4.1.2.10. Triclopir

O triclopir possui massa de $256,5 \text{ g mol}^{-1}$ que, após ionização ESI(+), apresenta uma m/z de 257,99. Ao fragmentar-se por CID gera fragmentos de m/z 211,80 (($\text{C}_5\text{HCl}_3\text{NOCH}_3$), [M-45], [M-COOH]) e 147,90 (($\text{C}_5\text{HCl}_2\text{NH}_2$), [M-110,5], [M-OCH₂COOH-Cl]) para QT e QL, respectivamente. Segundo alguns autores, a ionização do triclopir tem sido bem sucedida quando em ESI(-) (REEMTSMA; ALDER; BANASIAK, 2013). Isto pode estar relacionado à presença de grupo ácido funcional carboxila (ROZENTAL; HOZ, 2009). No entanto, por possuir um nitrogênio como um composto heterocíclico (VUKOVIĆ et al., 2012), pode se comportar também como uma base, ou seja, uma molécula de caráter anfótero. Isto pode ter viabilizado a ionização no modo positivo, confirmado pela obtenção do espectro de massas (Figura 51).

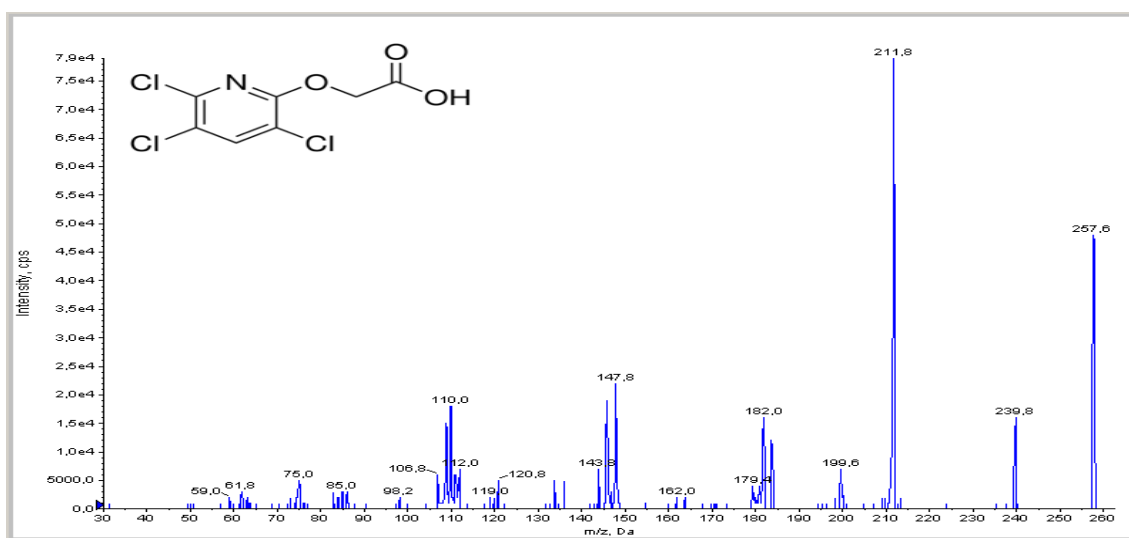


Figura 51. Espectro de massas do herbicida triclopir, após ionização por ESI(+).

4.1.2.11. Sulfametoxazol (PS)

Para detecção do sulfametoxazol, empregado como padrão controle do tipo surrogado (PS), foi necessário determinar quais fragmentos de QT e QL seriam monitorados. Assim, após infusão direta do sulfametoxazol obteve-se o espectro de massas para este composto (Figura 52) e selecionados os referidos fragmentos.

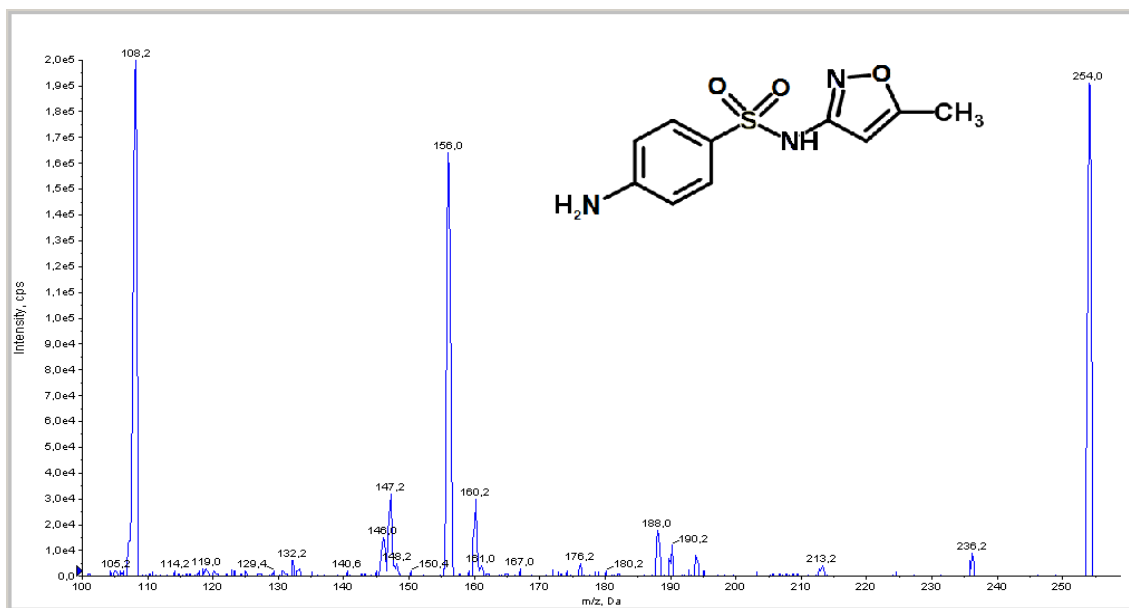


Figura 52. Espectro de massas do sulfametoxazol, composto escolhido como padrão surrogado (PS).

Para os demais compostos onde foi possível obter a ionização no modo ESI(+), e não foram identificadas peculiaridades consideradas diferentes das anteriormente discutidas, os espectros de massa estão no apêndice B.

4.2. SISTEMA CROMATOGRÁFICO DE SEPARAÇÃO

Na cromatografia em fase líquida, acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), deve-se empregar, na fase móvel, um solvente ou mistura, pensando não somente no processo cromatográfico, mas também na influência do solvente no processo de ionização. O emprego de soluções aquosas contendo solvente orgânico permite dispor de elevada constante dielétrica com baixa tensão superficial, o que facilita a formação de íons e a pulverização do solvente, o que melhora a formação do aerossol do electrospray com menores gotas em função da baixa viscosidade. Resultados de pesquisas com emprego de acetonitrila e metanol demonstram que a acetonitrila, em função da sua viscosidade, produz gotas menores que resultam numa dessolvatação mais eficiente (KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009). Em termos cromatográficos, a acetonitrila como fase orgânica tem favorecido a obtenção de picos mais resolvidos e delgados, com baixa pressão da bomba e necessidade de menor tempo para o reequilíbrio (MA et al., 2014).

Além da aplicação do solvente, ou um gradiente deste, para promover a separação dos analitos, existe a necessidade da presença de aditivo que varia em função do modo de ionização, positivo ou negativo, ou ainda, dependendo do tipo de próton que se deseja adicionar ou extrair da molécula que será ionizada. O aditivo é indispensável para obtenção de um sinal estabilizado do eletrospray, porém, apesar da pequena possibilidade, pode suprimir os sinais do íon quasi-molecular (KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009; PENG; FARKAS, 2008). Alguns estudos afirmam que estes aditivos não devem estar em concentração superior a 20mmol/L, (MARTINS JR, 2005) ou mesmo acima de 10mmol/L (KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009), pois seus aductos competem pela transferência de íons da fase líquida para a gasosa. Muitos trabalhos têm utilizado com sucesso ácido fórmico 0,1% ou 2,17mmol/L como aditivo em ESI (+) em um ou mais solventes da fase móvel (FONTANA; BOTTINI, 2014; LING et al., 2014; PIZZUTTI et al., 2007). Assim sendo, utilizou-se esta concentração para emprego no método aqui estudado.

Em relação às condições cromatográficas, inicialmente promoveu-se a separação empregando-se vazões mais baixas com fase móvel de maior polaridade e forno da coluna desligado (Tabela 14).

Utilizando estes parâmetros supracitados não se obteve uma boa separação com excessivas co-eluições e o tempo de retenção do primeiro analito foi superior a 12min, que somados ao tempo de condicionamento eram necessários mais de 18 min de análise para início do aparecimento dos compostos entre uma injeção e outra, ou seja, metade do tempo de análise, que era de 36 min. Na figura 53 está o cromatograma, fruto das condições cromatográficas apresentadas na Tabela 14.

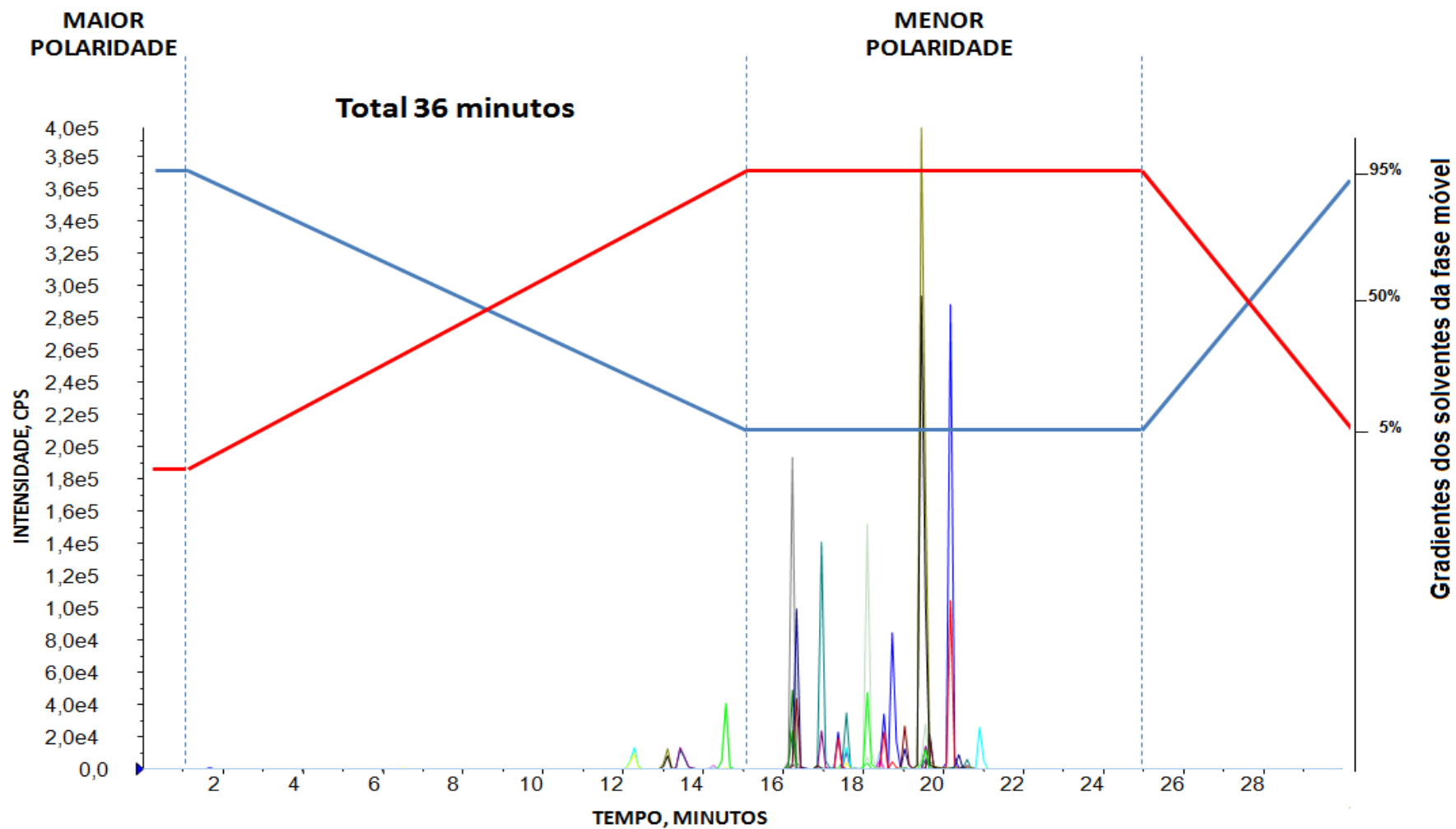


Figura 53. Exemplo de cromatograma obtido por LC-MS/MS dos fragmentos de quantificação, inicialmente obtido, utilizando-se os parâmetros da tabela 14. **Linha azul** indica a proporção do eluente mais polar presente na fase móvel (95 a 5%) e a **linha vermelha** indica a proporção de eluente menos polar presente na fase móvel (5 a 95%).

Após ajustes modificando vazão, polaridade do solvente e temperatura da coluna, o tempo de análise cromatográfica passou de 36 para 15min. Com aumento da vazão para 400µL/min, ligou-se o forno da coluna para mantê-lo a 40^oC, para promover a diminuição da viscosidade da fase móvel facilitando a passagem da fase móvel pela coluna.

Na cromatografia líquida a temperatura do forno pode reduzir ou evitar variações no tempo de retenção e melhora na resolução cromatográfica (LEITE, 2008). Ensaio analisando 150 agrotóxicos com LC-MS/MS em amostras vegetais variando a temperatura de 20 a 50^oC não apresentaram influência na largura da base do pico, mas diminuíram o tempo de retenção dos compostos, provavelmente pela diminuição da viscosidade da fase móvel (KMELLÁR et al., 2011). Na cromatografia líquida a temperatura pode influenciar no fator de retenção (K) e no fator de seletividade (α) podendo diminuir de 1 a 2% o tempo de retenção dos compostos a cada 1^oC (LANDBERG; LUNDBLAD; PÅHLSSON, 1998). Além disso, o número de pratos teóricos pode ser inicialmente aumentado com a elevação da temperatura (YANG, 2006), favorecendo a melhora na resolução cromatográfica. A partir dos ajustes supracitados e, após diminuição da polaridade da fase móvel, houve menos co-eluição dos compostos, com menor tempo para o início da detecção. Na tabela 21 estão listadas as melhores condições obtidas para separação, por cromatografia líquida, dos compostos analisados.

Tabela 21. Exemplo de parâmetros de separação fixados para separação dos agrotóxicos por cromatografia líquida e que serão empregados na validação do método.

TEMPO (min)	VAZÃO (µL/min)	ÁCIDO FÓRMICO 0,1% (Eluente de maior polaridade)	ACETONITRILA 95% (Eluente de menor polaridade)
0,00	400	80,0	20,0
1,00	400	80,0	20,0
10,00	400	5,0	95,0
12,00	400	5,0	95,0
12,01	400	80,0	20,0
15,00	400	80,0	20,0

Concluídas as modificações nas condições cromatográficas, obteve-se cromatogramas a exemplo do apresentado na figura 54. Os picos correspondentes aos compostos estão relativamente resolvidos e separados para a técnica de detecção por espectrômetro de massas.

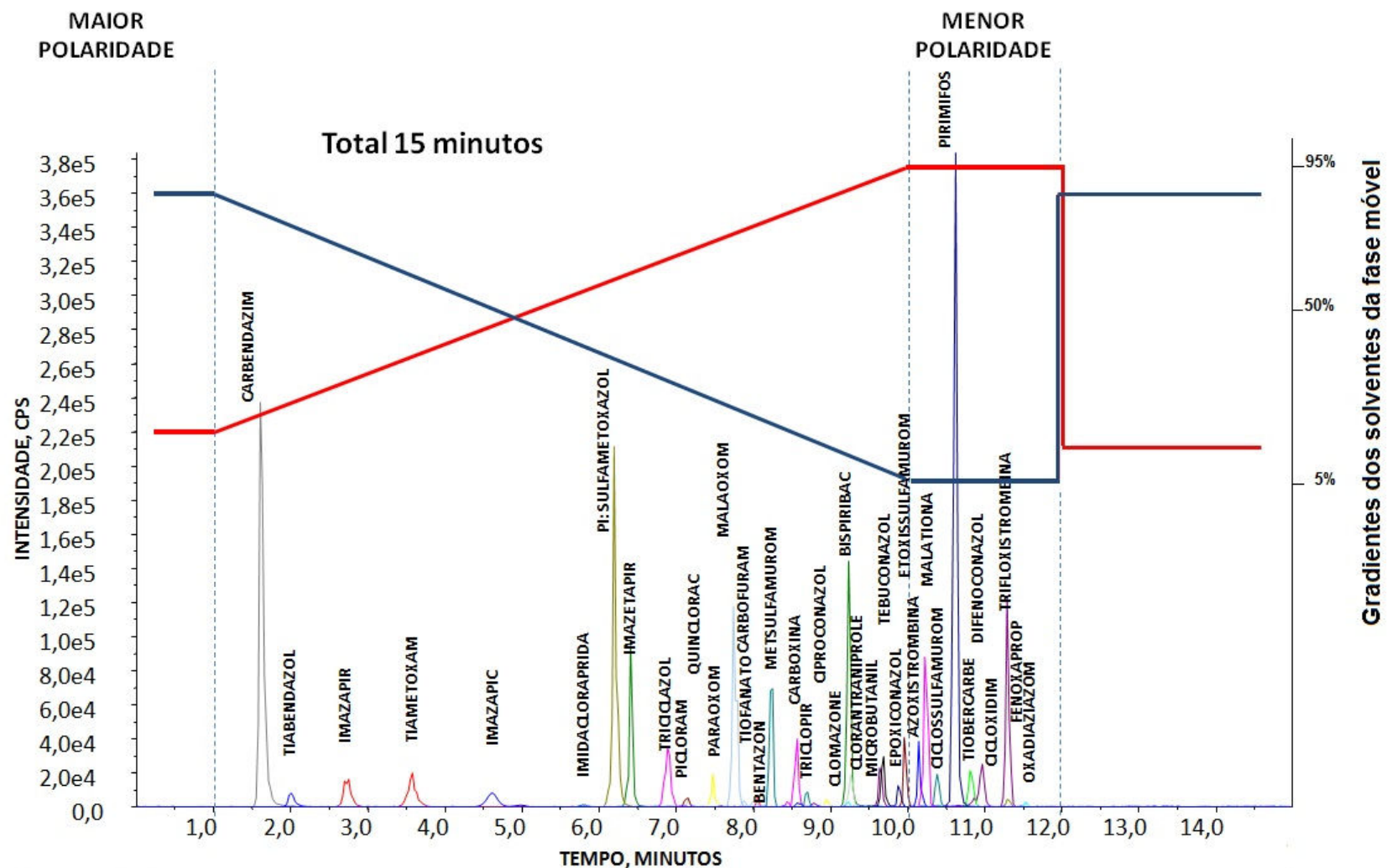


Figura 54. Cromatograma obtido por LC-MS/MS dos fragmentos de quantificação, nas condições da tabela 21 para cromatografia líquida. **Linha azul** indica a proporção (%) do eluente mais polar presente na fase móvel (80 – 5 - 80%) e a **linha vermelha** indica a proporção (%) de eluente menos polar presente na fase móvel (20 – 95 - 20%).

O emprego da LC-MS/MS, realizando medidas dos íons no modo MRM, não somente permite a formação de fragmentos de estrutura específica, mas também reduz a interferência da co-eluição de compostos e da matriz. Na determinação de composto de interesse é possível determiná-los de maneira inequívoca, mesmo que apresentem mesmo tempo de retenção. Isto é possível desde pois a fragmentação resulta em íons empregados para quantificação e outro para confirmação, sendo suficiente que um destes fragmentos sejam diferentes entre os compostos co-eluídos. A utilização de técnicas hífenizadas com espectrômetros de massa no modo tandem possibilitam esta propriedade.

Na determinação de 42 resíduos de agrotóxicos em 28 minutos, foi possível empregar a técnica na análise de chás mesmo com grande número de elementos co-eluindo, sendo que 38 daqueles compostos tinham seu tempo de retenção entre 2,5 e 8 minutos, onde mais de 50% deles estavam concentrados numa faixa de tempo de 2 minutos (KANRAR; MANDAL; BHATTACHARYYA, 2010). Na análise de ervas, 234 compostos foram determinados em um tempo de 45 minutos, no entanto, para garantir a identificação dos compostos um terceiro fragmento foi monitorado como forma de confirmar o analito de interesse (NGUYEN et al., 2010). Para determinação de 98 resíduos de agrotóxicos que incluíram organofosforados e carbamatos, o tempo de corrida foi de 19 minutos sendo que 95 deles apresentaram tempo de retenção entre 8 e 19 minutos (CHUNG; CHAN, 2010), mesmo assim, por espectrometria de massas foi possível diferenciá-los.

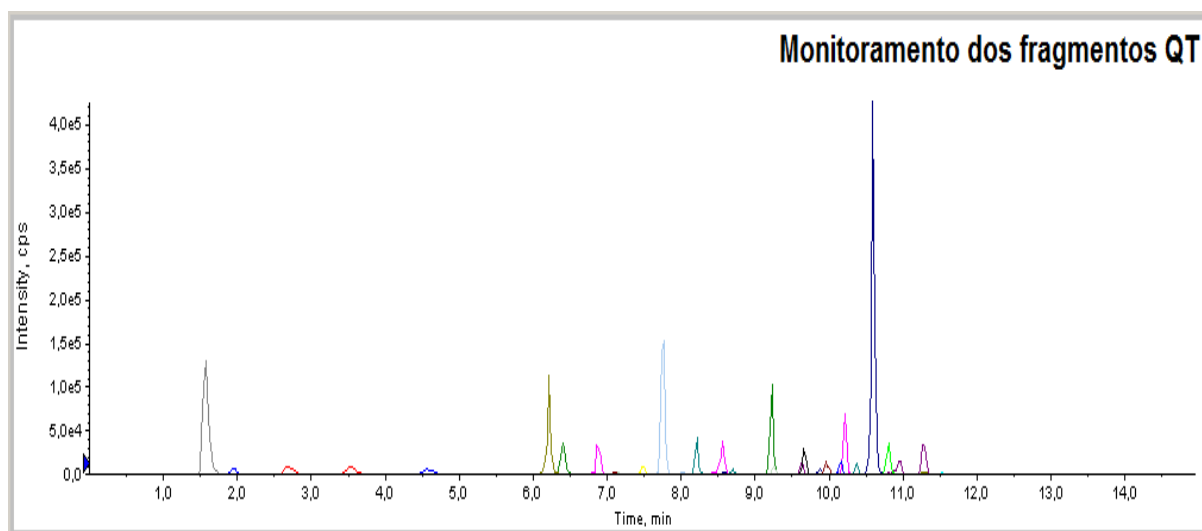
Neste trabalho, em um período de 1,5 a 11,6 minutos, 36 compostos mais o padrão controle surrogado (PS) puderam ser detectados. Apesar de por espectrometria de massas ser permitida a co-eluição, é tecnicamente desejada a separação dos picos e fundamental quando compostos apresentam fragmentos de QT e QL idênticos, como o que ocorreu em malaoxon e malationa, principalmente para espectrômetros de massa de baixa resolução, ou seja, quando não diferenciam m/z com diferenças próximas de um (1,0). Na tabela 22 estão apresentados os tempos de retenção obtidos dos compostos que apresentaram ionização ESI (+).

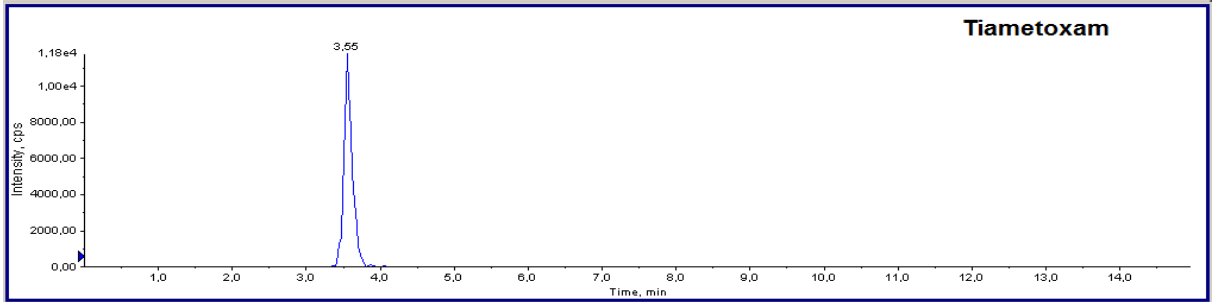
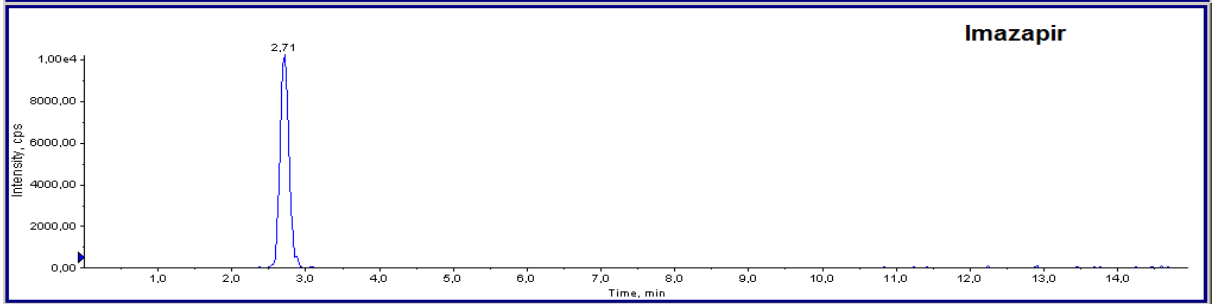
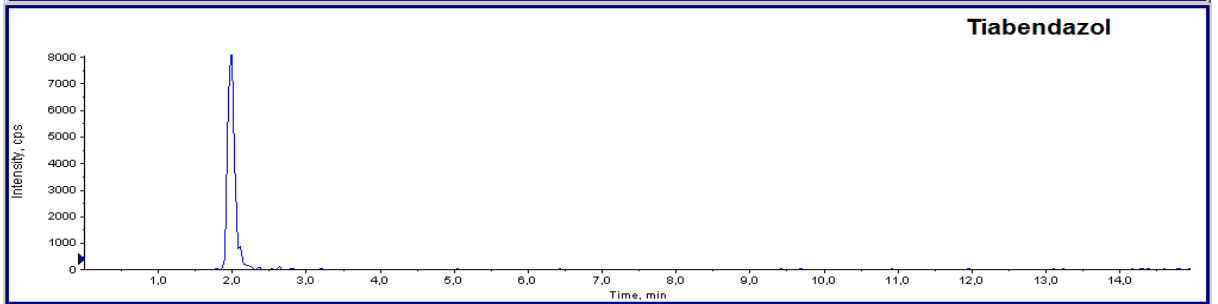
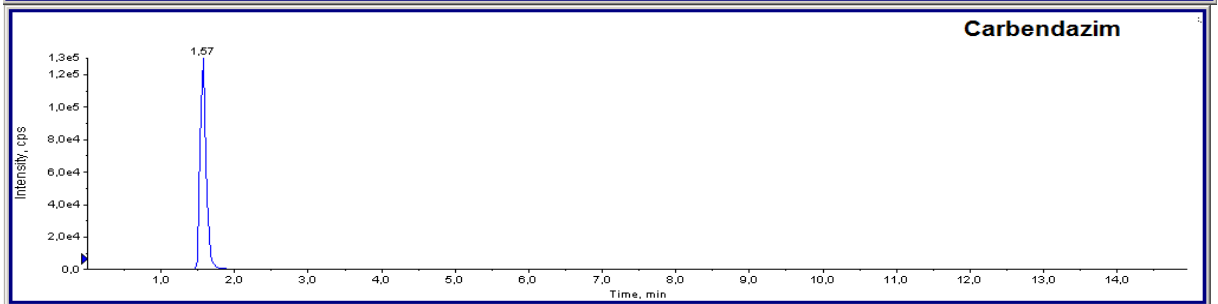
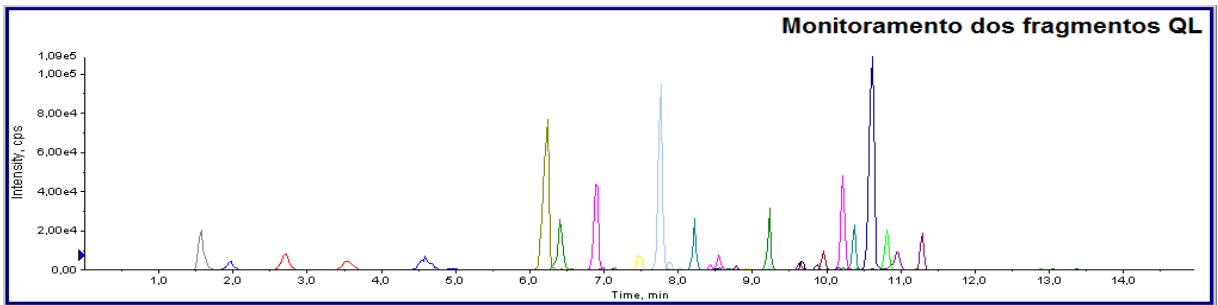
Tabela 22. Tempo de retenção (T_R) cromatográfica dos compostos detectados neste trabalho.

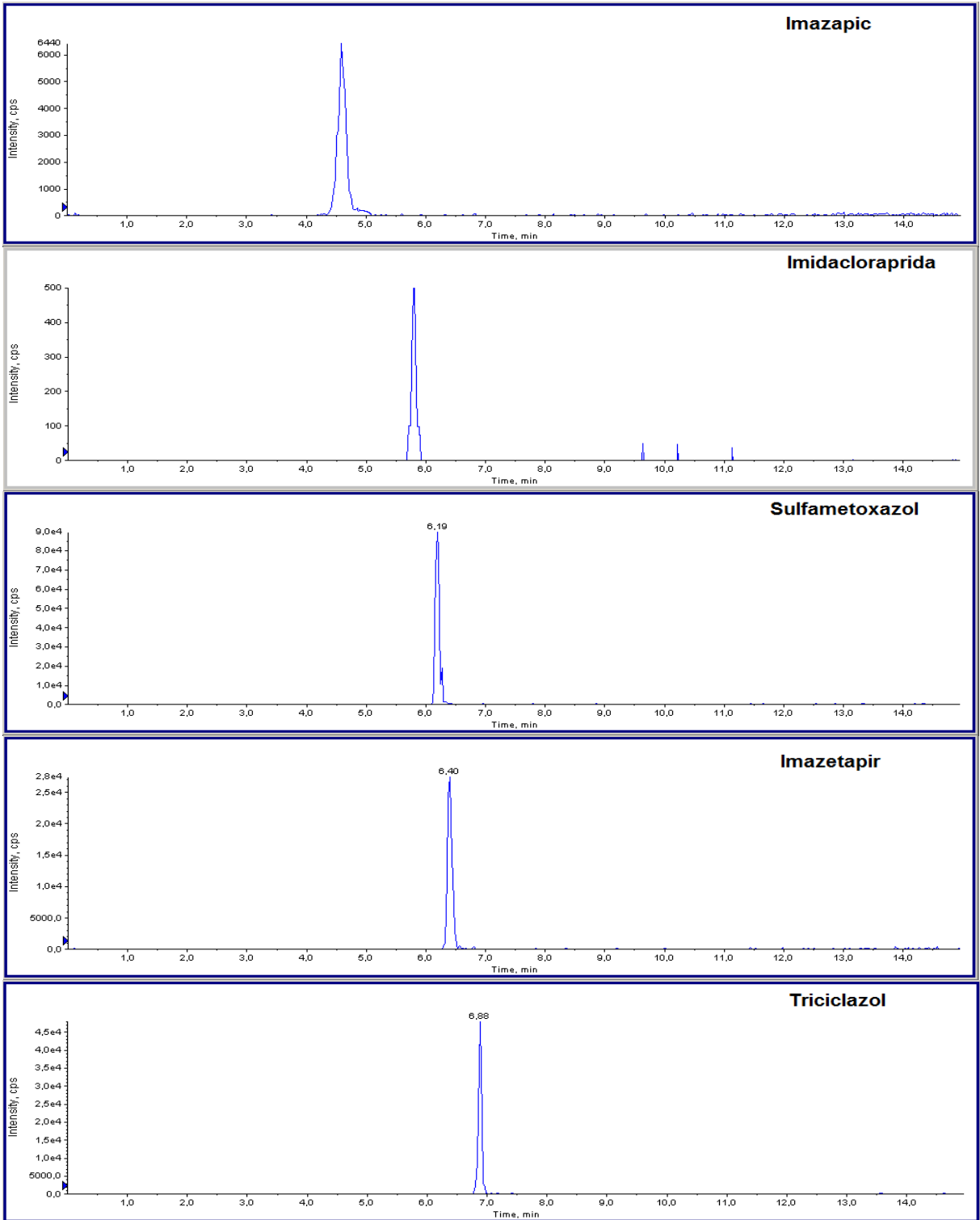
Agrotóxico	T_R (min.)	Agrotóxico	T_R (min.)	Agrotóxico	T_R (min.)
Carbendazim	1,57	Tiofanato metílico	8,01	Malationa	10,22
Tiabendazol	1,95	Bentazona	8,03	Ciclossulfamurom	10,37
Imazapir	2,71	Metsulfamurom	8,21	Pirimifos	10,61
Tiametoxam	3,54	Carboxina	8,55	Tiobencarbe	10,76
Imazapic	4,60	Triclopir	8,69	Difenoconazol	10,81
Imidacloprida	5,83	Clomazone	8,94	Cicloxidim	10,97
Sulfametoxazol (PS)	6,19	Ciproconazol	8,95	Trifloxistrombina	11,28
Imazetapir	6,39	Byspiribac	9,23	Fenoxaprop-P-ethyl	11,29
Triciclazol	6,87	Clorantraniliprole	9,27	Oxadiazon	11,53
Quinclorac	7,13	Microbutanil	9,64	Pendimentalim	RI
Picloram	7,14	Tebuconazol	9,67	Propiconazol	RI
Paraoxon-metil	7,48	Epoconazol	9,88	Furatiocarb	RI
Malaoxon	7,75	Etoxissulfamurom	9,96	Pirazossulfamurom	RI
Carbofuram	7,87	Azoxistrombina	10,14	Tiodicarbe	RI

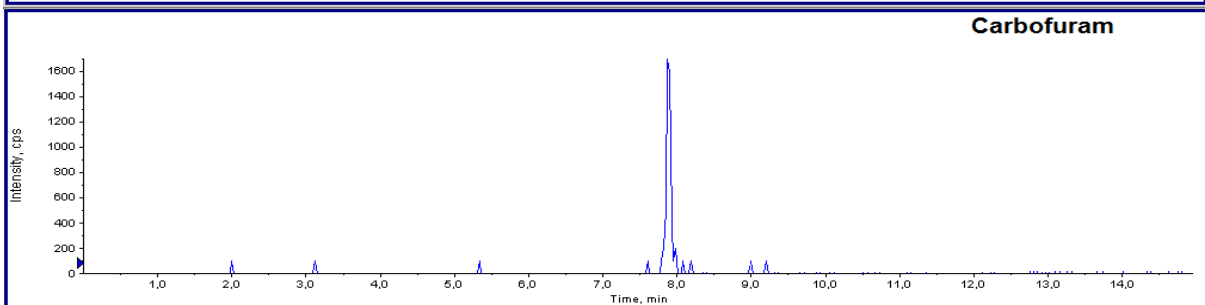
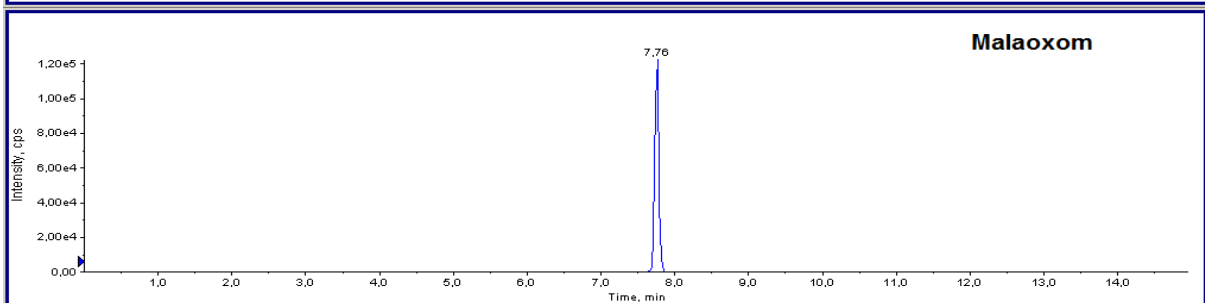
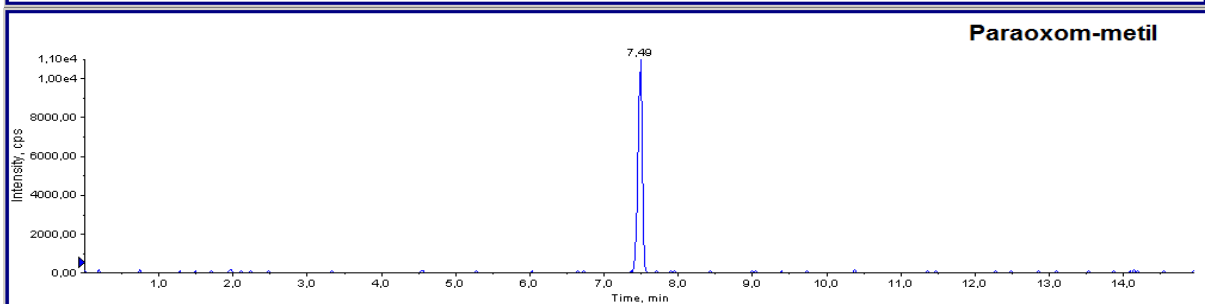
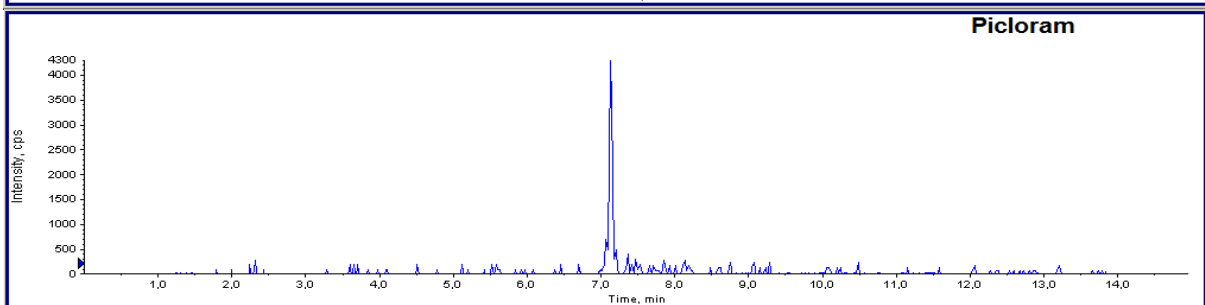
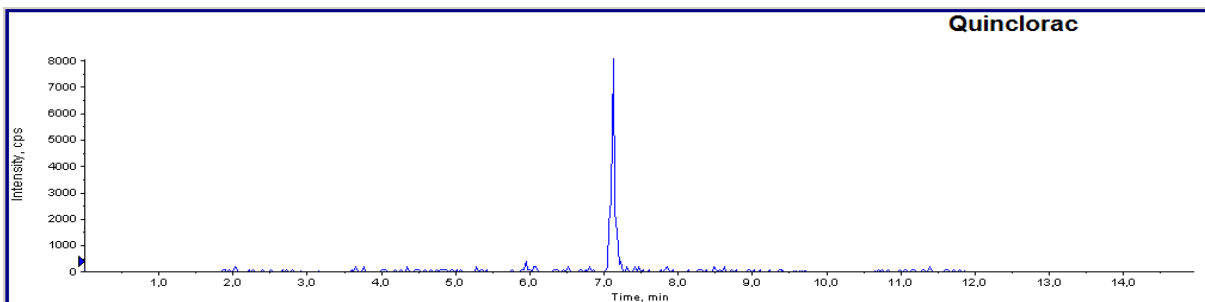
RI: reagentes cedidos por laboratórios em quantidade insuficiente ou que apresentavam tempo de validade vencida superior a 24 meses e por isso impossibilitando o emprego como padrões na continuidade dos testes de validação. Assim só se pode empregá-los na obtenção dos espectros de massa.

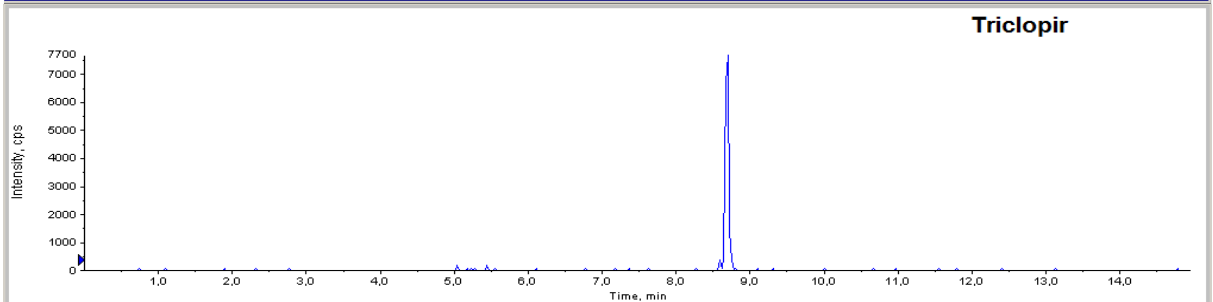
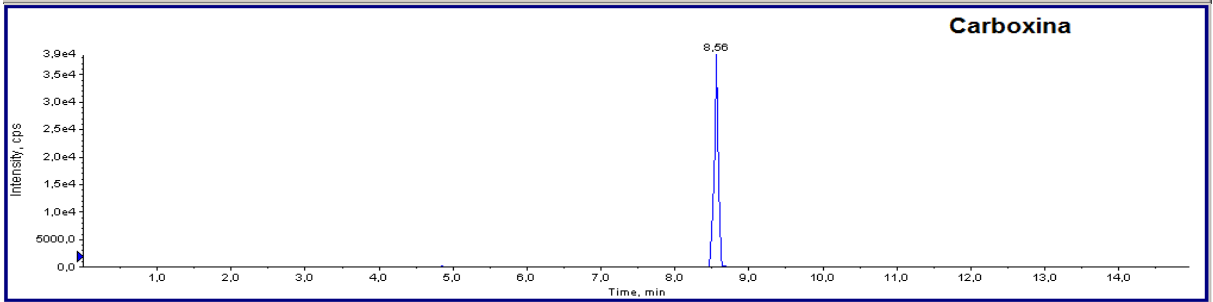
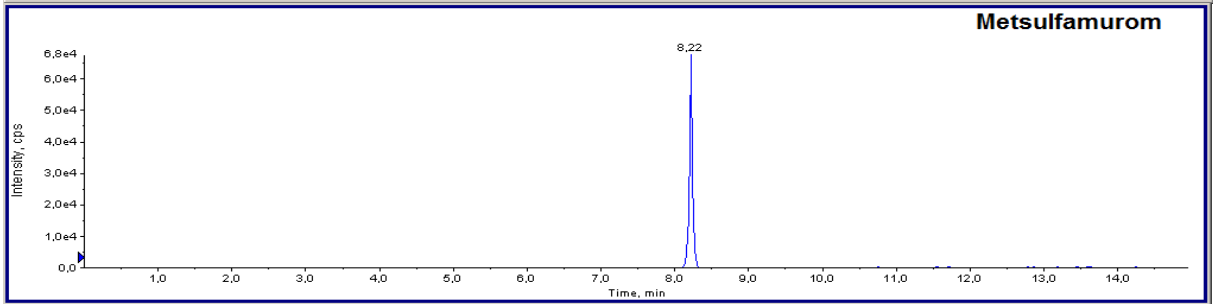
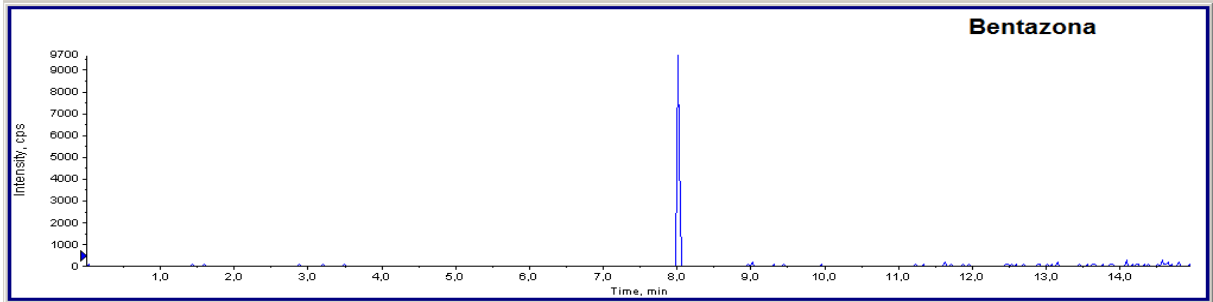
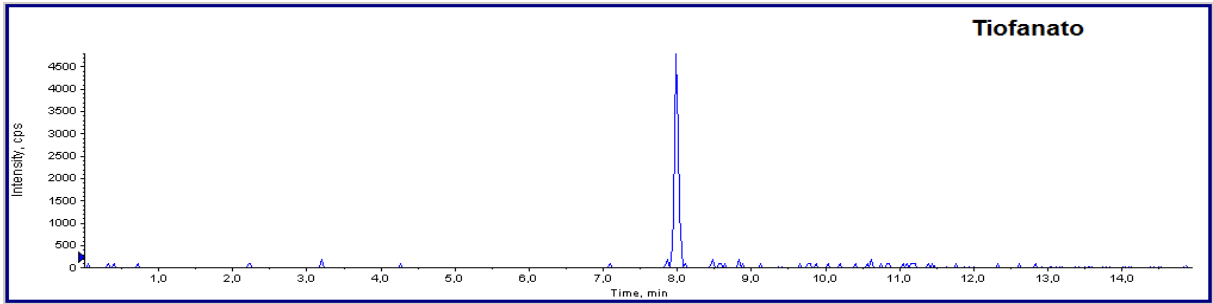
Na figura 55 estão apresentados, no primeiro cromatograma, os fragmentos de quantificação (QT) detectados pelo método em estudo, no segundo, o cromatograma com a detecção dos fragmentos de qualificação (QL) de todos analitos detectados. A seguir, por ordem do tempo de retenção, apresentado na tabela 22, os cromatogramas individuais dos QTs de cada analito.

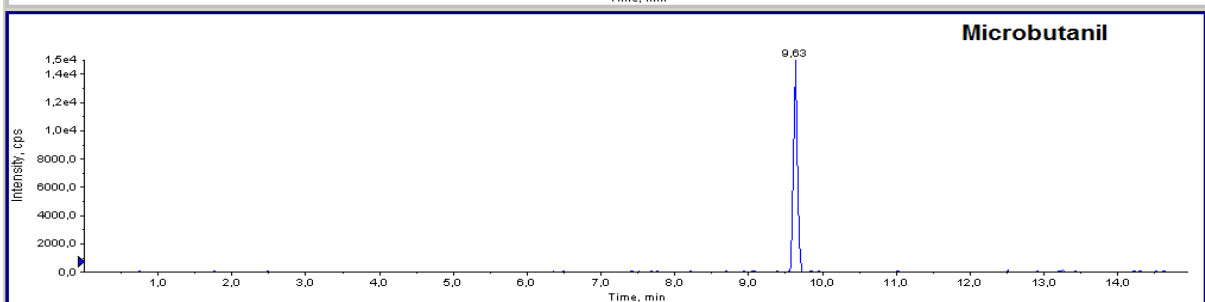
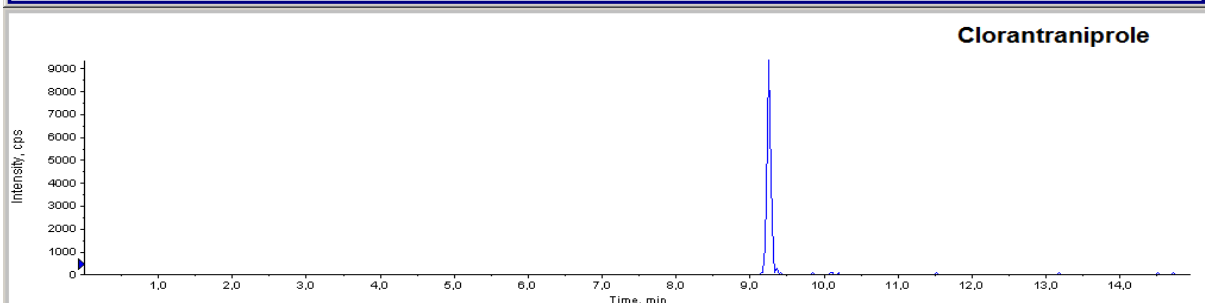
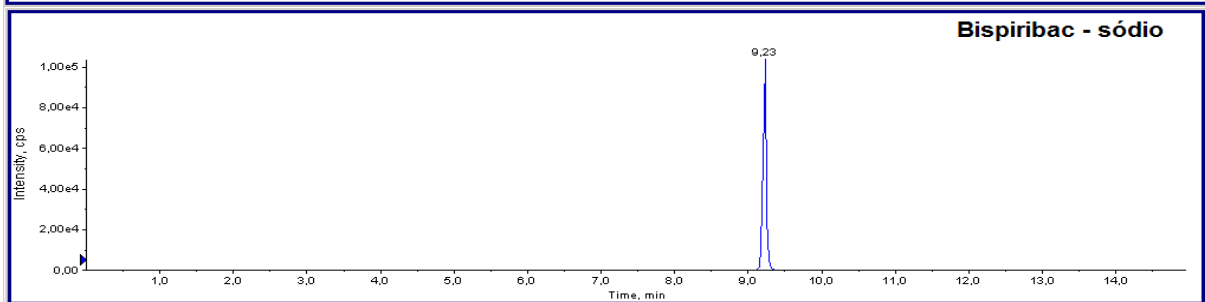
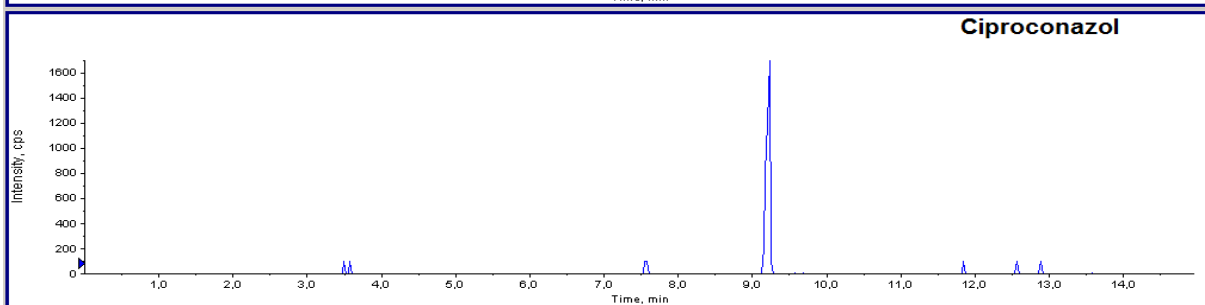
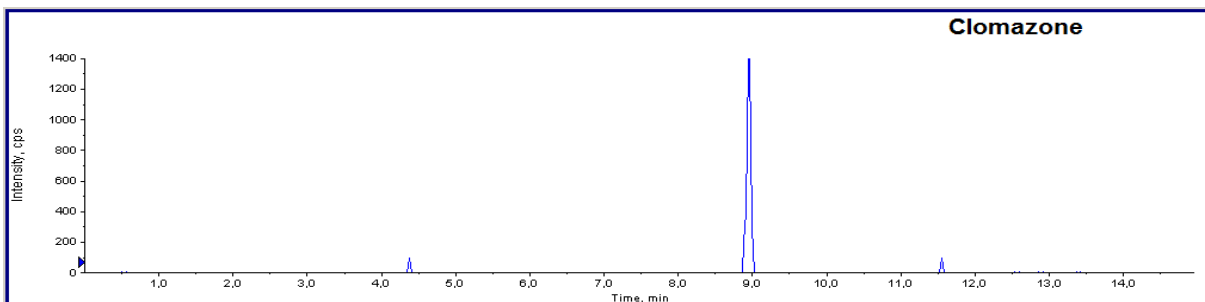


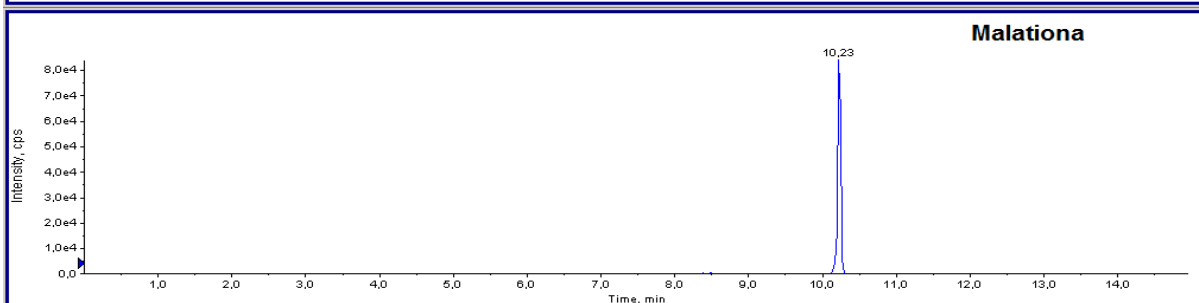
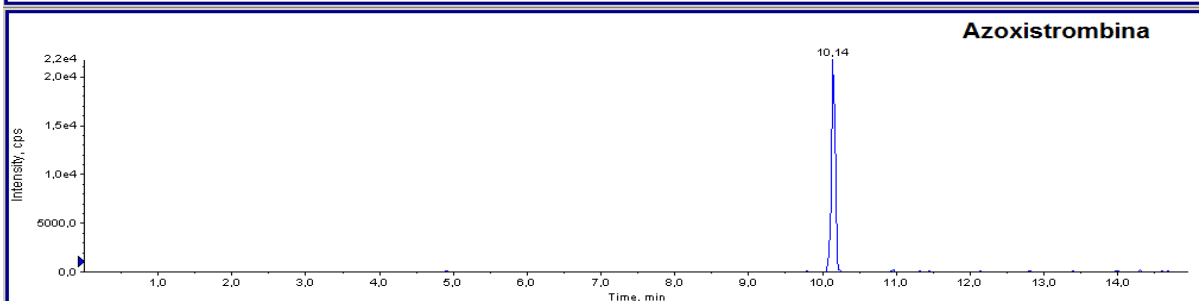
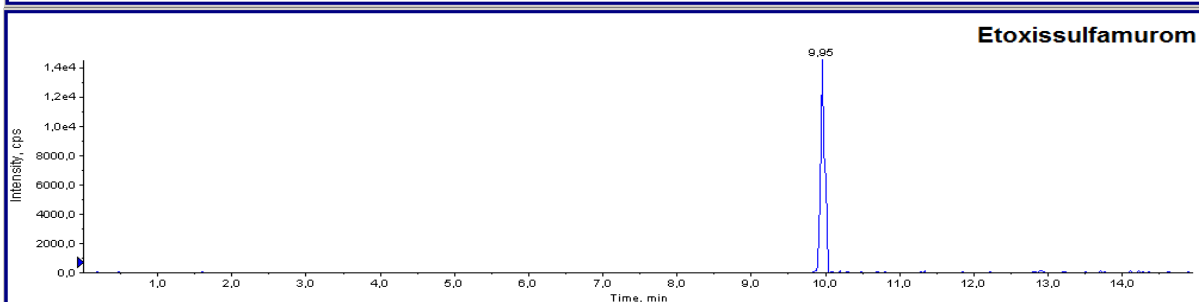
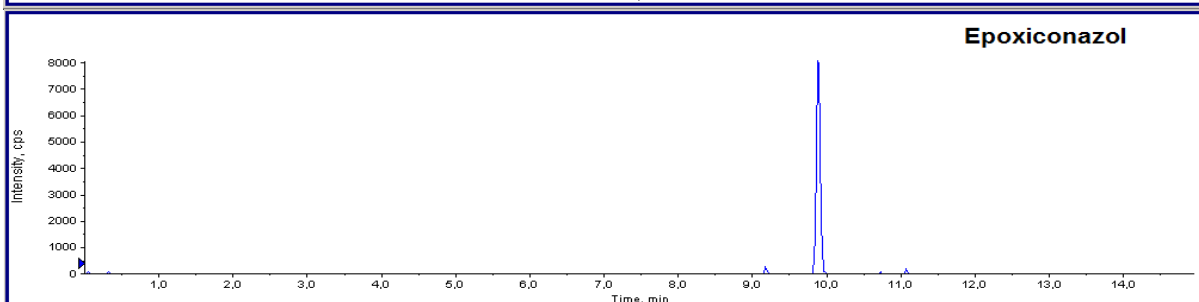
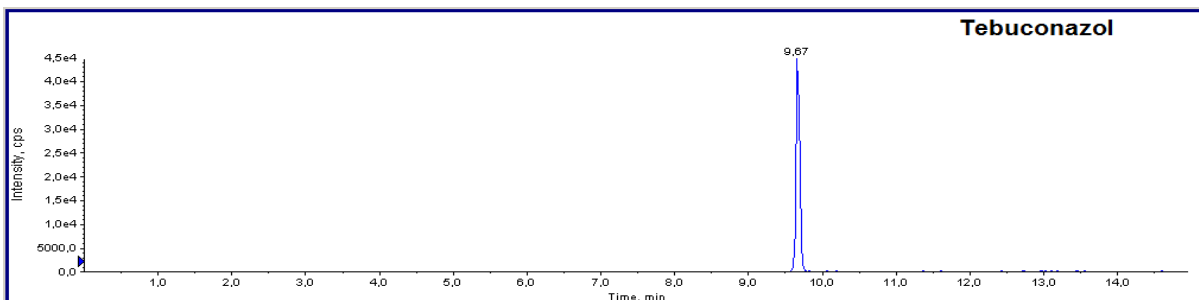


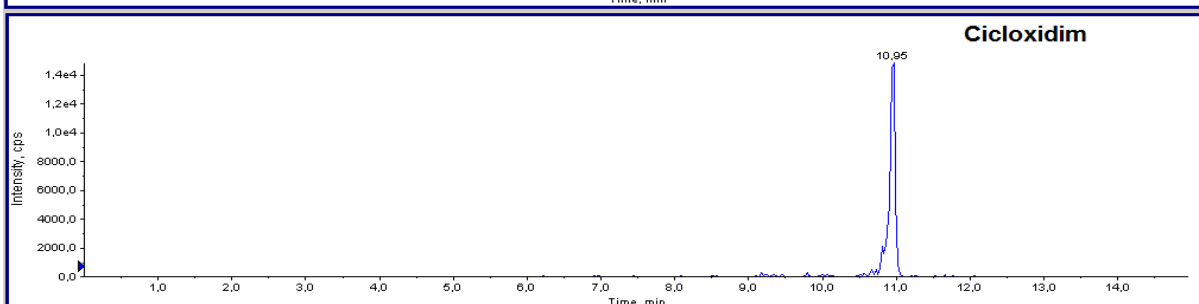
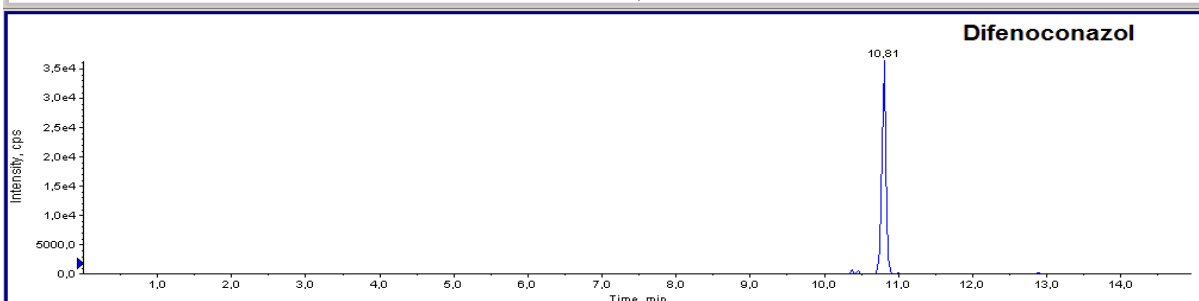
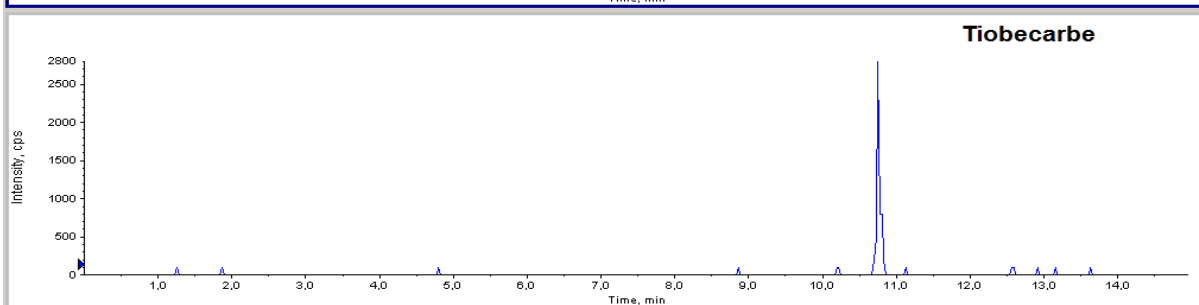
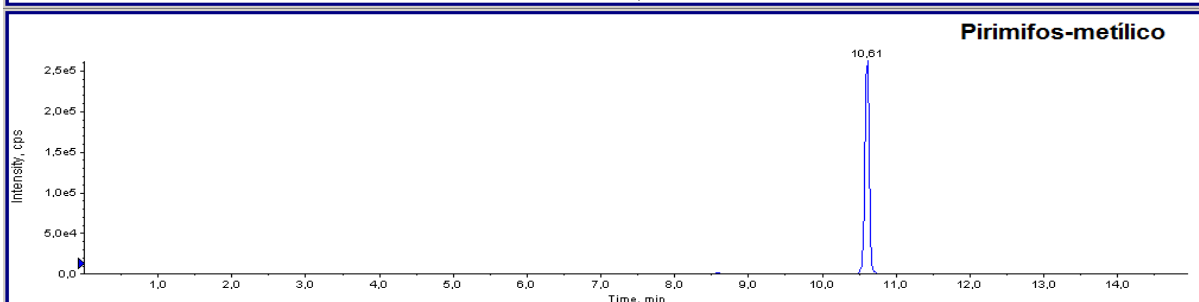
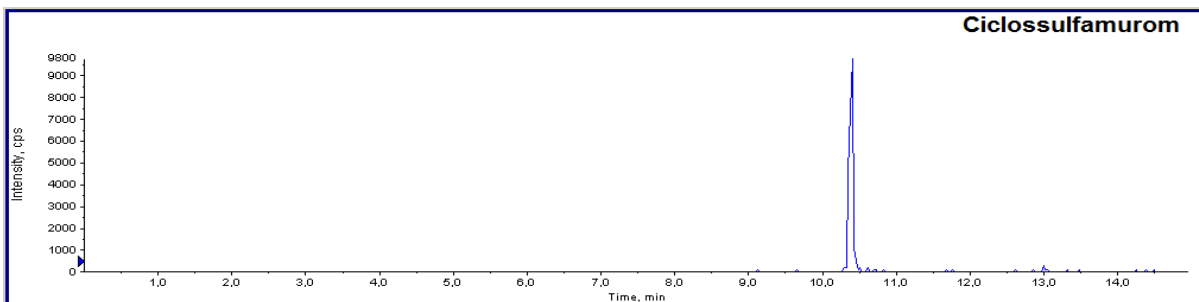












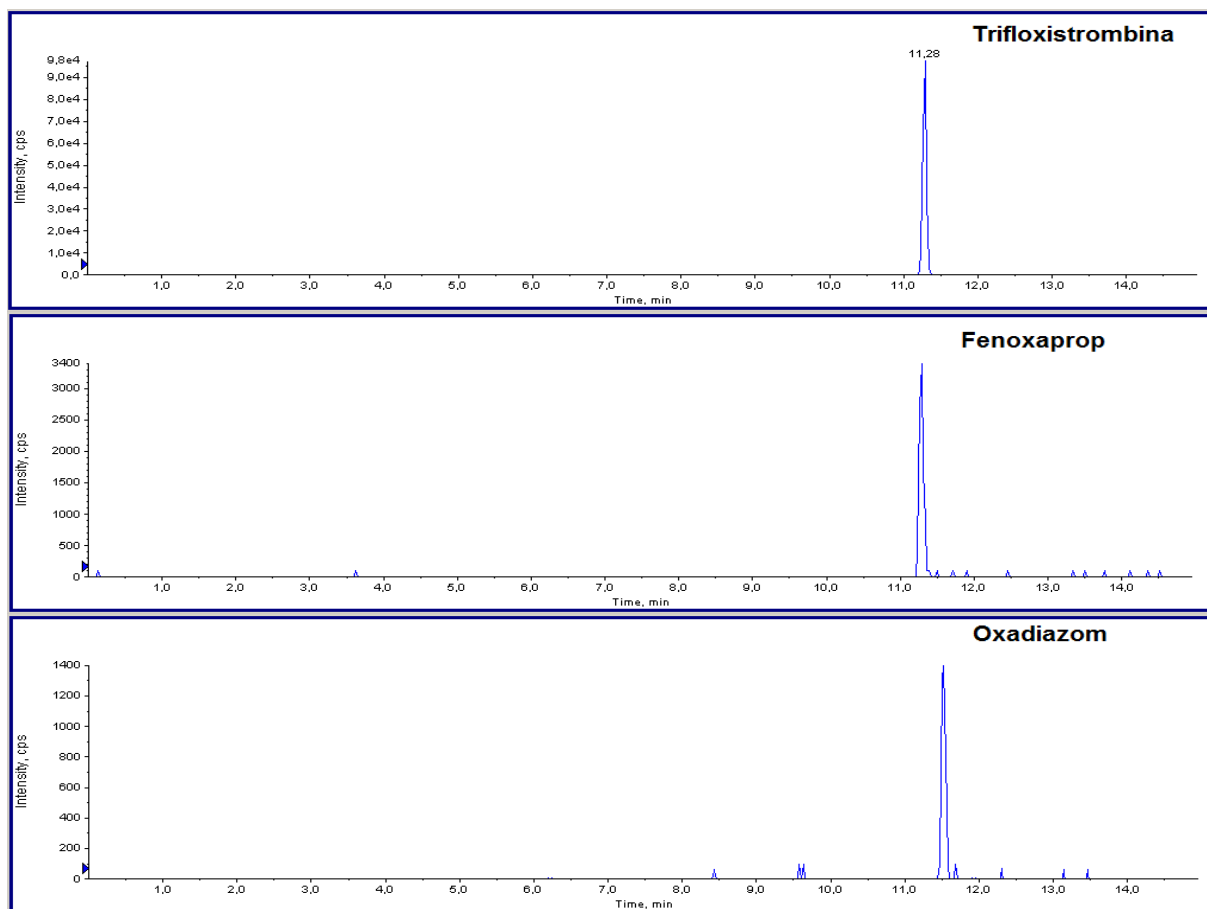


Figura 55. Cromatogramas agrupados e separados dos compostos analisados. O primeiro cromatograma corresponde aos fragmentos de quantificação (QT); o segundo, dos fragmentos de qualificação (QL) ou confirmação. Os demais correspondem aos cromatogramas individuais dos fragmentos de quantificação de cada um dos analitos detectados no método aqui estudado, em ordem de detecção ou tempo de retenção.

Neste estudo, o carbendazim apresentou tempo de retenção muito baixo. Caso este tempo fosse o mesmo da chegada do solvente no detector, o que corresponderia ao tempo morto da coluna, o pico deste poderia apresentar deformidades que prejudicariam a sua quantificação. Assim, executou-se teste para determinar este tempo, ou seja, qual o tempo que a fase móvel levaria para chegar ao detector, equivalente ao tempo necessário para um produto não retido passar pela coluna. Para isso aplicou-se um método, sob as mesmas condições de separação selecionada anteriormente, sem a presença do ácido fórmico, com ionização no modo ESI (-), para detectar o ácido fórmico injetado como amostra, pois este possui baixa afinidade pela fase estacionária da coluna sendo detectado antes de qualquer outro analito e, praticamente, no mesmo tempo que a fase móvel

alcançasse o detector. Como resultado deste teste obteve-se o cromatograma da figura 56. Os picos apresentados correspondem aos três fragmentos com maior intensidade caracterizados pela m/z 38,5, 41,7 e 39,1, oriundos do íon-molecular desprotonado ($[M-H]^-$) de m/z 44,88. Ainda na figura 56 pode-se notar a deformidade dos picos, possivelmente um efeito das perturbações geradas pela inicial e descontínua chegada da fase móvel ao detector, contendo os fragmentos monitoráveis do ácido fórmico.

O tempo de retenção do carbendazim foi superior a 1,5 minutos de análise e, após o referido teste, verificou-se que os fragmentos do ácido fórmico tem sua detecção entre 1,0 e 1,3 minutos, representando o tempo morto da coluna. Nestas condições, o carbendazim não deverá sofrer interferência, pois aparece após este tempo, ou seja, após a fase móvel já ter chegado ao detector, no qual julga-se haver um fluxo contínuo da fase móvel, evitando problemas na resolução cromatográfica do analito.

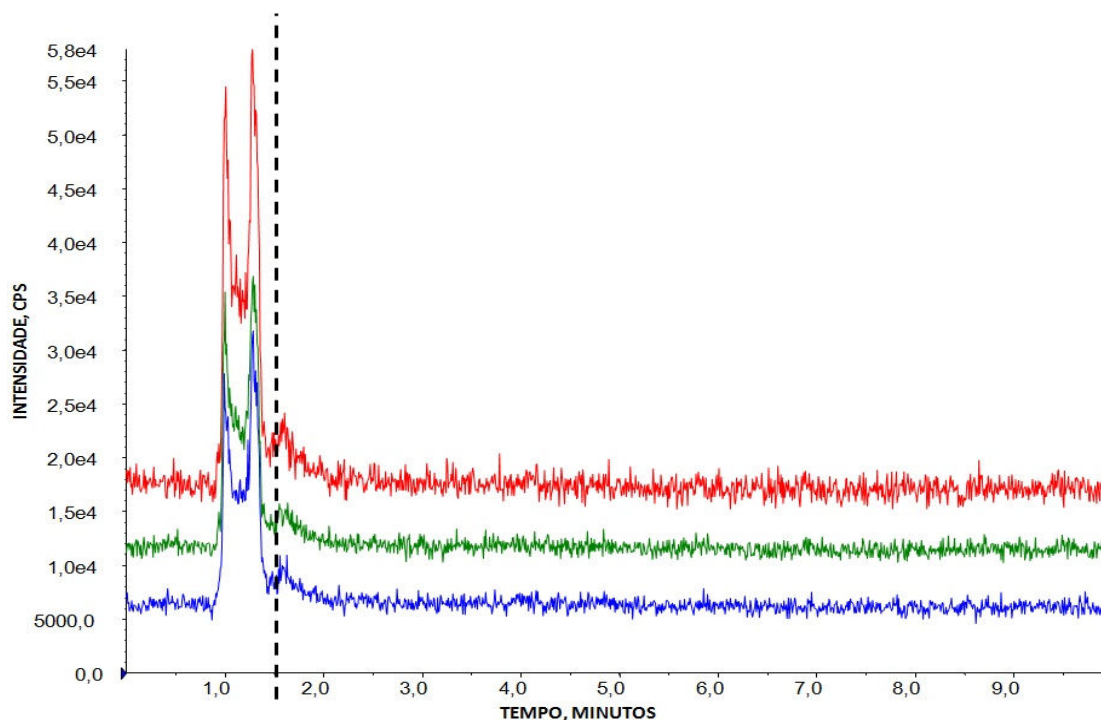


Figura 56. Cromatograma das transições (fragmentos m/z 38,5, 41,7 e 39,1) do ácido fórmico obtidas para determinar tempo morto da coluna em LC-MS/MS, sob parâmetro cromatográficos da tabela 25, por ionização ESI(-), sem adição de ácido fórmico na fase móvel. Linha pontilhada indica tempo onde o primeiro analito (carbendazim) foi encontrado na análise através do método aqui desenvolvido.

4.3. PARÂMETROS DE MÉRITO

4.3.1. Curva analítica e linearidade por adição de padrão

Aplicados os testes de validação foi possível a obtenção das curvas analíticas e dos parâmetros de mérito dentro das normas para os 35 dos 36 compostos detectados após separação cromatográfica por LC MS/MS ESI (+). Entre os 36 compostos testados, a bentazona não satisfaz aos critérios estatísticos de validação. Apresentou diferenças discrepantes entre replicatas das curvas, assim como o coeficiente angular que variou de 0,2 a 1,2, R^2 de 0,8583 a 0,9976 e CV das replicatas dos pontos da curva que atingiram percentuais superiores a 80%. Deste modo, como houve problemas de variação da resposta linear do analito, não foi possível estabelecer a equação da curva analítica e prosseguir com os testes de validação para este composto.

Vários são os fatores que poderiam levar a este desvio com variação da resposta linear, desde a decomposição, volatilização, ou adsorção do padrão às paredes do recipiente (SKOOG et al., 2006), e no caso do emprego de MS, problemas no processo de ionização, resultando em variações na quantidade de íons e fragmentos obtidos durante a análise, e ocorrência de supressão de íons por contaminantes com maior afinidade por prótons (KEBARLE; TANG, 1993) ou a presença de subprodutos formados durante a ionização como aductos do tipo HCOO^- , presente na FM, oriundos do modificador adicionado (ácido fórmico) (NÚÑEZ; MOYANO; GALCERAN, 2005), competindo na ionização do analito, prejudicando a detectabilidade, repetibilidade e influenciando na seletividade do método (CHICO; VAN HOLTHOON; ZUIDEMA, 2012; KRUIVE; LEITO; HERODES, 2009). Em estudo que buscou determinar 18 resíduos de herbicidas ácidos por LC-ESI(+)-MS/MS, a bentazona estava entre cinco que não apresentaram linearidade satisfatória, considerando que uma das possíveis causas seria a suscetibilidade de alguns destes compostos formarem íons desprotonados (KOPPEN; SPLIID, 1998).

Como já foi citado, os outros 35 compostos apresentaram um R^2 igual ou superior a 0,9906 (Tabela 27), obtendo coeficiente de correlação adequada e um erro não sistemático, próprio da aleatoriedade dos resíduos em função da

concentração, satisfazendo as exigências do Inmetro (INMETRO, 2003) que aceita R^2 de pelo menos 0,90 e até mesmo da Anvisa (ANVISA, 2003) que recomenda R^2 maiores que 0,99. Na figura 57 tem-se um exemplo de uma das curvas analíticas obtidas por calibração externa com adição de PI, onde não foi necessário eliminar nenhum dos sete pontos da curva, pois as replicatas dos pontos apresentaram CV menores que 20% e o R^2 obtido foi superior a 0,99 e, na figura 58, um dos gráficos de resíduos obtido, ambos da trifloxistrombina.

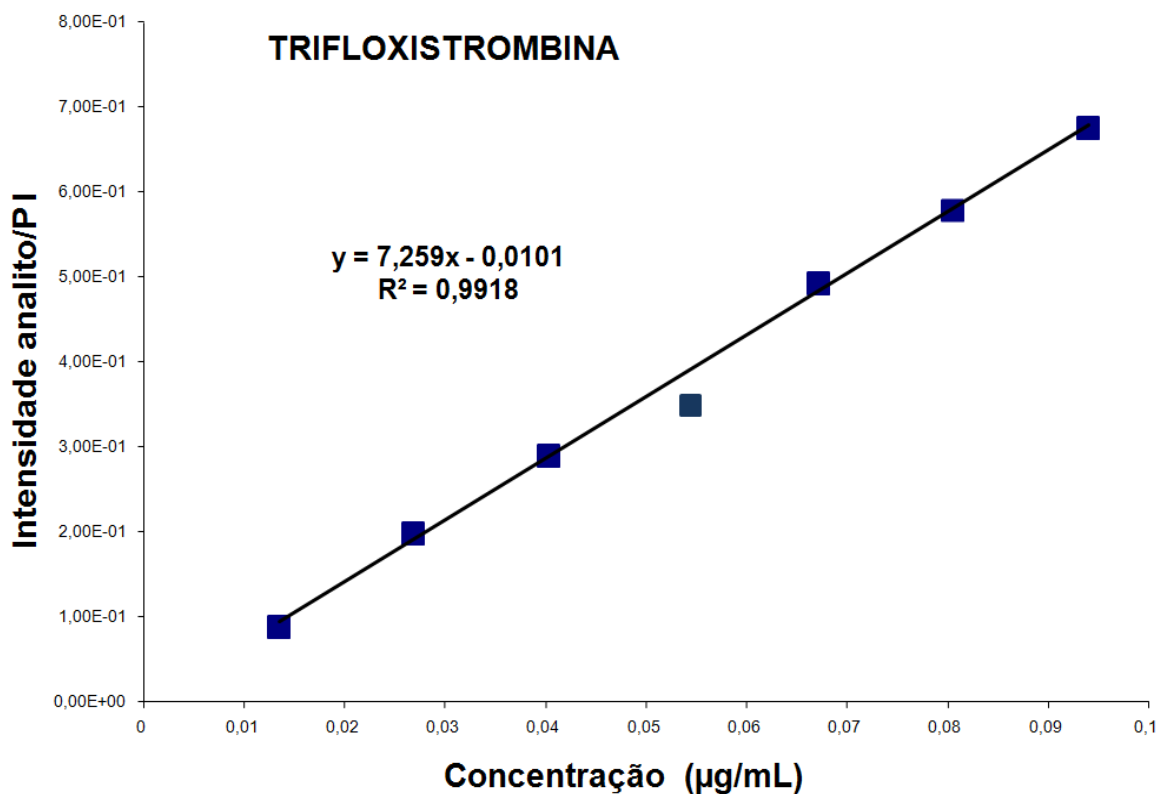


Figura 57. Curva analítica da trifloxistrombina.

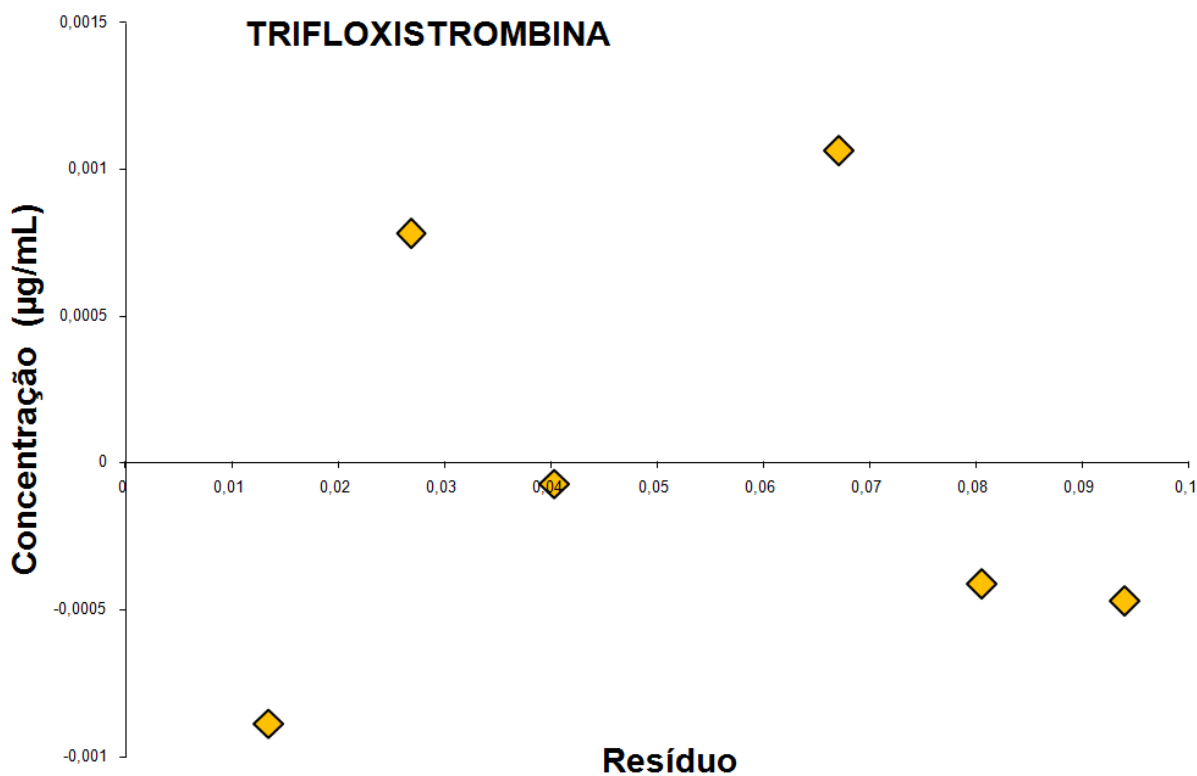


Figura 58. Gráfico de resíduos da trifloxistrombina.

Os coeficientes angulares (a) obtidos com a construção da curva analítica indicam a sensibilidade do método para cada composto (tabela 23). De modo geral, os compostos que possuíam coeficientes angulares maiores apresentaram LQ menores (Tabela 24).

4.3.1.1. Precisão

Para validação do método, testes de precisão foram executados. Foi possível obter estimativa do desvio padrão relativo inferior a 14% nas avaliações de precisão instrumental, repetibilidade e precisão inter-ensaio para os 35 compostos testados (Tabela 23).

Tabela 23. Parâmetros de mérito obtidos após análise estatística, para os 35 agrotóxicos que foram aprovados de acordo com parâmetros de precisão, repetibilidade, desvios e coeficientes angular, linear e de determinação.

AGROTÓXICOS	RSD%			a	Desvio	b	Desvio	R ²
	PI	RP	PIE					
Azoxistrombina	5,05	5,20	5,85	8,626	0,36	-0,001	0,01	0,9913
Bispiribac-sódio	5,04	8,83	8,71	7,911	0,44	-0,068	0,04	0,9908
Carbendazim	2,68	5,82	5,17	16,218	0,42	0,134	0,04	0,9973
Carbofuram	3,44	4,99	4,91	0,347	0,01	0,001	0,00	0,9933
Carboxina	4,50	9,61	8,28	6,117	0,29	0,014	0,01	0,9909
Ciclossulfamurom	9,60	11,29	9,20	1,003	0,04	0,000	0,00	0,9950
Cicloxdim	5,53	5,71	5,04	2,299	0,04	-0,003	0,00	0,9989
Ciproconazol	13,93	13,62	12,60	1,407	0,03	0,000	0,00	0,9990
Clomazone	6,37	13,10	10,66	1,215	0,04	-0,004	0,00	0,9958
Clorraniliprole	7,89	8,31	7,58	0,467	0,04	-0,056	0,01	0,9981
Difenoconazol	9,93	10,86	9,12	1,383	0,04	-0,005	0,01	0,9962
Epoconazol	6,13	15,84	12,59	0,672	0,02	-0,009	0,00	0,9976
Etoxisulfamurom	4,42	4,20	5,60	1,412	0,04	-0,005	0,00	0,9974
Fenoxaprop	5,16	6,51	6,81	0,320	0,01	0,003	0,00	0,9977
Imazapic	4,06	4,34	4,97	1,485	0,07	-0,009	0,01	0,9912
Imazapir	2,44	3,84	8,72	1,936	0,06	0,004	0,01	0,9962
Imzetapir	5,47	4,65	5,70	4,175	0,16	0,012	0,01	0,9931
Imidacloprida	9,58	8,03	10,41	0,003	0,00	-0,002	0,00	0,9955
Malaoxom	3,65	5,75	5,33	7,542	0,33	-0,018	0,04	0,9906
Malationa	4,64	6,23	10,30	1,373	0,05	-0,056	0,02	0,9945
Metsulfamurom	4,41	7,02	7,72	5,529	0,10	-0,018	0,01	0,9990
Microbutanil	4,63	8,17	6,79	1,233	0,03	-0,012	0,00	0,9970
Oxadiazom	5,83	6,66	5,61	1,096	0,05	-0,001	0,00	0,9913
Paraoxom-metil	4,89	6,35	6,14	1,046	0,03	-0,002	0,00	0,9958
Picloram	2,56	10,82	9,18	1,227	0,04	0,002	0,00	0,9964
Pirimifós-metil	5,69	5,39	5,58	14,506	0,10	-0,077	0,02	0,9998
Quinclorac	6,50	9,88	9,72	0,236	0,01	0,001	0,00	0,9964
Tebuconazol	5,36	4,77	5,08	9,596	0,25	0,012	0,01	0,9973
Tiabendazol	3,42	2,06	3,51	2,676	0,04	-0,001	0,00	0,9992
Tiametoxam	4,61	4,35	4,76	1,044	0,05	0,008	0,01	0,9912
Tiobearbe	12,45	13,72	12,72	0,531	0,02	0,000	0,00	0,9928
Tiofanato metílico	2,67	11,67	13,82	0,747	0,03	-0,006	0,00	0,9944
Triciclazol	6,67	8,92	7,33	2,916	0,15	0,011	0,02	0,9922
Triclopir	5,01	6,72	8,70	0,524	0,02	0,000	0,00	0,9944
Trifloxistrombina	6,68	8,91	8,67	7,259	0,09	-0,003	0,01	0,9994

PI: Precisão Instrumental; RP: Repetibilidade; PIE: Precisão inter ensaio; a: coeficiente angular; b: coeficiente linear.

Para matrizes ambientais e de alimentos, o nível de precisão aceitável depende da matriz a ser analisada, da concentração avaliada do analito e da técnica de análise empregada, variando geralmente de 2 a 20% (HUBER, 2001). Na validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração trabalhada neste estudo, os RSD inferiores a 14% estão perfeitamente adequados tanto para órgãos nacionais como internacionais (ANVISA, 2003) exceto para epoconazol que apresentou RSD% de 15,84 para o teste de repetibilidade, mas que é perfeitamente aceito pela maioria dos órgãos e guias de validação na presente concentração avaliada (AOAC, 1998; ICH, 1995; INMETRO, 2011; MAPA, 2011).

4.3.1.2. Limites Detecção e Quantificação

Com os dados das curvas analíticas foi possível determinar os limites de detecção e quantificação para os 35 compostos validados estatisticamente. Os limites de quantificação apresentaram índices entre sete a 830 vezes menores que o LMR estabelecidos pela Anvisa em 2009 a 2010 para o arroz (Tabela 24), garantindo a sensibilidade do método para o monitoramento destes compostos em amostras reais e possibilitando a diluição das amostras no momento da análise ou testes de recuperação.

Tabela 24. Apresentação dos menores Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela Anvisa entre 2009 e 2010 e os limites de determinação (LD) e quantificação (LQ) na amostra, após avaliação estatística do método, utilizando-se uma mistura de soluções padrão.

AGROTÓXICOS	LMR Anvisa ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Azoxistrombina	0,1	0,027	0,009
Bispiribac-sódio	0,5	0,168	0,051
Carbendazim	0,5	0,081	0,024
Carbofuram	0,2	0,054	0,015
Carboxina	0,2	0,057	0,018
Ciclossulfamurom	0,5	0,114	0,033
Cicloxidim	0,5	0,048	0,015
Ciproconazol	0,03	0,006	0,003
Clomazone	0,1	0,015	0,006
Clorantraniliprole	0,2	0,198	0,06
Difenoconazol	1	0,195	0,06

Epoxiconazol	0,3	0,087	0,027
Etoxissulfamurom	0,5	0,087	0,027
Fenoxaprop	0,5	0,066	0,021
Imazapic	0,5	0,162	0,048
Imazapir	0,5	0,096	0,03
Imazetapir	0,5	0,102	0,03
Imidacloprida	0,5	0,12	0,036
Malaoxom	0,5	0,168	0,051
Malationa	8	0,477	0,144
Metsulfamurom	0,5	0,048	0,015
Microbutanil	0,5	0,096	0,027
Oxadiazom	0,5	0,018	0,006
Paraoxom-metil	0,5	0,087	0,027
Picloram	0,1	0,021	0,006
Pirimifós-metil	10	0,036	0,012
Quinclorac	0,5	0,129	0,039
Tebuconazol	0,1	0,015	0,006
Tiabendazol	0,2	0,021	0,006
Tiametoxam	1	0,222	0,066
Tiobearbe	0,05	0,015	0,003
Tiofanato metílico	0,5	0,129	0,039
Triciclazol	0,5	0,159	0,048
Triclopir	0,5	0,096	0,03
Trifloxistrombina	0,2	0,021	0,006

4.3.1.3. Exatidão (recuperação)

Entre os 35 agrotóxicos aqui estudados, 20 apresentaram uma recuperação adequada em pelo menos quatro concentrações testadas (Tabela 25). Os demais apresentaram recuperações inadequadas. Este resultado pode estar relacionado ao efeito de matriz comum na determinação de resíduos em matrizes complexas como as ambientais e de alimentos e serão confirmadas com os resultados dos testes de calibração por superposição de matriz adiante apresentados. Outra possibilidade pode ser a decomposição de compostos como ocorreu com propacloro, atrazine-2-hydroxy e pendimentalim em estudos para determinação de ácidos fenólicos, sulfonilureias, triazinas e outros herbicidas em água (ZHANG et al., 2014).

O valor médio da recuperação dos compostos para o método pode ser considerado dentro da faixa que é de 80 e 110%, recomendado pela Comunidade Européia (EC/2002/657, 2002) e pelo Mapa (MAPA, 2011) mais principalmente para Anvisa que estabelece faixa de 80 a 120% (ANVISA, 2003). Nestas condições, fica adequada também a faixa de 70 e 120% exigida por normas e guias nacionais e internacionais menos restritivas

(EC (SANCO/12571/2013), 2013; RIBANI et al., 2004), confirmando a validação do método aqui estudado por calibração externa com adição de padrão interno para os 20 compostos citados.

Tabela 25. Dados de recuperação por meio de adição de padrão em amostras de arroz isentas de agrotóxicos, determinadas com emprego de calibração externa com adição de padrão.

AGROTÓXICOS	% recuperação							média	CV
Azoxistrombina			80,4	75,6	78,5	86,2	94,7	83,1	7,58
Carbendazim			74,8	80,1	80,1	107,1	92,5	86,9	13,00
Carboxina	94,3	93,2		105,3	115,8	118,0		105,3	11,60
Ciclossulfamurom	78,7	83,5	110,4	94,1	91,9	111,5		95,0	13,55
Cicloxiidim		118,9	109,1	103,7		115,4		111,8	6,76
Ciproconazol		102,6	107,8	98,1	104,1	97,1		101,9	4,40
Clomazone	117,4	74,6	111,1	96,7	83,4	94,5		96,3	16,18
Clorantranilprole	108,7	75,4	88,9	84,9				89,4	14,02
Epoxiconazol	71,1	71,3	78,5	70,8	75,2	79,0		74,3	3,80
Etoxissulfamurom	84,2	84,0	101,2	113,2	98,8			96,3	12,40
Imidacloprida		90,8	113,4	113,8	84,4	118,8		104,2	15,50
Metsulfamurom	103,7	74,5	112,8	110,3				100,3	17,63
Microbutanil		93,4	92,6	113,3	93,5	96,6	88,3	96,3	8,74
Oxadiazom	110,1		80,3	84,2	80,5	80,9		87,2	12,93
Paraoxom-metil	98,1	78,4	97,9	104,0	103,6	109,1		98,5	10,69
Pirimifós-metil	71,5		74,6	74,1	75,2	81,0		75,3	3,51
Tiabendazol	86,9	101,0	83,3	96,9	99,2	88,4		92,6	7,34
Tiametoxam	100,9	111,0	108,5	104,9	97,7	109,8		105,5	5,29
Tiobearbe		104,1	101,8	99,3	99,3	110,4		103,0	4,60
Triciclazol	117,8	114,6		114,8	107,9			113,8	4,18

4.3.2. Curva analítica e linearidade por superposição de matriz

Na figura 59 há um exemplo de das curvas analíticas obtidas por calibração pelo emprego do método de superposição de matriz, onde foi necessário eliminar dois dos sete pontos da curva, pois apresentaram CV maiores que 20%, além de resultarem na obtenção de R^2 inferiores a 0,99 e, na figura 60, um dos gráficos de resíduos obtidos, ambos do bispiribac-sódio.

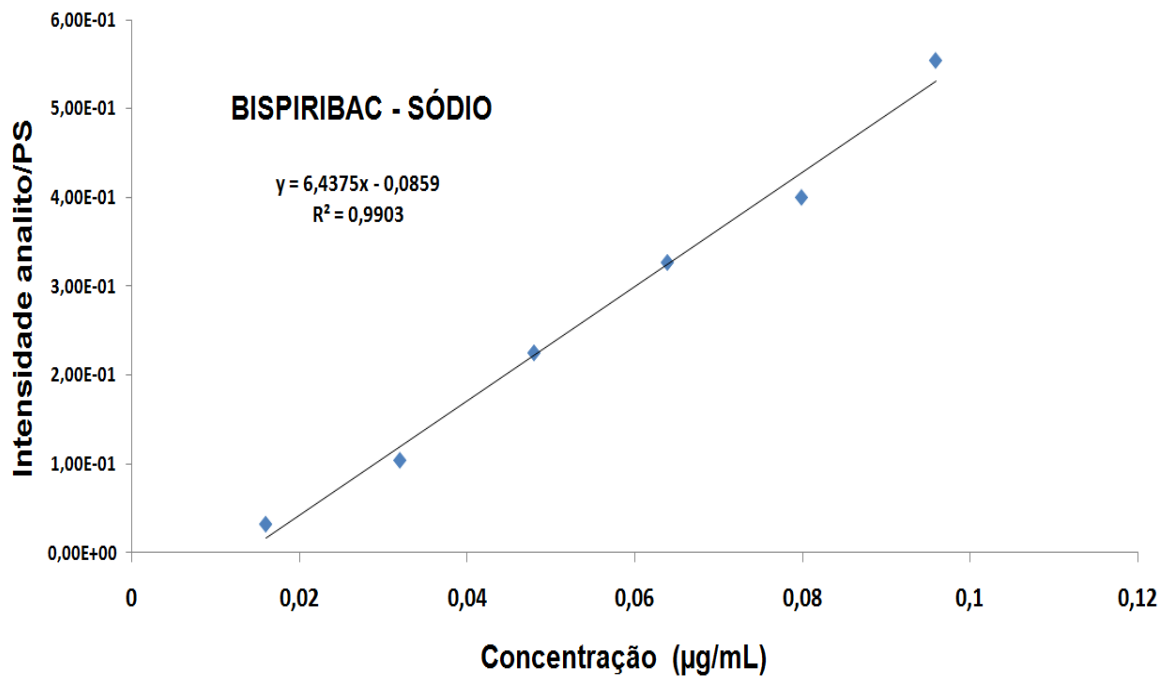


Figura 59. Curva analítica do bispiribac-sódio obtida de calibração por superposição de matriz. (PS: padrão sub-rogado)

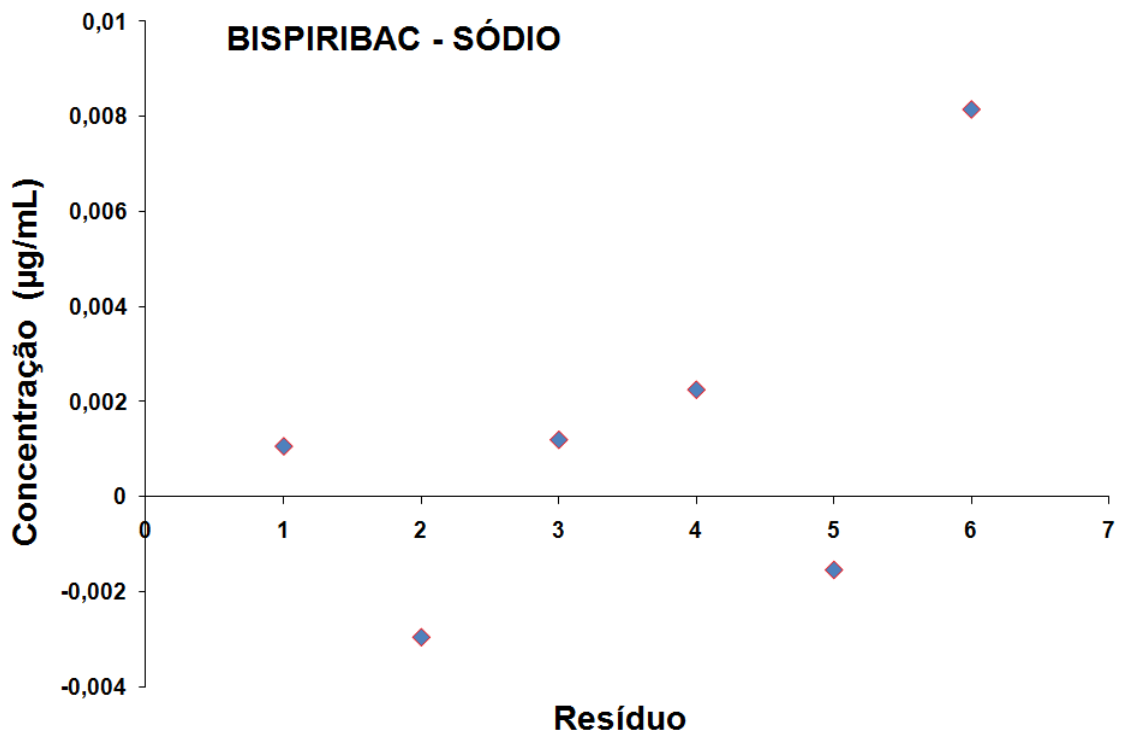


Figura 60. Gráfico de resíduos do bispiribac-sódio obtido após calibração por superposição de matriz.

Como já foi dito anteriormente, os coeficientes angulares (a) obtidos com a construção da curva analítica, agora por superposição de matriz, indicam a sensibilidade do método para cada composto (Tabela 26). Comparando os compostos analisados por meio dos dois métodos de calibração avaliados neste estudo, verificou-se que apenas 25% dos compostos analisados por calibração externa com adição de padrão interno apresentaram coeficientes angulares “ a ” maiores que por superposição de matriz, atribuindo a esta calibração maior sensibilidade para maioria dos compostos.

Erros na determinação de compostos dependem da matriz, da concentração do resíduo, assim como do analito e da técnica empregada. Para verificar os efeitos de matriz e garantir que um método por calibração externa com adição de padrão interno possa ser empregado, testes com superposição de matriz podem ser necessários (JIMÉNEZ et al., 2004).

Em estudo visando determinar resíduos de agrotóxicos em groselha, onde os efeitos de matriz foram estudados, comparando calibração externa com adição de padrão interno e superposição de matriz, os autores afirmaram ser possível o emprego de calibração externa para determinação de resíduos em alimentos, porém, quando o objetivo é estabelecer uma relação com LMR, o emprego de calibração com matriz garante maior precisão dos resultados e, por isso, seu uso é indicado (WALORCZYK, 2014).

4.3.2.1. Precisão

Sabe-se que para matrizes ambientais e de alimentos, o nível de precisão aceitável depende da matriz a ser analisada, da concentração avaliada do analito e da técnica de análise empregada, variando geralmente de dois a até mesmo mais de 20% (HUBER, 2001). Em função de se estar trabalhando com concentração de ng/mL (ppb) e até mesmo pg/mL (ppt), RSDs próximos de 30% são aceitos (AOAC, 1998, Huber, 2014). Assim, RSDs de até 19,53% para precisão instrumental (PI), 21,64% para repetibilidade (RP) e 30,22 para os ensaios de precisão inter-ensaio (PIE), ocorridos no método aqui desenvolvido (Tabela 30), podem ser considerados aceitáveis (EC (SANCO/12571/2013), 2013; INMETRO, 2011; MAPA, 2011).

Tabela 26. Parâmetros de mérito obtidos após obtenção da curva analítica por superposição de matriz para os 28 agrotóxicos que apresentaram parâmetros de precisão, repetibilidade, desvios e coeficientes angular, linear e de determinação aceitáveis.

AGROTÓXICOS	RSD%			a	Desvio	b	Desvio	R ²
	PI	RP	PIE					
Azoxistrombina	12,50	17,65	17,41	4,837	0,232	0,018	0,0049	0,9932
Bispiribac-sódio*	19,53	8,77	10,59	6,438	0,220	-0,086	0,024	0,9903
Carbendazim	11,25	11,15	12,20	21,827	0,593	0,583	0,0558	0,9971
Carboxina	19,08	17,70	15,45	15,101	0,798	0,051	0,031	0,9917
Ciclossulfamurom	19,15	11,32	18,50	1,724	0,061	-0,005	0,0057	0,9919
Cicloxidim	14,86	18,23	18,50	3,057	0,144	0,038	0,0130	0,9934
Ciproconazol	19,20	18,55	19,12	1,968	0,088	0,004	0,0008	0,9940
Clomazone	17,64	16,72	19,57	1,305	0,07	0,003	0,001	0,9914
Clorantraniliprole	19,22	12,51	13,77	0,588	0,019	0,038	0,0025	0,9933
Difenoconazol*	19,16	11,97	18,32	2,735	0,078	0,129	0,0132	0,9975
Epoxiconazol	15,53	17,18	16,55	0,501	0,016	0,002	0,002	0,9957
Etoxissulfamurom	13,32	14,86	15,36	1,589	0,104	-0,025	0,0084	0,9915
Fenoxaprop*	12,92	20,24	20,28	0,060	0,004	0,005	0,0003	0,9900
Imazapic*	17,16	20,19	21,25	0,387	0,018	-0,005	0,002	0,9918
Imazapir*	14,04	13,94	17,59	0,227	0,011	-0,002	0,0012	0,9930
Imazetapir*	15,82	21,33	30,22	1,963	0,086	-0,033	0,008	0,9943
Imidacloprida	19,00	11,52	16,10	0,083	0,004	-0,001	0,0004	0,9931
Metsulfamurom	12,86	16,61	18,93	6,974	0,119	-0,077	0,0083	0,9991
Microbutanil	12,04	11,53	16,35	1,112	0,064	0,031	0,0081	0,9900
Oxadiazom	12,19	15,58	22,45	0,713	0,023	0,001	0,0003	0,9960
Paraoxom-metil	17,78	11,41	18,27	1,144	0,047	-0,008	0,0044	0,9917
Pirimifós-metil	16,29	13,19	17,16	10,350	0,346	0,202	0,063	0,9956
Tiabendazol	17,70	12,31	15,58	2,395	0,114	0,018	0,0048	0,9910
Tiametoxam	10,69	9,54	12,72	1,771	0,030	0,019	0,0051	0,9988
Tiobecarbe	19,46	18,11	19,40	0,787	0,044	0,001	0,0004	0,9905
Tiofanato metílico*	12,26	13,02	16,74	2,024	0,115	0,006	0,0084	0,9936
Triciclazol	11,24	18,77	22,64	4,233	0,118	0,023	0,0112	0,9977
Trifloxistrombina*	10,43	17,81	19,41	0,461	0,003	0,022	0,0002	0,9925

PI: Precisão Instrumental; RP: Repetibilidade; PIE: Precisão inter ensaio; *: Compostos que não apresentaram recuperação adequada por calibração externa com adição de padrão interno segundo Anvisa (ANVISA, 2003), porém apropriada segundo normas internacionais (EC (SANCO/12571/2013), 2013). Em **negrito**: RSD% >20 e <23; **sublinhado**: > 30.

Fenoxaprop, imazapic e imazetapir apresentaram RSD% entre 20 e 22 nos testes de repetibilidade. Ainda, fenoxaprop, imazapic, oxadiazom e triciclazol, nos testes inter-ensaio, apresentaram RSD% entre 20 e 23. Em função do que já foi descrito é possível considerar que para estes compostos o método pode ser empregado. Ainda, segundo Horwitz, os limites de RSD% ou CV, variam de acordo com a concentração do analito na amostra. Este limite pode ser estabelecido pela equação que resulta na obtenção da curva e construção da trombeta de Horwitz. Sendo assim, aplicando-se a equação citada:

Equação: $CV(\%) = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$; onde: CV = coeficiente de variação; C= concentração do analito na amostra como uma fração decimal; assim é possível considerar que o RSD% está dentro do limite de 24,5 na concentrações testada na faixa de 0,0591 e 0,0789 mg/kg (HUBER, 2014; IUPAC, 2002; LEITE, 2008; MAPA, 2011).

Imazetapir apresentou desvio relativamente alto nos testes inter-ensaio, ou seja, RSD% acima de 30, o que num primeiro momento poderia ser considerado inadequado, mesmo considerando a trombeta de Horwitz, que permitiria um RSD% de 25 para a concentração testada de 0,0538 mg/kg.

Segundo Portolés e colab. (2014) a baixa intensidade de sinal do íon de confirmação (QL) pode ser um dos fatores que levam à diminuição da sensibilidade e exatidão do método (PORTOLÉS et al., 2014). Nos casos de Imazapic e Imazetapir, estes poderiam ter sido os fatores que levaram aos altos desvios na repetibilidade e, principalmente, de precisão inter-ensaio para imazetapir.

Similarmente aos resultados do presente trabalho há outros que visaram a determinação de múltiplos resíduos em matrizes complexas e em baixa concentrações. Resultados de RSD% idênticos foram considerados aceitáveis, justificando a validação do método desenvolvido dentro dos desvios apresentados, além de estarem dentro de limites considerados adequados para normas e guias de validação (AOAC, 1998; ICH, 1995; INMETRO, 2011; MAPA, 2011).

Na determinação de 55 resíduos de agrotóxicos em frutas e verduras, em alguns compostos a recuperação e os RSDs% não ficaram dentro de intervalos aceitáveis. Em outros apenas, o RSD% ficou fora da faixa aceitável. Assim, aqueles com recuperação adequada e com RSD% entre 20 e 25 foram considerados

aceitáveis, porém apresentando baixa sensibilidade, o que obrigou a exclusão daqueles com RSD% superior a 25 (CERVERA et al., 2012).

Buscando validar método que pudesse ser empregado na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos para bebês, deltametrina e fosalone apresentaram RSD% de 26,9 e 22,6, respectivamente, mas com recuperação adequada e R^2 superior a 0,99. Apesar dos RSD%, estes analitos foram incluídos no método, apesar da menor sensibilidade para sua determinação em amostras (VUKOVIĆ et al., 2012).

Na determinação de sete agrotóxicos em água por CG-MS o método apresentou LQ de até 3,5ng L⁻¹, recuperação entre 63 e 104% e RSD% de 4 a 23. Mesmo com RSD% acima de 20 o autor considerou o método preciso e robusto (BONANSEA; AMÉ; WUNDERLIN, 2013).

Na análise de múltiplos resíduos em groselha por CG-MS/MS a recuperação alcançada foi de 70 a 116% e RSD% na faixa entre 3 a 19. No entanto, para clorotalonil RSD% foi de 23. Apesar disto, o método foi qualificado bom, pois possuía boa acurácia (WALORCZYK, 2014).

4.3.2.2. Limites de Detecção e Quantificação

Com os dados das curvas analíticas, foi possível determinar os limites de detecção e quantificação para os 28 compostos validados estatisticamente. Estes limites apresentaram índices menores de sete a 164 vezes em relação ao LMR estabelecidos pela Anvisa em 2009 a 2010 para o arroz (Tabela 27), garantindo a sensibilidade do método para o monitoramento destes compostos em amostras reais e possibilitando a diluição das amostras no momento da análise ou testes de recuperação.

Comparando os LQ do método de calibração externa com adição de padrão interno com o de superposição de matriz, verificou-se que 50% dos compostos apresentavam LQ menores.

Tabela 27. LMR permitidos pela Anvisa para o arroz destinado ao consumo humano relacionado com os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) na amostra obtidas pelo método, cuja curva analítica foi construída por superposição de matriz.

AGROTÓXICOS	LMR ANVISA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ	LD	N x LQ < LMR
		($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)	
Azoxistrombina	0,1	0,03	0,009	3,3
Bispiribac-sódio	0,5	0,159	0,048	3,1
Carbendazim	0,5	0,078	0,024	6,4
Carboxina	0,2	0,063	0,018	3,2
Ciclossulfamurom	0,5	0,15	0,045	3,3
Cicloxdim	0,5	0,129	0,039	3,9
Ciproconazol	0,03	0,012	0,003	2,5
Clomazone	0,1	0,027	0,009	3,7
Clorantranilprole	0,2	0,195	0,057	1,0
Difenoconazol	1	0,144	0,045	6,9
Epoconazol	0,3	0,09	0,027	3,3
Etoxisulfamurom	0,5	0,159	0,048	3,1
Fenoxaprop	0,5	0,162	0,048	3,1
Imazapic	0,5	0,156	0,048	3,2
Imazapir	0,5	0,165	0,048	3,0
Imazetapir	0,5	0,12	0,036	4,2
Imidacloprida	0,5	0,147	0,045	3,4
Metsulfamurom	0,5	0,036	0,012	13,9
Microbutanil	0,5	0,219	0,066	2,3
Oxadiazom	0,5	0,015	0,003	33,3
Paraoxom-metil	0,5	0,114	0,033	4,4
Pirimifós-metil	10	0,183	0,054	54,6
Tiabendazol	0,2	0,06	0,018	3,3
Tiametoxam	1	0,087	0,027	11,5
Tiobearbe	0,05	0,018	0,006	2,8
Tiofanato metílico	0,5	0,126	0,039	4,0
Triciclazol	0,5	0,081	0,024	6,2
Trifloxistrombina	0,2	0,012	0,003	16,7

Muitos são os trabalhos que tratam da determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes, especialmente alimentos. Resíduos de agrotóxicos advindos da produção de arroz têm tido especial atenção quando se busca determinar estes em água, em face dos impactos ambientais. Apesar do crescente interesse em determiná-los no arroz, as metodologias não têm focado esforços na determinação de resíduos de agrotóxicos passíveis de aplicação no cultivo e que possuem LMR estabelecidos pela Anvisa.

Em estudos para determinação de 203 compostos (NGUYEN et al., 2008) a carboxina, oxadiazom e pirimifós-metil também foram estudadas aqui neste trabalho,

porém com LQ menores. Da mesma forma, em outro trabalho onde 98 compostos puderam ser determinados, pirimifos-metil e tiobcarb apresentaram LQ instrumental de $10\mu\text{g kg}^{-1}$ que, em comparação com estudo aqui realizado, foram seis vezes maior e duas vezes menor, respectivamente (CHUNG; CHAN, 2010). Em outro estudo, onde 124 resíduos foram avaliados (HOU et al., 2013a), pirimifós-metil, microbutanil e difenoconazol apresentaram LQ instrumental 10 vezes superior ao aqui desenvolvido.

É possível encontrar outros trabalhos como os supracitados, onde muitos compostos são trabalhados, mas nem todos aplicados na produção de arroz ou, se empregados, não coincidem com os estudados aqui. Métodos que apresentem LQ cada vez menores são de interesse, porém, para validá-los como úteis e aplicáveis, basta que o LQ possibilite indicar que os resíduos presentes estão, ou não, abaixo dos LMR de interesse.

4.3.2.3. Exatidão (recuperação)

Empregando o método de superposição de matriz na construção da curva analítica houve um aumento de 20 para 28 (Tabela 28) do número de compostos com recuperação entre 70 e 120% (EC (SANCO/12571/2013), 2013).

Com estes resultados de recuperação, associados aos demais dados de validação, é possível diferenciar os métodos de calibração estudados aqui, em função do número de compostos passíveis de serem determinados que, por calibração com adição de PI, foi de 20 e, por superposição de matriz, de 28 compostos.

Tabela 28. Dados de recuperação utilizando superposição de matriz na obtenção da curva analítica.

AGROTÓXICOS	% recuperação							média	CV
Azoxistrombina	110,1	115,6	90,0	102,3	103,2	86,0	99,2	100,9	10,42
Bispiribac-sódio*		99,7	103,6	101,2	94,5	102,5	101,8	100,5	3,24
Carbendazim	108,3	101,1	100,4	97,2	96,8	118,5	102,2	103,5	7,62
Carboxina	116,6	99,4	93,1	110,3	96,7	103,6	104,9	103,5	8,08
Ciclossulfamurom	95,6	89,5	102,9	90,2	87,2	100,9		94,4	6,46
Cicloxdim	100,2	107,7	104,3	98,3	94,3	107,1	102,9	102,1	4,86
Ciproconazol		106,6	93,0	103,1	98,0	105,8	100,7	101,2	5,14
Clomazone	79,9	102,6	79,7	109,0	98,6	87,6	98,0	93,6	11,41
Clorantraniliprole	93,5	111,4	91,0	102,8		81,0	100,0	96,6	10,53
Difenoconazol*	92,5	106,8	96,9	101,4	110,2	99,6		101,2	6,47
Epoxiconazol	102,2	98,8	97,9	104,5	96,4	101,1	105,5	100,9	3,42
Etoxissulfamurom	113,2	94,0	87,5	95,8	103,1	92,0	113,5	99,9	10,34
Fenoxaprop*	111,5	101,4	86,7	106,4	72,7		100,0	96,4	14,32
Imazapic*		102,3	92,4	92,8	90,9	101,6	101,9	97,0	5,44
Imazapir*	105,6	102,3	81,4	92,8	88,4	104,8	98,5	96,3	9,09
Imazetapir*		108,7	98,4	96,0	98,0	87,0	101,9	98,3	7,13
Imidacloprida	119,7	74,9	90,1	100,5	99,5	78,3	101,5	94,9	15,33
Metsulfamurom	101,2	97,0	101,4	101,0	99,2			100,0	1,87
Microbutanil		97,4	98,6	101,3		105,0	96,1	99,7	3,54
Oxadiazom	83,5	111,6		97,3	102,1	99,0	99,9	98,9	9,10
Paraoxom-metil		105,3	88,1	97,4	100,2	99,1	102,8	98,8	5,94
Pirimifós-metil	110,2	100,3	74,6	98,3	97,0	97,6	103,6	97,4	11,04
Tiabendazol	95,4	96,2	107,0	93,7	105,7	108,3	98,3	100,7	6,14
Tiametoxam	103,1	97,7	102,1	100,3	97,5	91,8	100,9	99,1	3,83
Tiobecarbe	77,2	116,4	98,7	99,6	98,9	99,9	110,5	100,2	12,27
Tiofanato metílico*	96,8	110,1	92,8	112,4	112,6	100,8		104,3	8,58
Triciclazol	93,9	100,8	101,1	108,8	102,7	97,9	113,8	102,7	6,68
Trifloxistrombina*		104,7		99,6	97,8	96,8	103,3	100,4	3,44

* Compostos que apresentaram $R^2 > 0,99$ e recuperação entre 70 e 110% por superposição de matriz e não por calibração por adição de padrão interno.

Na determinação de 116 agrotóxicos em plantas medicinais verificaram se os efeitos de matriz na fonte de ionização ESI poderiam ocorrer. Para isto fez-se comparação entre a curva analítica construída pelo método de calibração com adição de PI e por superposição de matriz. Em função dos efeitos de matriz

pronunciados, o método de superposição de matriz foi eleito para construção da curva (CHEN et al., 2012). Assim como no estudo anterior, buscando determinar 180 agrotóxicos em groselha por CG-MS/MS associado QuEChERS avaliou-se o efeito de matriz pela comparação da inclinação das retas formadas pela curva analítica obtida por calibração externa com adição de PI e superposição de matriz. A calibração por adição de PI foi considerada eficiente na quantificação dos compostos, mesmo que por superposição de matriz os resultados fossem mais precisos e considerados mais confiável (WALORCZYK, 2014). Na determinação 10 herbicidas triazínicos em arroz por meio de LC, o uso de calibração por adição de PI apresentou menor recuperação com um erro de até $2,1 \mu\text{g g}^{-1}$ em relação ao uso de superposição de matriz na obtenção da curva analítica (MOU et al., 2011). Comparando recuperações obtidas ao empregar calibração externa por adição de PI e superposição de matriz em resíduos presentes em tomates e pepinos, os autores encontraram diferenças em torno de 15% para maioria dos compostos, sendo que para três dos 14 avaliados esta diferença foi muito maior, revelando um grande efeito de matriz que pode ser minimizado pelo emprego de calibração por superposição de matriz (DASCHTBOZORGI et al., 2013).

Comparando os ensaios de recuperação executados em nosso trabalho, os resultados foram mais exatos e precisos nos de superposição de matriz em relação ao emprego de calibração com adição de PI. Todos estes 28 compostos, além de boa recuperação, apresentaram R^2 superior a 0,99. A recuperação, neste caso, foi satisfatória para 28 agrotóxicos em pelo menos cinco concentrações testadas (Tabela 28). Esta melhora na recuperação pode ter sido possível por esta técnica resultar na compensação do efeito de matriz (EGEA GONZÁLEZ et al., 2002; PADILLA-SÁNCHEZ et al., 2011) apresentando recuperações média entre 93,6-104,3%.

4.4. APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

Após a execução dos testes para validação dos métodos multirresíduos, onde se empregou LC-ESI(+)-MS/MS-QuEChERS, amostras comerciais de arroz foram adquiridas em supermercados para determinação de agrotóxicos empregando as equações das curvas analíticas para os respectivos analitos, de acordo com a validação por calibração externa por adição de padrão interno e superposição de matriz, cujos resultados estão nas tabelas 29 e 30, respectivamente.

Tabela 29. Resultados das análises de resíduos de agrotóxicos em amostras reais de arroz adquiridas no comércio, empregando o método para determinação de agrotóxicos com calibração com adição de padrão interno, segundo os limites de detecção e quantificação.

AGROTÓXICOS	LMR ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Amostras comerciais ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Azoxistrombina	0,1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Carbendazim	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ciclossulfamurom	0,5			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Cicloxidim	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Clorantraniliprole	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Epoxiconazol	0,3		<LQ					<LQ	
Metsulfamurom	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Microbutanil	0,5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Oxadiazom	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Pirimifós-metil	10	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,014	<LQ
Tiobecarbe	0,05	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Triciclazol	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Nota:<LQ: a concentração do agrotóxico estava entre o limite de quantificação e o de detecção.

<LD: amostras que continham agrotóxico em concentração inferior ao limite de detecção calculado e apresentaram pico cromatográfico no tempo de retenção, correspondente a m/z do fragmento de quantificação.

Pelo método de calibração externa com adição de PI seria possível determinar até 20 compostos. Por este método, nas amostras, 12 resíduos de agrotóxicos apresentaram picos em pelo menos duas marcas comerciais de arroz, porém, apenas pirimifós-metil, um inseticida organofosforado, foi quantificado, pois se encontrava em concentração superior ao LQ na amostra “7”.

Considerando que no processo de extração são adicionados 15 mL de solvente a cinco gramas de amostra, a concentração de pirimifós-metil no arroz seria de $0,042 \mu\text{g g}^{-1}$, muito abaixo do limites máximos de resíduos autorizados pela

Anvisa. No entanto, em virtude da faixa linear no extrato ser de 0,0390-0,2730 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para este composto, esta concentração deve ser considerada uma estimativa e não um valor mensurável.

Pelo método de calibração por superposição de matriz, além dos 20 compostos passíveis de determinação pelo método anterior, outros oito compostos podem ser quantificados. Entre as amostras reais analisadas, além dos 12 agrotóxicos citados anteriormente, outros seis se comportaram da mesma forma em pelo menos uma das marcas comerciais de arroz. Todos os resultados obtidos estavam em concentração inferior ao LQ deste método, inclusive pirimifós-metil, pois, por superposição de matriz, o LD era superior ao LQ por calibração externa com adição de PI, sem prejuízo do resultado, já que o LQ é muito menor que o LMR.

Tabela 30. Resultados das análises de resíduos de agrotóxicos em amostras de arroz adquiridas no comércio, empregando método para determinação de agrotóxicos com calibração por superposição de matriz, segundo os limites de detecção e quantificação.

AGROTÓXICOS	LMR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Amostras comerciais							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Azoxistrombina	0,1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Bispiribac-sódio*	0,5	<LQ	<LQ						
Carbendazim	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ciclossulfamurom	0,5			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Cicloxidim	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Clorantraniliprole	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Epoxiconazol	0,3		<LD					<LD	
Fenoxaprop*	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Imazapic*	0,5	<LD		<LD					
Imazetapir*	0,5							<LQ	
Metsulfamurom	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Microbutanil	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Oxadiazom	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Pirimifós-metil	10	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Tiobecarbe	0,05	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Tiofanato metílico*	0,5							<LD	
Triciclazol	0,5	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Trifloxistrombina*	0,2					<LQ			

Nota: <LQ: a concentração do agrotóxico estava entre o limite de quantificação e o de detecção. <LD: amostras que continham agrotóxico em concentração inferior ao limite de detecção calculado e apresentaram picos no tempo de retenção correspondente a m/z do fragmento de quantificação.

* Compostos com validação apenas no método de superposição de matriz.

A maioria dos estudos mais antigos que determinou agrotóxicos em alimentos apresentou concentração de resíduos de agrotóxicos acima dos LMR, ou pelo menos acima dos LQ. Picó e Kozmutza (2007), por meio de método para determinação de 12 resíduos de agrotóxicos por LC-MS/MS em suco de uva, verificaram que apenas um dos compostos não foi encontrado acima do LQ em alguma das amostras reais analisadas (PICÓ; KOZMUTZA, 2007).

Kmellár e colab. (2008), após validarem método para determinação de 160 agrotóxicos, aplicaram-no em amostras de 14 espécies de vegetais por LC-MS/MS e encontraram 31 tipos de resíduos de agrotóxicos em concentração próxima a 0,1 mg kg⁻¹ e imazalil e malation a 1,0 mg kg⁻¹ em 50 (84%) das 59 amostras analisadas que, apesar de não excederem aos LMR estabelecidos, são possíveis de quantificação por técnicas que empregam detectores MS (KMELLÁR et al., 2008).

Frenich e colab. (2008), analisando 200 amostras de alimentos por LC-MS/MS confirmaram a presença de agrotóxicos em 21% das amostras sendo que em 9% destas havia resíduos acima dos LMR estabelecidos pela União Europeia. Segundo estes pesquisadores, o número de amostras contaminadas em concentrações abaixo dos LMR vem sendo notado, fruto das boas práticas agrícolas (GARRIDO-FRENICH et al., 2008).

Estudos mais recentes demonstram que o número de amostras reais contaminadas acima do LMR tem diminuído, o que num primeiro momento parece ser uma resposta ao monitoramento constante viabilizado pelas tecnologias analíticas disponíveis.

Em 2010, na União Europeia, a EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), constatou que 97% de 77.000 amostras analisadas de 500 diferentes tipos de alimentos apresentavam concentração abaixo dos LMR estabelecidos pela AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), sendo encontrado resíduos acima dos limites apenas em aveia, morango, alface e pêssego (CHAVARRÍAS, 2013).

Nguyen e colab. (2010) analisaram 224 amostras de plantas medicinais empregando método capaz de determinar 234 agrotóxicos por CG-MS, no entanto, apenas 11 (4,9%) continham resíduos de agrotóxicos e estavam abaixo do LMR requerido pela Coreia (NGUYEN et al., 2010).

Na Índia, Srivastava e colab. encontraram resíduos em vegetais na faixa de concentrações entre 5 a 12.350 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (SRIVASTAVA et al., 2011). Em trabalho desenvolvido por Sinha e colab. (2012) no mesmo país, a concentração máxima encontrada foi de 0,6 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (SINHA; VASUDEV; RAO, 2012).

Furlani e colab. (2011) na determinação de sete resíduos de agrotóxicos em caldo de cana, por GC/ECD, não encontraram nenhum dos resíduos acima do LQ em 80 amostras reais deste produto (FURLANI et al., 2011). Estudando a mesma matriz, Sampaio e colab. (2013) na determinação de atrazina e outros nove diferentes compostos por LC-ESI-MS/MS em caldo de cana, não detectaram nenhum destes compostos (SAMPAIO et al., 2013).

Lemes e colab. (2011) empregaram GC com detectores de captura de elétrons (ECD) e fotométrico de chama pulsante (PFPD) na determinação de 34 resíduos em arroz e 40 em feijão em amostras coletadas em municípios do Estado de São Paulo. Das 44 amostras de arroz, apenas o propiconazol foi detectado em 26 amostras e, em 44 amostras de feijão apenas procimidona foi detectada, estando em 11 amostras, ambos em concentração de 0,05 a 0,1 mg kg^{-1} , dentro do LMR (LEMES et al., 2011).

4.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preocupação com o emprego de agrotóxicos e os malefícios do seu consumo existem desde a sua introdução (ANVISA, 2006), principalmente quando se tornaram sistemáticos e amplamente incentivados pela revolução verde entre as décadas de 1960 e 70, no mundo todo. Apesar desta preocupação, apenas anos mais tarde é que os avanços científicos permitiram avaliar a qualidade do alimento oferecido.

No Brasil, após inúmeros alertas de órgãos de saúde, agricultura e instituições de pesquisa, foi com a criação do programa de análise de resíduos de agrotóxicos e alimentos (PARA), em 2001, que se tomou providências oficiais de controle dos resíduos em alimentos. Nos anos entre 2001 e 2004, nove diferentes alimentos estavam sob monitoramento em quatro estados, onde foram constatados que 28% das amostras estavam contaminadas. Com esta constatação, diversos setores da sociedade, como o Instituto de Defesa do Consumidor, começaram a exigir a ampliação do programa, que tem sido executado e seus dados de monitoramento relatados anualmente. Em 2008, 25 estados já faziam parte do PARA, onde 17 produtos agrícolas eram monitorados (ANVISA, 2009b), sendo que apenas em 2010 todos os estados, inclusive o Distrito Federal, foram incluídos no PARA, com 18 produtos monitorados (ANVISA, 2011b). No caso do arroz, os LMR foram estabelecidos pela Anvisa apenas a partir de 2008.

“Em 2005... .. mais de 300 mil toneladas de soja da América do Sul foram rejeitadas pela China no ano passado em razão da contaminação por pesticidas... ..a China também elevou os padrões de pureza em óleo de soja em outubro e suspendeu as compras de soja sul-americana...”
(CHINAFEEDONLINE, 2005)

“A União Européia decidiu suspender a importação de mel produzido no Brasil sob a alegação de que o País não tem equivalência com o bloco no que se refere às diretivas para controle de resíduos e qualidade do produto. A decisão entra em vigor a partir de 17 de março de 2006” (MAPA, 2006).

“Em 28 de dezembro de 2011... ... FDA passou a analisar os sucos importados e a recusar lotes cuja amostra apresentasse residual acima de 10ppb (micrograma por kg). Desde então, lotes de suco de laranja brasileiros e de outras origens têm sido rejeitados, não podendo entrar no país...” (FOODSAFETYBRAZIL, 2012).

É possível compreender que a partir da intensa divulgação de resultados de análises e das exigências do mercado pela mídia pública, os agricultores e cooperativas, assim como as empresas de assistência técnica tenham se preocupado recentemente em evitar que resíduos de agrotóxico estejam em concentrações superiores às estabelecidas pela Anvisa e até mesmo por órgãos internacionais.

Para garantir a segurança e a qualidade do alimento, várias são as formas de se evitar esta contaminação, seja por meio do manejo agroecológico ou sustentável, seja pela criação de cultivares mais resistentes a doenças, ou o pelo emprego de produtos que, em sua composição, tenham associações de ativos, diminuindo a concentração deles, resultando em menor quantidade de um mesmo resíduo.

A fiscalização e a pressão da sociedade sobre a produção e a oferta de alimentos com vista à segurança alimentar e ambiental podem estar ligadas aos resultados da análise das amostras de arroz comercial feita neste estudo. Encontraram-se diferentes resíduos de agrotóxicos, porém em concentrações inferiores ao LMR, garantia legal de qualidade e segurança alimentar.

Diante do exposto, a diminuição da presença de agrotóxico em alimentos não significa garantia da segurança alimentar, ou que os métodos existentes são capazes de garanti-la. Constantemente novos produtos são introduzidos e lançados para aplicação no manejo agrícola e a legislação ainda é pouco atuante na questão dos subprodutos da degradação destes compostos, ou seja, a ausência dos ativos empregados na produção dos alimentos não garante a inocuidade deles, até porque os LMR permitidos são baseados em informações teóricas e nas poucas ou inexistentes informações sobre a toxicidade dos agrotóxicos em humanos. O que há é uma estimativa empírica e de comprometimento duvidoso na determinação destes limites máximos de resíduos.

5. CONCLUSÕES

A técnica de separação por LC e detecção por MS/MS, associado ao método de extração QuEChERS, pode ser empregada nos programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em grãos de arroz destinados ao consumo alimentar.

Por meio do protocolo analítico apresentado, que associa LC-MS/MS e QuEChERS, em apenas 15 minutos pode-se detectar 35 resíduos de agrotóxicos, quantificar até 20 compostos quando a curva analítica for obtida por calibração externa com adição de padrão interno e 28 se for obtida por superposição de matriz dos 71 herbicidas, inseticidas e ou fungicidas indicados para o manejo do arroz irrigado.

A seletividade e a análise rápida por LC-ESI(+)-MS/MS, usando QuEChERS na fase de extração, resulta em método simples, rápido e confiável pela facilidade de utilização, rapidez e custo.

Os métodos validados, tanto por calibração externa com adição de padrão interno, quanto por superposição de matriz, pela rapidez, eficiência e produtividade, podem ser empregados como ferramentas do Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (**PARA**) da Anvisa e para validação das praticas agrícolas no que diz respeito aos LMR dos agrotóxicos utilizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSCIEX. **Pushing the Limits in Mass Spectrometry**. Disponível em: <<http://www.absciex.com/products/mass-spectrometers/qtrap-lcms-systems/3200-qtrap-lcmsms-system>>.
- ABSCIEX. **Advanced QTRAP® System performance – outstanding budget sensitivity**. AB Sciex P ed. [s.l.] AB Sciex Pte. Ltd, 2012.
- ACIEGO PIETRI, J. C.; BROOKES, P. C. Relationships between soil pH and microbial properties in a UK arable soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 1856–1861, jul. 2008.
- ALLEN, J. S. The Emission of Secondary Electrons from Metals Bombarded with Protons. **PHYSICAL REVIEW**, v. 55, p. 336–339, 1939.
- ALMIVIK, M. et al. Multi-year transport studies of sulfonylurea herbicides from a barley field in Norway, 2007-2010. **Bioforsk Report**, v. 6, n. 10, p. 4–45, 2011.
- ALVES, S. R.; SILVA, J. J. O. Avaliação de Ambientes contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Eds.). **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, Saúde e Ambiente**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. p. 137–156.
- AMARANTE JR, O. P. DE. et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: uma breve revisão. **Caderno de Pesquisa**, v. 12, n. 1-2, p. 116–131, 2001.
- ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.
- ANASTASSIADES, M.; MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, n. 1-2, p. 163–184, out. 2003.
- ANVISA. **Resolução RE nº899, de 29/05/2003** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2003.
- ANVISA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361–363, 2006.
- ANVISA. **Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009a. p. 1–12
- ANVISA. **Limite máximo de resíduos: Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA-2009)**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009b. p. 5
- ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA-2008)**. Brasília Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2009c. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>
- ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA-2010)**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011a. p. 26
- ANVISA. **Limite máximo de resíduos: Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA-2011)**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011b. p. 5

ANVISA. **Limite máximo de resíduos. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA-2014)**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014. p. 5

AOAC. **Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures**. Arlington, VA: Association of Official Agricultural Chemists, 1993.

AOAC. **Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures**. Arlington, Va., USA: [s.n.].

BARBOSA, L. C. A. **Os Pesticidas o Homem e o Meio Ambiente**. Viçosa-MG: Universidade de Viçosa, 2004. p. 216

BARKER, A. et al. ISOLATION OF DRUG RESIDUES FROM TISSUES BY SOLID PHASE DISPERSION. **Journal of Chromatography**, v. 475, p. 353–361, 1989.

BARKER, S. A. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. **Journal of chromatography. A**, v. 880, n. 1-2, p. 63–8, 2 jun. 2000.

BATTAGLIN, W. A et al. Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. **The Science of the total environment**, v. 248, n. 2-3, p. 123–33, 5 abr. 2000.

BERKEL, G. J. V.; ZHOUT, F. Electrospray as a Controlled = Current Electrolytic Cell : Electrochemical Ionization of Neutral Analytes for Detection by Electrospray Mass Spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 67, p. 3958–3964, 1995.

BERKEL, G. J. VAN; MCLUCKEY, S. A.; GLISH, G. L. Electrochemical Origin of Radical Cations Observed in Electrospray Ionization Mass Spectra. **Anal. Chem.**, n. 25, p. 1586–1593, 1992.

BLADES, A. T. et al. Hydration Energies in the Gas Phase of Select (MX) m M + Ions , Their Possible Significance. n. 2, p. 11995–12003, 2004.

BONANSEA, R. I.; AMÉ, M. V.; WUNDERLIN, D. A. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). **Chemosphere**, v. 90, n. 6, p. 1860–9, fev. 2013.

BONDARENKO, S.; SPURLOCK, F.; GAN, J. Analysis of pyrethroids in sediment pore water by solid-phase microextraction. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 26, n. 12, p. 2587–93, dez. 2007.

BOTTREL, S. E. C. **Avaliação da remoção da etilenotiouréia (etu) e 1,2,4-triazol através de processos oxidativos avançados e adsorção**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

BOUNIAS, M.; DUJIN, N.; POPESKOVIC, D. S. Sublethal effects of synthetic pyrethroid, deltamethrin, on the glycemia, lipemia, and the gut alkaline phosphatase of honeybees. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 24, p. 149–160, 1985.

BRASIL. **Decreto no 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989**. Brasília Diário Oficial da República Federativa do Brasil, , 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm>

BRISTOL, U. OF. **Life Sciences Mass Spectrometry Facility: natural environment research council**.

BRITO, N. M. et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS : ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003a.

BRITO, N. M. et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS : ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003b.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos 1. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 12, p. 137–162, 2000.

ČAJKA, T. et al. Use of automated direct sample introduction with analyte protectants in the GC–MS analysis of pesticide residues. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 9-10, p. 1048–1060, jun. 2005.

CARNEIRO, R. P. et al. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 413–423, out. 2013.

CAVALCANTE, R. M. et al. Relation factor: a new strategy for quality control in the determination of pesticides in environmental aqueous matrices. **Talanta**, v. 93, p. 212–8, 15 maio 2012.

CAVALIERE, C. et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk: comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. **Journal of chromatography. A**, v. 1101, n. 1-2, p. 69–78, 6 jan. 2006.

CECH, N. B.; ENKE, C. G. Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 13, p. 2717–23, 1 jul. 2000.

CERVERA, M. I. et al. Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of chromatography. A**, v. 1244, p. 168–77, 29 jun. 2012.

CHAVARRÍAS, M. **Restos de pesticidas en alimentos, límites seguros**. Disponível em: <<http://www.netconsumo.com/2013/03/restos-de-pesticidas-en-alimentos.html>>.

CHEN, L. et al. Multi-residue method for fast determination of pesticide residues in plants used in traditional chinese medicine by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1225, p. 132–40, 17 fev. 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O ESTADO DA ARTE DA CROMATOGRAFIA ASSOCIADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA ANÁLISE DE COMPOSTOS TÓXICOS EM ALIMENTOS. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CHICO, J.; VAN HOLTHOON, F.; ZUIDEMA, T. Ion Suppression Study for Tetracyclines in Feed. **Chromatography Research International**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

CHINAFEEDONLINE. **China to Allow Soy Imports, Brazil Agriculture Inspector Says**. Disponível em: <http://global.chinafeedonline.com/global/info/news/show_news_detail.jsp?id=148055>. Acesso em: 11 jul. 2010.

CHOWDHARY, S.; BHATTACHARYYA, R.; BANERJEE, D. Acute organophosphorus poisoning. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 431, p. 66–76, 20 abr. 2014.

CHROMACADEMY. **Understanding GC-MS Analysis (Part 1)**. Disponível em:
<http://www.chromacademy.com/resolver-november2010_Understanding_GCMS_part_1.asp>.
Acesso em: 8 abr. 2013.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R. Qualidade de Medições em Química Analítica. Estudo De Caso: Determinação de Cádmio por Espectrofotometria de Absorção Atômica com Chama. **Química nova**, v. 24, n. 3, p. 374–380, 2001.

CHUNG, S. W. C.; CHAN, B. T. P. Validation and use of a fast sample preparation method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in analysis of ultra-trace levels of 98 organophosphorus pesticide and carbamate residues in a total diet study involving diversified food types. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 29, p. 4815–24, 16 jul. 2010.

COLE, R. **Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications**. New York, Unites States: John Wiley & Sons, Inc., 1997.

CONAB. **Arroz em casca natural**. Disponível em:
<<http://www.conab.gov.br/detalhe.php?c=31211&t=2#this>>.

CONCEIÇÃO, M. H. **Resíduos de Pesticidas em Tomates: Metodologia Analítica e Avaliação da Exposição Humana**. Brasília-DF: Tese (Doutorado). Instituto de Química da Universidade de Brasília, IQ-UnB. Brasília-DF, 2002. p. 147

COOKS, R. G. et al. **For descriptions of instrumentation, typical operating conditions and experimental procedures**. [s.l.: s.n.].

COVEY, T. R.; JAVAHERI, H.; JONG, R. **Method of and apparatus for ionizing an analyte and ion source probe for use therewith** US 10/118,343 . US20030189170 A1USA, 2003. Disponível em:
<<http://www.google.com/patents/US20030189170> >

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de Massas com Ionização por “Electrospray”: Processos Químicos Envolvidos na Formação de Ions de Substâncias Orgânicas de Baixo Peso Molecular. **Química nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

CUADROS-RODRÍGUES, L. C. et al. Calibration in chemical measurement processes . II . A methodological approach. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 620–636, 2001.

CURRAN, W. S.; LIEBL, R. A.; SIMMONS, W. F. Effects of tillage and application method on clomazon, imazaquin, and imazethapyr persistence. **Weed Sci.**, v. 40, p. 482–489, 1992.

DASCHTBOZORGI, Z. et al. Validation of Matrix Matched Calibration for Analysis of Insecticide and Fungicid Residues in Cucumber and Tomato Using Quechers Sample Preparation Followed by Gas. **Journal Chil. Chem. Soc.**, v. 58, n. 2, p. 1701–1705, 2013.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary Mass Spectrometry Wiley- Interscience Series on Mass Spectrometry**. John Wiley ed. New Jersey: [s.n.].

DEMOLINER, A. **Otimização e Validação de Metodologia Analítica Empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Multiclasses de Agrotóxicos e Metabólitos em Água de Superfície e Abastecimento**. [s.l.] FURG, 2008.

DEMOLINER, A. et al. Development and Validation of a Method using SPE and LC-ESI-MS-MS for the Determination of Multiple Classes of Pesticides and Metabolites in Water Samples. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 8, p. 1424–1433, 2010.

DIAO, X. et al. Simultaneous quantitation of 3-n-butylphthalide (NBP) and its four major metabolites in human plasma by LC-MS/MS using deuterated internal standards. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 78-79, p. 19–26, 5 maio 2013.

DÍEZ, C. et al. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of chromatography. A**, v. 1131, n. 1-2, p. 11–23, 27 out. 2006.

DOLE, M. Molecular Beams of Macroions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 49, n. 5, p. 2240, 1968.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, n. 5771, p. 212–7, 14 abr. 2006.

DÓREA, H. S.; LOPES, W. G. Aplicação da Técnica de Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS) na Análise de Pesticidas em Quiabo Por CG-EM. **Química nova**, v. 27, n. 6, p. 892–896, 2004.

DURDEN, D. A. Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 850, n. 1-2, p. 134–46, 1 maio 2007.

EC (SANCO/12571/2013). **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. [s.l.] EUROPEAN COMMISSION, 2013. p. 42

EC/2002/657. **Guidelines for the Implementation**. [s.l.] European Commission, 2002.

EGEA GONZÁLEZ, F. J. et al. Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis. **Journal of chromatography. A**, v. 966, n. 1-2, p. 155–65, 9 ago. 2002.

ELSEVIER. **ScienceDirect**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014.

EMBRAPA. **Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil: sistema de produção 3**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2005.

ESCARRONE, A L. V et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. **Food chemistry**, v. 146, p. 597–602, 1 mar. 2014.

EYER, P. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. **Toxicol. Rev.**, v. 22, p. 165–190, 2003.

F.A.O. **Rice is Life**. Spanish: Food and Agriculture Organization of the United Nations, , 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004/en/rice-us.htm>>. Acesso em: 20 mar. 2014

FAO. **Statistical databases**. [s.l.] Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2006.

FAO. **Statistical databases**. [s.l.] (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2012.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64–71, 1989.

FENN, J. B. *Ab r f.* v. 13, n. 3, p. 101–118, 2002.

FEO, M. L.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 692–705, jul. 2010.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Chromatographic - Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues. In: BARCELÓ, D. (Ed.). **Comprehensive Analytical Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 493.

FERRER, I.; THURMAN, E. M. Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1175, n. 1, p. 24–37, 14 dez. 2007.

FLECK, N. G. et al. Competitividade relativa entre cultivares de arroz irrigado e biótipo de arroz-vermelho. **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 101–111, 2008.

FONTANA, A. R.; BOTTINI, R. High-throughput method based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe followed by liquid chromatography-multi-wavelength detection for the quantification of multiclass polyphenols in wines. **Journal of chromatography. A**, v. 1342, p. 44–53, 16 maio 2014.

FOODSAFETYBRAZIL. **O pesticida carbendazim no suco de laranja**. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.com/o-pesticida-carbendazim-no-suco-de-laranja/#ixzz36PwJ9R5m>>. Acesso em: 3 jul. 2014.

FURLANI, R. P. Z. et al. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1283–1287, jun. 2011.

FUSSELL, R. J. et al. Assessment of the stability of pesticides during cryogenic sample processing. 1. Apples. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 3, p. 441–8, 30 jan. 2002.

FUTRELL, J. H.; MILLER, C. D. Tandem mass spectrometer for study of ion-molecule reactions. Review of Scientific Instruments. **Review of Scientific Instruments**, v. 37, n. 11, p. 1521–1526, 1966.

GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via “fragmentation-degradation” relationships. **Analytical chemistry**, v. 79, p. 307–321, 1 jan. 2007.

GARRIDO-FRENICH, A. et al. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 390, n. 3, p. 947–59, fev. 2008.

GIRAUDEAU, P. et al. Reference and normalization methods: essential tools for the intercomparison of NMR spectra. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. xxx, p. xxx–xxx, maio 2013.

GLISH, G. L.; MCLUCKEY, S. A.; MCKOWN, H. S. Improved Performance of a Tandem Quadrupole/Time-of-Flight Mass Spectrometer. **Analyt. Instrum**, v. 16, 1987.

GOMES, A.S. & MAGALHÃES, A. M. **Gomes, A.S.; Magalhães, A.M. Arroz irrigado no sul do Brasil. Pelotas: Editora Embrapa Clima Temperado, 2004, 900p.** [s.l: s.n.]. p. 2004

GONZÁLEZ, A G.; HERRADOR, M. A; ASUERO, A G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, n. 3, p. 729–36, mar. 1999.

GURE, A. et al. Salting-out assisted liquid-liquid extraction combined with capillary HPLC for the determination of sulfonylurea herbicides in environmental water and banana juice samples. **Talanta**, v. 127, p. 51–8, set. 2014.

GUSTAFSSON, E.; LINDHOLM, E. . Ionização e dissociação de H₂, N₂ e CO RESPONSÁVEL EXCHANGE colisões com POSITIVOS ÇÕES. **Arkiv foer Fysik**, v. 18, p. 219–239, 1960.

GUSTAVO GONZÁLEZ, A.; ÁNGELES HERRADOR, M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227–238, mar. 2007.

HAN, L.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Streamlined sample cleanup using combined dispersive solid-phase extraction and in-vial filtration for analysis of pesticides and environmental pollutants in shrimp. **Analytica chimica acta**, v. 827, p. 40–6, 27 maio 2014.

HARNISCH, M. et al. Collisions of low-energy Ar⁺, N₂⁺, and D₂⁺ ions with room-temperature and heated surfaces of mixed beryllium–tungsten thin films of different composition. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 365-366, p. 316–323, maio 2014.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: LCT Editora, 2008. p. 876

HAY, J. V. Chemistry of sulfonylurea herbicides. **Pestic. Sci.**, v. 29, p. 247– 261, 1990.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of chromatography. A**, v. 1153, n. 1-2, p. 54–73, 15 jun. 2007.

HERNANDO, M. D. et al. Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1815–31, nov. 2007.

HILTON, J. E.; VAN DER NET, A. Dynamics of charged hemispherical soap bubbles. **EPL (Europhysics Letters)**, v. 86, n. 2, p. 24003, 5 abr. 2009.

HIRATA, R. **Piretróides: estrutura química - atividade biológica**. [s.l.: s.n.].

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

HOLADOVA, K. et al. Stability of pesticides in plant extracts used as calibrants in the gas chromatographic analysis of residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 297–304, 1998.

HOLLAWAY, K. L. et al. Persistence and leaching of sul-fonylurea herbicides over a 4-year period in the highly alkaline soils of south-eastern Australia. **Aust J Exp Agric**, v. 46, p. 1069–1076, 2006.

HOU, X. et al. A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1198–205, 1 jun. 2013a.

HOU, X.-L. et al. Evaluation of two modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) sample preparation methods for the analysis of baclofen and gabapentin in feeds by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 88C, p. 53–59, 30 ago. 2013b.

HUBER, L. **Validation of analytical methods: review and strategy**. [s.l.: s.n.].

HUBER, L. **Validation of Analytical Methods and Procedures**. Disponível em: <http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/#03_standard>. Acesso em: 29 jul. 2014.

HUBER, L.; GMBH, H.-P. Validation of Analytical Methods : Review and Strategy LC / GC Magazine. p. 1–17, 1999.

HUERTA, B. et al. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1288, p. 63–72, 3 maio 2013.

HUG, C. et al. Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 184, p. 25–32, jan. 2014.

IBGE. **Área Territorial Brasileira: Consulta por Unidade da Federação**. [s.l.] (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2013.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95)**. [s.l.] International Conference on Harmonisation, 1995.

ICH. **Validation of analytical procedures: methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline. CPMP/ICH/281/95** London International Conference on Harmonisation, , 1996.

IGLESIAS, A. H. **Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas**. Disponível em: <<http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CDMQFjAB&url=http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/000446395.pdf&ei=mY9FU9-uloW50AH_j4GYBQ&usg=AFQjCNHH8mq S7K8C-UC8yNGVpuHzZLiMMA&sig2=54W8eCNAuBzST5YrLgHT3w>> .

INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008**. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2003.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008**. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2007. p. 25

INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008**. [s.l.] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2011. p. 10

IRIBARNE, J. V.; THOMSON, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. **The Journal of Chemical Physics**, v. 64, n. 6, p. 2287–2294, 1976.

ISO. **ISO 5725: accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results** Gêneve International Standards Organization, , 1994.

IUPAC. **Quality Assurance Schemes for Analytical Laboratories _Harmonized Guidelines For Single- Laboratory Validation Of Methods Of Analysis (IUPAC Technical Report)**. [s.l.: s.n.]. v. 74p. 835–855

JEMAL, M.; SCHUSTER, A.; WHIGAN, D. B. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 17, n. 15, p. 1723–1734, 2003.

JENNINGS, K. R. Collision-induced decompositions of aromatic molecular ions. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics**, v. 1, n. 3, p. 227–235, 1968.

JIMÉNEZ, J. J. et al. Liquid–liquid extraction followed by solid-phase extraction for the determination of lipophilic pesticides in beeswax by gas chromatography–electron-capture detection and matrix-matched calibration. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, n. 1, p. 89–97, set. 2004.

JULIANO, B. O. Cap. 3: Polysaccharides, proteins, and lipids of rice. In: JULIANO, B. O. (Ed.). **Rice: chemistry and technology**. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, 1985. p. 17–57.

KANRAR, B.; MANDAL, S.; BHATTACHARYYA, A. Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 42 pesticides in made tea, tea infusion and spent leaves using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 12, p. 1926–33, 19 mar. 2010.

KATTA, V.; ROCKWOOD, A. L.; VESTAL, M. L. Field Limit for Ion Evaporation from Charged. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 103, p. 129–148, 1991.

KEBARLE, P.; TANG, L. From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase: The Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. **ANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 65, n. 22, p. 972–986, 1993.

KING, R. et al. FOCUS: ELECTROSPRAY Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization. v. 0305, n. 00, 2000.

KIOUSSI, M. K. et al. External calibration in gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry measurements of endogenous androgenic anabolic steroids in sports doping control. **Journal of chromatography. A**, v. 1218, n. 33, p. 5675–82, 19 ago. 2011.

KIRCHNER, M. et al. Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants. **Journal of chromatography. A**, v. 1186, n. 1-2, p. 271–80, 4 abr. 2008.

KMELLÁR, B. et al. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1215, n. 1-2, p. 37–50, 26 dez. 2008.

KMELLÁR, B. et al. Study of the effects of operational parameters on multiresidue pesticide analysis by LC-MS/MS. **Talanta**, v. 84, n. 2, p. 262–73, 15 abr. 2011.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 626, n. 1, p. 10–20, 19 set. 2008.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. **Food chemistry**, v. 153, p. 44–51, 15 jun. 2014.

KONERMANN, L. A simple model for the disintegration of highly charged solvent droplets during electrospray ionization. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 3, p. 496–506, mar. 2009.

KOPPEN, B.; SPLIID, N. H. Determination of acidic herbicides using liquid chromatography with pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. **Journal of chromatography. A**, v. 803, n. 1-2, p. 157–68, 17 abr. 1998.

KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1216, n. 4, p. 685–99, 23 jan. 2009.

KRUVE, A. et al. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1187, n. 1-2, p. 58–66, 11 abr. 2008.

KRUVE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: the extrapolative dilution approach. **Analytica chimica acta**, v. 651, n. 1, p. 75–80, 28 set. 2009.

KUSSUMI, T. A. **Desenvolvimento de Método Multirresíduo para Determinação de Pesticidas Benzimidazóis, Carbamatos e Triazinas em Milho por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem e sua Certificação.** [s.l.] IPEN, 2007.

KWON, H.; LEHOTAY, S. J.; GEIS-ASTEGGIANTE, L. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. **Journal of chromatography. A**, v. 1270, p. 235–45, 28 dez. 2012.

LAGANÀ, A. et al. Determination of diphenyl-ether herbicides and metabolites in natural waters using high-performance liquid chromatography with diode array tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 414, n. 1-2, p. 79–94, jun. 2000a.

LAGANÀ, A. et al. Liquid chromatography mass spectrometry tandem for multiresidue determination of selected post-emergence herbicides after soil column extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 415, n. 1-2, p. 41–56, jun. 2000b.

LANDBERG, E.; LUNDBLAD, A.; PÅHLSSON, P. Temperature effects in high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides. **Journal of chromatography. A**, v. 814, n. 1-2, p. 97–104, 24 jul. 1998.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas.** São Paulo: Manolo, 1999. p. 230

LASKOWSKI, D. A. Physical and chemical properties of pyrethroids. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 174, p. 49–170, 2002.

LEANDRO, C. C.; FUSSELL, R. J.; KEELY, B. J. Determination of priority pesticides in baby foods by gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 2, p. 207–212, set. 2005.

LEE, S. W. et al. Development of a new QuEChERS method based on dry ice for the determination of 168 pesticides in paprika using tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1218, p. 4366–4377, 15 jul. 2011.

LEHOTAY, S. J. et al. Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4589–96, out. 2001.

LEHOTAY, S. J. et al. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 595–614, 2005a.

LEHOTAY, S. J. et al. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 595–614, 2005b.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **J. AOAC Int.**, v. 88, p. 615–629, 2005.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5. ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008. p. 357

LEMES, V. R. R. et al. Avaliação de resíduos de agrotóxicos em arroz e feijão e sua contribuição para prevenção de riscos à saúde da população consumidora Survey of pesticide residues in rice and beans and its contribution to prevention of human health risks of consumers. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 113–121, 2011.

LESUEUR, C. et al. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. **Talanta**, v. 75, n. 1, p. 284–93, 15 mar. 2008.

LEVIGARD, Y. A. **A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas do nervodo no meio rural: uma aproximação ao problema na intoxicações por agrotóxicos**. Rio de Janeiro, RJ: Dissertação: (Mestrado em Saúde Pública): ENSP/FIOCRUZ, 2001.

LI, J. et al. Enantioselective determination of triazole fungicide simeconazole in vegetables, fruits, and cereals using modified QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) coupled to gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 702, n. 1, p. 127–35, 19 set. 2011.

LI, X. et al. Dissipation and residues detection of dioctyl-diethylenetriamine cetate in rice plant and environment by QuEChERS method and liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 84, n. 5, p. 596–601, maio 2010.

LIANG, Y.-J. et al. A metabonomic investigation of the effects of 60 days exposure of rats to two types of pyrethroid insecticides. **Chemico-biological interactions**, v. 206, n. 2, p. 302–8, 25 nov. 2013.

LING, Y. et al. High performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight-mass spectrometry as a powerful analytical strategy for systematic analysis and improved characterization of the major bioactive constituents from Radi. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 98C, p. 120–129, 16 maio 2014.

LIU, L. et al. Rapid Analysis of Multiresidual Pesticides in Agricultural Products by Gas Chromatography-mass Spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 783–786, jun. 2006.

LIU, W.; QIN, S.; GAN, J. Chiral stability of synthetic pyrethroid insecticides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3814–20, 18 maio 2005.

LOPES, P. H. **Agrotóxicos: tipos, estruturas, persistência e monitoramento**. Disponível em: <www.sederural.com.br/engambiental/mpss/agrotoxicos_monit.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2014.

MA, Q. et al. Investigation of noncovalent interactions between hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and bovine serum albumin using electrospray ionization-ion mobility-mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 357, p. 34–44, jan. 2014.

MACHADO, R. A. C. **Alterações morfológicas, hepáticas e renais induzidas pela exposição aos fungicidas tebuconazol e mancozeb em *Altibeus literatus***. Viçosa, MG: Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Viçosa, 2010.

MAKAROV, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 6, p. 1156–62, 15 mar. 2000.

MAPA. **UE Confirma Embargo ao Mel Brasileiro**. [s.l.] Ministério da Agricultura, 2006.

MAPA. **Manual De Garantia Da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos. Brasília**. Brasília-DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

MARTINS JR, H. A. **Estudo de Determinação de Resíduos de Glifosato e Ácido Aminometilfosfônico (Ampa) em Amostras de Soja e Água Usando Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem com Ionização por Electrospray (LC-ESI/MS/MS)**. [s.l.] Dissertação (Mestrado) - IPEA: Tecnologia Nuclear-Materiais., 2005. p. 121

MASIÁ, A et al. Multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid phase microextraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1306, p. 1–11, 6 set. 2013.

MASTOVSKA, K. et al. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 10, p. 5959–72, 26 maio 2010.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, n. 2, p. 259–272, jun. 2004.

MCCARTNEY, C. et al. Effects of a strobilurin-based spray programme on disease control, green leaf area, yield and development of fungicide-resistance in *Mycosphaerella graminicola* in Northern Ireland. **Crop Protection**, v. 26, n. 8, p. 1272–1280, ago. 2007.

MCLAFFERTY, F. W. et al. Collisional Activation Spectra of Organic Ions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 95, p. 2120–2129, 1973.

MEI, H. et al. Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 17, n. 1, p. 97–103, jan. 2003.

MENET, M.-C. Principes de la spectrométrie de masse. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 2011, n. 437, p. 41–53, dez. 2011.

MESLEY, R. J.; POCKLINGTON, W. D.; WALKER, R. F. A Review. v. 116, n. October, 1991.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. DO. Espectrometria de Massas com Ionização por “Electrospray” Aplicada ao Estudo de Espécies Inorgânicas e Organometálicas. **Química nova**, v. 26, n. 4, p. 556–563, 2003.

MORENO, J. L. F. et al. Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1111, n. 1, p. 97–105, 7 abr. 2006.

MORIWAKI, H.; YAMAGUCHI, Y.; FUKUSHIMA, M. Directio of Ziram by liquid Chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Rapid Communication in mass spectrometry**, v. 15, p. 2374–2376, 2 jul. 2001.

MOSONACO. **Mass Spectrometry of Natural Compounds**. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/masonaco/Home/mass-spectrometry/sample-introduction-and-ionization/esi-apci>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

MOU, R.-X. et al. Simultaneous determination of triazine herbicides in rice by high-performance liquid chromatography coupled with high resolution and high mass accuracy hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 706, n. 1, p. 149–56, 7 nov. 2011.

MÜLLER, C. et al. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 773, n. 1, p. 47–52, 15 jun. 2002.

NEMOTO, S. et al. Studies on the stability of 89 pesticides in organic solvent. **Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku.**, v. 115, p. 86–92, 1997.

NGUYEN, T. D. et al. A multiresidue method for the determination of 109 pesticides in rice using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample preparation method and gas chromatography / mass spectrometry with temperature control and vacuum concentration. **RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY**, p. 3115–3122, 2007.

NGUYEN, T. D. et al. A multi-residue method for the determination of 203 pesticides in rice paddies using gas chromatography/mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 619, n. 1, p. 67–74, 30 jun. 2008.

NGUYEN, T. D. et al. A multiresidue method for the determination 234 pesticides in Korean herbs using gas chromatography mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 95, n. 1, p. 43–49, maio 2010.

NOCHE, G. G. et al. In situ aqueous derivatization and determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by salting-out-assisted liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1218, n. 37, p. 6240–7, 16 set. 2011.

NÚÑEZ, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. LC–MS/MS analysis of organic toxics in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 683–703, jul. 2005.

PADILLA-SÁNCHEZ, J. A et al. Simultaneous analysis of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in wastewater effluents, using solid phase extraction and further determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2397–404, 15 out. 2011.

PAES, C. M. D. **Desenvolvimento de método LC/MS/MS para análise multirresíduo de agrotóxicos em café**. [s.l.] Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química, 2012. p. 98

PAN, J.; XIA, X.-X.; LIANG, J. Analysis of pesticide multi-residues in leafy vegetables by ultrasonic solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 15, n. 1, p. 25–32, jan. 2008.

PAREJA, L. et al. Analytical methods for pesticide residues in rice. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 270–291, fev. 2011a.

PAREJA, L. et al. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1613–22, 15 fev. 2011b.

PAREJA, L. et al. Occurrence and distribution study of residues from pesticides applied under controlled conditions in the field during rice processing. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4440–8, 9 maio 2012.

PASZKO, T. Adsorption, degradation and mobility of carbendazim in profiles of Polish mineral soils. **Geoderma**, v. 226-227, p. 160–169, ago. 2014.

PAYÁ, P. et al. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1697–714, nov. 2007.

PENG, L.; FARKAS, T. Analysis of basic compounds by reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in high-pH mobile phases. **Journal of chromatography. A**, v. 1179, n. 2, p. 131–44, 1 fev. 2008.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, Saúde e Ambiente**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. p. 384

PHENOMENEX. **Polar-RP Phase Detail**. Disponível em:
<<https://www.phenomenex.com/products/detail/Synergi>>.

PICÓ, Y.; KOZMUTZA, C. Evaluation of pesticide residue in grape juices and the effect of natural antioxidants on their degradation rate. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1805–14, nov. 2007.

PIZZUTTI, I. R. et al. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of chromatography. A**, v. 1142, n. 2, p. 123–36, 23 fev. 2007.

PORTOLÉS, T. et al. Validation of a qualitative screening method for pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. **Analytica Chimica Acta**, jun. 2014.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS – um Método Moderno de Preparo de Amostra para Determinação Multirresíduo de Pesticidas em Alimentos por Métodos Cromatográficos Acoplados à Espectrometria de Massas. **Química nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

PUBMED. US National Library of Medicine National Institutes of Health. 2014.

RADHAIH, V.; RAO, K. J. Toxicity of the pyrethroid insecticide fenvalerate to a fresh water fish, *Tilapia mossambica* (Peters): changes in glycogen metabolism of muscle. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 19, n. 1, p. 116–21, fev. 1990.

REEMTSMA, T.; ALDER, L.; BANASIAK, U. A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1271, n. 1, p. 95–104, 4 jan. 2013.

RIBANI, M. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RICHTER, S. et al. Linearity tests for secondary electron multipliers used in isotope ratio mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 206, n. 1-2, p. 105–127, fev. 2001.

ROBLES-MOLINA, J. et al. Gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry method for monitoring multiclass organic pollutants in Spanish sewage treatment plants effluents. **Talanta**, v. 111, p. 196–205, 15 jul. 2013.

RODRIGUES, E. T.; LOPES, I.; PARDAL, M. Â. Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: a review. **Environment international**, v. 53, p. 18–28, mar. 2013.

RODRIGUES, S. R. **Otimização e Validação de Métodos Empregando Mspd, QuEChERS Modificado e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em Cebola**. Rio Grande, RS: Dissertação (Mestrado) - FURG: Química Tecnológica e Ambiental, 2010. p. 119

ROSENZWEIG, N. et al. Evaluation of QoI Fungicide Application Strategies for Managing Fungicide Resistance and Potato Early Blight Epidemics in Wisconsin. **Plant Disease**, v. 92, n. 4, p. 561–568, 2008.

ROZENTAL, E.; HOZ, S. Intrinsic barrier for protonation of radical anions. **Tetrahedron**, v. 65, n. 52, p. 10945–10949, dez. 2009.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Application of an HPLC–MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 176–183, jul. 2012.

RUBIO-DIAZ, D. E.; FRANCIS, D. M.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E. External calibration models for the measurement of tomato carotenoids by infrared spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 1, p. 121–126, fev. 2011.

SALAU, J. S. et al. Application of solid-phase disk extraction followed by gas and liquid chromatography for the simultaneous determination of the fungicides : captan , captafol , carbendazim , chlorothalonil , ethirimol , folpet , metalaxyl and vinclozolin in environmental . v. 293, p. 109–117, 1994.

SAMPAIO, M. R. F. et al. A method for the determination of multiclass pesticides in sugarcane juice employing QuEChERS and LC-ESI-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 5, n. 8, p. 2028, 2013.

SCIENCE. **The world's leading journal of original Scientific Research, Global News, and Commentary**. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/341/6147/728>>.

SHI, C. et al. Determination of oxadiargyl residues in environmental samples and rice samples. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 84, n. 2, p. 236–9, fev. 2010.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o Estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes. **Química nova**, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.

SILVA, C. M.; FAY, E. F. **Agrotóxicos e Ambiente. Embrapa Informações Tecnológicas**. Brasília: [s.n.]. p. 400

SILVA, R. DE O. et al. Liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry method for determination of twenty multi-class pesticide residues in cashew. **LWT - Food Science and Technology**, v. xxx, n. 1, p. 1–5, nov. 2014.

SINDAG. **Venda de defensivos segue em alta no Brasil**. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2337>.

SINHA, S. N.; VASUDEV, K.; RAO, V. V. M. Quantification of organophosphate insecticides and herbicides in vegetable samples using the “Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe”

(QuEChERS) method and a high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–MS/MS) t. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1574–1584, jun. 2012.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de. Química Analítica**. 8. ed. São Paulo-SP: Editora Thomson, 2006.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos da Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2007.

SLOBODNFK, J.; BRINKMAN, U. A. T. LC/MS interfacing systems in environmental analysis: application to polar pesticides. In: BARCEL, D. (Ed.). **Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance**. [s.l.] Elsevier Science B.V., 1999. v. 6p. 935–1001.

SOLER, C.; JAMES, K. J.; PICÓ, Y. Capabilities of different liquid chromatography tandem mass spectrometry systems in determining pesticide residues in food. Application to estimate their daily intake. **Journal of chromatography. A**, v. 1157, n. 1-2, p. 73–84, 20 jul. 2007.

SOSBAI. **Arroz Irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Porto Alegre, RS: SOSBAI, 2010. p. 161

SOSBAI. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do BrasilXXIX REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO**. Anais...Itajaí: SOSBAI, 2012, 2012

SOUZA CALDAS, S. et al. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. **Talanta**, v. 112, p. 63–8, 15 ago. 2013.

SOUZA, L. M. DE. **Aplicações da Espectrometria de Massas e da Cromatografia Líquida na Caracterização Estrutural de Biomoléculas de Baixa Massa Molecular**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2008.

SPADOTTO, C. A. et al. **Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. p. 29

SRIVASTAVA, A. K. et al. Monitoring of pesticide residues in market basket samples of vegetable from Lucknow City, India: QuEChERS method. **EnvironMonit Assess**, v. 176, p. 465–472, 2011.

STINGL, C. et al. Application of different fragmentation techniques for the analysis of phosphopeptides using a hybrid linear ion trap-FTICR mass spectrometer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1764, n. 12, p. 1842–52, dez. 2006.

SUDISHA, J. et al. Comparative efficacy of strobilurin fungicides against downy mildew disease of pearl millet. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 81, n. 3, p. 188–197, mar. 2005.

THIER, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single- Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

THURMAN, E. M. et al. Analysis of isobaric pesticides in pepper with high-resolution liquid chromatography and mass spectrometry: complementary or redundant? **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, p. 2340–2347, 13 mar. 2013.

TICHA, J. et al. Changes of pesticide residues in apples during cold storage. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 247–256, mar. 2008.

USDA. **Food Assistance Programs to Benefit Nearly 10 Million Worldwide**. [s.l.] (United States Department of Agriculture), 2012.

USF. **Electrospray Thin Film Deposition of Macro-Molecular Materials in Vacuum**. Disponível em: <[http://rsl.eng.usf.edu/Pages/Research Electropray.html](http://rsl.eng.usf.edu/Pages/Research%20Electrospray.html)>. Acesso em: 25 mar. 2014.

USÓ, S. M. R. S. et al. Artigo original Contribuição das moléculas de antígeno de histocompatibilidade leucocitária (HLA) para a contratação de Dupuytren em uma população do Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, n. 1, p. 38–43, 2013.

USP. **Pharmacopeia**. 24. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2000.

VALSAMAKI, V. I. et al. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. **Analytica Chimica Acta**, v. 573-574, p. 195–201, 2006.

VESTAL, M. L. Methods of ion generation. **Chemical reviews**, v. 101, n. 2, p. 361–75, fev. 2001.

VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P. **A Cultura do Arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p. 633

VUKOVIĆ, G. et al. Application of GC–MSD and LC–MS/MS for the determination of priority pesticides in baby foods in Serbian market. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 312–319, dez. 2012.

W.H.O. **The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009**. Stuttgart, Germany: World Health Organization, 2010. p. 78

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1165, n. 1-2, p. 200–12, 21 set. 2007.

WALORCZYK, S. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. **Talanta**, v. 120, p. 106–13, mar. 2014.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. DE. Arroz : composição e características nutricionais. p. 1184–1192, 2008.

WALTON, R. M.; ACVP, D. Validation of Laboratory Tests and Methods. v. 10, n. 2, p. 59–65, 2001.

WANDER, A. E. **A competitividade do agronegócio brasileiro de arroz: Custos e Agronegócio on line**. Goiais, GO: [s.n.]. p. 15

WANG, B. X.; TELEPCHAK, M. J. Determination of Pesticides in Red Wine by QuEChERS Extraction , Rapid Mini-Cartridge Cleanup and LC – MS – MS Detection. **Chromatography Online**, v. 10, n. 5, p. 1–12, 2013.

WANG, G.; COLE, R. B. Charged residue versus ion evaporation for formation of alkali metal halide cluster ions in ESI. **Analytica Chimica Acta**, v. 406, n. 1, p. 53–65, fev. 2000.

WANG, J.; CHOW, W.; CHEUNG, W. Application of a tandem mass spectrometer and core-shell particle column for the determination of 151 pesticides in grains. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 16, p. 8589–608, 24 ago. 2011.

WANG, S.; CYRONAK, M.; YANG, E. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, n. 2, p. 701–7, 17 jan. 2007.

WANG, X.-Z. et al. Qualitative and quantitative analyses of bioactive secolignans from folk medicinal plant *Peperomia dindygulensis* using UHPLC-UV/Q-TOF-MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 94, p. 1–11, jun. 2014.

WARD, W. O. et al. Transcriptional profiles in liver from mice treated with hepatotumorigenic and nonhepatotumorigenic triazole conazole fungicides: Propiconazole, triadimefon, and myclobutanil. **Toxicologic pathology**, v. 34, n. 7, p. 863–78, jan. 2006.

WEBSTER, E. P.; MASSON, J. A. Acetolactate synthase-inhibiting herbicides on imidazolinone-tolerant rice. **Weed Sci.**, v. 49, p. 652–657, 2001.

WEI, B.; MOHAN, K. R.; WEISEL, C. P. Exposure of flight attendants to pyrethroid insecticides on commercial flights: urinary metabolite levels and implications. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 215, n. 4, p. 465–73, jul. 2012.

WEISSBERG, A.; DAGAN, S. Interpretation of ESI(+)-MS-MS spectra—Towards the identification of “unknowns.” **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 299, n. 2-3, p. 158–168, jan. 2011.

WODE, F. et al. Multiresidue analytical method for the simultaneous determination of 72 micropollutants in aqueous samples with ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1270, p. 118–26, 28 dez. 2012.

WOLSKA, L. et al. Problems of PAH quantification by GC-MS method using isotope-labelled standards. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 730–5, 15 maio 2009.

YAMASHITAT, M.; FENN, J. B. Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. v. 434, n. 125, p. 4451–4459, 1984.

YANG, Y. A model for temperature effect on column efficiency in high-temperature liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 558, n. 1-2, p. 7–10, fev. 2006.

ZELENY, J. Instability of Electrified Liquid Surfaces. **The Physical Review**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 1917.

ZHANG, P. et al. Mixed-mode solid-phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine phenoxy acid, sulfonylurea, triazine and other selected herbicides at nanogram per litre levels in environmental waters. **Journal of chromatography. A**, v. 1325, p. 56–64, 17 jan. 2014.

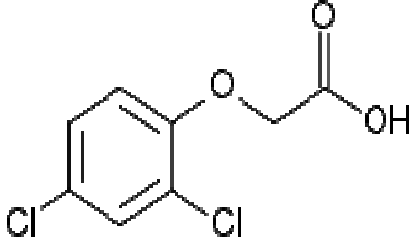
ZHANG, Q. et al. Dissipation and residues of bispyribac-sodium in rice and environment. **Environmental monitoring and assessment**, v. 185, n. 12, p. 9743–9, dez. 2013.

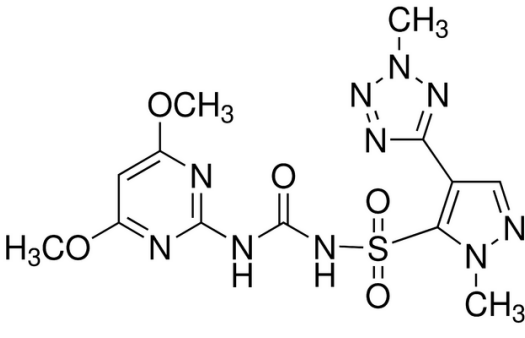
ZIDAR, P. et al. Behavioural response of terrestrial isopods (Crustacea: Isopoda) to pyrethrins in soil or food. **European Journal of Soil Biology**, v. 51, p. 51–55, jul. 2012.

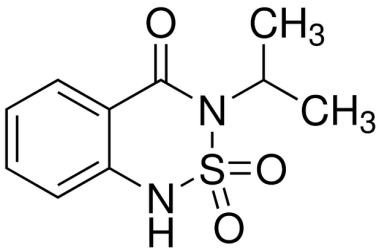
APÊNDICES

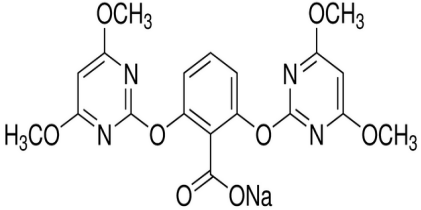
APÊNDICE A: características físico químicas dos agrotóxicos estudados

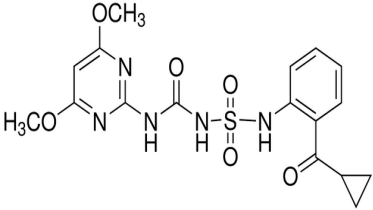
APÊNDICE A1. Herbicidas autorizados para emprego no cultivo em arroz.

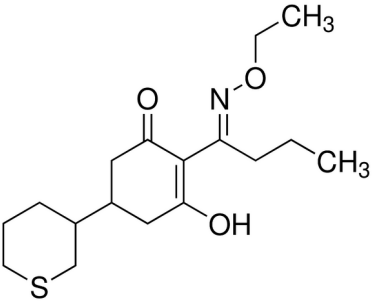
2-4 Ácido Diclorofenoxiacético					
	Grupo químico	Ácido ariloxialcanóico			
	Nome químico IUPAC	2-(2,4-diclorofenoxi) ácido acético			
	Fórmula molecular	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃			
	Número do CAS	94-75-7			
	Nomes Comerciais	aminol, DMA, Herbi D-480, U 46, 2,4-D e Deferon			
	Toxicidade	Classe I			
	Carência	Não determinado			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
221,04	-0,83		Fusão	Ebulição	Degradação
		2,87	138	160	200

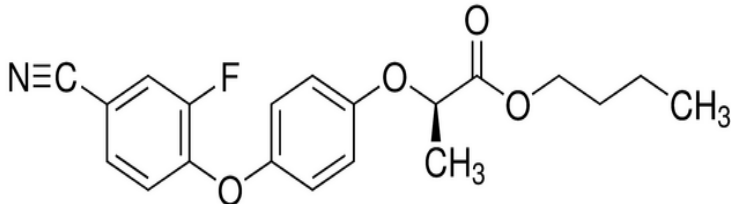
Azinsulfuron					
	Grupo químico	Sulfoniuréia			
	Nome químico IUPAC	1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-[1-methyl-4-(2-methyl-2H-tetrazol-5-yl)pyrazol-5-ylsulfonyl]urea			
	Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₆ N ₁₀ O ₅ S			
	Número do CAS	120162-55-2			
	Nomes Comerciais	Gulliver			
	Toxicidade	Classe III			
	Carência	15 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
424,40	-1,4		Fusão	Ebulição	Degradação
		3,6	170	NE	180

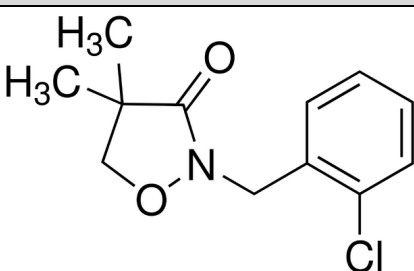
Bentazona					
	Grupo químico	Benzotiadiazinona			
	Nome químico IUPAC	3-isopropyl-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one 2,2-dioxide			
	Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S			
	Número do CAS	25057-89-0			
	Nomes Comerciais	Basagran e Nominee			
	Toxicidade	Classe III			
	Carência	60 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
240,3	-0,46		Fusão	Ebulição	Degradação
		3,28	140	NE	210

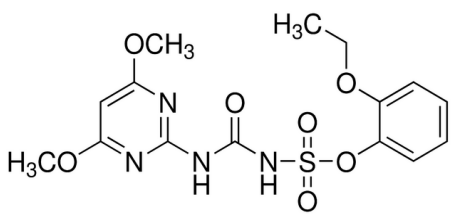
Bispiribac-sódio					
	Grupo químico	Ácido pirimidinil oxibenzóico			
	Nome químico IUPAC	sodium 2,6-bis(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)benzoate			
	Fórmula molecular	C ₁₉ H ₁₇ N ₄ NaO ₈			
	Número do CAS	125401-92-5			
	Nomes Comerciais	SC			
	Toxicidade	Classe III			
	Carência	14 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
452,36	-1,03	3,35	Fusão	Ebulição	Degradação
			223	NE	223

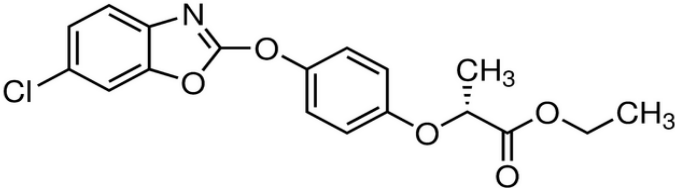
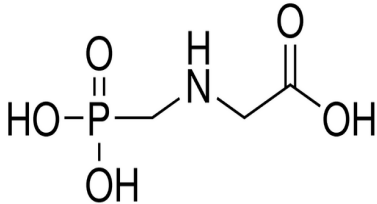
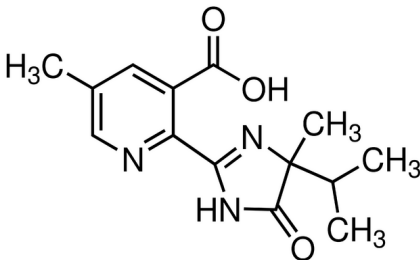
Ciclossulfamrom					
	Grupo químico	Sulfoniluréia			
	Nome químico IUPAC	1-[2-(cyclopropylcarbonyl)anilinosulfonyl]-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)urea			
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₆ S			
	Número do CAS	136849-15-5			
	Nomes Comerciais	Invest			
	Toxicidade	Classe III			
	Carência				
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
421,43	1,41	5,04	Fusão	Ebulição	Degradação
			151,9	NE	NE

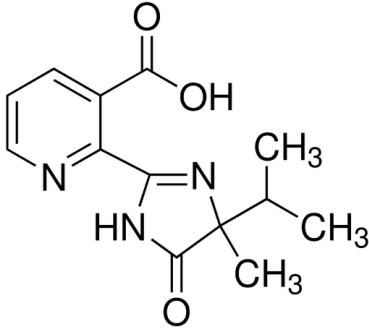
Cicloxidim					
	Grupo químico	Ciclohexanodiona			
	Nome químico IUPAC	2-[142-(4-chlorophenoxy)propoxy]mino buty1]-3-hydroxy-5(tetrahydro-2H-thiopyran-3-y1)-cyclohex-2-enone			
	Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃ S			
	Número do CAS	101205-02-1			
	Nomes Comerciais	Aura			
	Toxicidade				
	Carência				
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
325,46	1,36	4,17	Fusão	Ebulição	Degradação
			37,1	NE	200

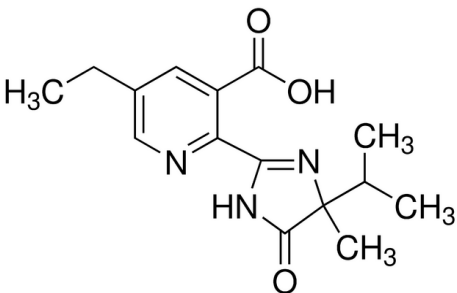
Cihalofop-butil				
				
Grupo químico		Ácido ariloxifenoxipropiônico		
Nome químico IUPAC		butyl(2R)-2-[4-(4-cyano-2-fluorophenoxy)phenoxy] propionate		
Fórmula molecular		C ₂₀ H ₂₀ FNO ₄		
Número do CAS		122008-85-9		
Nomes Comerciais		Clincher		
Toxicidade		Classe III		
Carência		77 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C	
			Fusão	Ebulição
357,38				

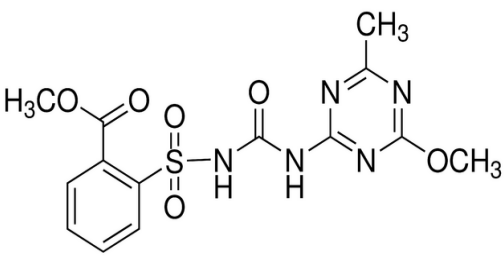
Clomazone					
					
Grupo químico		Isoxazolidinona			
Nome químico IUPAC		2-(2-chlorobenzyl)-4,4-dimethyl-1,2-oxazolidin-3-one			
Fórmula molecular		C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂			
Número do CAS		81777-89-1			
Nomes Comerciais		Gamit			
Toxicidade		Classe III			
Carência		Não determinado			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
239,70	2,54	NA	33,9	281,7	NE

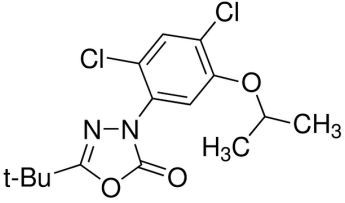
Etoxissulfurom					
					
Grupo químico		Sulfoniluréia			
Nome químico IUPAC		1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-(2-ethoxyphenoxy)sulfonylurea			
Fórmula molecular		C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₇ S			
Número do CAS		126801-58-9			
Nomes Comerciais		Gladium			
Toxicidade		Classe III			
Carência		50 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
398,39	1,01	5,28	150	NE	NE

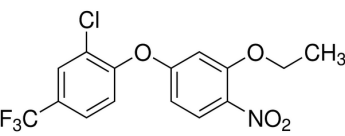
Fenoxaprop-p-etil					
					
Grupo químico		Ácido ariloxifenoxipropiônico			
Nome químico IUPAC		ethyl (R)-2-[4-(6-chloro-1,3-benzoxazol-2-yloxy) phenoxy]propionate			
Fórmula molecular		C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₅			
Número do CAS		71283-80-2			
Nomes Comerciais		Starice e Whip S			
Toxicidade		Classe II			
Carência		80 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
361,78	4,58	0,18	86,5	NE	260
Glifosato					
		Grupo químico		Glicina	
		Nome químico IUPAC		N-(Phosphonomethyl)glycine	
		Fórmula molecular		C ₃ H ₈ NO ₅ P	
		Número do CAS		1071-83-6	
		Nomes Comerciais		Glion, Roundao e Original	
		Toxicidade		Classe IV	
		Carência		Não determinado	
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
169,07	-3,2	2,34	189,5	NE	200
Imazapic					
		Grupo químico		Imidazolinona	
		Nome químico IUPAC		(±)-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-methylnicotinic acid	
		Fórmula molecular		C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃	
		Número do CAS		104098-48-8	
		Nomes Comerciais		Only e Kifix	
		Toxicidade		Classe II	
		Carência		60 dias	
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
275,30	2,47	2,0	205	NE	NE

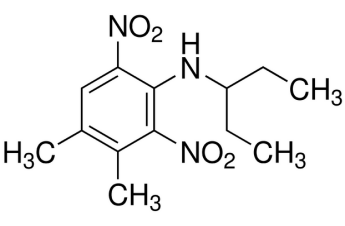
Imazapir					
		Grupo químico	Imidazolinona		
		Nome químico IUPAC	2-[(RS)-4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl]nicotinic acid		
		Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃		
		Número do CAS	81334-34-1		
		Nomes Comerciais	Kifix		
		Toxicidade	Classe I		
		Carência	60 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
261,28	0,11		Fusão	Ebulição	Degradação
		1,9	171	NE	NE

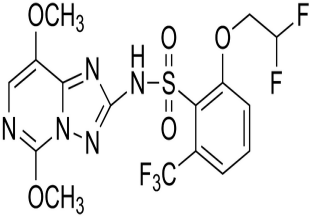
Imazetapir					
		Grupo químico	Imidazolinona		
		Nome químico IUPAC	5-ethyl-2-[(RS)-4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl]nicotinic acid		
		Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₃		
		Número do CAS	81335-77-5		
		Nomes Comerciais	Only		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	60 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
289,33			Fusão	Ebulição	Degradação

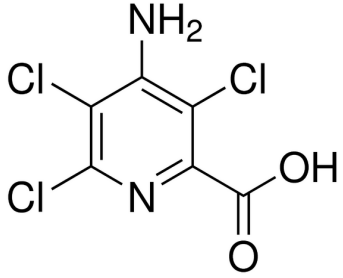
Metsulfurom-metil					
		Grupo químico	Sulfoniluréia		
		Nome químico IUPAC	2-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-ylcarbamoylsulfamoyl)benzoic acid		
		Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S		
		Número do CAS	74223-64-6		
		Nomes Comerciais	Ally		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	30 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
381,36	-1,7		Fusão	Ebulição	Degradação
		3,75	162	NE	NE

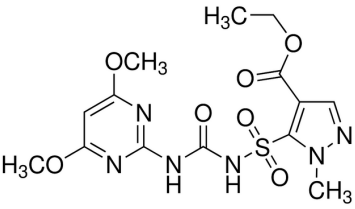
Oxadiazom					
		Grupo químico	Oxadiazolona		
		Nome químico IUPAC	5-tert-butyl-3-(2,4-dichloro-5-isopropoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-one		
		Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃		
		Número do CAS	19666-30-9		
		Nomes Comerciais	Ronstar		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	Não determinado		
		Massa molar	Log P	pKa	T °C
345,22	5,33	Fusão	Ebulição		Degradação
		NA	88,5	282,1	NE

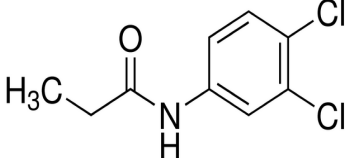
Oxifluorfem					
		Grupo químico	Éter difenílico		
		Nome químico IUPAC	2-chloro-α,α,α-trifluoro-p-tolyl 3-ethoxy-4-nitrophenyl ether		
		Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄		
		Número do CAS	42874-03-3		
		Nomes Comerciais	Goal BR		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	Não determinado		
		Massa molar	Log P	pKa	T °C
361,7	4,68	Fusão	Ebulição		Degradação
		NA	85,3	NE	331

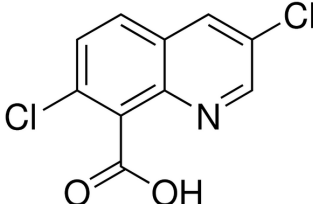
Pendimetalina					
		Grupo químico	Dinitroanilina		
		Nome químico IUPAC	N-(1-ethylpropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylidine		
		Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄		
		Número do CAS	40487-42-1		
		Nomes Comerciais	Herbadox		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	Não determinado		
		Massa molar	Log P	pKa	T °C
281,31	5,2 – 5,56	Fusão	Ebulição		Degradação
		2,8	58	330	NE

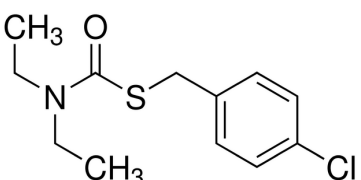
Penoxsulam					
		Grupo químico	Sulfonamida triazolopirimidina		
		Nome químico IUPAC	3-(2,2-difluoroethoxy)-N-(5,8-dimethoxy[1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-2-yl)- α,α -trifluorotoluene-2-sulfonamide		
		Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₄ F ₅ N ₅ O ₅ S		
		Número do CAS	219714-96-2		
		Nomes Comerciais	Ricer		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	98 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
483,37	-0,602	5,1	212	NE	214

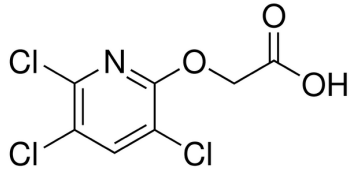
Picloram					
		Grupo químico	Ácido piridino-carboxílico		
		Nome químico IUPAC	4-Amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid		
		Fórmula molecular	C ₆ H ₃ Cl ₃ N ₂ O ₂		
		Número do CAS	1918-02-1		
		Nomes Comerciais	Tordon e Grazon		
		Toxicidade	Classe I		
		Carência	90 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
241,46	-1,92	2,3	174	NE	179

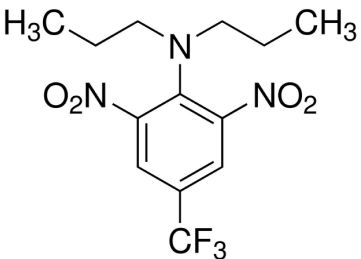
Pirazossulfamurom-etil					
		Grupo químico	Sulfoniluréia		
		Nome químico IUPAC	5-[(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoyl)sulfamoyl]-1-methylpyrazole-4-carboxylic acid		
		Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O ₇ S		
		Número do CAS	93697-74-6		
		Nomes Comerciais	Sirus		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	30 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
414,29	3,16	3,7	181,5	NE	NE

Propanil					
		Grupo químico	Anilida		
		Nome químico IUPAC	3',4'-dichloropropionanilide		
		Fórmula molecular	C ₉ H ₉ Cl ₂ NO		
		Número do CAS	709-98-8		
		Nomes Comerciais	Grassmax, Grassaid, Herbipropanin, Propanil, Fersol, Stam, Stampir e Satanil		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	80 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
218,08	2,29	19,1	91	351	NE

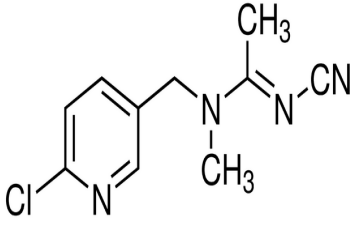
Quinclorac					
		Grupo químico	Ácido quinolinocarboxílico		
		Nome químico IUPAC	3,7-dichloroquinoline-8-carboxylic acid		
		Fórmula molecular	C ₁₀ H ₅ Cl ₂ NO ₂		
		Número do CAS	84087-01-4		
		Nomes Comerciais	Facet		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	90 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
242,06	-1,15	4,34	274	NE	NE

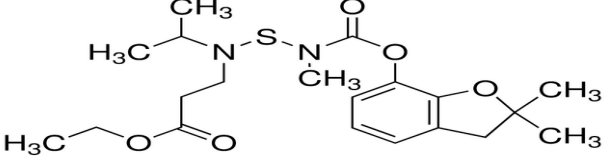
Tiobearbe					
		Grupo químico	Tiocarbamato		
		Nome químico IUPAC	S-4-chlorobenzyl diethylthiocarbamate; S-4-chlorobenzyl diethyl(thiocarbamate)		
		Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₆ ClNOS		
		Número do CAS	28249-77-6		
		Nomes Comerciais	Saturn e Satanil		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	Não determinado		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
257,8	4,23	NA	NE	326,6	NE

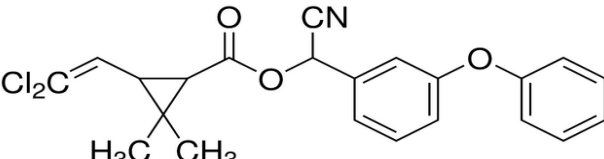
Triclopir					
		Grupo químico	Ácido piridiniloxialcanóico		
		Nome químico IUPAC	3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid		
		Fórmula molecular	C ₇ H ₄ Cl ₃ NO ₃		
		Número do CAS	55335-06-3		
		Nomes Comerciais	Stampir		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	Não determinado		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
256,5	4,62	3,97	Fusão	Ebulição	Degradação
			150	NE	208

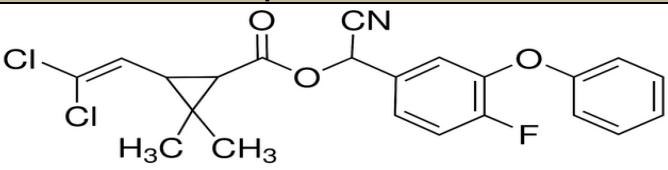
Trifluralina					
		Grupo químico	Dinitroanilina		
		Nome químico IUPAC	2,6-Dinitro- <i>N,N</i> -dipropyl-4-trifluoromethylaniline		
		Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄		
		Número do CAS	1582-09-8		
		Nomes Comerciais	Nortox Gold		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	Não determinado		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
335,28	5,27	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			47,2	NE	202

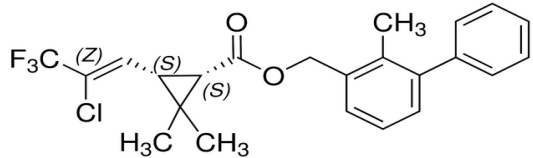
APÊNDICE A2. Inseticidas autorizados para emprego no cultivo em arroz.

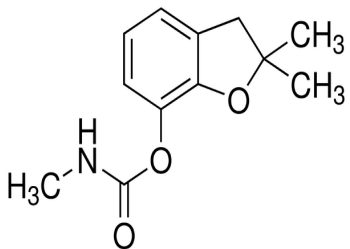
Acetamiprido					
		Grupo químico	Neonicotinóide		
		Nome químico IUPAC	(E)-N-(6-Chloro-3-pyridylmethyl)-N'-cyano-N-methylacetamidine		
		Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄		
		Número do CAS	135410-20-7		
		Nomes Comerciais	Saurus e Mospilan		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	30 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
222,67	0,8	0,7	Fusão	Ebulição	Degradação
			NE	NE	NE

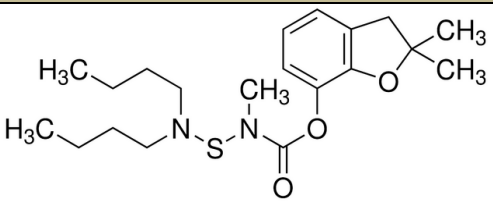
Benfuracarbe					
					
Grupo químico		Metilcarbamato de benzofuranila			
Nome químico IUPAC		ethyl N-[2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl]oxycarbonyl(methyl)aminothio]-N-isopropyl-b-alaninate			
Fórmula molecular		C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅ S			
Número do CAS		82560-54-1			
Nomes Comerciais		Oncol			
Toxicidade		Classe II			
Carência		Não estabelecido			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
410,53	4,22	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			NE	NE	200

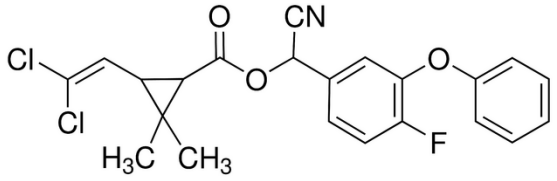
β-cipermetrina					
					
Grupo químico		Piretróide			
Nome químico IUPAC		(RS)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (1RS)-cis-trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate			
Fórmula molecular		C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃			
Número do CAS		65731-84-2			
Nomes Comerciais		Nor-trin			
Toxicidade		Classe II			
Carência		10 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
416,3	5,3	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			41,2	NE	NE

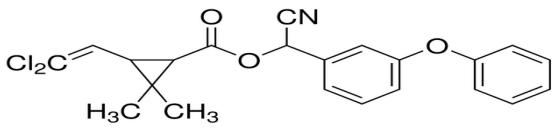
β-ciflutrina					
					
Grupo químico		Piretróide			
Nome químico IUPAC		(S)- α-cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl(1R)-cis-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate			
Fórmula molecular		C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃			
Número do CAS		68359-37-5			
Nomes Comerciais		Solfac e FCR 1272			
Toxicidade		Classe II			
Carência		7 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
434,29	6	NA	NE	NE	NE

Bifentrina					
					
Grupo químico		Piretróide			
Nome químico IUPAC		2-methylbiphenyl-3-ylmethyl (Z)-(1RS,3RS)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate			
Fórmula molecular		C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂			
Número do CAS		82657-04-3			
Nomes Comerciais		Talstar 100 CE			
Toxicidade		Classe II			
Carência		30 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
422,8	6,6	NA	79,6	NE	280

Carbofurano					
					
Grupo químico		Metilcarbamato de benzofurana			
Nome químico IUPAC		2,3-Dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranoil N-metilcarbamate			
Fórmula molecular		C ₁₂ H ₁₅ NO ₃			
Número do CAS		1563-66-2			
Nomes Comerciais		Furadan			
Toxicidade		Classe II			
Carência		Não determinado			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
221,26	1,8	NA	153,1	254	276

Carbosulfano					
					
Grupo químico		Metilcarbamato de benzofuranila			
Nome químico IUPAC		2,3-Dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl (dibutylaminothio)methylcarbamate			
Fórmula molecular		C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₃ S			
Número do CAS		55285-14-8			
Nomes Comerciais		Marshal 200 sc			
Toxicidade		Classe II			
Carência		30 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
380,5	7,42	NA	NE	219,3	219,5

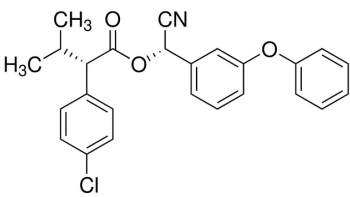
Ciflutrina					
					
Grupo químico		Piretróide			
Nome químico IUPAC		ciano-(4-fluor-3-fenoxifenil)- metil - 3 - (2,2-dicloroetenil) - 2 , 2 - dimetil - ciclopropano carboxilato			
Fórmula molecular		C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃			
Número do CAS		68359-37-5			
Nomes Comerciais		Baytroid e Solfac			
Toxicidade		Classe II			
Carência		7 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
434,29	6	NA	79	NE	210

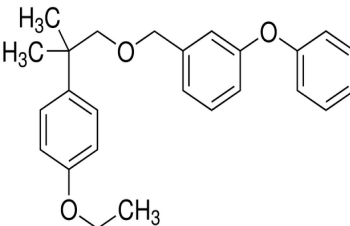
Cipermetrina					
					
Grupo químico		Piretróide			
Nome químico IUPAC		(RS)-a-cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate			
Fórmula molecular		C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃			
Número do CAS		52315-07-8			
Nomes Comerciais		Arrivo			
Toxicidade		Classe II			
Carência		10 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
416,3	5,3	NA	41,2	NE	NE

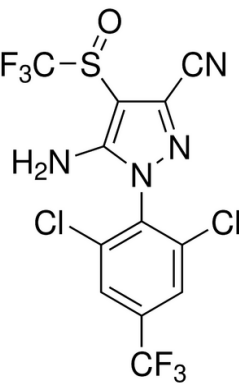
Clorantraniliprole					
		Grupo químico	Antranilamida		
		Nome químico IUPAC	3-bromo-4'-chloro-1-(3-chloro-2-pyridyl)-2'-methyl-6'-(methylcarbamoyl)pyrazole-5-carboxanilide		
		Fórmula molecular	C ₁₈ H ₁₄ BrCl ₂ N ₅ O ₂		
		Número do CAS	50008-45-7		
		Nomes Comerciais	Altacor		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	15 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
483,15	2,86	10,88	Fusão	Ebulição	Degradação
			209	NE	NE

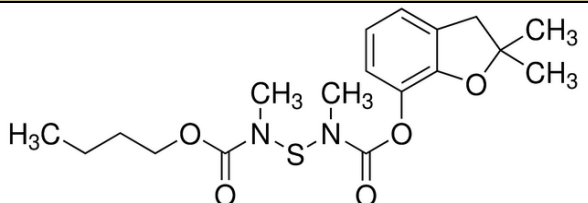
Deltametrina					
Grupo químico		Piretróide			
Nome químico IUPAC		(S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)- 2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate			
Fórmula molecular		C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃			
Número do CAS		52918-63-5			
Nomes Comerciais		Fersol			
Toxicidade		Classe III			
Carência		15 a 37 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
505,20	4,6	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			101	NE	NE

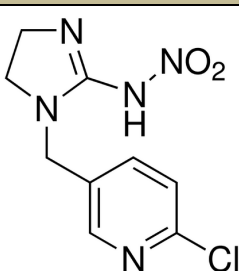
Diflubenzurom					
		Grupo químico	Benzoiluréia		
		Nome químico IUPAC	1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-ifluorobenzoyl)urea		
		Fórmula molecular	C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂		
		Número do CAS	35367-38-5		
		Nomes Comerciais	DU 112307		
		Toxicidade	Classe IV		
		Carência	70 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
310,68	3,89	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			227,6	257	NE

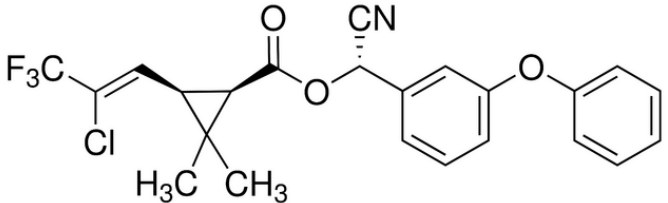
Esfenvalerato					
		Grupo químico	Piretróide		
		Nome químico IUPAC	(S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (S)-2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyrate		
		Fórmula molecular	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃		
		Número do CAS	66230-04-4		
		Nomes Comerciais	Sumidan 25 EC		
		Toxicidade	Classe II		
		Carência	15 a 21 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
419,90	6,42	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			60	360	NE

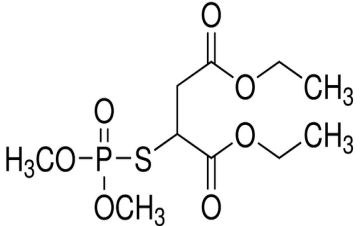
Etofemproxi					
		Grupo químico	Éter difenílico		
		Nome químico IUPAC	2-(4-Ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzyl ether		
		Fórmula molecular	C ₂₅ H ₂₈ O ₃		
		Número do CAS	80844-07-1		
		Nomes Comerciais	Safety		
		Toxicidade	Classe IV		
		Carência	3 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
376,49	6,9	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			37,4	NE	200

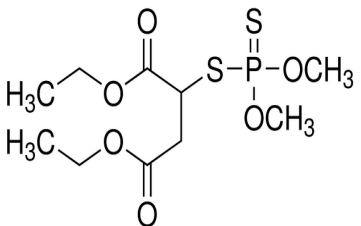
Fipronil					
		Grupo químico	Pirazol		
		Nome químico IUPAC	5-amino-1-(2,6-dichloro-α,α,α-trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile		
		Fórmula molecular	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS		
		Número do CAS	120068-37-3		
		Nomes Comerciais	Standak		
		Toxicidade	Classe II		
		Carência	30 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
437,15	3,75	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			203	NE	230

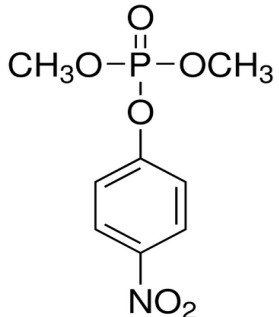
Furatiocarbe					
					
Grupo químico		Metilcarbamato de benzofuranila			
Nome químico IUPAC		butyl 2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl N,N'-dimethyl-N,N'-thiodicarbamate			
Fórmula molecular		C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₅ S			
Número do CAS		65907-30-4			
Nomes Comerciais		CGA 73 102			
Toxicidade		Classe II			
Carência		Não estabelecido			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
382,47	4,6	NA	NE	150	NE

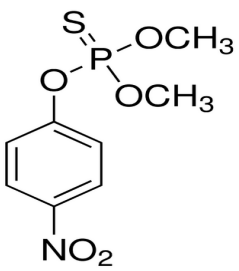
Imidacloraprida					
					
Grupo químico		Neonicotinóide			
Nome químico IUPAC		(E)-1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine			
Fórmula molecular		C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂			
Número do CAS		138261-41-3			
Nomes Comerciais		Gaucho e Nortox SA			
Toxicidade		Classe III			
Carência		Não determinado			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
255,66	0,57	NA	144	NE	230

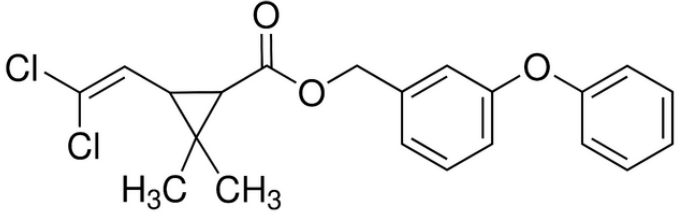
λ-cialotrina					
					
Grupo químico		Piretróide			
Nome químico IUPAC		(R)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (1S,3S)-3-[(Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoropropenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate and (S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-[(Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoropropenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate			
Fórmula molecular		C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃			
Número do CAS		91465-08-6			
Nomes Comerciais		Platinum neo			
Toxicidade		Classe III			
Carência		21 a 42 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
449,85	6,9	NA	49,2	NE	NE

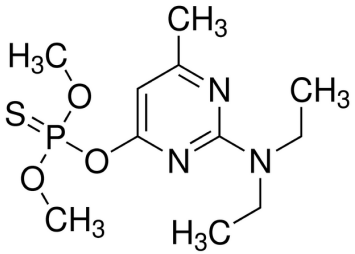
Malaixon					
		Grupo químico	Dietil Ester		
		Nome químico IUPAC	diethyl 2-(dimethoxyphosphorylsulfanyl)butanedioate		
		Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₉ O ₇ PS		
		Número do CAS	1634-78-2		
		Nomes Comerciais			
		Toxicidade			
		Carência	Não determinado		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
314,29	2,3		Fusão	Ebulição	Degradação
		NA	NE	NE	NE

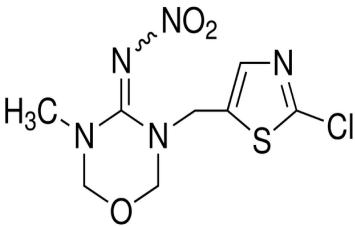
Malationa					
		Grupo químico	Organofosforado		
		Nome químico IUPAC	diethyl (dimethoxythiophosphorylthio)succinate		
		Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂		
		Número do CAS	121-75-5		
		Nomes Comerciais	Malathion 500		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	60 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
330,36	2,75		Fusão	Ebulição	Degradação
		NA	-20	NE	174

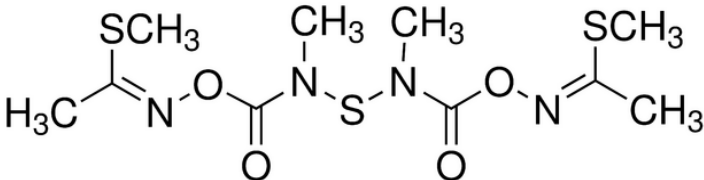
Paraoxon-metil					
		Grupo químico	Organofosforado		
		Nome químico IUPAC	diethyl 4-nitrophenyl phosphate		
		Fórmula molecular	C ₈ H ₁₀ NO ₆ P		
		Número do CAS	950-35-6		
		Nomes Comerciais	Folisuper 600 BR		
		Toxicidade			
		Carência	Não determinado		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
247,14	2,31		Fusão	Ebulição	Degradação
		NA	NE	344,7	NE

Parationa-metílica					
		Grupo químico	Organofosforados		
		Nome químico IUPAC	O,O-Dimethyl O-(4-nitrophenyl) phosphorothioate, Methyl parathion		
		Fórmula molecular	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS		
		Número do CAS	298-00-0		
		Nomes Comerciais	Folisuper 600 Br		
		Toxicidade	Classe I		
		Carência	Não determinado		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
263,21	3,0	NA	35,5	315	NE

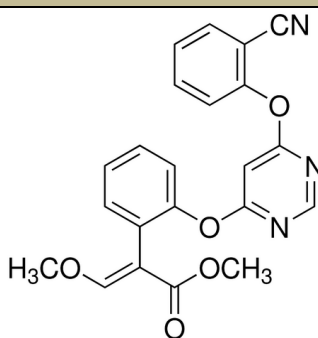
Permetrina					
					
Grupo químico		Piretróide			
Nome químico IUPAC		3-Phenoxybenzyl(1RS)-cis,trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate			
Fórmula molecular		C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃			
Número do CAS		52645-53-1			
Nomes Comerciais		Nedax			
Toxicidade		Classe III			
Carência		20 a 60 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
391,30	6,1	NA	34,5	200	NE

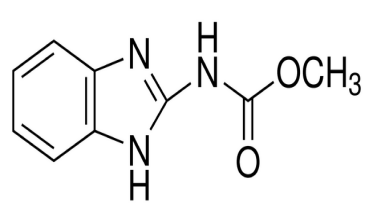
Pirimifós-metílico					
		Grupo químico	Organofosforado		
		Nome químico IUPAC	O-2-diethylamino-6-methylpyrimidin-4-yl O,O-dimethyl phosphorothioate		
		Fórmula molecular	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS		
		Número do CAS	29232-93-7		
		Nomes Comerciais	Actellic 500 EC		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	45 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
305,33	3,9	4,3	21	NE	200

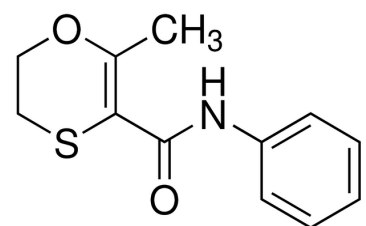
Tiametoxam					
		Grupo químico	Neonicotinóide		
		Nome químico IUPAC	(E)-3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine		
		Fórmula molecular	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S		
		Número do CAS	153719-23-4		
		Nomes Comerciais	Actara e Platinum neo		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	21 a 78 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
291,71	-0,13	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			139,1	NE	147

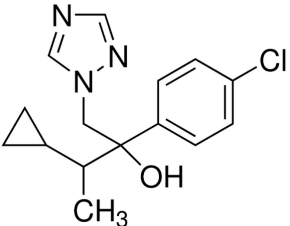
Tiodicarbe					
					
Grupo químico		Metilcarbamato de oxima			
Nome químico IUPAC		3,7,9,13-tetramethyl-5,11-dioxa-2,8,14-trithia-4,7,9,12-tetraazapentadeca-3,12-diene-6,10-dione			
Fórmula molecular		C ₁₂ H ₁₆ ClNOS			
Número do CAS		59669-26-0			
Nomes Comerciais		SADDLER 350 SC			
Toxicidade		Classe II			
Carência		Não deerminado			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
354,47	1,62	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			172,6	NE	184,7

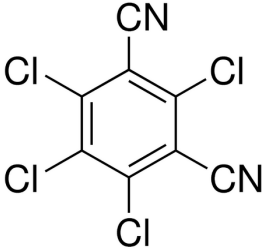
APÊNDICE A3. Fungicidas autorizados para emprego no cultivo em arroz.

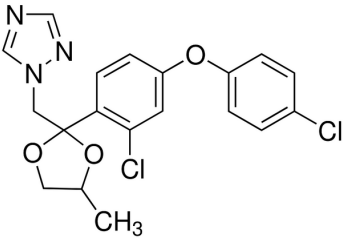
Azoxistrombina					
		Grupo químico	Estrobilurina		
		Nome químico IUPAC	methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3-methoxyacrylate		
		Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅		
		Número do CAS	131860-33-8		
		Nomes Comerciais	Piori		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	30 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
403,4	2,5		Fusão	Ebulição	Degradação
		NA	116	360	345

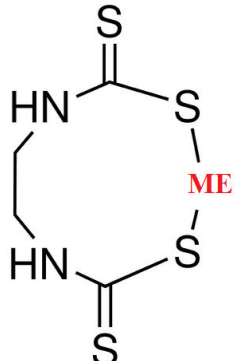
Carbendazim					
		Grupo químico	Benzimidazol		
		Nome químico IUPAC	Methyl 2-benzimidazolecarbamate, Methyl benzimidazol-2-ylcarbamate		
		Fórmula molecular	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂		
		Número do CAS	10605-21-7		
		Nomes Comerciais	Carbendazim Nortox		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	Não determinado		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
191,21	1,48		Fusão	Ebulição	Degradação
		4,2	305	NE	305

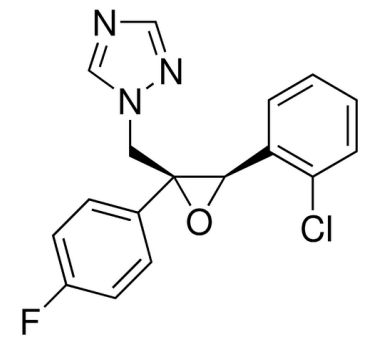
Carboxina					
		Grupo químico	Carboxanilida		
		Nome químico IUPAC	5,6-dihydro-2-methyl-1,4-oxathi-ine-3-carboxanilide		
		Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S		
		Número do CAS	5234-68-4		
		Nomes Comerciais	Vitavax 200 SC		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	Não determinado		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
235,30	2,3		Fusão	Ebulição	Degradação
		0,5	91,5	NE	210

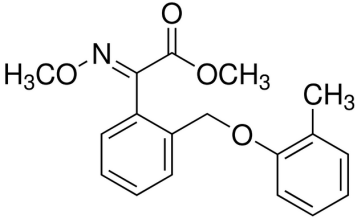
Ciproconazol					
		Grupo químico	Triazol		
		Nome químico IUPAC	(2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-chlorophenyl)-3-cyclopropyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol		
		Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O		
		Número do CAS	94361-06-5		
		Nomes Comerciais	Priori xtra		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	30 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
291,78	NA		Fusão	Ebulição	Degradação
		NA	106,5	NE	299

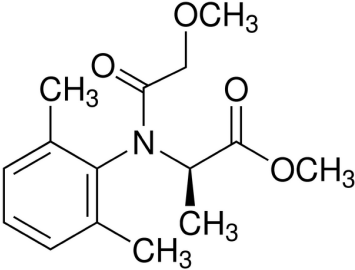
Clorotalonil					
		Grupo químico	Isoftalonitrila		
		Nome químico IUPAC	2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile		
		Fórmula molecular	C ₈ H ₁₉ NO ₄		
		Número do CAS	1897-45-6		
		Nomes Comerciais	Bravo e Daconil		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	15 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
265,91	2,94		Fusão	Ebulição	Degradação
		NA	252,1	350	NE

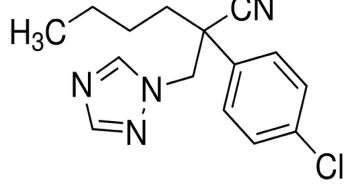
Difenoconazol					
		Grupo químico	Triazol		
		Nome químico IUPAC	cis-trans-3-chloro-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-2-yl]phenyl 4-chlorophenyl ether		
		Fórmula molecular	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃		
		Número do CAS	119446-68-3		
		Nomes Comerciais	Prisma		
		Toxicidade	Classe I		
		Carência	45 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
406,26	4,36		Fusão	Ebulição	Degradação
		1,07	82,5	101	337

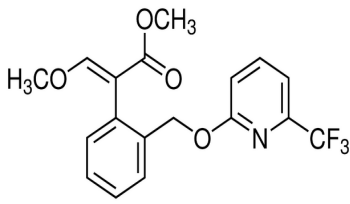
Ditiocarbamatos					
					
ME = Fe ⁺³ , Mn ⁺² , Zn ⁺²					
Grupo químico		Organofosforados			
Nome químico IUPAC		ME ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt			
Fórmula molecular		[C ₄ H ₆ ME N ₂ S ₄] _n			
Número do CAS		8018-01-7 (Zn) 12427-38-2 (Mn)			
Nomes Comerciais		Dithiobin 780 PM, Mancozeb, Maneb			
Toxicidade		Classe III			
Carência		15 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
210,37+ME					
Maneb = Etileno bis-ditiocarbamato de manganês PM 264,9 Zineb = Etileno bis-ditiocarbamato de zinco PM 265,3 Ferbam = Dimetil ditiocarbamato férrico PM 416,5 Ziram = Dimetil ditiocarbamato de zinco PM 305,82					

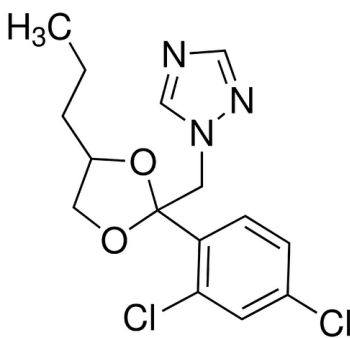
Epoxiconazol					
					
Grupo químico		Triazol			
Nome químico IUPAC		(2RS,3SR)-1-[3-(2-chlorophenyl)-2,3-epoxy-2-(4-fluorophenyl)propyl]-1H-1,2,4-triazole			
Fórmula molecular		C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O			
Número do CAS		133855-98-8			
Nomes Comerciais		Brio			
Toxicidade		Classe I			
Carência		45 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
329.76	3,3	NA	136,7	NE	310

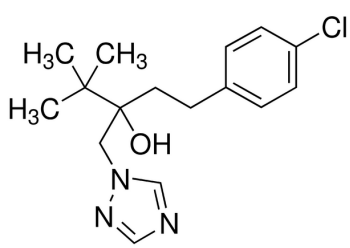
Kresoxim-metil					
		Grupo químico	Estrobilurina		
		Nome químico IUPAC	methyl (E)-methoxyimino[α-(o-tolylloxy)-o-tolyl]acetate		
		Fórmula molecular	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄		
		Número do CAS	143390-89-0		
		Nomes Comerciais	Brio		
		Toxicidade	Classe III		
		Carência	45 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
313,35	3,4	NA	102	NE	310

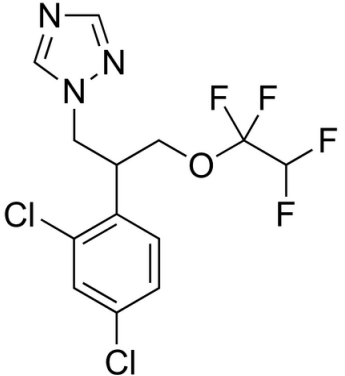
Metalaxil-M					
		Grupo químico	Acilalaninato		
		Nome químico IUPAC	N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)-D-alanine methyl ester		
		Fórmula molecular	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄		
		Número do CAS	70630-17-0		
		Nomes Comerciais	Ridomil gold mz		
		Toxicidade	Classe II		
		Carência	Não estabelecido		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
279,33	1,71	NA	-38,7	NE	NE

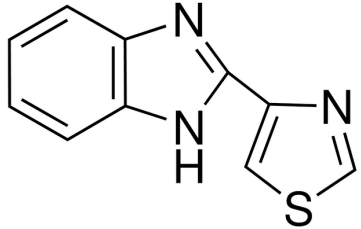
Miclobutanil					
		Grupo químico	Triazol		
		Nome químico IUPAC	2-p-chlorophenyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)hexanenitrile		
		Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄		
		Número do CAS	88671-89-0		
		Nomes Comerciais			
		Toxicidade	Classe I		
		Carência	25 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
			Fusão	Ebulição	Degradação
288,78	2,89	NA	NE	NE	NE

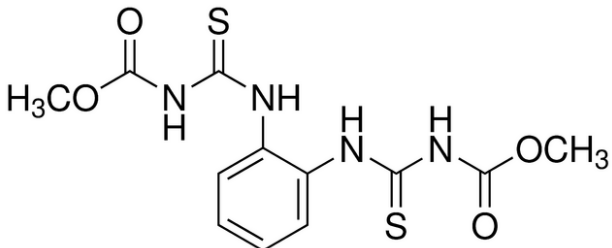
Picoxistrobina					
		Grupo químico	Estrobilurina		
		Nome químico IUPAC	Methyl (E)- α -methoxymethylene-2-(3-trifluoromethyl-2-pyridyloxymethyl)phenylacetate		
		Fórmula molecular	C ₁₈ H ₁₆ F ₃ NO ₄		
		Número do CAS	117428-22-5		
		Nomes Comerciais	Aproach		
		Toxicidade	Classe II		
		Carência	42 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
367,32	3,6	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			75	NE	NE

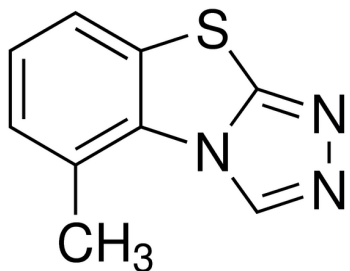
Propiconazol					
		Grupo químico	Triazol		
		Nome químico IUPAC	(RS)-1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl]-1H-1,2,4-triazole		
		Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂		
		Número do CAS	60207-90-1		
		Nomes Comerciais	Nortox		
		Toxicidade	Classe II		
		Carência	45 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
342,22	3,72	1,09	Fusão	Ebulição	Degradação
			-23	NE	355

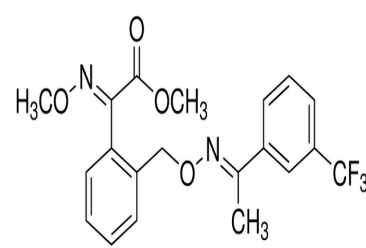
Tebuconazol					
		Grupo químico	Triazol		
		Nome químico IUPAC	(RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol		
		Fórmula molecular	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O		
		Número do CAS	107534-96-3		
		Nomes Comerciais	Nativo		
		Toxicidade	Classe I		
		Carência	35 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
307,82	3,7	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			105	NE	350

Tetraconazol					
		Grupo químico	Triazol		
		Nome químico IUPAC	(RS)-2-(2,4-dichlorophenyl)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl 1,1,2,2-tetrafluoroethyl ether		
		Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O		
		Número do CAS	112281-77-3		
		Nomes Comerciais	Eminent		
		Toxicidade	Classe II		
		Carência	42 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
372,15	3,56	0,65	Fusão	Ebulição	Degradação
			-29,2	NE	235

Tiabendazol					
		Grupo químico	Benzimidazol		
		Nome químico IUPAC	2-(4-Thiazolyl)benzimidazole		
		Fórmula molecular	C ₁₀ H ₇ N ₃ S		
		Número do CAS	148-79-8		
		Nomes Comerciais	Maxim		
		Toxicidade	Classe IV		
		Carência	Não determinado		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
201,25	2,39	4,73	Fusão	Ebulição	Degradação
			297	NE	NE

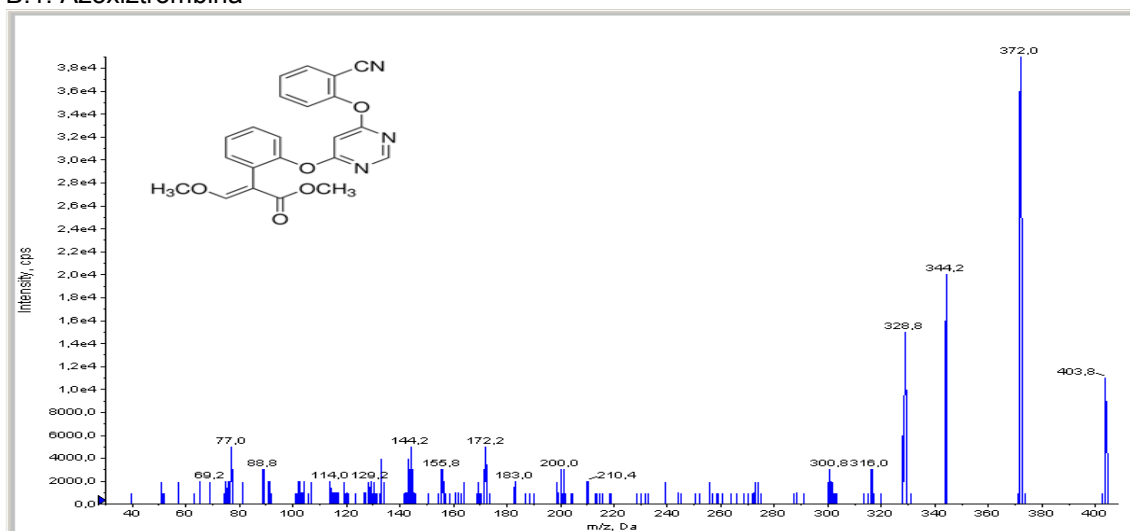
Tiofanato metílico					
					
Grupo químico		Benzimidazol			
Nome químico IUPAC		dimethyl 4,4'-(o-phenylene)bis(3-thioallophanate)			
Fórmula molecular		C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂			
Número do CAS		23564-05-8			
Nomes Comerciais		Dithiobin 780 PM			
Toxicidade		Classe IV			
Carência		7 dias			
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
189,24	1,45	7,28	Fusão	Ebulição	Degradação
			NE	NE	165

Triciclazol					
		Grupo químico	Benzotiazol		
		Nome químico IUPAC	5-methyl-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3]benzothiazole		
		Fórmula molecular	C ₉ H ₇ N ₃ S		
		Número do CAS	41814-78-2		
		Nomes Comerciais	Bim 750 BR		
		Toxicidade	Classe II		
		Carência	30 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
189,24	1,4	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			185,9	NE	285,3

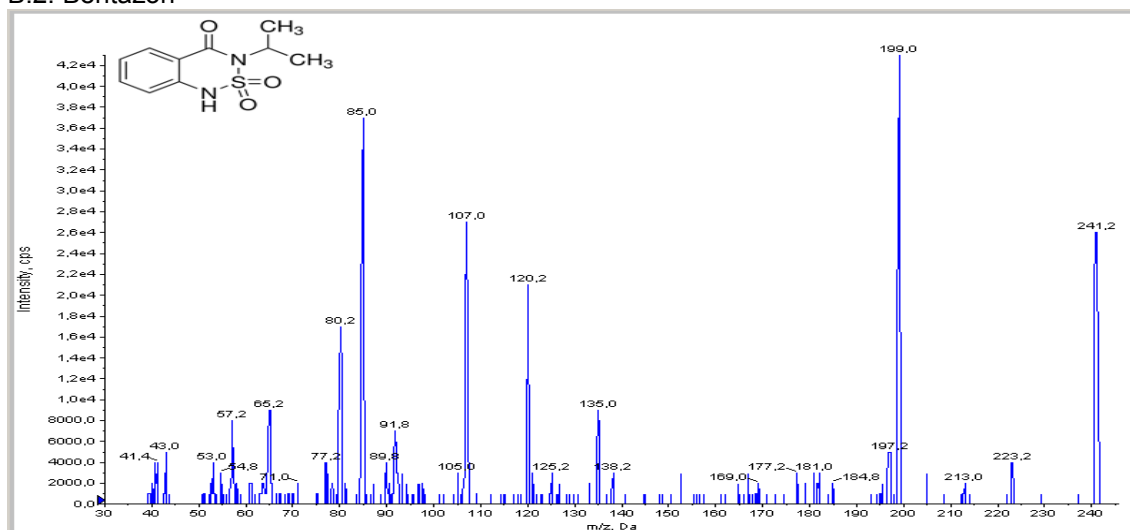
Trifloxistrobina					
		Grupo químico	Estrobirulina		
		Nome químico IUPAC	methyl (E)-methoxyimino-((E)-α-[1-(α,α,α-trifluoro-m-tolyl)ethylideneaminooxy]-o-tolyl}acetate		
		Fórmula molecular	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄		
		Número do CAS	141517-21-7		
		Nomes Comerciais	Nativo		
		Toxicidade	Classe II		
		Carência	15 dias		
Massa molar	Log P	pKa	T °C		
408,37	4,5	NA	Fusão	Ebulição	Degradação
			72,9	NE	285

APÊNDICE B: espectros de massas dos agrotóxicos ionizados por ESI(+).

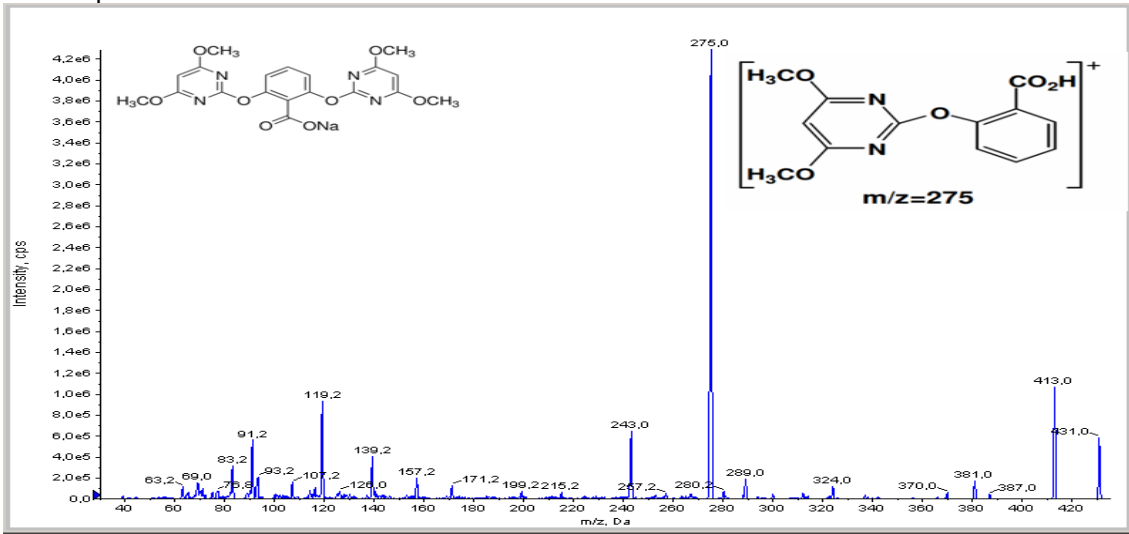
B.1. Azoxiztrombina



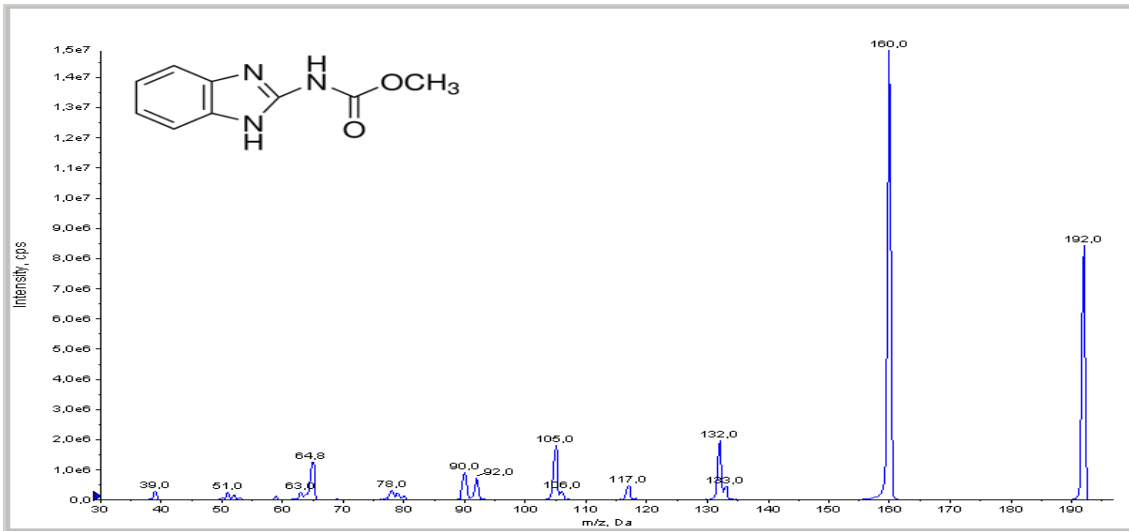
B.2. Bentazon



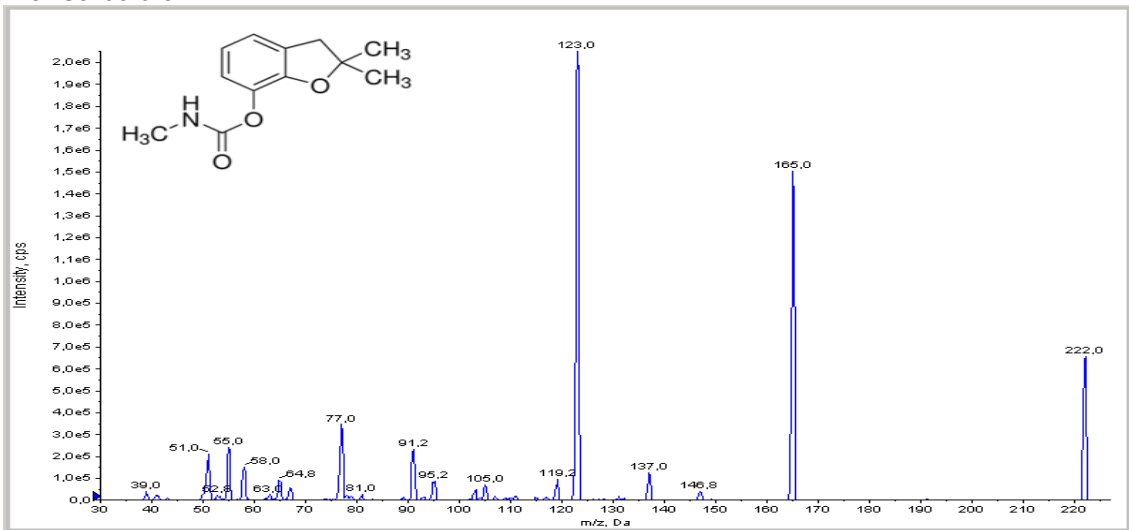
B.3. Bispiribac-sódio



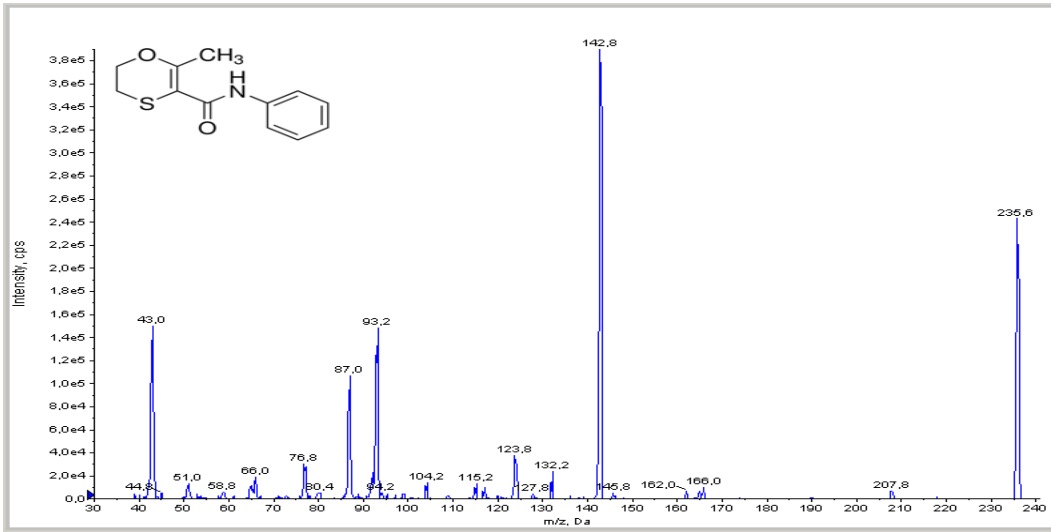
B.4. Carbendazim



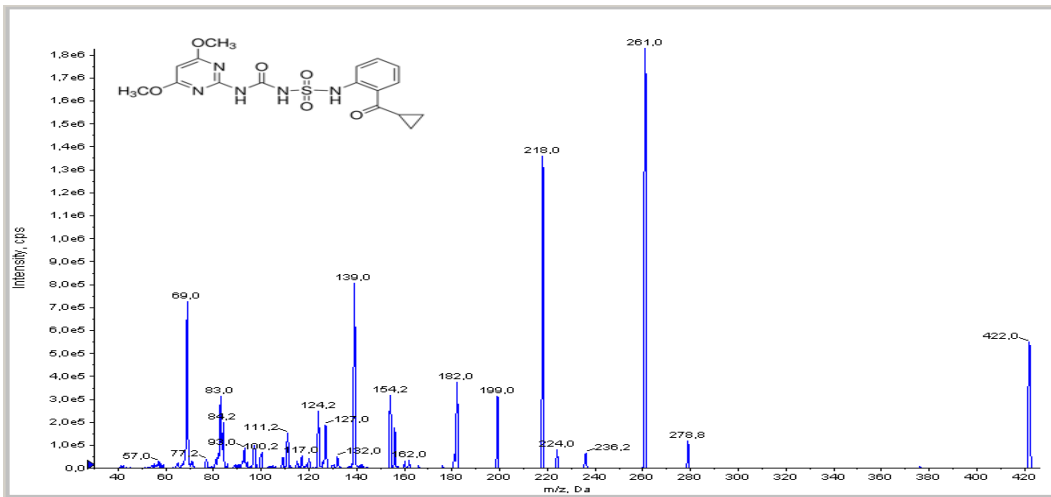
B.5. Carbofuran



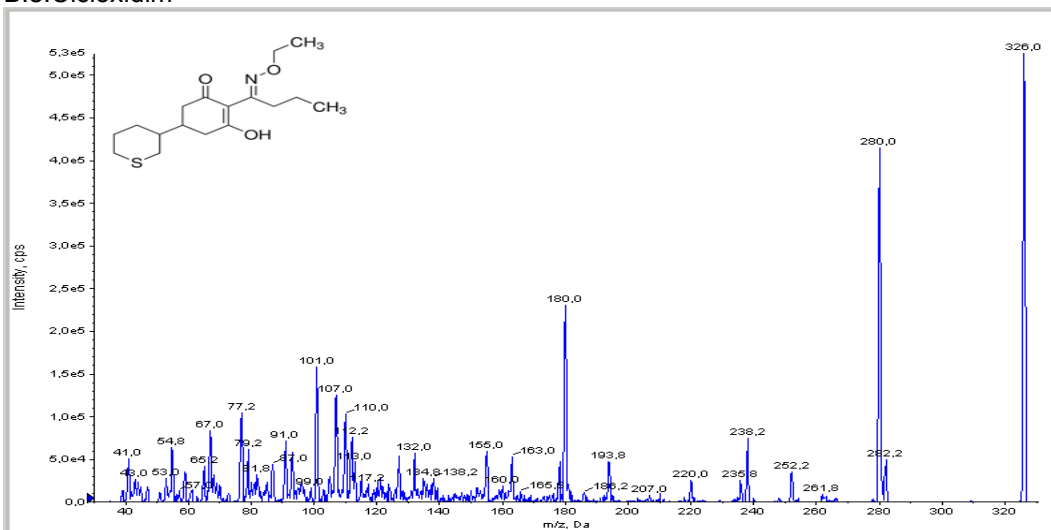
B.6. Carboxina



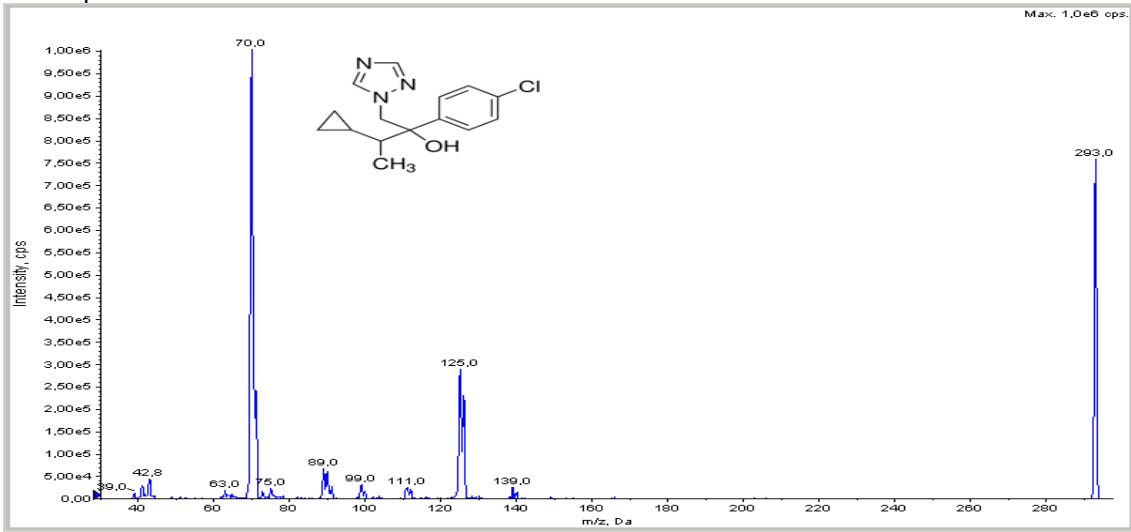
B.7. Ciclossulfamurom



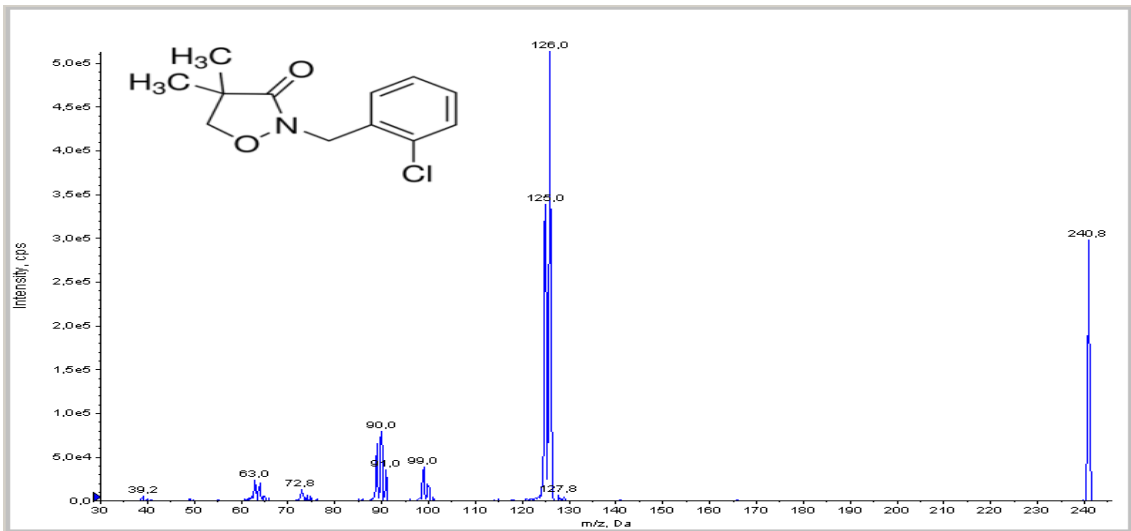
B.8. Ciclodim



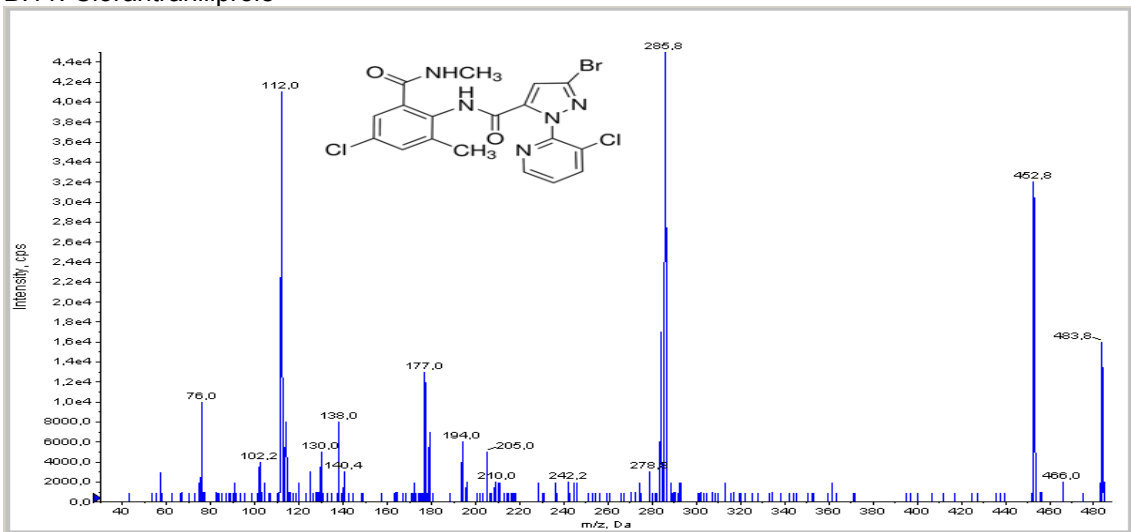
B.9. Ciproconazol



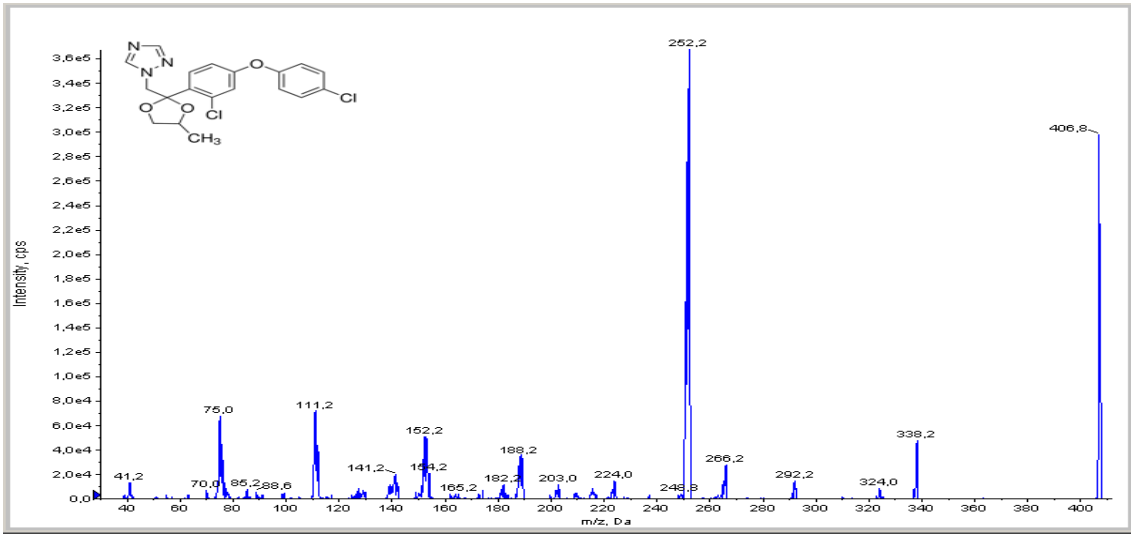
B.10. Clomazone



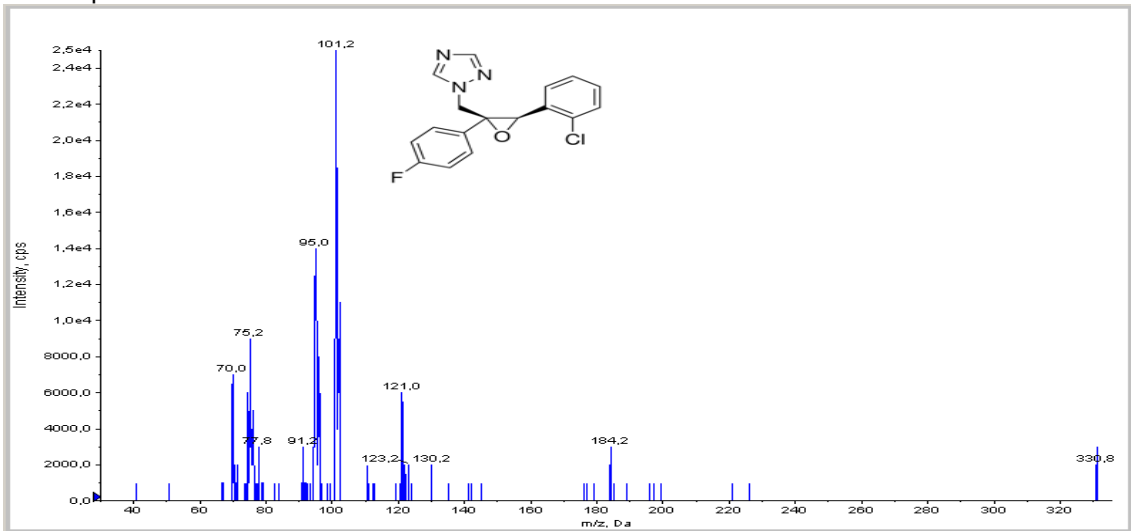
B.11. Clorantraniliprole



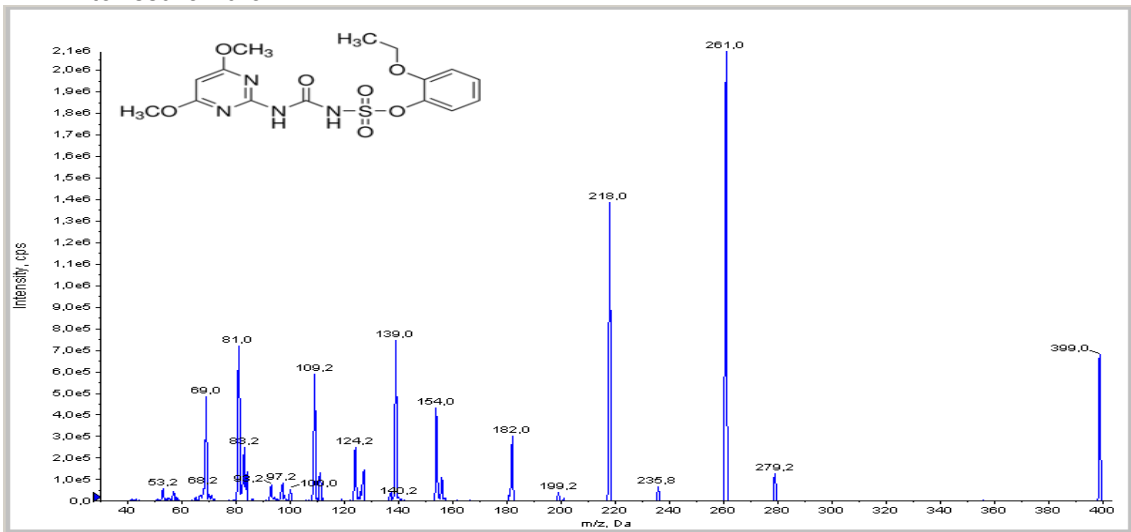
B.12. Difenoconazol



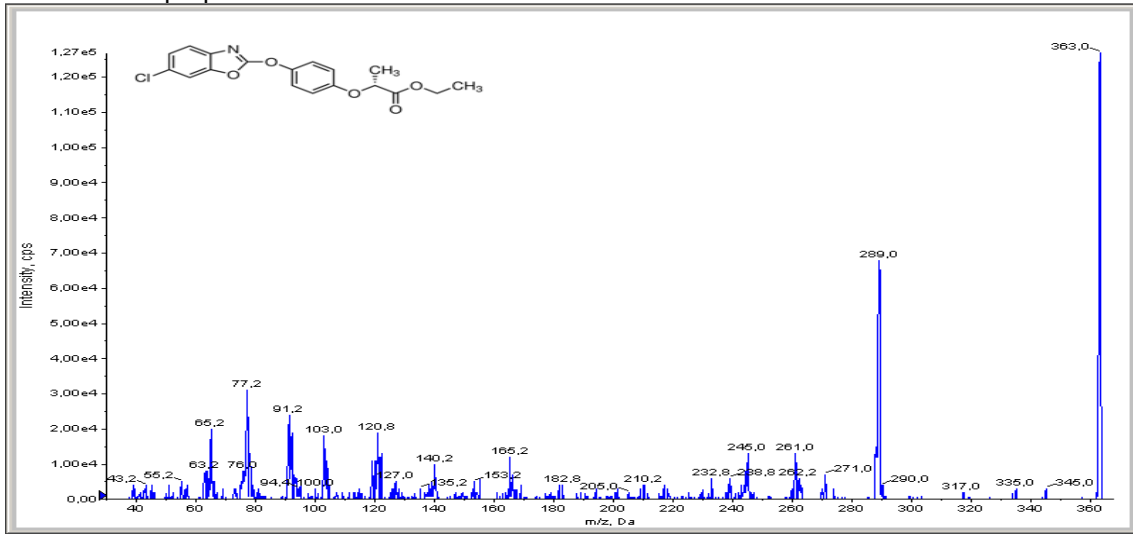
B.13. Epoxiconazol



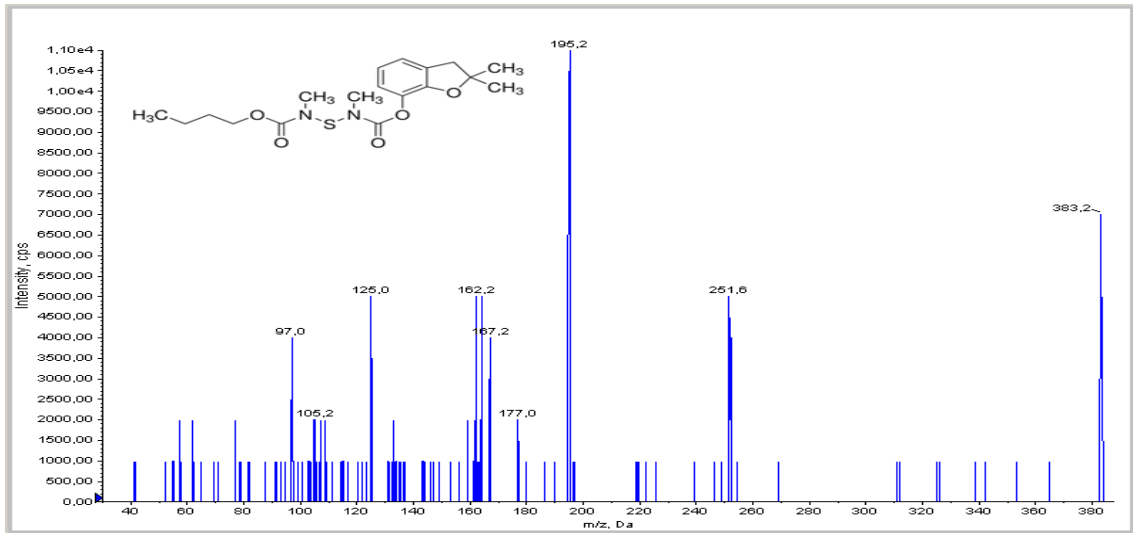
B.14. Etoxissulfamrom



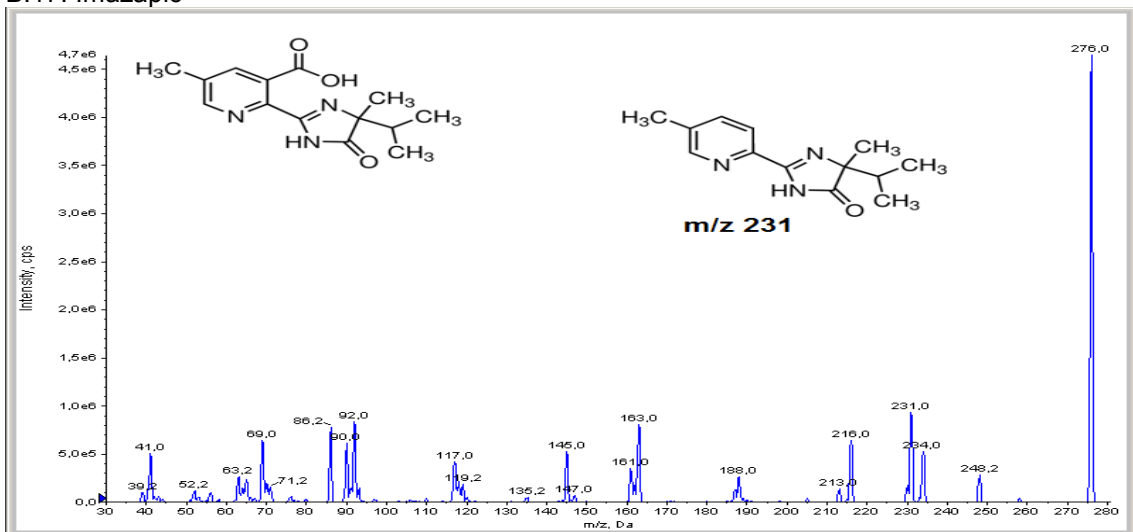
B.15. Fenoxaprop



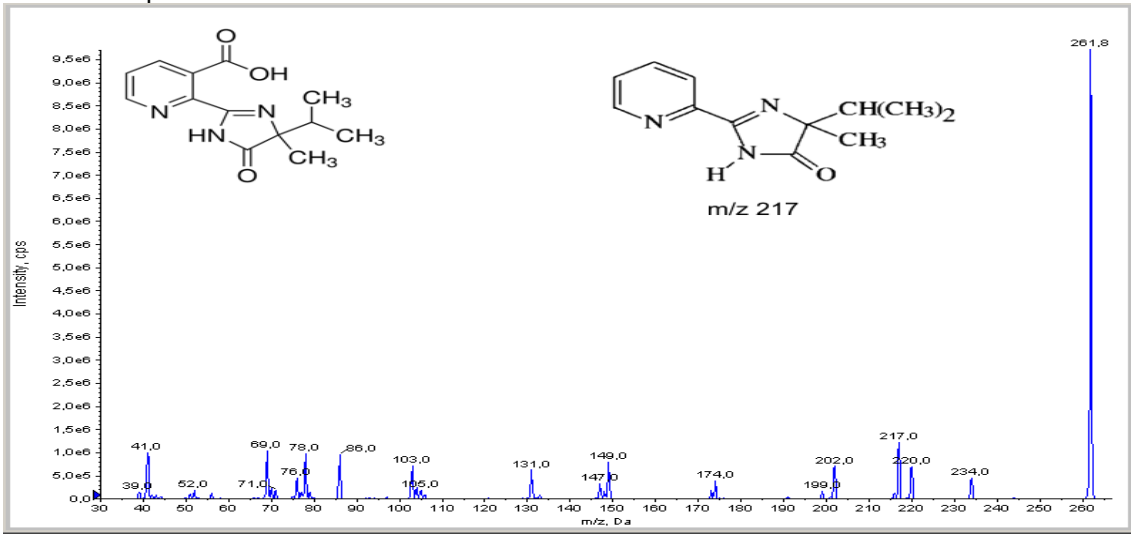
B.16. Furatiocarb



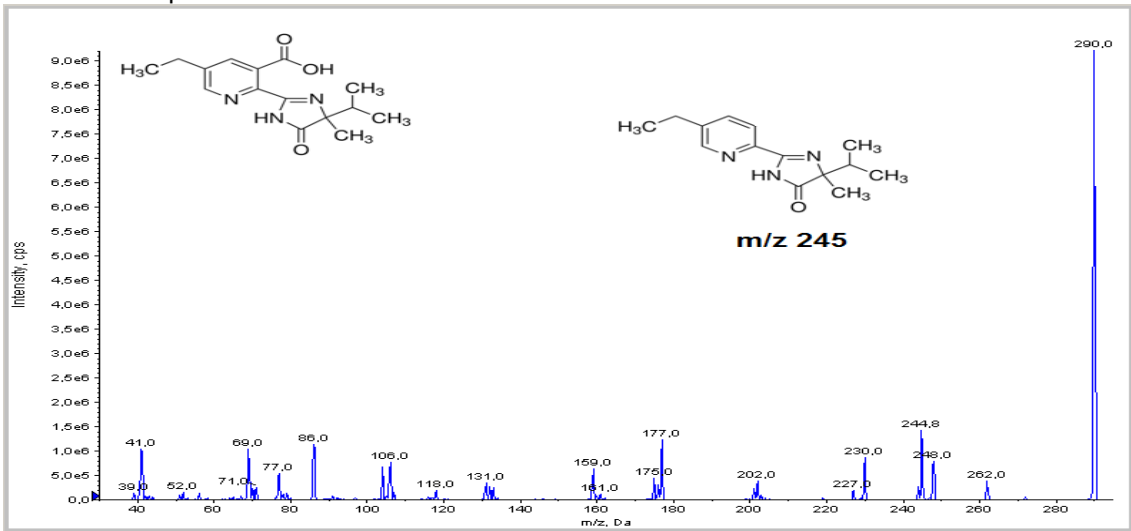
B.17. Imazapic



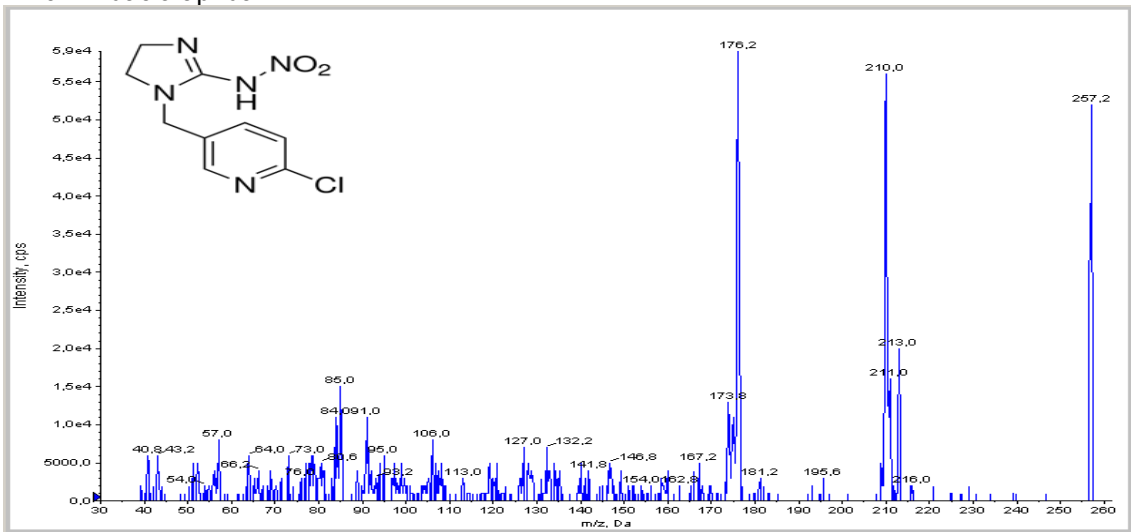
B.18. Imazapir



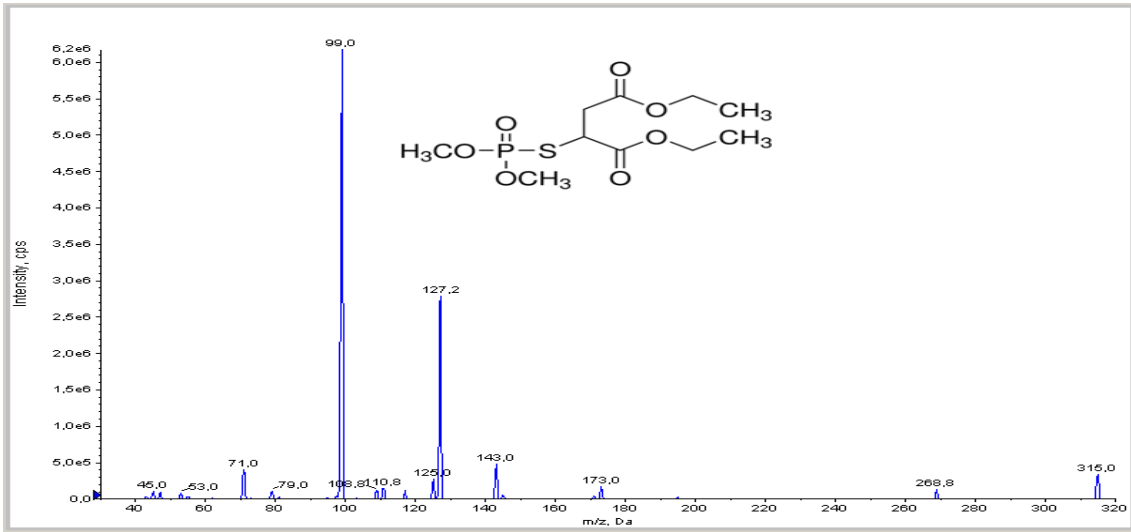
B.19. Imazetapir



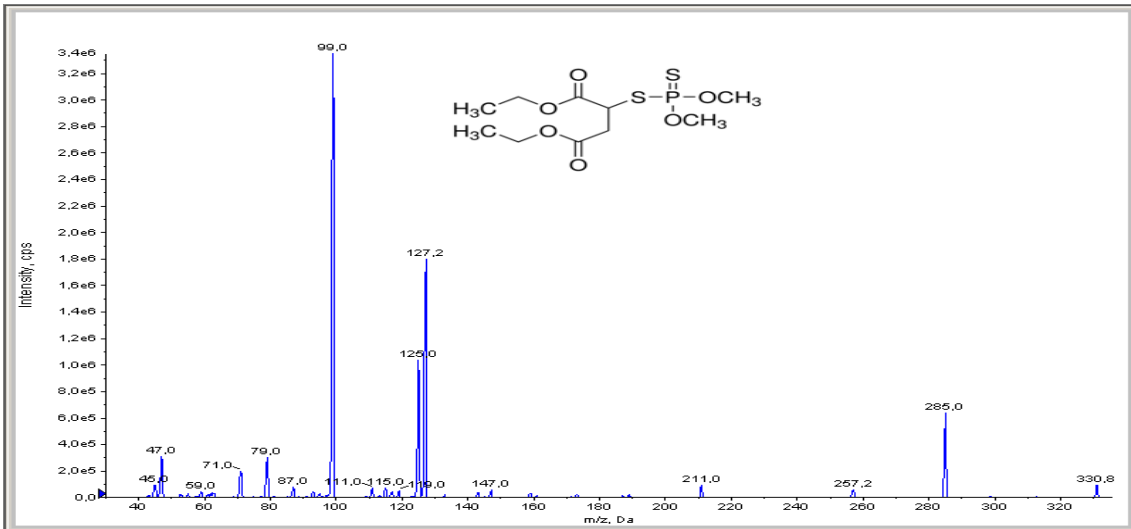
B.20. Imidacloraprida



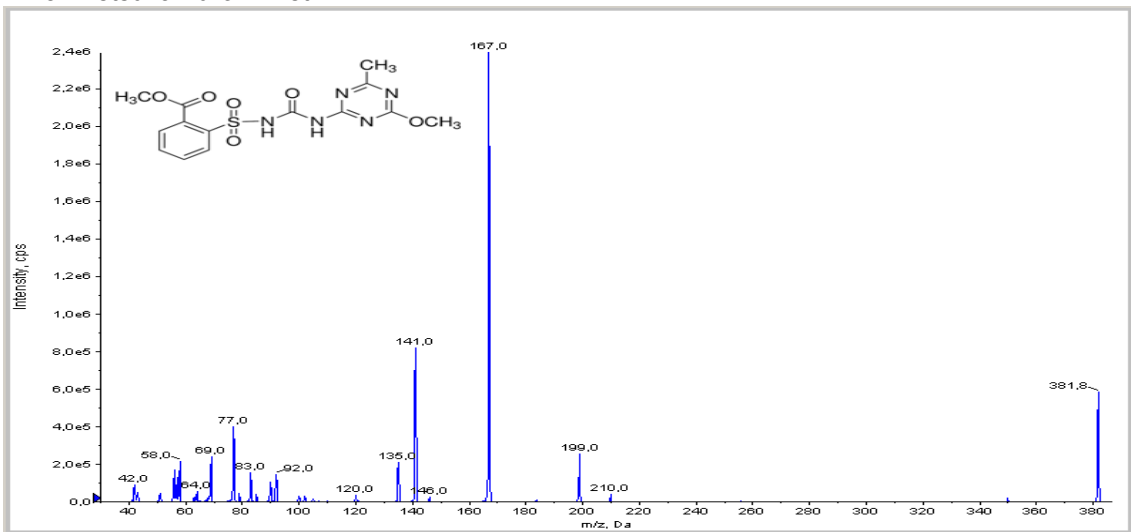
B.21. Malaoxon



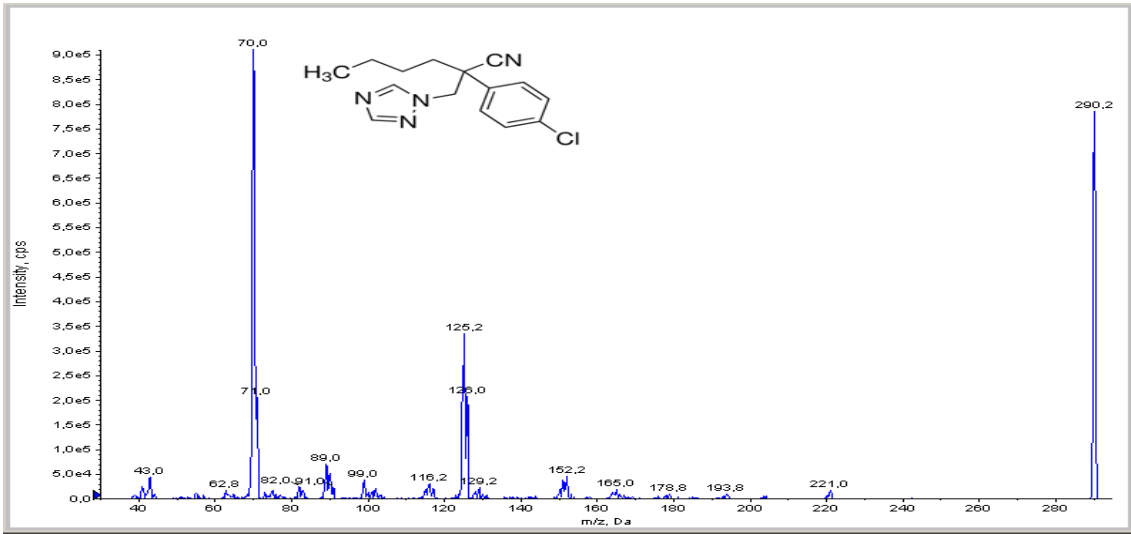
B.22. Malationa



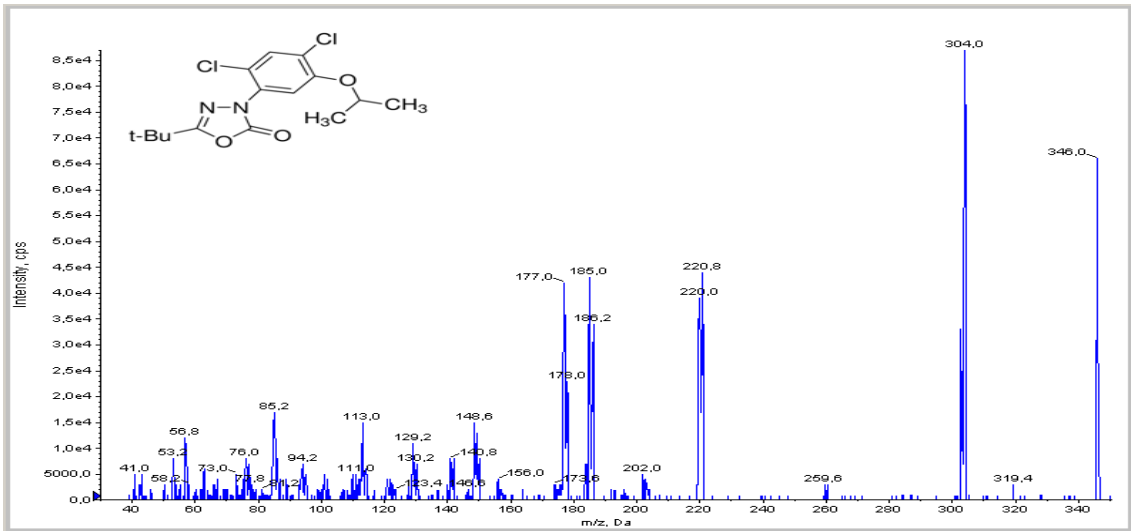
B.23. Metsulfamurom metil



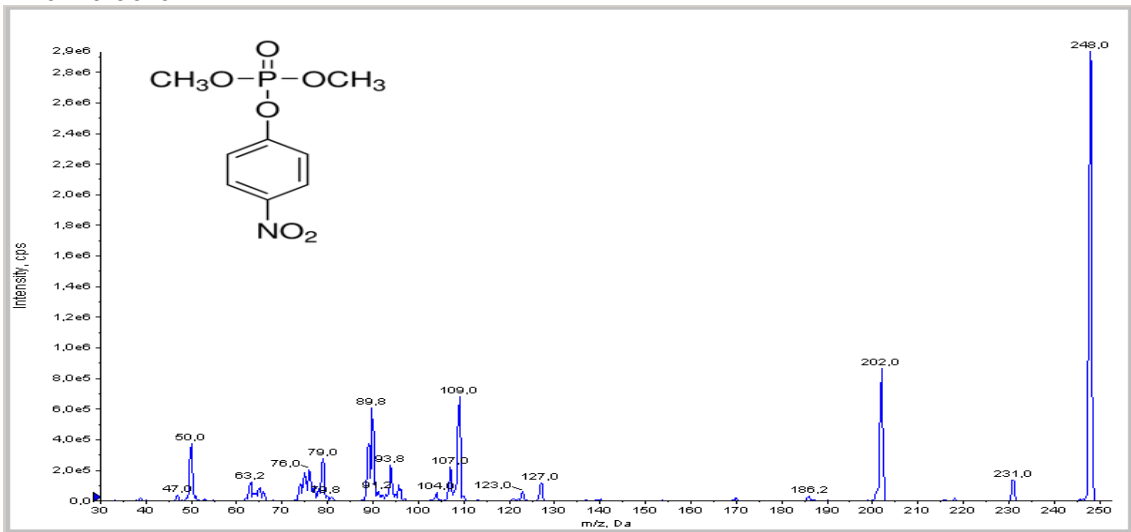
B.24. Microbutanil



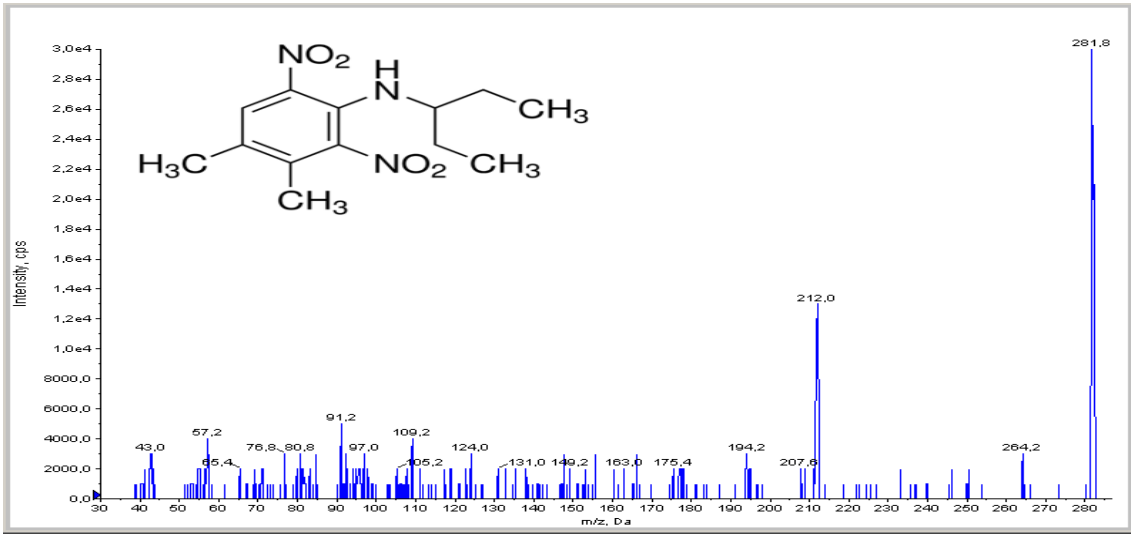
B.25. Oxadiazon



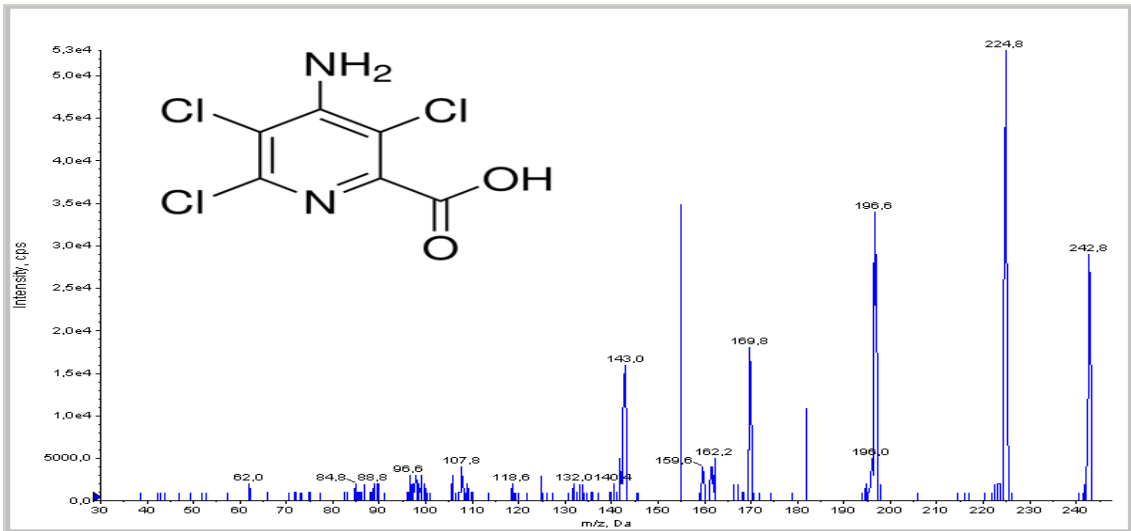
B.26. Paraoxom



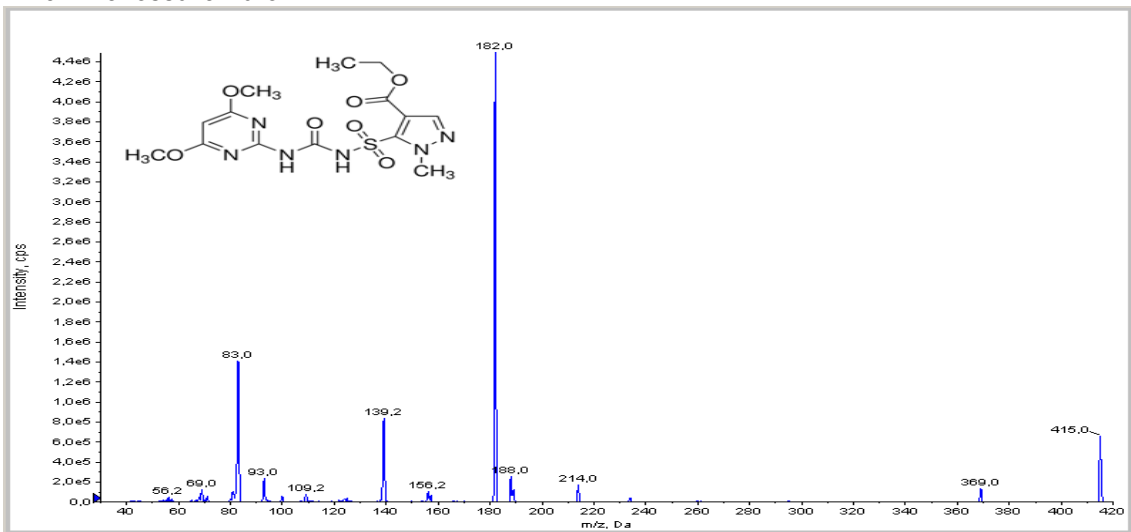
B.27. Pendimentalim



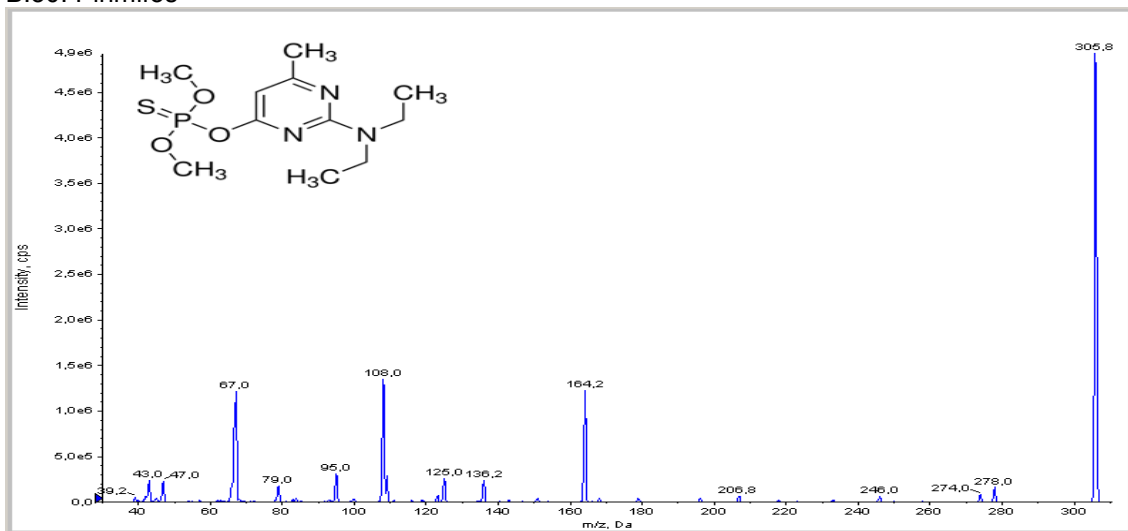
B.28. Picloram



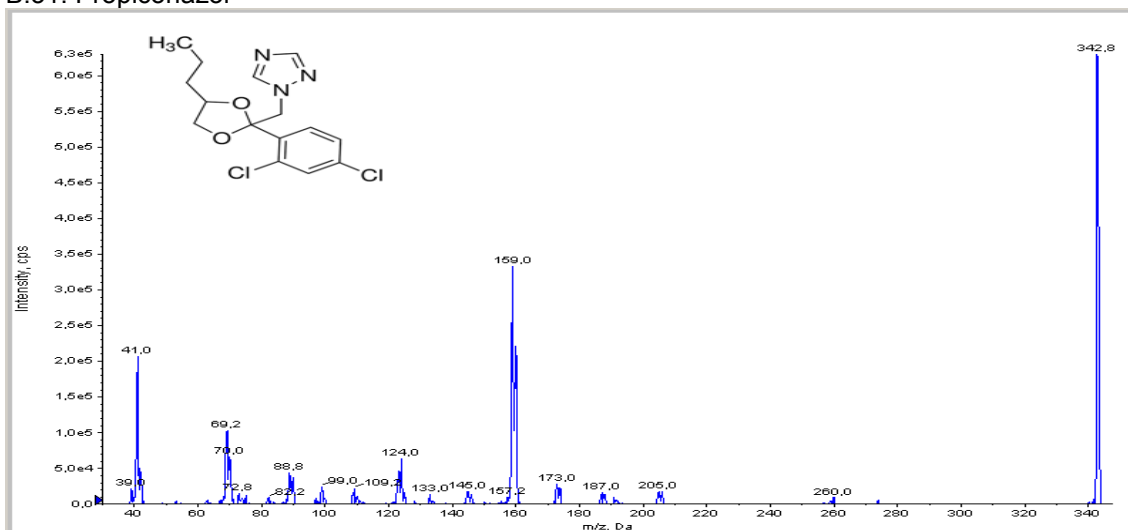
B.29. Pirazossulfamurom



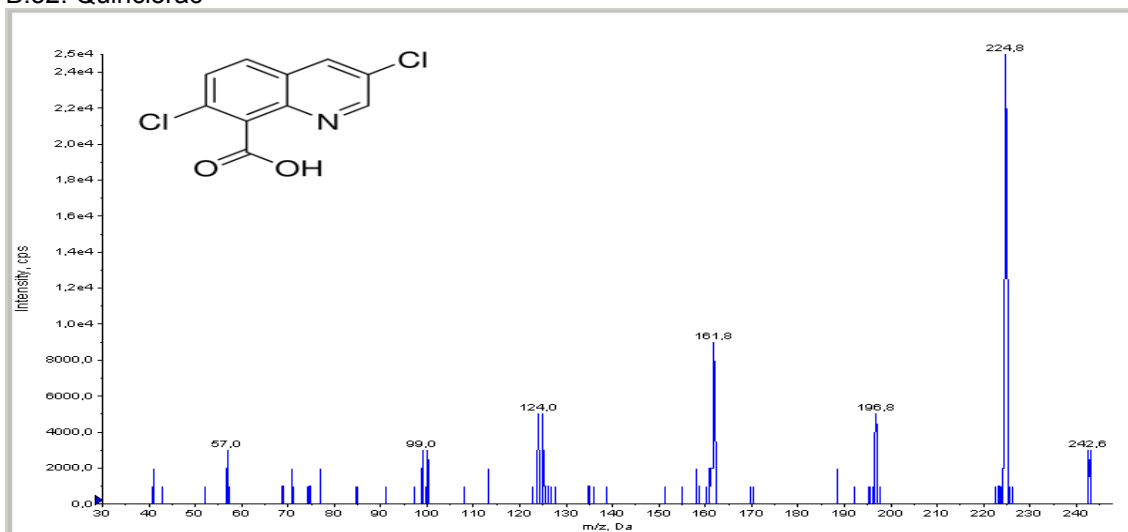
B.30. Pirimifós



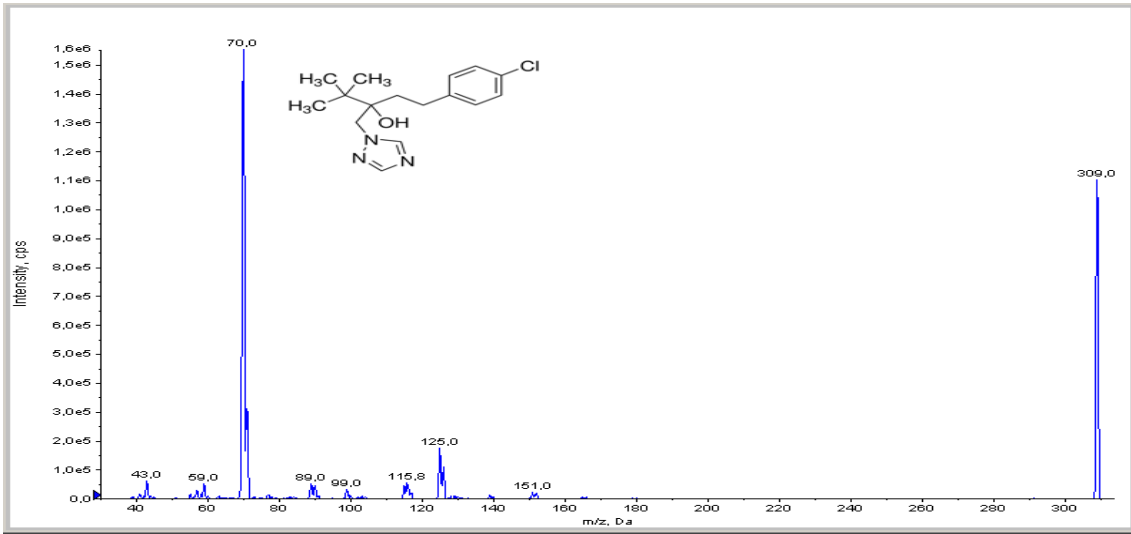
B.31. Propiconazol



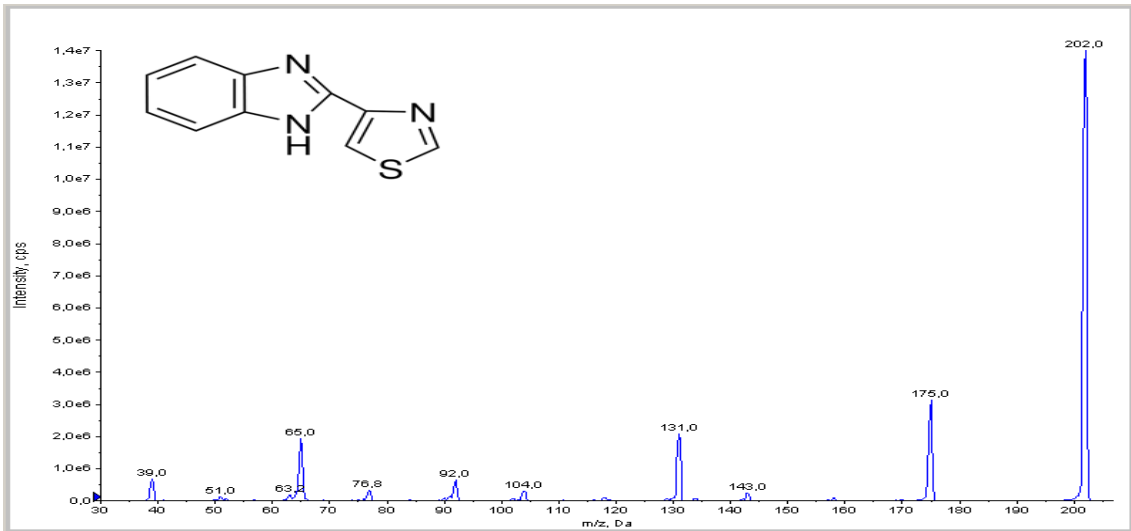
B.32. Quinclorac



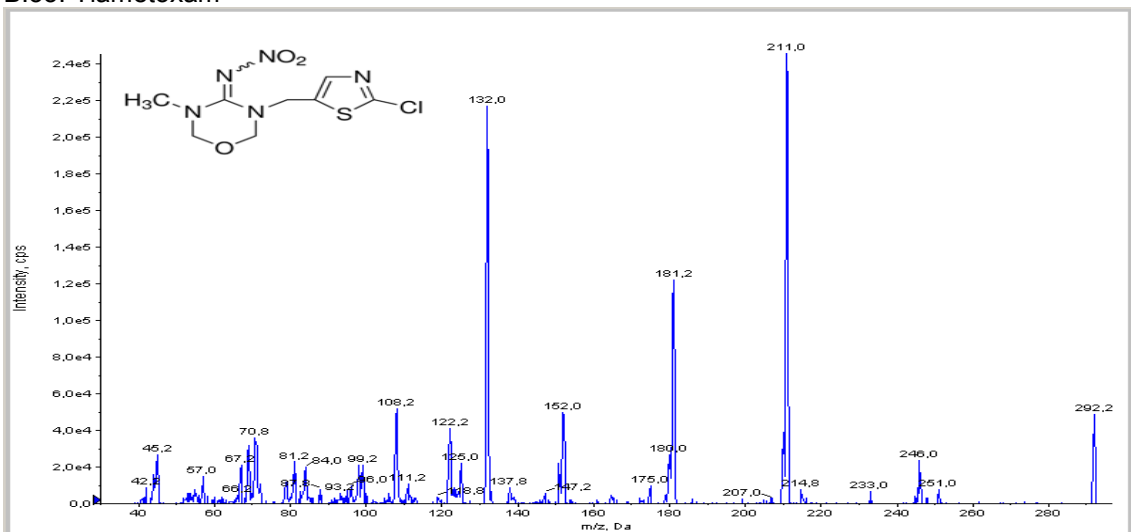
B.33. Tebuconazol



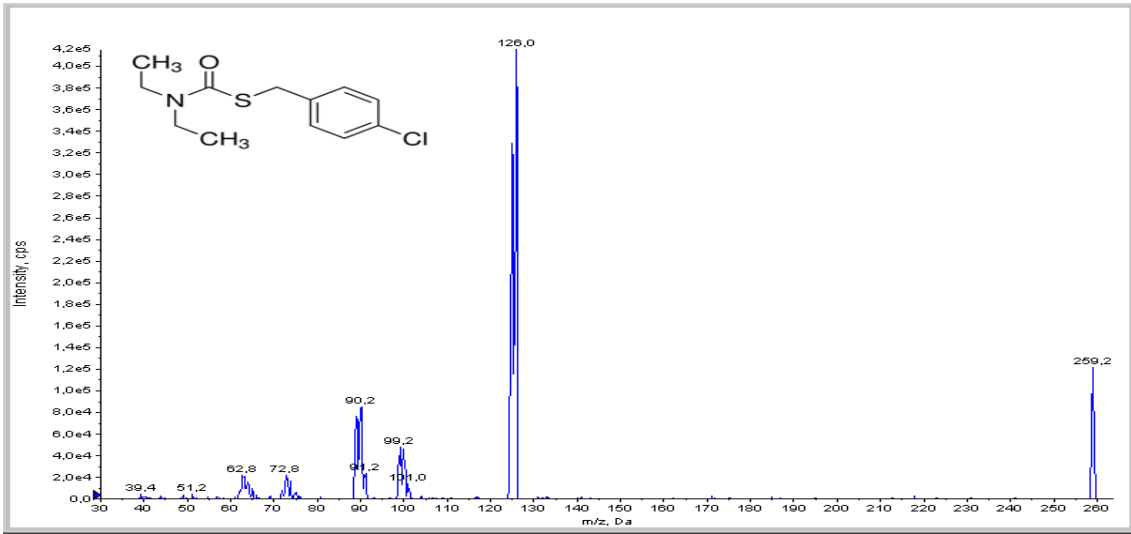
B.34. Tiabendazol



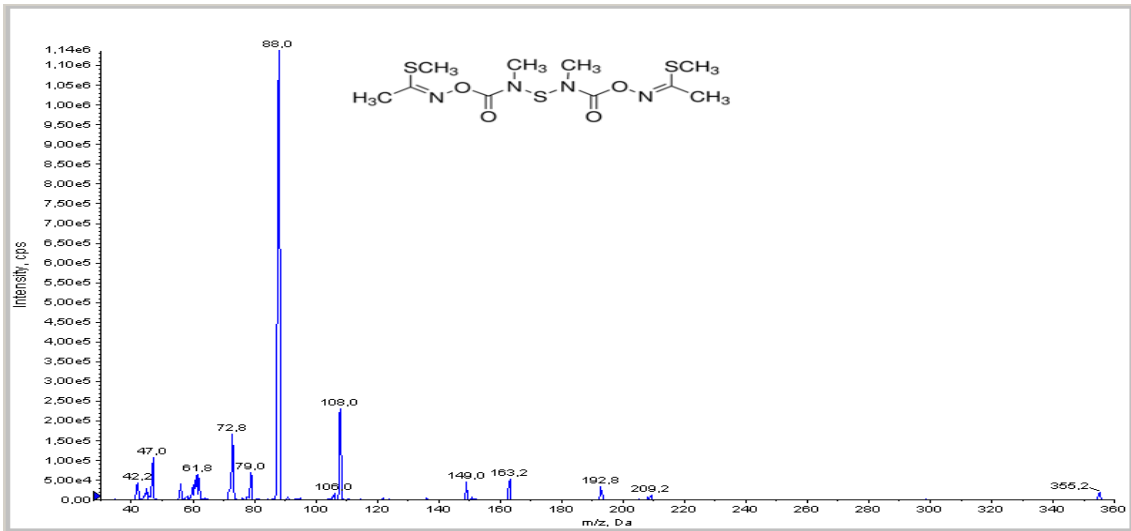
B.35. Tiametoxam



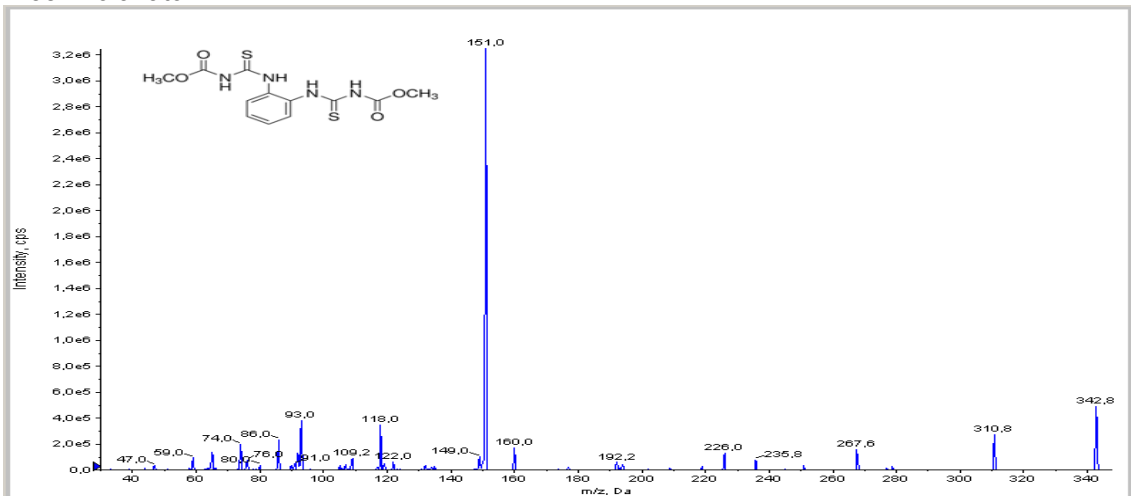
B.36. Tiobercarb



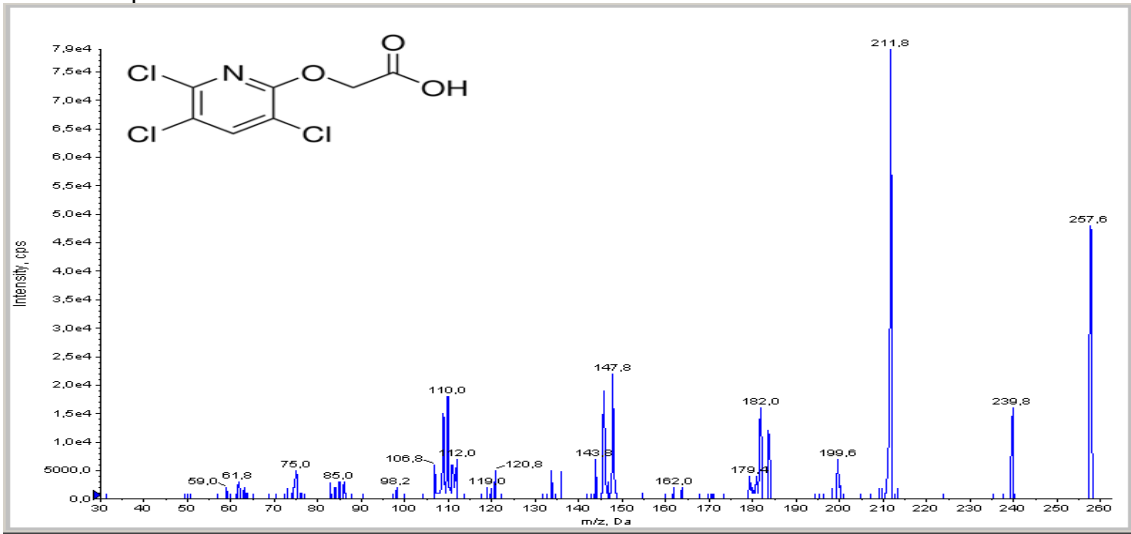
B.37. Tiodicarb



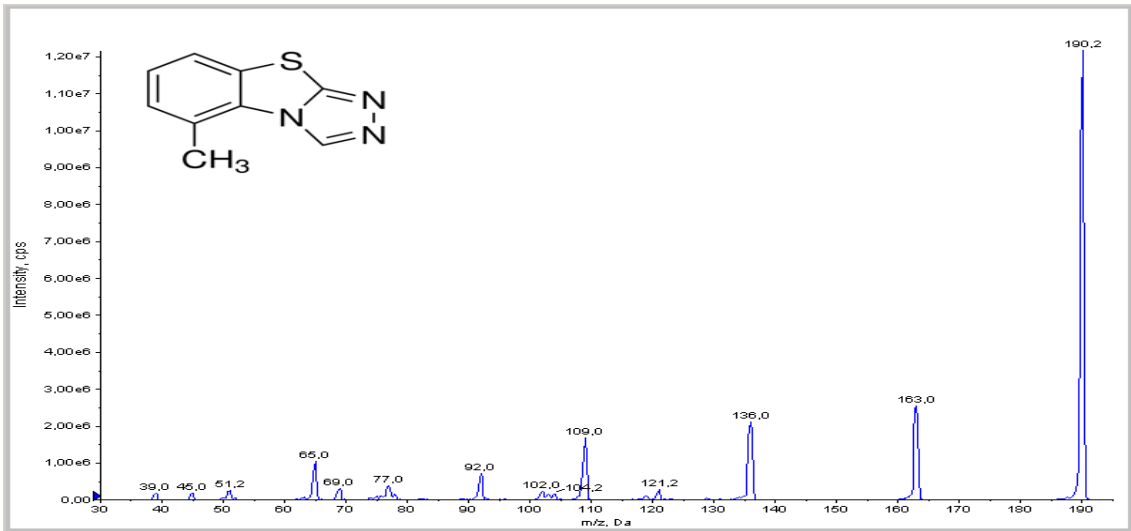
B.38. Tiofanato



B.39. Triclopir



B.40. Triciclazol



B.41. Trifloxistrombina

