

---

Fabiano Aurélio da Silva Oliveira

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO MULTIRRESÍDUOS E MULTICLASSES PARA  
DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE 140 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM  
LEITE ATRAVÉS DA TÉCNICA LC-MS/MS

Dissertação apresentada à Escola de  
Veterinária da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial à obtenção do  
grau de Mestre em Ciência Animal.  
Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinária - Toxicologia  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Martins Melo  
Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2011



---

---

## Agradecimentos

Agradeço a Deus por tudo. Por toda a coragem, luz, determinação e força na escolha da direção correta a tomar e por dar-me a oportunidade de conhecer tantas pessoas boas que tem cruzado o meu caminho. Agradeço a Ele todas as vitórias e conquistas alcançadas durante a minha vida.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marília Martins Melo pela orientação e pela confiança depositada durante a realização deste trabalho.

Gostaria de expressar o meu especial agradecimento a minha esposa Michelle, meu fruto de inspiração, que tem tido uma força sobre-humana para conciliar as funções de mãe, esposa e profissional, mantendo-se sempre companheira, amorosa e carinhosa em todas as horas, tudo em prol da felicidade e do bem estar de nossa família. Sem a sua força e determinação seria impossível passar por esta fase de nossas vidas.

À Eugênia Azevedo Vargas, Coordenadora Técnica do LANAGRO-MG e à Gilsara Silva, Responsável pelo laboratório de pesticidas do LANAGRO-MG, superiores e amigas, pela paciência, por ceder os materiais e o instrumental e por permitir minha ausência para realização deste trabalho.

Aos amigos Fernando Diniz Madureira e Wesley Robert de Souza do laboratório de pesticidas do LANAGRO-MG pela contribuição, paciência e pelas longas e valiosas discussões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento especial às colegas do laboratório de toxicologia da escola de Veterinária da UFMG pelo grande incentivo para o começo deste trabalho.

Agradeço à minha família, meus pais Waldir e Neuza pelo apoio e pela compreensão do tempo de convívio muitas vezes sacrificado para realização deste trabalho.

Aos meus filhotes Maria Eduarda, Bruno e Mariana, que são os maiores presentes que Deus poderia ter me dado nesta vida.pelo amor, felicidade, carinho, compreensão, apoio, incentivo, dedicação e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao amigo Wagner Dibai, companheiro de disciplinas e de trabalho pelo constante otimismo e incentivo para a conclusão deste trabalho.

À Coordenação do Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Veterinária pelo apoio.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento por permitir a realização de toda a parte experimental deste trabalho nas instalações do LANGRO-MG e pelo suporte financeiro.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

---

---

## SUMÁRIO

---

|  |    |
|--|----|
| RESUMO .....   | 13 |
| ABSTRACT .....   | 14 |
| ABREVIATURAS .....   | 15 |
| I – INTRODUÇÃO .....   | 17 |
| II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 18 |
| II.1 Leite .....   | 18 |
| II.1.1 Mercado do leite .....  | 18 |
| II.2 Agrotóxicos .....   | 20 |
| II.2.1 Histórico .....   | 20 |
| II.2.2 Definição .....   | 21 |
| II.2.3 Utilização e mercado .....  | 21 |
| II.2.4 Toxicidade dos Agrotóxicos .....  | 23 |
| II.2.4.1 Inseticidas .....   | 25 |
| II.2.4.1.1 Inseticidas de ação local .....                                       | 26 |
| II.2.4.1.2 Inseticidas de ação sistêmica: .....                                  | 26 |
| II.2.4.1.3 Inseticidas neonecotóides .....                                       | 27 |
| II.2.4.2 Fungicidas .....  | 27 |
| II.2.4.3 Herbicidas .....  | 29 |
| II.2.5 Mecanismos de ação das principais classes químicas de agrotóxicos .....   | 31 |
| II.2.5.1 Organoclorados .....  | 31 |
| II.2.5.1.1 Mecanismo de Ação .....   | 32 |
| II.2.5.2 Piretróides .....   | 32 |
| II.2.5.2.1 Mecanismo de Ação .....   | 32 |
| II.2.5.3 Organofosforados e Carbamatos .....                                     | 34 |
| II.2.5.3.1 Mecanismos de Ação .....  | 36 |
| II.3 Segurança Alimentar .....   | 38 |
| II.4 Resíduos de Agrotóxicos em Leite .....                                      | 39 |
| II.4.1 Legislação e Limites Máximos de Resíduos (LMRs) .....                     | 41 |
| II.5 Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Leite .....                           | 41 |
| II.5.1 Métodos de extração .....   | 42 |
| II.5.2 Métodos de “clean-up” .....   | 43 |
| II.5.2.1 Método de Luke .....  | 43 |
| II.5.2.2 Método QuEChERS .....   | 44 |
| II.6 Separação e Determinação de Resíduos de Agrotóxicos .....                   | 45 |
| II.6.1 Cromatografia .....   | 45 |
| II.6.1.1 Cromatografia gasosa .....  | 46 |
| II.6.1.1.1 Instrumental, aspectos .....  | 47 |
| II.6.1.2 Cromatografia líquida .....   | 47 |
| II.6.1.2.1 Instrumentação para cromatografia líquida .....                       | 47 |
| II.6.2 Espectrometria de massas - MS .....                                       | 49 |
| II.6.2.1 Fontes de ionização .....   | 49 |
| II.6.2.1.1 Fonte de ionização electrospray .....                                 | 49 |
| II.6.2.2 Analisadores de massas .....  | 50 |
| II.6.3 Cromatografia líquida acoplada á espectrometria de massas, LC-MS/MS ..... | 51 |
| II.7 Validação de Métodos Analíticos .....                                       | 52 |
| II.7.1 Conceito .....  | 52 |

---

|  |    |
|--|----|
| II.7.2 Validação no Contexto de Sistemas de Gestão .....   | 53 |
| II.7.3 Quando Validar .....  | 53 |
| II.7.4 Desenvolvimento de métodos e parâmetros de validação.....   | 53 |
| II.7.4.1 Seletividade (ou especificidade).....   | 55 |
| II.7.4.2 Sensibilidade .....   | 55 |
| II.7.4.3 Curva Analítica, Linearidade .....  | 56 |
| II.7.4.3.1 Avaliação da qualidade do ajuste .....  | 57 |
| II.7.4.3.2 Teste de Significância da Regressão .....   | 58 |
| II.7.4.3.3 Coeficiente de correlação .....   | 58 |
| II.7.4.4 Faixa de trabalho .....   | 59 |
| II.7.4.5 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) .....   | 59 |
| II.7.4.5.1 Limites de Detecção .....   | 59 |
| II.7.4.5.2 Limite de Quantificação .....   | 60 |
| II.7.4.6 Precisão .....  | 60 |
| II.7.4.7 Exatidão.....   | 61 |
| II.7.4.8 Identificação de “outliers” pelo teste de Grubs (ISO, 1994).....  | 61 |
| II.7.4.8.1 Teste para um valor discrepante (ISO, 1994).....  | 61 |
| II.7.4.9 Robustez.....   | 62 |
| II.8 Incerteza de Medição .....  | 62 |
| II.8.1 Avaliação da Incerteza Padronizada .....  | 63 |
| II.8.1.1 Avaliação do Tipo A .....   | 64 |
| II.8.1.2 Avaliação do Tipo B .....   | 64 |
| II.8.1.3 Determinação da incerteza de medição .....  | 64 |
| II.8.1.3.1 Cálculo da incerteza padrão para a medida de volume: .....  | 64 |
| II.8.1.3.2 Cálculo da incerteza padrão para a medida de massa da amostra: .....  | 64 |
| II.8.1.3.3 Cálculo da incerteza padrão dos ensaios de precisão intermediária.....  | 65 |
| II.8.1.3.4 Cálculo da incerteza padrão da curva analítica: .....   | 65 |
| II.8.1.3.5 Determinação da incerteza expandida do método (U). .....  | 65 |
| II.8.1.3.6 Determinação da incerteza padrão combinada (u). .....   | 66 |
| II.9 Estabilidade dos Padrões e das Amostras .....   | 66 |
| III - MATERIAL E MÉTODOS.....  | 66 |
| III.1 Instrumentação.....  | 67 |
| III.2 Reagentes solventes e materiais.....   | 68 |
| III.3 Padrões analíticos dos agrotóxicos estudados.....  | 68 |
| III.3.1 Preparação de pools de trabalho .....  | 69 |
| III.4 Otimização do sistema de detecção de massas .....  | 75 |
| III.4.1 Otimização dos parâmetros da fonte de ionização.....   | 75 |
| III.5 Otimização das condições cromatográficas .....   | 75 |
| III.5.1 Seleção da coluna cromatográfica .....   | 76 |
| III.5.2 Otimização da separação cromatográfica .....   | 76 |
| III.6 Comparação de metodologias de extração de resíduos de agrotóxicos .....  | 77 |
| III.6.1 Método A .....   | 78 |
| III.6.2 Método B .....   | 78 |
| III.6.3 Método C .....   | 78 |
| 6.4 Método D .....   | 79 |
| III.7 Validação do Método QuEChERS modificado (Método C) para determinação /<br>quantificação de resíduos de agrotóxicos em leite..... | 80 |
| III.7.1 Seletividade.....  | 80 |
| III.7.2 Estudos de linearidade .....   | 80 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| III.7.3   | Análise dos Solventes e Reagentes pelo Método de Extração Quechers modificado.....   | 80  |
| III.7.4   | Ensaio de Fortificação e Extração com o Método QuEChERS para Avaliação da Recuperação .....  | 81  |
| III.7.4.1 | Fortificação antes da Etapa de Extração.....   | 81  |
| III.7.5   | Preparação dos extratos para a construção da curva analítica.....  | 82  |
| III.7.6   | Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do instrumento e do método.....   | 82  |
| III.8     | Determinação da incerteza de medição.....  | 83  |
| IV        | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 83  |
| IV.1      | Otimização do sistema de detecção de massas .....  | 83  |
| IV.2      | Otimização das condições cromatográficas .....   | 88  |
| IV.2.1    | Seleção da coluna cromatográfica.....  | 88  |
| IV.2.2    | Escolha da fase móvel.....   | 91  |
| IV.2.3    | Otimização das condições de temperatura e fluxo de fase móvel.....   | 93  |
| IV.2.4    | Comparação de metodologias de extração de resíduos de agrotóxicos.....   | 94  |
| IV.3      | Validação do método QuEChERS para determinação/quantificação de resíduos de agrotóxicos em leite .....   | 99  |
| IV.3.1    | Seletividade.....  | 99  |
| IV.3.2    | Estudos de linearidade .....   | 101 |
| IV.3.3    | Análise dos solventes e reagentes empregados no método QuEChERS.....   | 108 |
| IV.3.4    | Curvas analíticas .....  | 108 |
| IV.3.4.1  | Identificação de “outliers”.....   | 108 |
|           | A identificação de valores dispersos ou aberrantes, “outliers” foi conduzida pela aplicação do teste de Grubbs para identificação de dispersos. O teste foi aplicado ao conjunto de dados empregado na construção da curva analítica, por nível de concentração. Em caso de indicação de valores aberrantes pelo teste, o mesmo foi investigado quando às possíveis causas de seu aparecimento no conjunto de dados e, em se tratando realmente de um valor aberrante o mesmo foi descartado. .... | 108 |
| IV.3.4.2  | Verificação da homocedasticidade das respostas instrumentais. ....   | 108 |
| IV.3.4.3  | Análise de variância dos resíduos do modelo ajustado .....   | 109 |
| IV.3.5    | Determinação da estimativa da incerteza do método.....   | 117 |
| IV.3.5.2  | Cálculo da incerteza padrão dos ensaios de precisão intermediária.....   | 118 |
| IV.3.5.3  | Cálculo da incerteza padrão da curva analítica: .....  | 118 |
| IV.3.5.4  | Determinação das incertezas padrão (u) e expandida (U) do método.....  | 118 |
| IV.3.5    | Estudos de precisão e exatidão do método.....  | 122 |
| 3.6       | Robustez.....  | 129 |
| IV        | CONCLUSÕES .....   | 129 |
| V         | PERSPECTIVAS FUTURAS .....   | 130 |
| VI        | BIBLIOGRAFIA .....   | 131 |

---

---

## ÍNDICE DE TABELAS

---

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 1 Desempenho da indústria alimentícia no Brasil.....   | 19  |
| Tabela 2. Desempenho da indústria alimentícia no Brasil.....  | 19  |
| Tabela 3. Classificação dos agrotóxicos quanto ao grau de toxicidade. ....  | 24  |
| Tabela 4. Registros de casos de intoxicação por agrotóxico em números absolutos no período de 2006 a 2008.....  | 24  |
| Tabela 5. Principais classes de agrotóxicos em função de sua natureza química. ....   | 25  |
| Tabela 6. Pesticidas mais comumente envolvidos em intoxicações de animais domésticos .....  | 31  |
| Tabela 7. Classes de piretróides.....   | 34  |
| Tabela 8. Compilação dos limites máximos de resíduos de agrotóxicos em leite estabelecidos pelo PNCRC-2010.....   | 42  |
| Tabela 9. Parâmetros de validação conforme a natureza do ensaio.....  | 55  |
| Tabela 10. Tabela de ANOVA para o ajuste pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear dos parâmetros. ....  | 58  |
| Tabela 11. Agrotóxicos selecionados para o desenvolvimento do método. ....  | 70  |
| Tabela 12. Composição da fase móvel para o teste de desempenho de coluna. ....  | 76  |
| Tabela 13. Composição do gradiente de fase móvel A.....   | 77  |
| Tabela 14. Composição do gradiente de fase móvel B.....   | 77  |
| Tabela 15. Composição do gradiente de fase móvel C.....   | 77  |
| Tabela 16. Agrotóxicos selecionados para a realização dos experimentos piloto. ....   | 77  |
| Tabela 17. Preparo das amostras fortificadas. ....  | 81  |
| Tabela 18. Preparo da curva de calibração matrizada.....  | 82  |
| Tabela 19. Condições operacionais e transições MRM utilizadas no desenvolvimento e validação do método. ....  | 84  |
| Tabela 20. Valores de razão sinal/ruído para os agrotóxicos avaliados no experimento de otimização das condições cromatográficas com o gradiente C, na concentração de 50,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . ....                            | 93  |
| Tabela 21. Recuperações médias (Rec %) e coeficiente de variação (CV %) para os diferentes métodos de extração testados para os 20 agrotóxicos constantes da Tabela 16. ....  | 96  |
| Tabela 22. Valores dos parâmetros da regressão, coeficiente de correlação, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do instrumento e tipo de ajuste do modelo por agrotóxico para o primeiro dia de ensaios de validação. .... | 114 |
| Tabela 23. Recuperações médias (% , n=6), coeficientes de variação (CV%), incerteza expandida do método, limites de detecção, limites de quantificação do método, obtidos em leite, e valores de LMR para cada agrotóxico. ....     | 125 |

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

---

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Consumo formal de leite fluido no Brasil e participação do UHT e pasteurizado. ....   | 20 |
| Figura 2. Mercado Mundial de agrotóxicos 1999-2008 (US\$ milhões) .....   | 21 |
| Figura 3. Participação do Brasil no consumo mundial de agrotóxicos em 2007 .....  | 22 |
| Figura 4. Estruturas químicas dos ditiocarbamatos zinebe, mancozebe e manebe. ....  | 29 |
| Figura 5. Potenciais sítios de ação das principais classes de agrotóxicos sobre o axônio e porção terminal do neurônio. ....  | 30 |
| Figura 6. Agrotóxicos organoclorados. ....  | 32 |
| Figura 7. Agrotóxicos da classe dos piretróides. Grupo I: aletrina e permetrina. Grupo II: deltametrina e $\beta$ -ciflutrina. ....   | 33 |
| Figura 8. Agrotóxicos representantes das classes dos organofosforados (a) e carbamatos (b). ....  | 35 |
| Figura 9. Esquema de ação inibitória dos agrotóxicos organofosforados e carbamatos sobre a colinesterase indicando os receptores afetados pelo acúmulo de ACh gerado pelo bloqueio da colinesterase. ....   | 36 |
| Figura 10. Interação entre um éster organofosforado e um éster carbamato com o grupo hidroxil serina no sítio ativo da AChE (E-OH). ....  | 37 |
| Figura 11. Diagrama esquemático do método de Luke. ....   | 44 |
| Figura 12. Esquema da sequência do método QuEChERS .....  | 45 |
| Figura 13. Diagrama de um sistema de cromatografia gasosa. ....   | 47 |
| Figura 14. Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida. ....  | 48 |
| Figura 15. Representação esquemática de um espectrômetro de massas, com todas as partes constituintes. ....   | 49 |
| Figura 16. Representação do processo de ionização por " <i>electrospray</i> " e formação do cone de Taylor .....  | 50 |
| Figura 17. Esquema de um sistema triplo quadrupolo. ....  | 51 |
| Figura 18. Esquema de validação de método analítico. ....   | 54 |
| Figura 19. Marcha analítica do Método A. ....   | 78 |
| Figura 20. Marcha analítica do Método B. ....   | 78 |
| Figura 21. Marcha analítica do Método C. ....   | 79 |
| Figura 22. Marcha analítica do Método D. ....   | 79 |
| Figura 23. Região do cromatogram situado entre 6,0 e 8,0 min., apresentado: o cromatograma total (a), cromatograma total de transições <i>m/z</i> (b) e o cromatograma extraído para transições <i>m/z</i> selecionadas do agrotóxicos tridemorfe (c). .... | 88 |
| Figura 24. Cromatograma total (a) e das transições <i>m/z</i> monitoradas para os agrotóxicos carbendazim e tridemorfe (b) obtidos com a coluna Shim-Pack XR-ODS II no nível de concentração 0,1 ng. $\mu$ L <sup>-1</sup> .....                            | 89 |
| Figura 25. Cromatograma total (a) e das transições <i>m/z</i> monitoradas para os agrotóxicos carbendazim e tridemorfe (b) obtidos com a coluna Synergi Fusion-RP no nível de concentração 0,1 ng. $\mu$ L <sup>-1</sup> .....                              | 90 |

---

|   |     |
|---|-----|
| Figura 26. Cromatograma total do Gradiente A. ....  | 91  |
| Figura 27. Cromatograma total do Gradiente B.....   | 92  |
| Figura 28. Cromatograma total do Gradiente C.....   | 92  |
| Figura 29. Determinação da razão S/R para os agrotóxicos bifentrina e clorpirifós. ....   | 94  |
| Figura 30. Recuperações (Rec%) para os diferentes métodos de extração testados<br>por agrotóxico no nível 10,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .....  | 95  |
| Figura 31. Coeficientes de variação (CV%) para os diferentes métodos de<br>extração testados por agrotóxico no nível 10,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .....   | 97  |
| Figura 32. Recuperações (Rec%) para os diferentes métodos de extração testados<br>por agrotóxico no nível 50,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .....  | 98  |
| Figura 33. Coeficientes de Variação (CV%) para os diferentes métodos de<br>extração testados por agrotóxico no nível 50,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .....   | 98  |
| Figura 34. Cromatogramas totais das amostras branco de matriz (a) e branco de<br>reagente (b).....  | 100 |
| Figura 35. Cromatograma das transições <i>m/z</i> para o agrotóxico acefato . ....  | 100 |
| Figura 36. Cromatograma das transições <i>m/z</i> para o agrotóxico cresoxim metil .....  | 100 |
| Figura 37. Cromatograma das transições <i>m/z</i> para o agrotóxico clorpirifós.....  | 101 |
| Figura 38. Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico<br>benalaxil, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método dos<br>mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de determinação. ....       | 102 |
| Figura 39. Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico<br>fenarimol, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método dos<br>mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de determinação. ....       | 102 |
| Figura 40. Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico<br>iprodiona, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método dos<br>mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de determinação. ....       | 103 |
| Figura 41. Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico benalaxil.....   | 103 |
| Figura 42. Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico fenarimol.....   | 104 |
| Figura 43. Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico iprodiona.....   | 104 |
| Figura 44. Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico<br>acetamiprido, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método<br>dos mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de<br>determinação. .... | 105 |
| Figura 45. Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico<br>monocrotofós, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método<br>dos mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de<br>determinação. .... | 105 |
| Figura 46. Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico<br>piridato, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método dos<br>mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de determinação. ....        | 106 |
| Figura 47. Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico acetamiprido.....  | 106 |
| Figura 48. Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico monocrotofod.....  | 107 |
| Figura 49. Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico piridato.....  | 107 |

---

|   |     |
|---|-----|
| Figura 50. Imagem em <i>printscreen</i> da planilha de cálculos empregada para o ajuste da curva analítica do agrotóxico triassulfurom, com visualização dos dados experimentais e das estatísticas aplicadas. .... | 111 |
| Figura 52. <i>t</i> -teste para o valor do coeficiente de correlação ( <i>r</i> ) da curva analítica para o agrotóxico triassulfurom. ....  | 112 |
| Figura 51. Curva analítica do agrotóxico traissulfurom. ....  | 112 |
| Figura 53. Diagrama de causa e feito com levantamento das principais fontes de incerteza (a), detalhamento das fontes de incerteza presentes na diluição dos padrões (b). ....                                      | 117 |
| Figura 54. Imagem em " <i>printscreen</i> " da planilha de cálculo empregada na estimativa da incerteza de medição do método. ....  | 120 |
| Figura 55. Contribuição da principais fonts de incerteza para a incertez padrão total do método, no nível de concentração 10,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . ....   | 121 |
| Figura 56. Curva de incerteza expandida $U(x)$ em função da concentração para o método. O valor da incerteza é dados em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . ....  | 122 |

---

---

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

---

|                 |     |
|-----------------|-----|
| Equação 1.....  | 55  |
| Equação 2.....  | 58  |
| Equação 3.....  | 59  |
| Equação 4.....  | 60  |
| Equação 5.....  | 60  |
| Equação 6.....  | 61  |
| Equação 7.....  | 61  |
| Equação 8.....  | 61  |
| Equação 9.....  | 64  |
| Equação 10..... | 64  |
| Equação 11..... | 64  |
| Equação 12..... | 64  |
| Equação 13..... | 64  |
| Equação 14..... | 64  |
| Equação 15..... | 65  |
| Equação 16..... | 65  |
| Equação 17..... | 65  |
| Equação 18..... | 65  |
| Equação 19..... | 65  |
| Equação 20..... | 66  |
| Equação 21..... | 66  |
| Equação 22..... | 82  |
| Equação 23..... | 82  |
| Equação 24..... | 108 |
| Equação 25..... | 112 |

---

## RESUMO

O leite é um dos alimentos de origem animal mais importantes para o ser humano, consumido indistintamente por crianças e adultos em todo o mundo. Sendo, muitas vezes a única fonte de proteínas disponível.

A produção brasileira tem se mostrado crescente nas últimas décadas e este aumento de produtividade leva à necessidade de maior controle sobre parasitas que infestam os animais comprometendo a produtividade. Considerando isto, e sob a ótica da segurança alimentar e diante do número reduzido de agrotóxicos monitorados pelo MAPA em leite, é premente a necessidade de estabelecimento de metodologias capazes de pesquisar a presença de multirresíduos de agrotóxicos em leite.

Devido a complexidade desta matriz e às baixas concentrações dos agrotóxicos presentes, há uma grande necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos eficientes e confiáveis para a identificação e quantificação de contaminantes. Neste trabalho avaliaram-se quatro métodos de extração e análise de resíduos de agrotóxicos em leite, seguidos por detecção e quantificação pela técnica LC-MS/MS.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa de linearidade das curvas analíticas, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e a exatidão do método. A faixa linear de concentração das curvas analíticas situou-se entre 10,0 a 20,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  com valores de  $r^2 \geq 0,97$ . A técnica LC-MS/MS no modo ESI+ e ESI- promoveu a quantificação (critérios de recuperação entre 70 e 120% e valores de RSD% < 20%) de 140 agrotóxicos em uma única corrida cromatográfica.

O método mostrou-se adequado à análise multirresíduos de agrotóxicos em leite, conciliando sensibilidade e seletividade adequadas, e todos os parâmetros de validação encontram-se dentro dos limites sugeridos para validação de métodos cromatográficos.

Palavras-chave: leite, agrotóxicos, multirresíduos, LC-MS/MS, validação de métodos.

---

## ABSTRACT

Milk is a food of animal origin very important to human, widely consumed by children and adults around the world. Often the only available source of protein.

Brazilian production has shown increasing in recent decades and this increase in productivity leads to the need for greater control of parasites that infest animals affecting productivity. From the perspective of food safety and considering the reduced number of pesticides monitored by MAPA in milk, there is an urgent need to establish methodologies that can search the presence of multiresidue pesticides in milk.

Due to the complexity of the matrix milk and low concentrations of pesticides present in it, there is a great need to develop efficient and reliable analytical methods for identification and quantification of contaminants. This study evaluated four methods of extraction and analysis of pesticide residues in milk, followed by detection and quantification by LC-MS/MS technique.

The parameters evaluated were: selectivity, linear response range, limit of detection, limit of quantification, precision and accuracy of the method. The concentration range of analytical curves was established between 10.0 to 20.0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , with  $r^2$  values  $\geq 0.97$ . The technique LC-MS/MS in ESI + and ESI- modes promoted quantification (criteria of recovery between 70% and 120% and RSD  $< 20\%$ ) of 140 pesticides in a single chromatographic run.

The method was suitable for multiresidue analysis of pesticides in milk, combining sensitivity and selectivity measures, and all the validation parameters were within the limits suggested for validation of chromatographic methods.

Keywords: milk, pesticides, multiresidue, LC-MS/MS method validation.

---

## ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina.  
AChE – Acetilcolinesterase.  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.  
API - ionização a pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization*).  
APPI - fotoionização a pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization*).  
CAD - dissociação ativada por colisão (*Collision Activated Dissociation*).  
CE - energia de colisão (*Collision Energy*).  
CI - ionização química (*Chemical Ionization*)  
CXP - potencial de saída da célula de colisão (*Collision Cell Exit Potential*).  
DAD - detecção com arranjo de diodos (*Diode-Array Detector*).  
DDT – Diclorodifeniltricloetano.  
DP - potencial de declusterização (*Declustering Potential*).  
ECD - Detector por Captura de Elétrons (*Electron Capture Detection*).  
EI - ionização por elétrons (*Electronic Impact*)  
ESI - ionização por eletrospray (*Eletrospray Ionization*).  
FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization*).  
FIA – análise por injeção de fluxo (*Flow Injection Analysis*).  
FID - Detector de Ionização de Chama (*Flame Ionization Detection*).  
FPD - Detector Fotométrico de Chama (*Flame Photometric Detection*).  
GABA - Ácido Gama Aminobutírico.  
GC - Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*).  
HCB – Hexacloro benzeno  
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*).  
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.  
ISO - Organização Internacional para Padronização (*International Organization for Standardization*).  
LC - Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography*).  
LLE - Extração Líquido-Líquido (*Liquid-Liquid Extraction*).  
LMR - Limites Máximos de Resíduos.  
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.  
MRM - modo de monitoramento de reações múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring*).  
MS - Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*).  
MSPD - Dispersão da Matriz em Fase Sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion*).  
NPD - Detector de Nitrogênio e Fósforo (*Phosphorus Filter and Nitrogen-Phosphorus Detection*).  
OMC - Organização Mundial do Comércio.  
OMPA - Octametil pirofosforamida.  
PCP – Penta cloro fenol (PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.  
SBSE - Extração Sortiva com Barra Magnética (*Stir Bar Sorptive Extraction*).

---

SFC - Cromatografia por fluido supercrítico (*Super Critic Fluid Chromatography*).  
SFE - Extração com Fluido Supercrítico (*Super Critic Fluid Extraction*).  
SINITOXI – Sistema Nacional de Informações Toxicológicas.  
SISAN - Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional.  
SLE - Extração Sólido-Líquido (*Solid-Liquid Extraction*).  
SNC – Sistema Nervoso Central.  
SNP - Sistema Nervoso Periférico.  
SPE - Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*).  
SPME - Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Micro-Extraction*).  
TEPP – Tetraetilpirofosfato.  
UPLC - cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra Performance Liquid Chromatography*).  
USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.  
VGSC - Canais de sódio dependentes de voltagem (*Voltage-Gated Sodium Channels*).

---

## I – INTRODUÇÃO

A dinâmica do setor leiteiro nos últimos anos, principalmente a partir dos anos 90, tem apontado para o crescimento da oferta de leite, decorrente de expressivas taxas de crescimento na produção interna, via um contínuo incremento da produtividade, e também das substanciais importações que foram realizadas. Além do imenso potencial produtivo do país (grandes áreas, mão-de-obra, clima), há ainda um crescente mercado interno. Baseando o consumo nas recomendações do Ministério da Saúde, podemos calcular que a nossa produção está muito abaixo do que é necessário (38 bilhões de toneladas/ano), se os brasileiros ingerissem as quantidades recomendadas de leite (Gomes et al., 2004).

Agrotóxicos, em especial organofosforados e carbamatos, são bastante utilizados no controle de pragas em plantações. Quando aplicados de forma inadequada na lavoura, essas substâncias podem contaminar cursos de água além de gerarem resíduos em produtos agrícolas. Tanto as fontes de água como esses produtos agrícolas podem ser destinados ao consumo dos animais, e através de seu metabolismo, essas substâncias se depositam na gordura e músculos, podendo ser encontrados também no leite (Rothwell et al., 2001). Outro fato importante é o parasitismo animal, considerado o maior flagelo que acomete os rebanhos mundiais, situação que leva a utilização de diferentes classes de agrotóxicos, utilizados diretamente nos animais para controle de endo e ectoparasitos (Spinosa et al., 2006).

O cenário atual mundial da produção de alimentos revela o grande interesse da sociedade quanto à inocuidade do produto final a ser consumido. Diversos acontecimentos envolvendo a contaminação de alimentos há muito têm despertado a atenção do consumidor, especialmente no

que concerne aos resíduos de agrotóxicos (Paschoal et al., 2008). Este quadro tem forçado os países a estabelecerem normas legislativas rígidas que garantam o consumo de alimentos seguros por parte da população.

Métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de resíduos de contaminantes em alimentos como ferramenta principal para assegurar que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais. Para que estes métodos garantam a disponibilidade de um alimento seguro, é preciso que sejam normalizados e cumpram requisitos que garantam bons resultados. Com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, são delineados procedimentos de validação do processo analítico empregado, como garantia da qualidade das medições químicas, através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade.

Os laboratórios que realizam as análises em alimentos precisam ter capacidade técnica comprovada para tal compromisso, a qual é garantida pelas normas de credenciamento estabelecidas por órgãos responsáveis, que no Brasil são representados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), os quais disponibilizam guias para procedimentos de validação de métodos analíticos. Há ainda órgãos internacionais, como União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), Organização Internacional para Padronização (ISO), Conferência Internacional em Harmonização (ICH) que também estabelecem procedimentos de validação como critério fundamental no credenciamento de laboratórios.

Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho é validar um método

---

multirresíduos para determinação e quantificação de resíduos de agrotóxicos em leite empregando como técnica instrumental a cromatografia de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem, atendendo as normas de qualidade nacionais e internacionais (ABNT, 2005; SANCO, 2010).

## II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### II.1 Leite

O leite, produto de secreção das glândulas mamárias é um fluido viscoso constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão, formando uma emulsão natural, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração. Possui elevado valor nutritivo, sendo o único alimento que satisfaz às necessidades nutricionais e metabólicas do recém-nascido de cada espécie (Sgarbieri, 2004).

Do ponto de vista de saúde pública, ocupa lugar de destaque em nutrição humana, pois constitui-se em um alimento essencial para todas as idades, principalmente recém-nascidos, o mesmo se aplicando para todos os derivados lácteos (Oliveira et al., 1999). No entanto, a sua composição química pode ser alterada por uma série de fatores, tais como raça, idade e alimentação do animal, estágio de lactação, variações climáticas, ou ainda infecções do úbere da vaca (Nascimento et al., 2001).

Os macrocomponentes do leite bovino são: água (87,30%), lactose (4,90%), gordura (3,80%), proteínas (3,30%) e minerais (0,72%). As partículas suspensas na fase líquida do leite são gotículas de gordura e micelas de caseína. O leite bovino é comercializado em sua forma líquida, pasteurizado ou esterilizado, integral ou desengordurado. Essas mesmas formas são

também comercializadas desidratadas, leite em pó (Sgarbieri, 2004).

A proteína contida no leite é classificada como de alto valor biológico, na medida em que contém todos os aminoácidos essenciais. Um copo de leite contém aproximadamente 16% da quantidade diária de proteína necessária em uma dieta padrão de 2000 calorias (Timerman, 2010). Já as proteínas do soro de leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais a tal ponto que alguns pesquisadores classificaram essas proteínas como proteínas de metabolização rápida “*fast metabolizing proteins*”, muito adequadas para situações de estresses metabólicos em que a reposição de proteínas no organismo se torna emergencial (Sgarbieri, 2004).

O leite e seus derivados, principalmente os queijos e iogurtes, são um dos cinco grupos alimentares incluídos na Pirâmide Alimentar elaborada pelas autoridades sanitárias dos Estados Unidos. Nessa Pirâmide preconiza-se a ingestão de duas ou três porções de um de seus constituintes por dia. Essa mesma sugestão foi incorporada pela Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição (CGPAN) do Ministério da Saúde, que da mesma forma, recomenda a ingestão de três porções de lácteos por dia (Brasil, 2006 a).

#### II.1.1 Mercado do leite

Segundo Carvalho (2010), a indústria de alimentos sempre desempenhou um importante papel na economia brasileira, representando uma das mais tradicionais estruturas produtivas existentes no País. Com um faturamento de R\$ 291,6 bilhões em 2009, essa indústria contribuiu com quase 10% do Produto Interno Bruto do Brasil (Tabela 1).

Apesar de a maior parte do PIB da indústria de alimentos ser resultado do mercado doméstico, o setor externo vem tendo participação crescente na receita das empresas. Isso pode ser observado no desempenho da balança comercial de alimentos, que, após registrar um saldo de R\$ 20,9 bilhões em 2001, atingiu R\$ 55,3 bilhões em 2009. Com isso, as exportações da indústria de alimentos representam cerca de 20% das exportações totais brasileiras. Vale ressaltar que o saldo comercial da indústria de alimentos só não evoluiu de forma mais expressiva em função da recente valorização cambial, que tem dificultado as exportações de alguns setores, como por exemplo, o de laticínios (Carvalho, 2010).

**Tabela 1** Desempenho da indústria alimentícia no Brasil.

| Valores em R\$ bilhões | 2001  | 2005  | 2009  |
|------------------------|-------|-------|-------|
| Faturamento            | 117,9 | 195,7 | 291,8 |
| Participação no PIB    | 9,1 % | 9,1 % | 9,3 % |
| Importações            | 2,9   | 3,6   | 6,3   |
| Exportações            | 23,8  | 48,9  | 31,7  |
| Saldo Comercial        | 20,9  | 45,3  | 55,3  |

Fonte: Carvalho, 2010.

Segundo Peres et al.(2011) os dois últimos censos agropecuários realizados no período entre 1996 e 2006, revelam um significativo aumento nos processos de produção pecuária, destacando-se as exportações de carne bovina (de 46.656 t – ou 1,2% da produção – para mais de um milhão de toneladas – ou 17,8 % da produção) e o aumento da demanda interna de leite. Em razão disto, ocorreu o aumento não apenas da produção de gado de corte, mas também da produção e investimentos em tecnologia para a produção de leite e derivados, que no período cresceu de aproximadamente 18 bilhões de litros/ano para mais de 20 bilhões, crescimento próximo a 10% no período (Peres et al., 2011).

Leite e produtos lácteos são importantes commodities agrícolas, tanto pelo volume de produção quanto pelo seu alto valor nutritivo (Blasco et al., 2009). Dentre os diversos setores da indústria alimentícia, o

setor de laticínios destaca-se entre os quatro principais (Tabela 2). A liderança, neste caso, fica com o setor de derivados de carne. Estima-se que a participação dos laticínios no faturamento total da indústria de alimentos seja de aproximadamente 10% (ABIA, 2010).

**Tabela 2.** Desempenho da indústria alimentícia no Brasil.

| Produto                               | 2001 | 2005 | 2009 |
|---------------------------------------|------|------|------|
| Derivados de Carne                    | 1º   | 1º   | 1º   |
| Beneficiamento de Café, Chá e Cereais | 3º   | 2º   | 2º   |
| Açúcares                              | 6º   | 5º   | 3º   |
| Laticínios                            | 2º   | 4º   | 4º   |
| Óleos e Goduras                       | 4º   | 3º   | 5º   |
| Derivados do Trigo                    | 5º   | 6º   | 6º   |

Fonte: ABIA, 2010.

No mercado mundial do produto, segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA – “*United States Department of Agriculture*”), o Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite, com uma produção, em mil toneladas, de 28.795 em 2009. Ficando atrás apenas da União Européia (EU), Estados Unidos, Índia, China e Rússia, que produziram, respectivamente, 133.800, 85.820, 47.670, 32.800 e 31.290 mil toneladas de leite no mesmo período. Ainda segundo o USDA (2009), a produção de leite brasileira deverá crescer 5% em 2010 em relação ao ano anterior. Em relação ao mercado externo, as exportações brasileiras de leite saltaram de 8.927.628 kg, equivalentes a US\$13.360.878 em 2000, para 64.413.702 kg o que corresponde a US\$151.765.409 em 2009. Portanto, um aumento de 721% na produção e 1135,9% nos valores comercializados em apenas nove anos (Milk Point, 2010).

Um fenômeno interessante, respaldado pelos hábitos de consumo da população, é a alteração no tipo de leite fluido consumido. Neste caso, os leites tipo A, B e C foram paulatinamente substituídos pelo leite Longa Vida ou UHT - *Ultra High Temperature* - que hoje representa quase 75% do leite fluido vendido no mercado

formal (Figura 1). Essa substituição permitiu reduzir as fronteiras internas para a venda de leite e as grandes empresas passaram a ofertar leite fluido

nacionalmente, o que não era possível em se tratando de um produto de alta perecibilidade como o leite pasteurizado (Carvalho, 2010).

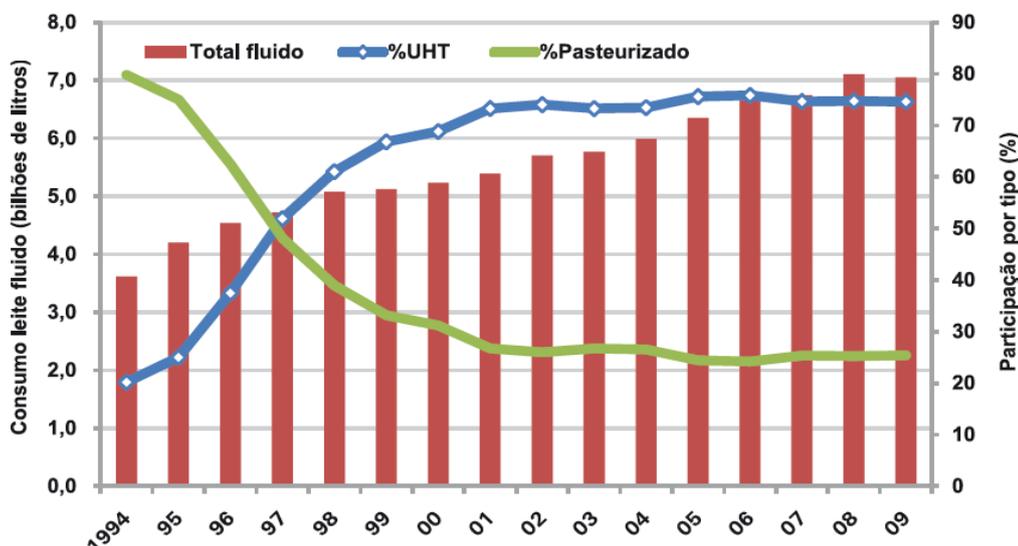


Figura 1. Consumo formal de leite fluido no Brasil e participação do UHT e pasteurizado (Carvalho, 2010).

## II.2 Agrotóxicos

### II.2.1 Histórico

Muitos dos compostos químicos usados como agrotóxicos foram desenvolvidos na década de 1930, contudo o primeiro químico a sintetizar um agrotóxico, o diclorodifeniltricloetano (DDT) foi Ottmar Zeidler em 1872. Todavia, o DDT somente foi comercializado em 1939, como carrapaticida. Porém, a baixa degradabilidade e o modo de dispersão deste agrotóxico tornaram-se grandes problemas para o ambiente e a saúde, levando-o a ser proibido comercialmente nos Estados Unidos em 1972 (Eto, 1977) e, nove anos depois, no Brasil.

Em 1897 o alemão Michaelis e o russo Arbusov foram os primeiros a trabalhar com os clássicos ésteres contendo fósforo. Porém, o progresso dos agrotóxicos

organofosforados é devido aos trabalhos de Gerhard Schrader, iniciados na Alemanha por volta de 1934. O mais conhecido foi o octametil pirofosforamida *Octamethyl Pyrophosphoro Amidate* (OMPA), primeiro inseticida de ação sistêmica descoberto em 1941 que passou a ser chamado de “Scharadan”, em homenagem ao seu descobridor. Devido à possibilidade de ser usado como arma química, os resultados destas pesquisas permaneceram secretos durante a II Guerra Mundial (Eto, 1977).

Segundo Lara e Batista, citado por Maciel (2005) desde então, com a expansão no mundo agrícola, dirigido pelo aumento de níveis populacionais, a pesquisa de novos agrotóxicos tem crescido consideravelmente. Por exemplo, foram introduzidas novas famílias de produtos tais como carbamatos e piretróides.

## II.2.2 Definição

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas e biocidas, são denominações dadas a substâncias químicas que são utilizadas para prevenir, destruir ou controlar alguma peste, incluindo vetores de doenças humanas ou de animais; espécies não desejadas de plantas ou animais que causam danos ou interferem com a produção, estocagem, transporte ou comercialização de alimentos. Estão incluídos também neste conceito os reguladores de crescimento de plantas, desfolhantes, dessecantes ou agentes para prevenção da queda prematura dos frutos ou ainda, substâncias utilizadas antes e após a colheita, para prevenir a deterioração durante a estocagem ou transporte (WHO, 2009a).

A Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89, regulamentada através do Decreto 98.816, no seu Artigo 2º, Inciso I, define o termo AGROTÓXICOS da seguinte forma:

"Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na

proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento". Essa definição exclui fertilizantes e químicos administrados a animais para estimular crescimento ou modificar comportamento reprodutivo (Santos, 2009).

## II.2.3 Utilização e mercado

A história da utilização dos agrotóxicos começou há vários séculos com relatos do emprego de produtos químicos para controle de algumas pestes principalmente insetos. O termo agrotóxico é, contudo, muito mais amplo, aplicando-se a substâncias químicas que apresentam ação fisiológica sobre organismos vivos e normalmente são utilizados para impedir a ação ou destruir, direta ou indiretamente, formas de vida animal ou vegetal prejudiciais, como ervas daninhas, roedores, fungos, ácaros e insetos (Melo et al., 2002).

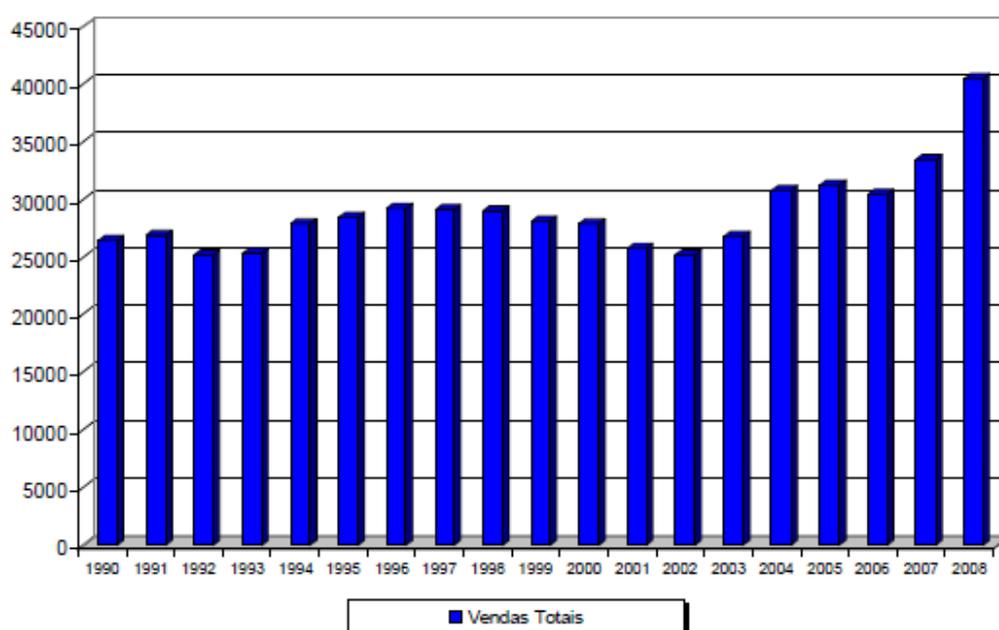
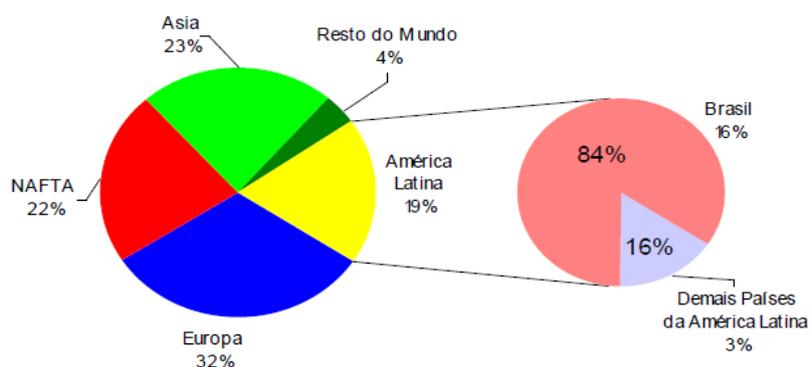


Figura 2. Mercado Mundial de agrotóxicos 1999-2008 (US\$ milhões) (MacDougall, 2008)

A utilização dos agrotóxicos na agricultura iniciou-se na década de 1920, época em que eram pouco conhecidos do ponto de vista toxicológico. Tornando-se mais importante para a humanidade a partir dos anos trinta, quando são patenteados o dinitro-ortocresol na França (1932) como herbicida e o Thiram nos EUA (1934), primeiro fungicida do grupo dos ditiocarbamatos (Trapé, 1995). A Figura 2 apresenta dados do mercado mundial de agrotóxicos no período de 1999 a 2008 em milhões de dólares. No Brasil, foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas, passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 1960, quando o Brasil adota um modelo de produção agrícola baseado na

incorporação de alta tecnologia com utilização de insumos mecânicos e químicos (agrotóxicos e fertilizantes). Em 1975, o Plano Nacional de Desenvolvimento - PND, responsável pela abertura do Brasil ao comércio de agrotóxicos, condiciona o agricultor a comprar estes produtos com recursos do crédito rural, ao instituir a inclusão de uma cota definida de agrotóxico para cada financiamento requerido (Trapé, 1995).

Essa obrigatoriedade, somada à propaganda dos fabricantes, determinou um enorme incremento e disseminação da utilização dos agrotóxicos no Brasil, que é atualmente um dos maiores consumidores mundiais (Figura 3), resultando em inúmeros problemas, tanto de saúde humana como animal, além do meio ambiente.



**Figura 3.** Participação do Brasil no consumo mundial de agrotóxicos em 2007 (Macdougall, 2008)

Atualmente existem mais de 800 compostos, pertencentes à cerca de 100 classes químicas diferentes, registrados como ingredientes ativos de produtos comercializados como agrotóxicos no mundo todo. Se forem incluídos metabolitos destes compostos no cálculo, o número supera 1500 substâncias. A aplicação de agrotóxicos aumentou em 50% no mundo, desde 1950. Atualmente, a produção industrial de agrotóxicos é de  $2,5 \times 10^9$  kg ao ano (Kovalczuk et al., 2008;

Cajka et al., 2008). Mas, o uso incorreto destes compostos pode contaminar o meio ambiente, ocasionando efeitos adversos à saúde dos seres vivos e problemas associados com a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Muitos desses produtos não possuem antídotos e são proibidos em seus países de origem (Rice et al., 2007; Khalili-Zanjani et al., 2008).

As práticas agrícolas modernas dependem, extensivamente, da aplicação de agrotóxicos durante o cultivo e após a

---

colheita, na etapa de estocagem dos produtos agrícolas. O uso de agrotóxicos é essencial para prevenir ou reduzir perdas na agricultura, melhorando, assim, a produção, e para que sejam obtidos produtos com qualidade, que satisfaçam os consumidores e garantam seu comércio (Kmešlár et al., 2008). São ainda largamente empregados na pecuária para o controle de parasitas que provocam dano à saúde dos animais ou desconforto a estes, diminuindo a produção e, por conseguinte, causando prejuízos aos produtores (Peres et al., 2010).

Existem atualmente cerca de 7.200 produtos de uso veterinário autorizados para comercialização no Brasil, com destaque para os antibióticos e os produtos para combate de ectoparasitas (em particular os carrapaticidas). Com relação aos carrapaticidas e outros produtos de controle de ectoparasitas, uma importante questão se coloca como tema de grande relevância para a Saúde Coletiva no país: esses produtos são formulados à base de princípios ativos considerados agrotóxicos (ou pesticidas, tal qual registrado no conceito de produtos de uso veterinário descrito pela legislação), agentes químicos reconhecidamente prejudiciais para a saúde humana, animal e o ambiente (Peres et al., 2011).

#### ***II.2.4 Toxicidade dos Agrotóxicos***

Agrotóxicos são muitas vezes aplicados topicamente ou administrados por via oral em animais com o objetivo de controlar infestações por insetos nocivos e parasitas ou, utilizados em seu ambiente para controlar uma variedade de pragas. No ambiente rural, as características do sistema de produção de alimentos, de origem animal ou vegetal, em larga escala, acaba por resultar na exposição de animais domésticos à grande variedade de produtos químicos agrícolas atualmente em uso. Esta exposição a agrotóxicos pode ser mínima ou pode ser suficientemente grande para

produzir sinais clínicos e resultar em intoxicações agudas, ou mesmo, deixar resíduos que afetam a segurança dos consumidores através da contaminação da cadeia alimentar (Poppenga e Oehme, 2010).

Um grande número de novas substâncias químicas tem sido desenvolvido para utilização como agrotóxicos em substituição a moléculas de uso corrente na agricultura e pecuária. A proposta destes novos agrotóxicos é apresentar menor toxicidade a organismos não alvo, menor persistência no ambiente e significativa redução da presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Pode-se citar o caso dos inseticidas organofosforados e carbamatos que, em função da legislação moderna têm apresentado significativa redução na utilização em medicina veterinária. Em substituição a estes compostos, inseticidas menos tóxicos, tais como piretrinas e piretróides, os neonicotinóides e os reguladores de crescimento de insetos, têm sido desenvolvidos (Krieger, 2010).

Agrotóxicos mais modernos têm sido especificamente concebidos para produzir a morte rápida das pragas alvo e aumentar a segurança relativa para os animais e pessoas. A eficácia e segurança destes compostos são resultado da exploração de características fisiológicas específicas de mamíferos e pragas, tais como insetos, parasitas intestinais e carrapatos. Isso tem levado a redução do número de casos de intoxicações agudas de animais domésticos, de produção e humanos, embora ainda ocorram casos de intoxicação deste tipo (Hodgson, 2004; Poppenga e Oehme, 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, as intoxicações agudas por agrotóxicos são da ordem de três milhões de indivíduos anuais, com 2,1 milhões de casos só nos países em desenvolvimento. O

número de mortes atinge 20.000 por ano em todo o mundo, com 14.000 nas nações do terceiro mundo. No entanto, acreditam os especialistas, que as estatísticas reais devem ser ainda maiores devido à falta de documentação a respeito das intoxicações subcrônicas, causadas por exposição moderada ou pequena a produtos de alta toxicidade, e intoxicações crônicas, que requerem meses ou anos de exposição que, em longo prazo, revelam danos irreversíveis. Ainda segundo a OMS, para cada caso notificado de intoxicação ter-se-ia 50 outros não notificados (Santos, 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde constituiu o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox) em 1980, vinculado à Fiocruz. O Sinitox divulga anualmente dados de notificações de intoxicações em humanos e animais, disponibilizados pelos 37 Centros de Informação e Assistência Toxicológica existentes no país. A Tabela 3 apresenta registros de casos de intoxicação humana, de intoxicação animal e de solicitação de informações por agrotóxicos no período de 2006 a 2008.

**Tabela 3.** Registros de casos de intoxicação por agrotóxico em números absolutos no período de 2006 a 2008. (Sinitox, 2010).

| Vítima       | Agrotóxico   |             |             |               |             |             |
|--------------|--------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|
|              | Uso agrícola |             |             | Uso doméstico |             |             |
|              | 2006         | 2007        | 2008        | 2006          | 2007        | 2008        |
| Humana       | 6346         | 6260        | 4074        | 3646          | 3451        | 2820        |
| Animal       | 125          | 150         | 128         | 390           | 376         | 244         |
| Solicitação  | 1018         | 1182        | 1012        | 613           | 576         | 571         |
| <b>Total</b> | <b>7489</b>  | <b>7592</b> | <b>5214</b> | <b>4749</b>   | <b>4403</b> | <b>3635</b> |

A OMS classifica os agrotóxicos em classes de acordo com o grau de toxicidade da

substância (Tabela 4).

**Tabela 4.** Classificação dos agrotóxicos quanto ao grau de toxicidade.

| Classe |   | LD <sub>50</sub> para ratos (mg/kg de massa corporal) |             |
|--------|---|---|-------------|
|        |   | Via oral  | Via dérmica |
| Ia     | Extremamente tóxico                           | < 5   | < 50        |
| Ib     | Altamente tóxico                              | 5 - 50  | 50 -200     |
| II     | Moderadamente tóxico                          | 50 – 200-   | 200 - 2000  |
| III    | Levemente tóxico                              | > 2000  | > 2000      |
| U      | Pouco provável que apresente toxicidade aguda | 5000 ou superior                                      |             |

Fonte: WHO (2009b)

Os agrotóxicos são ainda subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química ou a presença de um grupo funcional característico. Segundo o sítio CRL - Data Pool (2011), mantido pelos laboratórios de

referência da Comunidade Européia, existem 142 classes quimicamente diferentes de agrotóxicos, incluindo metabolitos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, órgão

responsável pelo registro e credenciamento de agrotóxicos juntamente com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, relata, no *Guia para Controle da Qualidade para a Análise de Resíduos de*

*Agrotóxicos em Alimentos para os Laboratórios Integrantes do PARA* (Brasil, 2007), 25 classes distintas de agrotóxicos (Tabela 5).

**Tabela 3.** Principais classes de agrotóxicos em função de sua natureza química.

| Grupo | Descrição                                      | Grupo | Descrição                                 |
|-------|--|-------|---|
| 1     | Ftalamidas                                     | 14    | Urea\ uracilas                            |
| 2     | Grupos nitrila/ciano ligados pós dupla ligação | 15    | Heterocíclicos nitrogenados               |
| 3     | Halogenados aromáticos (organoclorados)        | 16    | Metoxi-acetamidas                         |
| 4     | Conazóis e metabólitos                         | 17    | Imidazolinonas                            |
| 5     | Clorados (ciclo/ciclodienos - organoclorados)  | 18    | Fenóxi ácido                              |
| 6     | Carbamaldeidos                                 | 19    | Oxihidrocarbonos                          |
| 7     | Dinitroanilinas                                | 20    | Estrobilurinas                            |
| 8     | Piretróides e metabólitos                      | 21    | Neonicotinis                              |
| 9     | Triazinas                                      | 22    | Diacilidrazinas                           |
| 10    | Fenil pirróis                                  | 23    | Ácidos etanosulfonico, oxanílico e metab. |
| 11    | Organofosforados e metabólitos                 | 24    | Sulfonil uréias                           |
| 12    | Carbamatos and metabólitos                     | 25    | Ácido tetrônico                           |
| 13    | Tiocarbamatos                                  |       |   |

Fonte: Brasil, 2007.

Outra forma de classificação agrupa os agrotóxicos pelo tipo de ação destes compostos. Esta classificação subdivide os agrotóxicos em inseticidas, herbicidas, fungicidas e rodenticidas (Ecobichon, 1991; Cope et al., 2004; Heinzow. e Andersen, 2006; Poppenga e Oehme, 2010). Neste trabalho serão estudados apenas compostos pertencentes às três primeiras classes.

#### II.2.4.1 Inseticidas

A literatura relativa à química e ao desenvolvimento de diversas classes de inseticidas nos últimos 45 anos é extensa compreendendo diversas monografias que discutem aprofundadamente a química, nomenclatura (Química, nomes comuns e comerciais), biotransformação, a degradação e impacto ambiental, bem como

alvo e toxicidade a espécies não-alvo. Compilações de DL<sub>50</sub> em ratos de laboratório e dados de toxicidade aguda para animais de laboratório, peixes, e outros animais, estão registrados em uma série de relatórios (Ecobichon, 1991; Cope et al., 2004).

Várias monografias de agrotóxicos existentes fornecem perfil sucinto das propriedades físicas e químicas dos diversos agrotóxicos, bem como a sua persistência ambiental e toxicidade aos animais selvagens, domésticos e seres humanos (Ecobichon, 1991; Cope et al., 2004; Brasil, 2011; FOOD Print, 2011).

Todos os inseticidas químicos em uso hoje são neurotóxicos e agem por envenenamento do sistema nervoso do

---

organismo alvo. O sistema nervoso central (SNC) de insetos é altamente desenvolvido e não diferencia muito dos mamíferos, enquanto o sistema nervoso periférico (SNP) dos insetos não é tão complexo como o dos mamíferos, contudo, existem semelhanças. O desenvolvimento de inseticidas tem sido baseado nas relações estrutura-atividade específicas que exigem a manipulação de uma estrutura química básica para obter uma forma e configuração ideais para atingir a especificidade desejada para uma única característica bioquímica ou fisiológica do sistema nervoso do organismo-alvo (Ecobichon, 1991; Cope et al., 2004; Poppenga e Oehme, 2010).

Uma vez que os inseticidas não são seletivos e afetam as espécies não-alvo tão facilmente como organismos-alvo, não é surpreendente que uma substância química que atua sobre o sistema nervoso do inseto irá suscitar efeitos semelhantes em formas mais elevadas da vida. Os locais de destino e/ou mecanismo(s) de ação pode(m) ser semelhante(s) em todas as espécies, apenas a dosagem (nível de exposição e duração) ditará a intensidade dos efeitos biológicos (Ecobichon, 1991; Cope et al., 2004; Krieger, 2010; Poppenga e Oehme, 2010).

De modo geral o mecanismo de ação toxicológica das diferentes classes de inseticidas se dá por pelo menos uma das vias a seguir: interferências no transporte de íons sódio, potássio e cálcio ou íons cloreto através da membrana; inibição da seletividade da atividade enzimática, ou contribuição para a liberação e/ou a persistência de transmissores químicos nas terminações nervosas (Cope et al., 2004).

Os inseticidas são muitas vezes classificados de acordo com a forma de ação/deposição do composto no alvo (Cope et al., 2004).

#### ***II.2.4.1.1 Inseticidas de ação local:***

Estes afetam diretamente a praga, desta forma devem ser distribuídos o mais uniformemente possível sobre a superfície da planta ou animal a ser tratado, onde a sua absorção pelos insetos ocorrerá. Muitos inseticidas mostram uma boa profundidade de ação, penetrando na folha e alcançando até mesmo os insetos escondidos na parte de baixo da folha diretamente atingida pelo inseticida. Profundidade de ação é importante, principalmente no controle de estágios de desenvolvimento dos insetos, como por exemplo as larvas do bicho-mineiro de beterraba (*Pegomya hyoscyami*). Inseticidas com ação predominantemente local encontram-se principalmente nos organoclorados, muitos ésteres orgânicos do ácido fosfórico e carbamatos exibindo uma efetiva ação penetrante (Waxman, 1998; Cope et al, 2004; Heinzow. e Andersen, 2006; Poppenga e Oehme, 2010).

#### ***II.2.4.1.2 Inseticidas de ação sistêmica:***

São absorvidos de forma relativamente rápida por plantas e/ou animais nos quais são aplicados e transportados para o sistema vascular. De acordo com o tipo de aplicação em plantas, a absorção ocorre através das raízes ou pelas partes aéreas da planta. A persistência da atividade é dependente do tipo de substância, da intensidade da degradação na planta ou solo e das condições ambientais (Waxman, 1998; Cope et al, 2004).

A seguir são apresentadas algumas vantagens particularmente importantes da utilização de inseticidas sistêmicos em plantas (Waxman, 1998).

- rápida absorção pelas plantas o que reduz o grau de perigo para insetos benéficos. Poucas horas após a aplicação, apenas os insetos que sugam e se alimentam das plantas são afetados, enquanto inimigos

- 
- naturais presentes em seu habitat, por exemplo, as abelhas não são.
- boa distribuição pelo organismo vegetal no qual foi aplicado atingindo até mesmo insetos escondidos, enquanto que inseticidas de ação local os afetam pouco ou nada.
  - requisitos que dizem respeito à distribuição uniforme e resistência a intempéries são menos rigorosos para inseticidas de ação sistêmica. Devido à sua absorção rápida, eles são amplamente imunes à influência de fatores externos.

Os principais grupos químicos representantes dos inseticidas são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e os inseticidas mais modernos, de menor toxicidade para mamíferos, como os piretróides e neonicotóides. Somam-se a estas substâncias representantes de diversas classes químicas como: amidinas, benzoiluréia, oxidiazinas, pirazóis e triazinas entre outros (Waxman, 1998; Cope et al, 2004; Heinzow. e Andersen, 2006; Krieger, 2010; Poppenga e Oehme, 2010).

#### **II.2.4.1.3 Inseticidas neonicotóides**

Os neonicotóides são considerados inseticidas modernos. Estes agem especificamente através do bloqueio da rota de transmissão nervosa nicotérgica (juntamente com a acumulação de acetilcolinesterase). Esta rota é mais abundante em insetos que em animais de sangue quente, conferindo a estes compostos elevado grau de seletividade toxicológica contra insetos e, apenas toxicidade moderada a mamíferos. Embora não haja relatos de envenenamento de humanos, os sinais e sintomas de envenenamento devem ser semelhantes àqueles por envenenamento por nicotina. Estes sinais incluem fadiga, espasmos, câibras e fraqueza muscular (Heinzow. e Andersen, 2006).

#### **II.2.4.2 Fungicidas**

Consistem de uma vasta gama de substâncias químicas que vão desde compostos inorgânicos até compostos orgânicos complexos (Hodgson, 2004; Heinzow e Andersen, 2006).

Fungicidas podem ser descritos como protetores, curativos, ou erradicantes, de acordo com seu modo de ação. Protetores são aplicados para prevenir o aparecimento de fungos patogênicos. Curativos são usados quando a infestação já teve início e o fungo já invadiu a matriz, estes fungicidas agem destruindo o micélio de fungos jovens (as hifas), impedindo que a infestação se alastre. Erradicantes controlam o desenvolvimento de fungos após o aparecimento dos sintomas, geralmente após a esporulação, matando ambos, os esporos novos e os micélios e penetrando na matriz em nível subdérmico (Cope et al, 2004; Heinzow e Andersen, 2006; Poppenga e Oehme, 2010).

Diversas classes de fungicidas têm sido desenvolvidas para inibir a síntese e crescimento da membrana celular de fungos, pela inibição de enzimas específicas do complexo citocromo P450, na rota esterol (Heinzow e Andersen, 2006). Os agrotóxicos fungicidas envolvem um número muito grande de compostos pertencentes a diferentes classes químicas, tais como: triazinas, imidazóis e tiazóis, ftalimidas, organoclorados, dinitrofenóis, tiocarbamatos e ditiocarbamatos entre outras (Ecobichon, 1991).

Um exemplo da ampla disseminação do uso de fungicidas é dado pelo composto clorotalonil (tetracloroisofitalonitrila). Trata-se de um fungicida de amplo espectro que é amplamente utilizado em ambientes urbanos. É relativamente barato e controla cerca de 140 espécies de organismos. Como resultado da popularidade deste composto, é encontrado rotineiramente nas águas

---

superficiais entrar abastecimento público de água potável. Na formulação que pode ser adquirido pelo público em geral, é relativamente atóxico (Cope et al., 2004).

Um fungicida eficaz deve possuir as seguintes propriedades (Ecobichon, 1991):

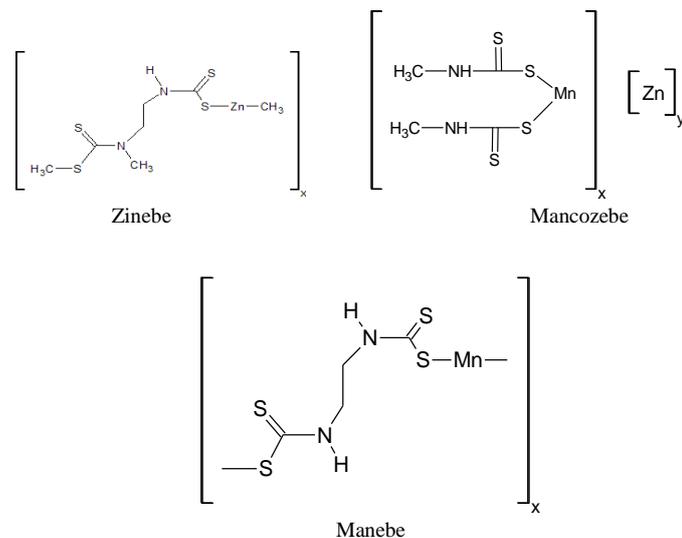
- baixa toxicidade para o organismo no qual será aplicado, mas elevada toxicidade para o fungo específico;
- atividade tóxica ou capacidade de converter-se (por planta ou enzimas fúngicas) em um intermediário tóxico;
- capacidade de penetrar nos esporos fúngicos ou no micélio em desenvolvimento para chegar ao local de ação;
- formação de um depósito de proteção tenaz na superfície onde foi aplicado, resistente às intempéries como chuva, luz solar, e vento.

A toxicidade dos fungicidas tem sido extensivamente revisada e, com poucas exceções, a maioria desses produtos químicos tem baixo nível de toxicidade aos mamíferos, mas alguns compostos possuem características biológicas que podem causar efeitos crônicos (Ecobichon, 1991; Cope et al, 2004). No entanto, todos os fungicidas são citotóxicos e produzem resultados positivos em testes *in vitro* de mutagenicidade. Em vista disso, a preocupação dos órgãos públicos se concentra na positividade dos testes de mutagenicidade obtidos com diversos fungicidas e na possibilidade de ocorrência de potencial teratogenicidade e carcinogenicidade. É fato que quase 90% de todos os fungicidas agrícolas são cancerígenos em modelos animais (Ecobichon, 1991).

Um estudo realizado com 11 fungicidas concluiu que, embora as áreas tratadas com esses produtos representem apenas 10% da área cultivada anualmente, estes compostos podem ser responsáveis por 60 % do risco total estimado de carcinogenicidade na dieta (Cope et al, 2004).

Agentes como pentaclorofenol (PCP), hexaclorobenzeno (HCB), captafol e folpete tiveram seu uso proibido em muitos países, mas ainda são empregados em países onde a legislação é menos rigorosa e os órgãos fiscalizadores menos eficientes (Cope et al, 2004). Outros fungicidas são submetidos à reavaliação devido a suspeita de toxicidade, nomeadamente aqueles para os quais os estudos de teratogenicidade ou carcinogenicidade são incompletos ou desatualizados (Hodgson, 2004; Krieger, 2010; Poppenga e Oehme, 2010).

Uma família de fungicidas que é motivo de preocupação são os ditiocarbamatos, derivados sulfurados do ácido ditiocarbâmico. A esta família pertencem os fungicidas mancozebe (um produto de coordenação de íons de zinco e manganês de etilenobisditiocarbamato), manebe (manganês etilenobisditiocarbamato) e zinebe (zinco etilenobisditiocarbamato) cujas estruturas são apresentadas na Figura 4. Todos são fungicidas eficazes e são usados em uma variedade de culturas, incluindo as uvas, beterraba, açúcar e plantas ornamentais. Embora relativamente não tóxicos, eles hidrolisam produzindo substâncias cancerígenas conhecidas como etiltiourea (ETU). (Cope et al, 2004; Hodgson, 2004; Heinzow e Andersen, 2006; Krieger, 2010).



**Figura 4.** Estruturas químicas dos ditiocarbamatos zinebe, mancozebe e manebe.

### II.2.4.3 Herbicidas

Herbicidas, na definição mais ampla, são compostos capazes de matar ou causar danos significativos a plantas indesejáveis. Podem ser empregados para inibir o crescimento de plantas ou eliminar partes aéreas destes organismos. Muitos dos primeiros produtos químicos empregados como herbicidas, tais como: ácido sulfúrico, clorato de sódio, o trióxido de arsênio, arsenito de sódio, óleos de petróleo ou borato de sódio, eram de difícil manipulação ou muito tóxicos. Além disso, apresentavam-se relativamente inespecíficos, ou fitotóxicos tanto para as plantas indesejáveis quanto para a cultura a ser protegida. No final de 1930, muitos estudos foram iniciados para encontrar agentes que destroem seletivamente certas espécies de plantas. Muitos destes produtos químicos iniciais foram eficazes, mas ainda

apresentavam considerável toxicidade em mamíferos (Ecobichon, 1991; Heinzow e Andersen, 2006).

Nas últimas duas décadas, os herbicidas representaram os agrotóxicos com mais rápido crescimento em volume de negócios, em parte devido às práticas monoculturais, onde o risco de infestação de plantas daninhas aumentou com o vazio sanitário e rotação de culturas e a mecanização das práticas agrícolas, devido ao aumento dos custos com mão de obra. Como resultado deste fenômeno, uma infinidade de estruturas quimicamente diversas empregadas com o objetivo de proteger as culturas e obter altos rendimentos, eliminando seletivamente espécies de plantas indesejáveis, reduzindo assim a competição por nutrientes foi desenvolvida (Ecobichon, 1991).

Segundo Ecobichon (1991) herbicidas podem ser classificados pela estrutura química, embora isso não seja esclarecedor uma vez que substâncias pertencentes a um mesmo grupo químico podem apresentar sobreposição de efeitos biológicos. Outra classificação destes agentes é feita com base no modo de aplicação. Nesta sistemática têm-se os herbicidas pré-plantio, que são aplicados no solo antes da semeadura. Os herbicidas pré-emergentes

aplicados no solo antes do período de aparição da vegetação indesejada e os herbicidas *post-emergentes*, aplicados no solo ou na folha após a germinação da cultura e/ou ervas daninhas. Em relação ao seu mecanismo de toxicidade em plantas, a sua ação é referida como seletiva, por contato (agem interferindo na folhagem das plantas), ou translocada (absorvidos através do solo ou através da folhagem no xilema e floema).

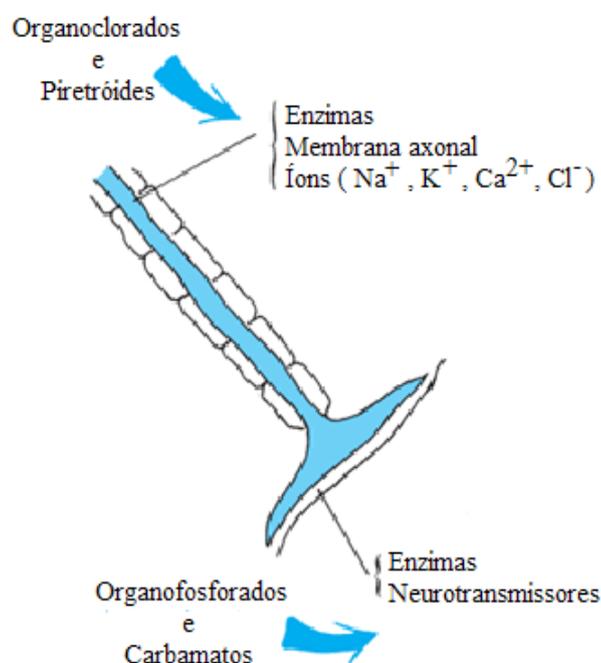


Figura 5. Potenciais sítios de ação das principais classes de agrotóxicos sobre o axônio e porção terminal do neurônio.

Com exceção de alguns produtos químicos, os herbicidas têm demonstrado baixa toxicidade em mamíferos. No entanto, a polêmica atual em torno desses produtos químicos recai sobre a demonstrada/suspeita mutagenicidade, teratogenicidade, e/ou carcinogenicidade associada tanto ao agente quanto a contaminantes e subprodutos da fabricação de herbicidas presentes em formulações técnicas. Em termos de toxicidade geral, como a principal via de exposição a

herbicidas é dérmica e esses agentes tendem a ser ácidos fortes, aminas, ésteres e fenóis, compostos irritantes da derme, herbicidas podem produzir erupções cutâneas e dermatites de contato mesmo quando a exposição envolve formulações diluídas. Em certos indivíduos, particularmente aqueles propensos a reações alérgicas, pode ocorrer dermatite de contato grave, asma, e até mesmo reações anafiláticas após absorção dérmica ou contato com herbicidas formulados (Ecobichon, 1991;

Heinzow e Andersen, 2006). Há ainda muitos outros herbicidas que podem provocar uma série de efeitos agudos e crônicos, após a exposição, e é sobre estes produtos químicos que a atenção das autoridades reguladoras deve recair.

### II.2.5 Mecanismos de ação das principais classes químicas de agrotóxicos

Das 25 classes quimicamente distintas listadas na Tabela 5 (vide item II.2.4), as mais estudadas quanto ao mecanismo de ação e toxicidade são: os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (Chantal et al., 2004; Pancetti et al., 2007; Mastrantonio et al., 2008; Mor et al., 2010; Körbes et al., 2010). Os agrotóxicos organoclorados foram banidos do comércio mundial desde a década de 60. Porém, dada a sua alta persistência no meio ambiente, ainda são alvo de estudos, estes foram substituídos, principalmente, pelos organofosforados (Mor et al., 2010).

Dentre os agrotóxicos mais empregados na pecuária no combate a parasitas e mais frequentemente envolvidos em intoxicações de animais (Tabela 6), estão os organofosforados, carbamatos e piretróides (Medeiros et al., 2009; United Kingdom, 2007). Sendo os organofosforados e carbamatos responsáveis pelo maior número de intoxicações no meio rural (Nero et al., 2007). A Figura 5 mostra esquematicamente os principais sítios de ação das classes de agrotóxicos mais representativas do ponto de vista toxicológico (Heinzow e Andersen, 2006).

#### II.2.5.1 Organoclorados

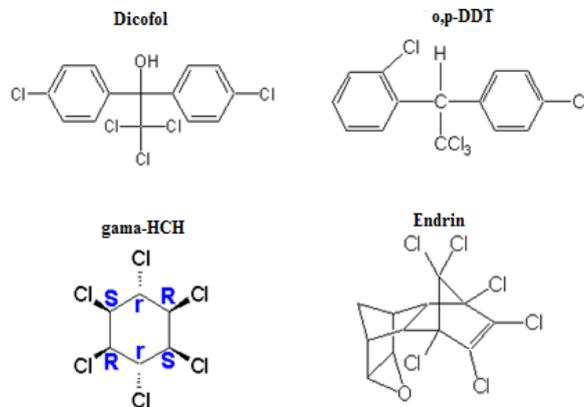
Diclofeniltricloroetano (DDT) foi o primeiro de uma gama de inseticidas organoclorados de contato a ser empregado

em larga escala. Além do DDT, incluem-se neste perfil, aldrin, dieldrin, endrin, clordano e hexaclorobernzeno. Estes compostos foram largamente empregados de meados da década de 1940 até a década de 1960. Suas características físico-químicas de baixa volatilidade, estabilidade química e persistência no ambiente, levaram à bioacumulação destes compostos na cadeia alimentar de peixes, pássaros e mamíferos, devido a sua lipofílicos e apresentarem baixa cinética de degradação (Heinzow e Andersen, 2006). A Figura 5 apresenta a estrutura química de alguns compostos representantes desta classe.

**Tabela 4.** Pesticidas mais comumente envolvidos em intoxicações de animais domésticos

| Inseticidas                            | Herbicidas                     |
|--|--------------------------------|
| Anticolinesterases                     | <i>Compostos bipiridínicos</i> |
| <i>organofosfatos</i>                  | diquate                        |
| Diazinona                              | paraquate                      |
| Diclovós                               | <i>Compostos fenoxílicos</i>   |
| fenetriom                              | 2,4 – D                        |
| malationa                              | <i>Anilinas substituídas</i>   |
| <i>carbamatos</i>                      | alaclor                        |
| aldicarbe                              | propanil                       |
| carbaril                               | propaclor                      |
| <i>Piretróides</i>                     | <i>Organofosfonatos</i>        |
| cipermetrina                           | glifosato                      |
| flumetrina                             | <b>Fungicidas</b>              |
| permetrina                             | <i>Organometálicos</i>         |
| piretrum                               | óxido de tributil estanho      |
| <i>Miscelania</i>                      | <i>Fenóis</i>                  |
| metropene                              | pentaclorofenol                |
| luferom                                | <i>Carbamato e</i>             |
|  | <i>tiabendazol</i>             |
| imidacloprido                          | benomil                        |
| fipronil                               | carbendazim                    |
| amitraz                                | tiabendazol                    |
| <b>Rodenticidas</b>                    | tiofanato                      |
| <i>Derivados do ácido fluoracético</i> |                                |
| fluoracetamida                         |                                |
| fluoracetato de sódio                  |                                |
| <i>Anticoagulantes</i>                 |                                |
| brodifacom                             |                                |
| bromadiolona                           |                                |
| clorfacinona                           |                                |
| difacinona                             |                                |
| difencoumarina                         |                                |
| pindona                                |                                |

Fonte: Oehme, F. W.; Mannala, 2001.



**Figura 6.** Agrotóxicos organoclorados.

### II.2.5.1.1 Mecanismo de Ação

Foi demonstrado que estes compostos (especialmente DDT, DDE e ciclodienos) apresentam propriedades hormônio supressoras e indutoras do citocromo P450, que interferem com o sistema reprodutor. Todavia, os sintomas apresentados são variados e não específicos, o que dificulta o diagnóstico (Heinzow e Andersen, 2006).

Os inseticidas do tipo DDT interagem com a membrana neuronal alterando a permeabilidade desta para potássio e sódio e para os processos mediados por cálcio. Uma vez inibidas estas funções a repolarização dos nervos é perturbada resultando em hipersensibilidade (Heinzow e Andersen, 2006).

Os ciclodienos e cicloexanicos, apresentam ação estimulante do SNC, antagonizando o neurotransmissor ácido gama aminobutírico – GABA, permitindo apenas repolarização parcial dos neurônios, levando a reflexos descoordenados. Finalmente a inibição de repolarização dos neurônios, leva à inibição de Na-, K-ATPase e Ca-Mg-ATPase, o que resulta na acumulação de cálcio livre no meio intracelular (Heinzow e Andersen, 2006).

### II.2.5.2 Piretróides

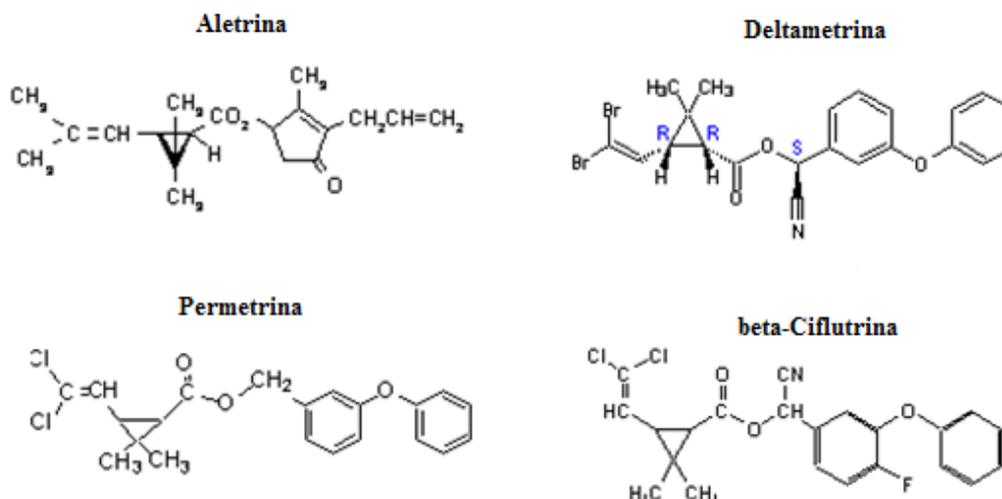
Piretróides são uma das classes mais utilizadas de inseticidas (Figura 7). Após a proibição do uso de organoclorados em praticamente todo o mundo, sendo estes permitidos em apenas alguns poucos países, os piretróides tornaram-se essenciais no controle de vetores de doenças em regiões de clima tropical (Neal et al., 2010).

Historicamente, piretróides naturais eram extraídos das flores de crisântemo que contêm ésteres ceto-alcoólicos, derivados dos ácidos crisantêmico e piretróico, com atividade inseticida denominados piretrinas, cinetrinas e jamolinas. A lipofilicidade dos piretróides lhes permite a rápida penetração pelas áreas não tegumentadas de muitos insetos e paralizam o sistema nervoso destes animais. Segundo Heinzow e Andersen (2006), são empregados frequentemente em combinação com piperonil butóxido e n-octil bicicloheptano dicarboxamida, compostos que exercem efeito sinérgico aos piretróides, aumentando sua toxicidade através de inibição de enzimas, podendo chegar à completa destruição das mesmas.

#### II.2.5.2.1 Mecanismo de Ação

A toxicidade de piretróides em mamíferos segue mecanismo similar àquele que ocorre em insetos. A principal diferença entre os mecanismos de ação em insetos e mamíferos, aparentemente é devida,

principalmente, à diferença de resposta dos canais de sódio dependentes de voltagem (*voltage-gated sodium channels* - VGSC).(WHO, 2005)



**Figura 7.** Agrotóxicos da classe dos piretróides. Grupo I: aletrina e permetrina. Grupo II: deltametrina e  $\beta$ -ciflutrina.

A ação dos piretróides sobre os VGSC prolonga o estado ativado – aberto - destes retardando a inativação do canal, resultando em uma corrente de cauda despolarizante prolongada que pode levar ao aumento da excitabilidade.

Há duas classes de piretróides (Tabela 7) diferenciadas pela presença de um grupo ciano: compostos do tipo II têm o grupo ciano, enquanto os piretróides do tipo I não (Figura 7). As duas classes podem causar diferentes sintomas toxicológicos provavelmente devido as diferenças em seus efeitos sobre os neurônios.

Diferenças na toxicidade das duas classes têm despertado a curiosidade dos pesquisadores e motivado diversos estudos para melhor compreensão de seu mecanismo de ação (WHO, 2005; Neal et al., 2010).

Estes sugerem que os piretróides da classe I afetam os canais de sódio na membrana dos neurônios levando ao prolongamento do influxo de sódio, causando descargas neuronais repetitivas e prolongamento do potencial residual. Contudo, não causam severa despolarização da membrana. Os compostos da classe II levam a um maior e mais prolongado influxo de sódio através da membrana, com despolarização persistente e, eventualmente, bloqueia a condução de impulsos nervosos (Heinzow e Andersen, 2006).

Todavia, segundo Heinzow e Andersen (2006), a classe I exerce seu efeito principalmente sobre a transmissão sináptica, causando hiper excitabilidade e tremores. A segunda classe tem efeito principalmente no sistema nervoso sensorial.

**Tabela 5.** Classes de piretróides

| Características químicas  | Classe toxicológica   | Sintomas   |
|---|---|--|
| <i>Classe I</i>   |   |  |
| Piretrina, aletrina, tetrametrina, resmetrina, fenotrim, permetrina.        | T-síndrome<br>Ação sobre o sistema nervoso central e periférico | Hiperexcitação, tremores e prostração.                                   |
| <i>Classe II</i>  |   |  |
| a-ciano substituídos: cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, fluvalinato. | CS-síndrome<br>Ação no sistema nervoso central de mamíferos.    | Paraestesia cutânea, salivação, apoplexia crônica, formigamento dérmico. |

Fonte: Heinzow e Andersen, 2006

A interação com os VGSC não é o único mecanismo de ação desta classe de agrotóxicos. Alguns autores sugerem que os efeitos sobre o SNC dependem da inibição mediada por um antagonista do GABA, da modulação da transmissão colinérgica de receptores nicotínicos, aumento da descarga de noradrenalina ou ação sobre os canais de cálcio (WHO, 2005). Outros sítios de ação dos piretróides de ambas as classes incluem a inibição de  $\text{Na}^+$  /  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase e alterações da homeostase iônica de cálcio e sódio (Neal et al., 2010).

DeMicco et al.(2010) realizaram um estudo sobre os efeitos neurotóxicos de seis piretróides, três da classe I e três da classe II, sobre embriões de peixe-zebra (paulistinha). Neste trabalho, demonstraram que a exposição crônica a piretróides leva a deformidades crânio faciais, curvatura anormal do eixo do corpo e espasmos nos embriões além de ligeiro efeito teratogênico. Demonstraram ainda que os piretróides da classe II são potencialmente mais tóxicos que os da classe I.

Gassner et al.(1997) demonstram que em baixas concentrações, os piretróides permetrina e cialotrina inibem o complexo respiratório em mitocôndrias de fígado de ratos. Os distúrbios na cadeia respiratória mitocondrial podem levar a uma nova

explicação para alguns dos sintomas de intoxicação por piretróides relacionados a desordens neurológicas como, por exemplo, síndrome semelhante à Síndrome de Parkinson.

### II.2.5.3 Organofosforados e Carbamatos

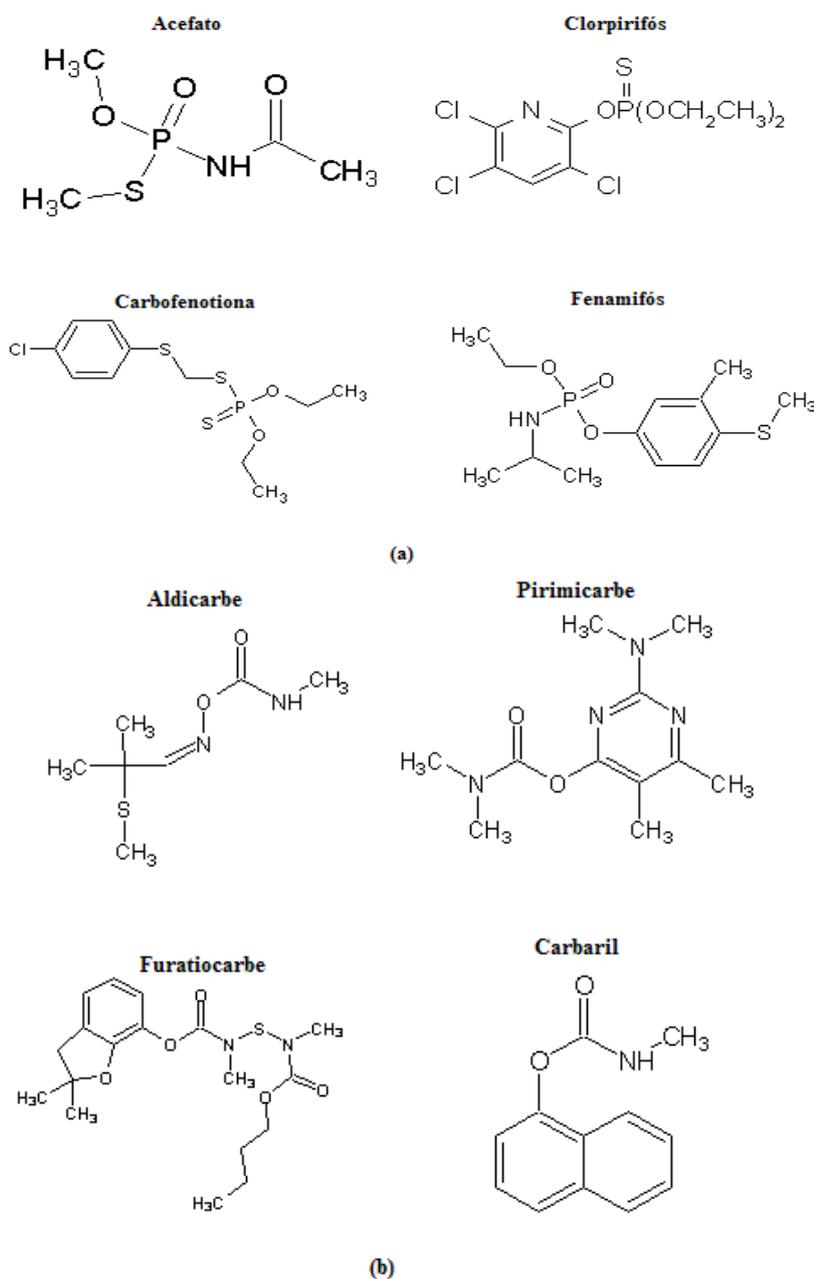
Organofosforados são compostos fosforados derivados do ácido fosfórico ou pirofosfórico; tiofosforados, derivados do ácido tionofosfórico ou ditionofosfórico; ou clorofosforados, quando possuem átomos de cloro em sua molécula. Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico ou do ácido N-metilcarbâmico.(Amaral, 1998; Heinzow e Andersen, 2006). A Figura 8 (a e b) apresenta alguns compostos representantes destas classes de agrotóxicos.

Ambas as classes são inibidores da colinesterase, ou agentes anticolinesterásicos. São capazes de inibir ou inativar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), uma das enzimas mais importantes e necessárias ao pleno funcionamento do sistema nervoso de humanos, de outros vertebrados e de insetos, resultando em um aumento da atividade da acetilcolina (Nelson et al., 2001;. Dell’Omo et al., 2003; Heinzow e Andersen, 2006).

O primeiro relato da síntese de um composto altamente potente da série dos anticolinesterásicos foi sobre a síntese do tetraetilpirofosfato (TEPP) em 1854. Durante a Segunda Guerra Mundial, foram desenvolvidos outros compostos extremamente tóxicos como o tabun e o sarin, estocados secretamente para serem utilizados em operações militares. Junto com outros gases, são conhecidos como gases neurotóxicos (Rosati et al., 1995).

Dentre os “praguicidas”, os organofosforados e carbamatos representam um número significativo (> 200) de princípios ativos quimicamente diferentes e encontram-se entre as principais causas de intoxicação aguda de humanos e animais, quer acidentalmente ou não (Xavier et al., 2007) sendo inclusive, usados em tentativas de suicídio (Cavaliere et al., 1996). As

principais razões para isto são: a alta toxicidade de alguns representantes desta classe de agrotóxicos, a facilidade de aquisição de produtos registrados para uso agrícola, veterinário ou doméstico contendo estas substâncias e a ineficiência da fiscalização da comercialização de agrotóxicos de uso proibido ou restrito (Xavier et al., 2007).



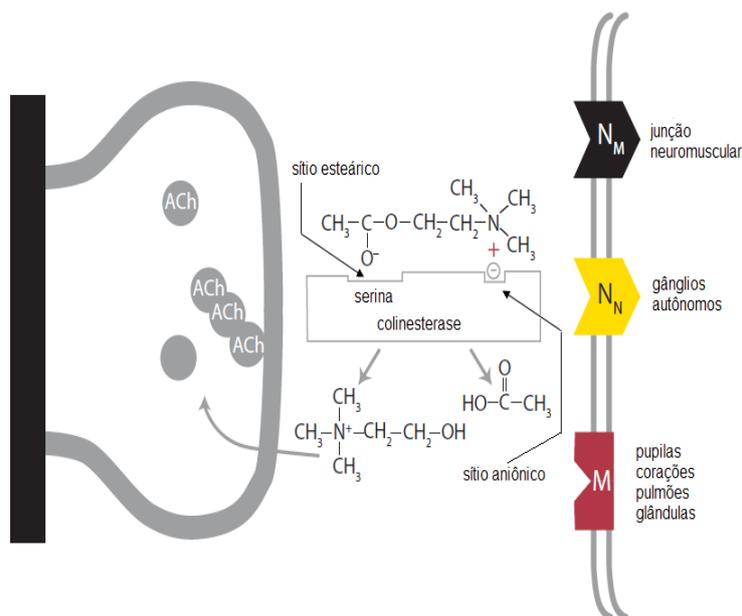
**Figura 8.** Agrotóxicos representantes das classes dos organofosforados (a) e carbamatos (b).

### II.2.5.3.1 Mecanismos de Ação

Interações toxicológicas de agrotóxicos organofosforados têm sido estudadas desde 1950. A maioria dos estudos envolve a administração de um “mix” destes compostos em animais experimentais com o objetivo de determinar se esta adição resulta em uma resposta aditiva, anatagonista ou sinergista do organismo. Do ponto de vista da toxicidade, a potenciação dos efeitos deve ser considerada como a interação mais grave resultante da combinação entre organofosforados (Cohen, 1984).

Os pesticidas organofosforados atuam inibindo as colinesterases, principalmente a AChE. Estas enzimas atuam hidrolizando o neurotransmissor acetil colina (ACh) e, se são inibidas, a acetilcolina se acumulará nas terminações sinápticas causando estimulação contínua e desordenada dos

receptores muscarínicos do sistema nervoso parassimpático, pela ACh. O excesso de ACh provoca, ainda, a estimulação e bloqueio dos receptores nicotínicos nos gânglios do sistema nervoso autônomo, dos músculos motores e do sistema nervoso central (Figura 9). Em mamíferos, estes efeitos caracterizam-se principalmente por lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios. Estes últimos são decorrentes de bronco constrição, aumento das secreções brônquicas e bradicardia, bem como de depressão do SNC, sendo as principais causas de morbidade e mortalidade por tais substâncias (Fukuto, 1990; Nelson et al., 2001; Dell’Omo et al., 2003; Moser et al., 2005; Heinzow e Andersen, 2006).



**Figura 9.** Esquema de ação inibitória dos agrotóxicos organofosforados e carbamatos sobre a colinesterase indicando os receptores afetados pelo acúmulo de ACh gerado pelo bloqueio da colinesterase. ( $\text{N}_M$  = receptores nicotínicos das junções neuromusculares;  $\text{N}_N$  = receptores nicotínicos dos gânglios;  $\text{M}$  = receptores muscarínicos).

Embora inseticidas anticolinesterásicos tenham um modo de ação comum (Nelson et al., 2001; Dell’Omo et al., 2003; Boxtel et al., 2010; Heinzow e Andersen, 2006) uma vez que não há diferença significativa entre os ésteres organofosforados e carbamatos, a reação entre os ésteres organofosforados e o sítio ativo na proteína AChE (um grupo hidroxil serina) resulta na formação de um complexo intermediário que hidrolisa parcialmente com a perda do grupo substituinte "Z", levando a uma enzima fosforilada inibida e altamente estável (Figura 10). Esta enzima, em circunstâncias normais, só poderá ser reativada de forma muito lenta. A natureza dos grupos substituintes em "X", "Y" e "Z" desempenha um importante papel na especificidade da enzima, na força de ligação ao sítio ativo, e na velocidade com a qual a enzima fosforilada dissocia-se para produzir a enzima livre. Ésteres organofosforados recentemente introduzidos no mercado - acefato, temefós, diclorvós, triclorfom - são inibidores da AChE menos potentes permitindo que a enzima fosforilada seja mais facilmente reativada (Nelson et al., 2001; Dell’Omo et al., 2003; Heinzow e Andersen, 2006).

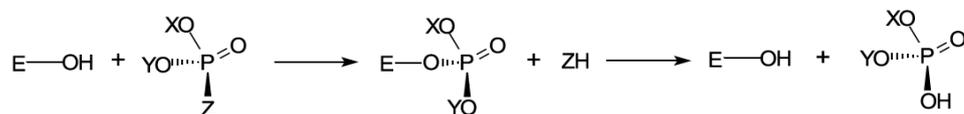
Em contraste, os ésteres do ácido carbâmico, que se ligam ao sítio ativo da enzima AChE, sofrem hidrólise em duas fases. A primeira é a remoção do

substituinte "X" (arila ou um grupo alquila) com a formação de uma enzima carbamilada. O segundo estágio é a decarbamilação da enzima inibida com a geração da enzima ativa (Figura 10). Ésteres de ácido carbâmico não são nada mais que substratos pobres para as enzimas do tipo colinesterase (Boxtel et al., 2010; Heinzow e Andersen, 2006).

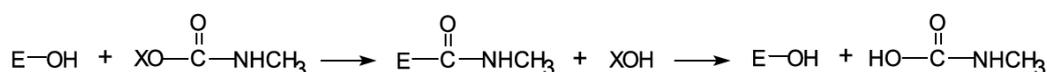
Estudos sobre exposição crônica a carbamatos relatam várias sequelas neurológicas de origem desconhecida e sugerem que outros mecanismos, distintos da inibição da AChE, estão envolvidos no mecanismo neurotóxico dos carbamatos. Chantal et al.(2004) demonstraram que além da inibição da AChE, vários carbamatos interagem com receptores nicóticos da acetilcolinesterase (nAChRs). Segundo os autores, os efeitos neurotóxicos parecem ser causados por competição e interação não-competitiva com os nAChRs.

Outros mecanismos têm sido propostos para explicar a ação dos organofosforados. Rahimi et al.(2007) sugerem que a hipérglicemia causada por intoxicação aguda por organofosforados envolve um mecanismo diferente na indução do metabolismo da glicose. Resultados obtidos pelos autores sugerem que o mesmo ocorre via stress oxidativo.

#### Éster organofosforado



#### Éster carbamato



**Figura 10.** Interação entre um éster organofosforado e um éster carbamato com o grupo hidroxil serina no sítio ativo da AChE (E-OH). A desfosforilação ou decarbamilação da enzima inibida é a etapa limitante da velocidade de reação da reativação da enzima. O intermediário de reação – complexo instável – formado antes da eliminação dos grupos “ZH” e “XOH” não é mostrado.

---

Pope (1999) demonstrou que alvos macromoleculares de alguns organofosforados podem alterar a cascata de eventos que se segue à fosforilação da AChE e, assim, modificar o mecanismo de ação destes compostos. Adicionalmente, outros alvos macromoleculares de alguns organofosforados parecem ser capazes de alterar processos colinérgicos neuroquímicos. Este trabalho poderá ser de grande valia na avaliação de diferenças quali e quantitativas da toxicidade observadas em níveis similares de inibição da AChE induzida por diferentes organofosforados.

### **II.3 Segurança Alimentar**

O conceito de Higiene e Segurança Alimentar veio à luz a partir da 2ª Grande Guerra com mais da metade da Europa devastada e sem condições de produzir o seu próprio alimento. Esse conceito leva em conta três aspectos principais: quantidade, qualidade e regularidade no acesso aos alimentos. No que diz respeito à qualidade dos alimentos consumidos, a população não pode estar submetida a qualquer tipo de risco por contaminação (resíduos de agrotóxicos, drogas veterinárias, elementos inorgânicos dentre outros), problemas de apodrecimento ou outros decorrentes de prazos de validade vencidos. O tema está intimamente relacionado com a saúde dos seres humanos, sua sobrevivência e desenvolvimento.

Os agrotóxicos merecem especial atenção sob o ponto de vista da Segurança Alimentar, devido à sua toxicidade e a grande diversidade de compostos quimicamente diferentes. A ampla utilização destes produtos, o desconhecimento dos riscos associados a sua utilização, o conseqüente desrespeito às normas básicas de segurança, a livre comercialização, a grande pressão comercial por parte das empresas distribuidoras e produtoras e os problemas

sociais encontrados no meio rural constituem importantes causas que levam ao agravamento dos quadros de contaminação humana, animal e ambiental observados no Brasil (Miranda et al., 2007).

No Brasil, o governo federal, através da Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006, criou o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN. Este tem como um de seus objetivos primordiais, garantir a qualidade dos alimentos oferecidos à população. Para tanto o SISAN constitui-se em uma entidade multisetorial integrado por um conjunto de órgãos e entidades da União, dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios e pelas instituições privadas.

Os alimentos são considerados a principal fonte de exposição dos seres humanos aos agrotóxicos (Picó et al., 2007). Um estudo realizado por Margni et al. (2002) acerca do impacto do uso de agrotóxicos na saúde humana e nos ecossistemas confirma este dado, pois conclui que a ingestão de alimentos é uma fonte toxicológica de exposição cerca de  $10^3$  a  $10^5$  vezes maior que a ingestão de água ou a inalação pelos seres humanos.

A presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos é uma questão importante que causa grande preocupação aos governos dos diferentes países e a diversas organizações internacionais. A Organização Mundial de Saúde – OMS coloca a segurança alimentar no topo da agenda global de higiene público. Nesta, resíduos de agrotóxicos e drogas veterinárias nos alimentos representam riscos potenciais para a Segurança Alimentar (Pang et al., 2006).

Para efeitos de garantir a inoquidade dos alimentos, a Food and Agriculture Organization (FAO)/OMS Alimentarius/Codex Comissão (CAC), estabelece Limites Máximos de Resíduos (LMR) para mais de 170 agrotóxicos e

---

medicamentos veterinários em mais de 300 variedades de produtos agrícolas e alimentos. Os Estados Unidos, Canadá, Alemanha e outros países da União Europeia (UE), bem como organizações internacionais regionais promulgaram seus próprios LMRs para resíduos de agrotóxicos para vários tipos de produtos agrícolas e alimentos com base nas características internas de cada país ou região (EC, 2008; *Codex Alimentarius*, 2011; EC, 2011).

A forte expansão das exportações do agronegócio na última década tem sido um dos aspectos mais destacados da agropecuária brasileira. A partir dos anos 90, com a expansão da globalização e abertura de novos mercados, ocorreu um rápido incremento do fluxo comercial e aumento do consumo. O consumidor tornou-se mais exigente e seletivo e os mercados, dado o aumento da oferta mundial, entraram em período de grande concorrência. Com a formação dos grandes blocos econômicos (União Europeia, NAFTA, MERCOSUL, e outros), o maior desafio das autoridades do nosso país na área tem sido o de adaptar o sistema de defesa agropecuária ao ambiente comercial do mercado globalizado, ao qual está inserido. Todos os países que se destacam no comércio internacional de produtos do agronegócio dispõem de tecnologias avançadas e de um eficiente sistema de defesa agropecuária. Esses sistemas destinam-se a proteger o seu mercado consumidor, sem perda de qualidade ou produtividade, garantindo a conformidade e a inocuidade dos alimentos, evitando assim, riscos à saúde pública e ao meio ambiente.

Neste contexto, a segurança alimentar é um tema estratégico envolvendo não só o aspecto de saúde pública no mercado interno onde tem levado os consumidores a alterarem seus hábitos de consumo (Landgraf et al., 2010), mas também, e cada vez mais, o aspecto de competitividade do

País no mercado externo. A integração comercial em escala global está sendo acompanhada de uma progressiva redução das barreiras tarifárias. Por outro lado, também ocorre uma elevação das barreiras não-tarifárias, particularmente barreiras técnicas ao comércio. As economias mais fortes tendem a tornarem-se cada vez mais restritivas e, apesar do acordo da Organização Mundial do Comércio - OMC, tendem a utilizar esses mecanismos como forma de proteger seus mercados.

As nações parceiras comerciais do Brasil vêm se tornando cada vez mais restritivas em relação à presença de resíduos destas substâncias nos alimentos. Assim sendo, é indispensável ao Brasil, para garantir a qualidade do leite produzido no país e a seguridade dos consumidores internos e externos, desenvolver programas eficientes de vigilância quanto à presença de resíduos de agrotóxicos neste e em outros alimentos.

## **II.4 Resíduos de Agrotóxicos em Leite**

Atualmente, a utilização de agrotóxicos em alguma etapa da produção animal é fato indiscutível. Entretanto, o uso inadequado dessas substâncias, seja pela não observância aos prazos de carência após a aplicação, às dosagens corretas e à via de administração recomendada, ou ainda pela terapia indiscriminada e uso de substâncias proibidas, pode deixar resíduos em produtos alimentícios de origem animal, colocando em risco a saúde humana.

Ração e forragem oferecidas aos animais são frequentemente contaminadas com resíduos de agrotóxicos e após a alimentação, estes resíduos são assimilados pelo organismo dos animais (Prasad e Chhabra, 2001).

Agrotóxicos com alta solubilidade em lipídios tendem a se concentrar no leite e em tecidos com maior teor de gordura, tais como tecido adiposo, cérebro, fígado e rim.

---

A ocorrência de resíduos de agrotóxicos em leite de ruminantes é motivo de preocupação de saúde pública, uma vez que leite e produtos lácteos são amplamente consumidos por crianças, adolescentes e adultos em todo o mundo. Em vista disso, muitos países têm legislação que limita o nível de resíduos de agrotóxicos neste alimento e derivados (Prasad e Chhabra, 2001).

Diversos trabalhos relatam a pesquisa de resíduos de agrotóxicos em leite. Pagliuca et al.(2006) avaliaram amostras de leite oriundas de quatro laticínios italianos quanto a presença de organofosforados. Das 135 amostras analisadas, 37 foram positivas em traços e 10 mostraram uma contaminação por organofosforados variando 5-18 mg.L<sup>-1</sup>. Todavia, em todas as amostras positivas, a contaminação por organofosforados foi inferior ao limite máximo de resíduos - LMR estabelecido pela Comissão Europeia.

Na Índia, Sharma et al.(2007), coletaram 147 amostras de leite em 14 distritos de Haryana, e as analisaram quanto a presença de resíduos de organoclorados. Oito por cento das amostras excederam o LMR de 0,10 mg.L<sup>-1</sup>, recomendado pela OMS, para HCH, e 24% das amostras excederam o LMR de 0,05 mg.L<sup>-1</sup> para DDT.

Na Espanha, Mezcuca et al.(2007) analisaram 25 amostras de leite em pó nas quais foram detectados resíduos de endossulfam I e II, fenitrotiona, clorpirifós etil e bifentrina em níveis de concentração na faixa de 0,03 a 5,03 µg.L<sup>-1</sup>.

Ainda na Espanha, Melgar et al.(2010) pesquisaram a presença de resíduos de organofosforados empregados no controle de ectoparasitas em gado ou na ração para animais, em 312 amostras assim distribuídas: 70 amostras de alimentos infantis à base de leite e 242 de leite “*in natura*”. Foram detectados resíduos de

organofosforados em 8,67 % das amostras de leite “*in natura*” principalmente diclorvós, parationa metilica e coumafós. Nas amostras de alimentos infantis não foram detectados resíduos dos agrotóxicos estudados.

Tian (2010) desenvolveu e aplicou um método para pesquisa de 29 agrotóxicos em leite. O método foi aplicado a 100 amostras de leite “*in natura*” nas quais foram detectados resíduos de fipronil (n = 3), diflufenican (n = 2), hexaflumuro (n = 2), teflubenzuro (n = 5) e piperofós (n = 1).

Na África do Sul, Sereda et al.(2009), investigaram a presença de resíduos de agrotóxicos em 10 amostras de leite de vaca. Em praticamente todas foram encontrados resíduos de DDT e, em seis amostras foi detectada a presença de resíduos de permetrina.

Nero et al.(2004) pesquisaram a presença de resíduos de agrotóxicos organofosforados e carbamatos em leite “*in natura*” oriundo de 210 propriedades rurais em quatro regiões leiteiras do Brasil (Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul). Agrotóxicos foram observados em 74,4% das amostras através da técnica de cromatografia em camada delgada.

Outro estudo realizado no Brasil, também por Nero et al.(2007), analisou 209 amostras de leite “*in natura*” nas mesmas quatro regiões produtoras, empregando a mesma técnica. Os resultados obtidos mostraram que 93,8% das amostras apresentavam resíduos de organofosforados e/ou carbamatos. Segundo os autores, embora a concentração dos resíduos nas amostras não tenha sido determinada, a sensibilidade da técnica sugere níveis elevados.

### **II.4.1 Legislação e Limites Máximos de Resíduos (LMRs)**

Atualmente, está havendo, por parte dos países produtores, uma adequação às exigências das organizações internacionais no que concerne a qualidade e a segurança dos produtos agropecuários. Órgãos governamentais competentes têm atualizado sua legislação e implementado seus mecanismos de controle específico, através do estabelecimento de LMRs para resíduos de agrotóxicos em leite e outros alimentos, até transformando-os em barreiras não tarifárias.

Em nível mundial, o *Codex Alimentarius*, organismo vinculado à FAO/WHO, estabelece os limites máximos de resíduos de agrotóxicos em leite (*Codex Alimentarius*, 2011). O governo brasileiro realiza o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em leite, no âmbito dos produtores e laticínios, através do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC – desenvolvido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Cabe à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, órgão do Ministério da Saúde, a fiscalização do produto final nos pontos de venda direta ao consumidor. O PNCRC (Brasil, 2010) para produtos de origem animal estabelece os LMRs e os agrotóxicos a serem monitorados em leite (Tabela 8)

A análise da Tabela 8 nos revela que o número de agrotóxicos para os quais há LMR estabelecido no Brasil, é muito reduzido face a gama de compostos distintos disponíveis no mercado. A União Européia desenvolve uns dos melhores, senão o melhor, programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em leite do mundo. Na Comunidade Européia, são legislados 393 LMRs para resíduos de agrotóxicos em leite, número muito significativo se comparado àqueles

definidos pelo *Codex Alimentarius* e Brasil (EC, 2011).

### **II.5 Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Leite**

A análise de resíduos de agrotóxicos em leite desempenha um papel importante para a estimativa da exposição dos seres humanos e do meio ambiente aos agrotóxicos, bem como para checar o comportamento dos produtores rurais quanto a conformidade com as Boas Práticas Agrícolas - BPA, facilitando as decisões regulatórias e comerciais, e ainda fortalecendo a confiança do consumidor com relação a segurança alimentar.

Nas análises de resíduos de agrotóxicos em leite, as concentrações do analito são geralmente muito baixas e a matriz muito complexa, para serem realizadas sem uma etapa prévia de preparo da amostra. Devido ao fato de que as medidas são normalmente efetuadas em baixos níveis de concentração, as interferências são problemas frequentes que devem ser considerados. O objetivo principal do preparo da amostra é, portanto, promover o fracionamento e o enriquecimento da mesma, com todos os analitos de interesse, e os deixando o mais livre possível das interferências provenientes dos componentes da matriz, que certamente estarão no extrato.

É importante lembrar que, qualquer perda de analito que venha a ocorrer nessa etapa não pode ser compensada por nenhuma das etapas subsequentes. Assim sendo, o preparo da amostra é uma etapa crucial dentro de todo o processo analítico<sup>1</sup>.

As maiores limitações dos procedimentos analíticos mais comumente utilizados, que são a extração líquido-líquido (LLE, do inglês “*liquid-liquid extraction*”) e a extração sólido-líquido (SLE, do inglês “*solid-liquid extraction*”), são que, além de exigirem muito trabalho, são demorados,

onerosos em termos de materiais e volumes de solventes e muitas vezes não podem ser concluídos antes que os produtos sejam colocados no mercado (Cacho et al., 2003). Para um método ser de aplicação viável, é necessário considerar os custos das análises, incluindo reagentes, equipamento, mão de obra e restrições ambientais (Obana et al., 1999). Em análises de rotina, um processamento rápido de numerosas amostras é desejado. Para isto, é necessário o desenvolvimento de métodos eficientes, rápidos e ambientalmente corretos.

**Tabela 6.** Compilação dos limites máximos de resíduos de agrotóxicos em leite estabelecidos pelo PNCR-2010. (Brasil, 2010)

| Grupo                   | Agrotóxico        | LMR<br>(mg.kg <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|-------------------|-------------------------------|
| <b>Organoclorados</b>   | Aldrin            | 0,006                         |
|                         | Alfa-HCH          | 0,004                         |
|                         | Lindano           | 0,01                          |
|                         | Dieldrin          | 0,006                         |
|                         | Endrin            | 0,002                         |
|                         | Heptacloro        | 0,004                         |
|                         | DDT e metabólitos | 0,04                          |
|                         | Clordano          | 0,002                         |
|                         | Mirex             | 0,002                         |
|                         | Metoxicloro       | 0,01                          |
| <b>Antiparasitários</b> | Abamectina        | 0,01                          |
| <b>Carbamatos</b>       | Carbaril          | 0,02                          |
|                         | Carbofurano       | 0,10                          |
|                         | Metomil           | 0,02                          |
|                         | Propoxur          | 0,05                          |
|                         | Aldicarbe         | 0,01                          |
|                         | Oxamil            | 0,05                          |
| <b>Organofosforados</b> | Metiocarbe        | 0,05                          |
|                         | Clorpirifós etil  | 0,01                          |
|                         | Clorpirifós metil | 0,01                          |
|                         | Diazinona         | 0,01                          |
|                         | Metamidofós       | 0,01                          |
|                         | Mevinfós          | 0,05                          |
|                         | Acefato           | 0,02                          |
|                         | Pirimifós metil   | 0,05                          |
|                         | Parationa         | 0,02                          |
|                         | Primifós etil     | 0,02                          |
|                         | Metidationa       | 0,02                          |
|                         | Azinfós metil     | 0,05                          |
|                         | Azinfós etil      | 0,05                          |

As análises de resíduos de agrotóxicos envolvem duas etapas:

1) a extração dos analitos de interesse da matriz, que pode ou não ser acompanhada por uma etapa posterior de purificação, dependendo das características da matriz e do tipo de extração utilizada;

2) a determinação qualitativa e quantitativa, que frequentemente é realizada empregando técnicas cromatográficas. Usualmente, cromatografia gasosa (GC, do inglês “*gas chromatography*”) com diferentes detectores e cromatografia líquida (LC, do inglês “*liquid chromatography*”) acoplada a detectores UV-Vis ou fluorescência. Modernamente empregam-se técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (MS, do inglês “*mass spectrometry*”), GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS e LC-MS/MS.

### II.5.1 Métodos de extração

LeDoux (2011) realizou uma revisão sobre os métodos empregados na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem animal nas duas últimas décadas. Neste trabalho, o autor observou que a LLE ainda é a metodologia preferida pela maioria dos autores para análise de resíduos de agrotóxicos em leite.

Este procedimento consiste na agitação das amostras diversas vezes em solventes orgânicos selecionados para a extração dos resíduos da matriz. Vários protocolos de LLE foram normalizados para aplicação a resíduos de organoclorados, organofosforados em leite e derivados (LeDoux, 2011).

Atualmente, os métodos multirresíduos mais comumente utilizados para as análises de agrotóxicos envolvem uma extração inicial com acetona, acetonitrila, ou acetato de etila, a partir da qual os analitos de interesse são transferidos para uma camada orgânica, deixando na fase aquosa os co-extrativos indesejáveis e alguns pesticidas altamente polares (Anastassiades et al.,

---

2003; Mol et al., 2003; LeDoux, 2011; Mol et al., 2008; Goulart et al., 2008).

A extração de resíduos de agrotóxicos com fluido supercrítico (*super critic fluid extraction* - SFE) foi testada em carnes (LeDoux, 2011). SFE geralmente é um método de extração eficiente, aplicável, principalmente, a amostras sólidas. Todavia, embora apresente inúmeras vantagens (eficácia, seletividade, curtos tempos de extração, baixos volumes de solventes), apresenta diversos inconvenientes (otimização difícil, aparelhos de alto custo de manutenção, altos níveis de interferentes).

Extração em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE) e dispersão da matriz em fase sólida, (*matrix solid phase dispersion* - MSPD) foram técnicas, recentemente, introduzidas como métodos alternativos para o preparo de amostras destinadas a análise de resíduos de agrotóxicos. Estes métodos miniaturizados têm como característica a redução do uso de solventes (Anastassiades et al., 2003; Lehotay et al., 2005; LeDoux, 2011).

Outra técnica bastante difundida é a microextração em fase sólida (*solid phase micro-extraction* - SPME), esta também consome um pequeno volume de solventes, porém, a extração e concentração dos analitos é realizada em uma única etapa. SPME têm sido aplicada com bastante sucesso na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, água e solo, outra característica desta técnica é o ganho de sensibilidade, uma vez que a fração extraída (na fibra) pode ser introduzida quantitativamente dentro do cromatógrafo a gás através de desorção térmica (LeDoux, 2011).

Hernandez e colaboradores (2006) desenvolveram um método que emprega extração sortiva com barra magnética (*stir*

*bar sorptive extraction* - SBSE). O mecanismo desta extração é similar ao da SPME, porém apresenta um fator de pré-concentração em torno de 100 vezes maior, dependendo da quantidade de adsorvente, polidimetilsiloxano (PDMS), utilizado. Esta nova metodologia permite que baixos limites de detecção sejam atingidos, especialmente para analitos hidrofóbicos.

### **II.5.2 Métodos de “clean-up”**

Interferentes da matriz podem ser co-extraídos e posteriormente co-eluídos com os componentes analisados podendo, conseqüentemente, interferir com a identificação e quantificação do analito. Além disso, compostos co-extraídos, principalmente lipídios, tendem a se fixar nos sistemas de GC obstruindo o injetor ou interagindo fortemente com a coluna, resultando em baixo desempenho do sistema cromatográfico (Anastassiades et al., 2003; Hong et al., 2004; Lehotay et al., 2005).

O *clean-up* eficiente do extrato minimiza a presença de interferentes melhorando a sensibilidade e permitindo que resultados mais consistentes e reprodutíveis sejam alcançados. Várias abordagens têm sido testadas para eliminar interferentes co-extraídos, como o congelamento, centrifugação, partição líquido-líquido, cromatografia de permeação em gel (*gel permeation chromatography* - GPC), SPE e SPME (Stajnbaher, 2008; Schenck et al., 2008; LeDoux, 2011).

#### **II.5.2.1 Método de Luke**

Luke et al. (1975) desenvolveram o chamado e bem conhecido “Método de Luke”, cuja versão original está representada de forma esquemática na Figura 11. O objetivo dos autores foi obter um método capaz de quantificar quase todos os agrotóxicos polares e apolares.

Atualmente, a versão mais utilizada desse método, consiste na análise de 15 g de frutas ou vegetais já processados, adicionando-se 30 mL de acetona e agitação em homogeneizador por cerca de 30 s, sendo posteriormente adicionados 15 g de sulfato de sódio anidro, 30 mL de éter de

petróleo e 30 mL de diclorometano, agitando-se novamente em homogeneizador por cerca de 1 minuto. Finalmente, o extrato é centrifugado e a parte líquida é transferida para erlenmeyer com tampa (Netherlands, 1996).

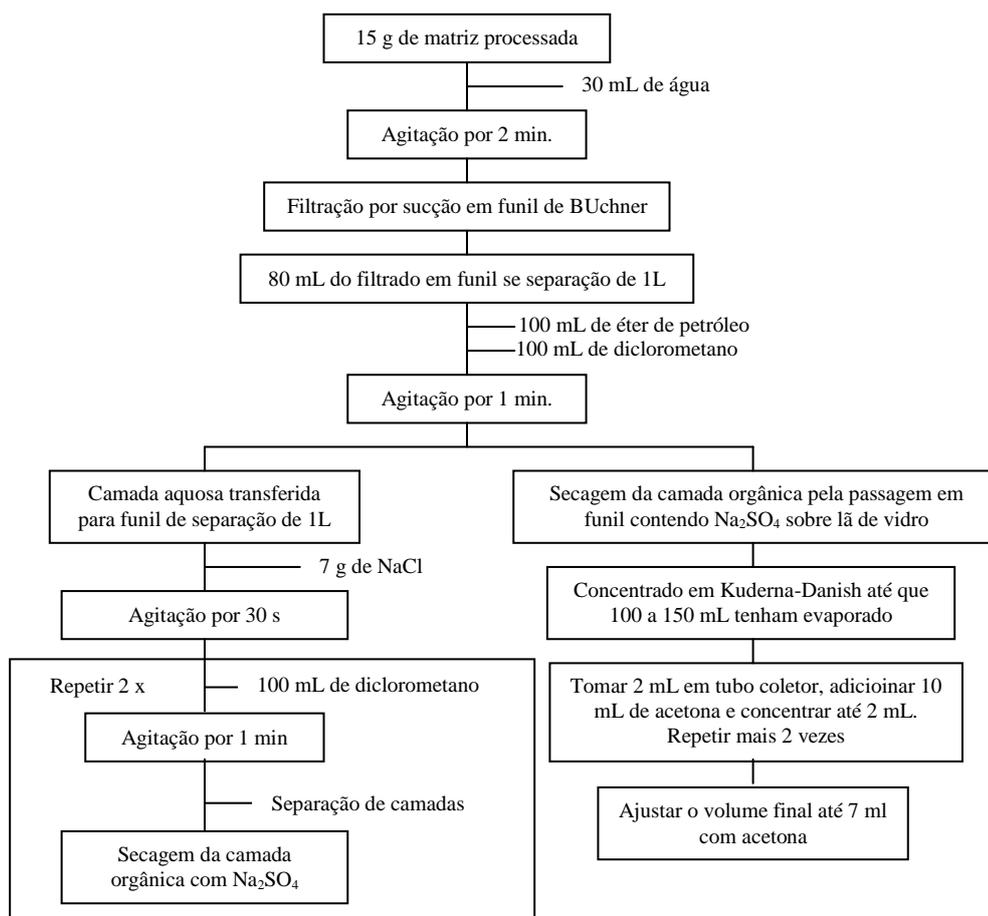


Figura 11. Diagrama esquemático do método de Luke.

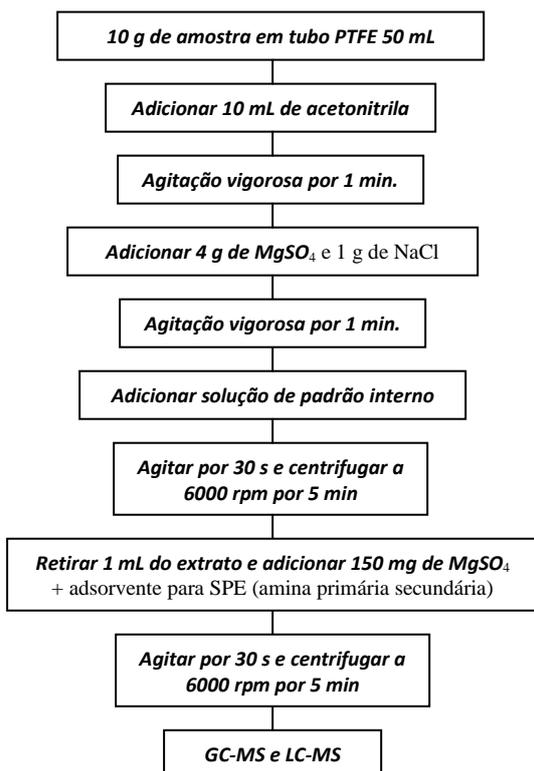
### II.5.2.2 Método QuEChERS

Anastassiades et al.(2003) desenvolveram um método multirresíduos, que utiliza as vantagens e possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna, este método foi denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), que foi desenvolvido para gerar extratos que são diretamente aplicáveis tanto para as análises por GC quanto por

LC. Durante o desenvolvimento desse método, grande ênfase foi colocada para a obtenção de um procedimento moderno e dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido a simplificação ou corte de etapas lentas, trabalhosas e impraticáveis.

O método envolve uma extração inicial com acetonitrila, seguido por uma etapa de partição líquido-líquido após adição da mistura de  $MgSO_4$  e  $NaCl$ , os quais

facilitam a remoção de uma quantidade significativa de componentes polares da matriz, e finalmente, uma etapa simples de purificação, onde o extrato é misturado com uma quantidade de sorvente (SPE) (Anastassiades et al., 2003). Esse método está descrito de forma esquemática na Figura 12.



**Figura 12.** Esquema da sequência do método QuEChERS (Anastassiades et al., 2003).

As vantagens desse método incluem a rapidez (preparo de oito amostras em cerca de 30 min), simplicidade, confiabilidade, robustez (poucas e simples etapas), baixo custo, baixo consumo de solventes (somente 10 mL de acetonitrila), praticamente não necessita de vidrarias e cobre um amplo espectro de pesticidas extraídos (incluindo pesticidas com caráter ácido, básico e aqueles muito polares).

Modificações do método original Quechers já foram recentemente realizadas (Lehotay et al., 2005).

## II.6 Separação e Determinação de Resíduos de Agrotóxicos

Em muitos casos, a GC tem sido a técnica selecionada para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (Anastassiades et al., 2003; Hirahara et al., 2005). Entretanto, nos últimos anos com o advento de agrotóxicos mais polares, os quais apresentam menor persistência e toxicidade ao meio ambiente, quando comparados aos apolares, a GC não é capaz de analisar um grande número destes compostos devido a sua alta polaridade. Isto implica no uso de técnicas alternativas. A LC acoplada à espectrometria de massas em série LC-MS/MS é a melhor escolha para estes tipos de compostos, que geralmente apresentam volatilidade baixa ou instabilidade térmica (LeDoux, 2011).

Desde que no desenvolvimento do presente estudo fez-se uso exclusivo da técnica LC-MS/MS a GC e GC-MS serão abordadas brevemente. A técnica de LC e LC acoplada à espectrometria será abordada em mais detalhadamente.

### II.6.1 Cromatografia

Cromatografia é um método de separação físico no qual os componentes a serem separados são seletivamente distribuídos entre duas fases imiscíveis: a fase móvel que flui através de um leito – a fase estacionária. A técnica leva o nome da fase móvel: cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC), ou cromatografia por fluido supercrítico (*super critical fluid chromatography* - SFC). O processo de cromatografia ocorre como resultado de várias etapas de sorção/dessorção que ocorrem durante o movimento dos analitos ao longo da fase estacionária. A separação deve-se às

---

diferenças nos coeficientes de distribuição dos analitos presente na amostra entre as fases móvel e estacionária (Niessen, 2006).

Os três principais problemas que surgem no desenvolvimento de um método que emprega a técnica LC são: (Niessen, 2006):

- a incompatibilidade entre o fluxo de fase móvel e a velocidade de injeção do efluente líquido da coluna no alto vácuo do espectrômetro de massas.
- a incompatibilidade com relação à composição da fase móvel frente à fase estacionária, como resultado do uso freqüente de aditivos não-voláteis à fase móvel para auxiliar a separação cromatográfica.
- a ionização de analitos voláteis e/ou termicamente lábeis em razão da temperatura na qual os experimentos são conduzidos.

A separação cromatográfica ocorre se os componentes de uma mistura interagem em diferentes graus com as fases móvel e/ou estacionária e, portanto, demandam diferentes tempos para percorrer o caminho entre o ponto onde ocorre a introdução da amostra até o ponto em que são detectados. Há, em relação a estas interações, dois extremos:

(I) todos os analitos têm afinidade com a fase móvel e não interagem com a fase estacionária – movendo-se com a mesma velocidade da fase móvel, chegam ao detector muito rapidamente e não são separados.

(II) todos os analitos têm afinidade com a fase estacionária e não interagem com a fase móvel - todos os analitos são retidos na coluna e não atingem o detector.

Para se obter a máxima eficiência na separação dos componentes de uma mistura, estes extremos devem ser evitados

ou, se não for possível, minimizados. São os diferentes graus de interação dos diferentes analitos que constituem a amostra com as fases móvel e estacionária, que determinarão se os analitos vão ou não ser separados por um sistema de LC particular. É suficiente dizer aqui que a interação pode ser considerada em termos da polaridade relativa das espécies envolvidas.

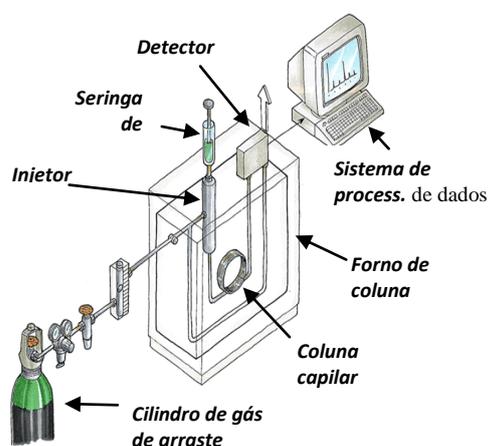
Pouco se pode fazer em relação à fase estacionária, pois estas são adquiridas em colunas previamente empacotadas impossibilitando o acesso do pesquisador a seu conteúdo. Resta então, a fase móvel a ser trabalhada. Fases móveis isocráticas (contendo um único solvente ou uma mistura de solventes de composição fixa), nem sempre permitem obter separação adequada dos componentes de uma amostra. A fase móvel que dá a separação adequada para analitos altamente polares levará a tempos de retenção excessivamente longos para os analitos não-polares, e vice-versa. Uma alternativa muito eficiente é o uso de fases móveis em gradiente, nas quais a composição da fase móvel é variada de uma forma controlada, durante a análise. Este tipo de fase móvel leva, em geral, a melhores resultados.

### ***II.6.1.1 Cromatografia gasosa***

A cromatografia gasosa constitui-se em uma técnica de separação na qual os componentes de uma mistura são seletivamente distribuídos entre a fase móvel, um gás inerte, e uma fase estacionária, que está presente como revestimento interno de uma coluna capilar. Sendo um método de separação em fase gasosa, GC exige que os analitos sejam volatilizados antes de sua introdução na coluna. Como tal, a aplicação da GC é limitada a compostos com volatilidade suficiente e estabilidade térmica (Niessen, 2001).

### II.6.1.1.1 Instrumental, aspectos

A instrumentação para GC (Figura 13) é constituída por uma unidade de controle de gás (geralmente hidrogênio, hélio ou nitrogênio) que constitui a fase móvel, injetor, uma coluna capilar – a fase estacionária - alojada no forno de coluna, detector ou interface para um espectrômetro de massas. Tipicamente, as colunas empregadas em cromatografia gasosa apresentam diâmetro interno de 0,25-0,50 mm e comprimento que variam entre 20 e 30 m (Niessen, 2001).



**Figura 13.** Diagrama de um sistema de cromatografia gasosa.

Fonte: <http://hiq.linde-gas.com.br/international/web/ig/br/like351gspgbr.nsf>

Na GC, são utilizados diferentes sistemas de detecção, tais como: (Demoliner et al., 2010).

- Detector por captura de elétrons (*electron capture detection* - ECD) empregado geralmente para detecção de organoclorados e piretróides;
- Detector de nitrogênio e fósforo (*phosphorus filter and nitrogen-*

*phosphorus detection* - NPD), na detecção de organofosforados.

- Detector de ionização de chama (*flame ionization detection* - FID);
- Detector fotométrico de chama (*flame photometric detection* - FPD) para detecção de organofosforados.

### II.6.1.2 Cromatografia líquida

Inventada a mais de um século, a Cromatografia Líquida aplica-se à análise de uma enorme gama de compostos, principalmente, compostos polares e/ou não-voláteis e/ou termicamente estáveis para os quais as condições de operação da GC não são adequadas, que constituem cerca 80% dos compostos sintéticos e naturais. No caso da análise de agrotóxicos, citam-se, principalmente carbamatos e triazinas, e seus metabolitos e produtos de degradação (Niessen, 2006; LeDoux, 2011).

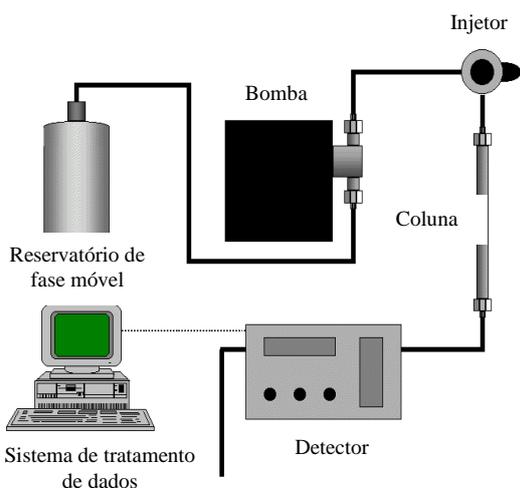
Com inúmeras aplicações em vários campos da ciência e da análise química, é usada para a análise de uma enorme faixa de compostos orgânicos, desde pequenas moléculas como metabolitos e peptídeos, até moléculas grandes como as biomoléculas, por exemplo, as proteínas (Niessen, 2006).

#### II.6.1.2.1 Instrumentação para cromatografia líquida

Na LC, a amostra é injetada por meio de uma porta de injeção na fase móvel que é transportada através da coluna – fase estacionária – por meio de um sistema de bombas de alta pressão, onde a separação ocorre. A separação é monitorada com um detector de fluxo contínuo (Figura 14). (Niessen, 2006)

A coluna cromatográfica é elemento fundamental na análise multirresíduos. A

correta escolha da coluna leva a condições ótimas de separação, minimizando esforços no desenvolvimento de fases móveis adequadas. As características da fase estacionária da coluna, se de fase normal ou reversa, devem ser consideradas em relação às características físico-químicas dos analitos a serem cromatografados.



**Figura 14.** Diagrama esquemático de um sistema de cromatografia líquida.

Fonte: <http://pfarma.com.br/farmacutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-.html>.

Várias fases estacionárias foram testadas para a separação de pesticidas, mas geralmente as fases reversas - octadecil (C18) ligado à superfície da sílica são as preferidas. Colunas com octil (C8)-ligado também têm sido empregadas para separar carbamatos extraídos de carnes bovinas e de aves. Segundo LeDoux (2011), alguns dos detectores mais comumente empregado na LC para identificar e quantificar resíduos de agrotóxicos são; detectores de fluorescência, UV-Vis e detecção com arranjo de diodos (*diode-array detector* - DAD).

A maioria dos métodos que utilizam a cromatografia líquida acoplada à

espectrometria de massas emprega coluna de fase reversa. As colunas mais amplamente empregadas contêm como fase estacionária sílica quimicamente modificada, estas modificações determinam a polaridade da coluna. A fase estacionária mais popular é aquela que emprega grupos C<sub>18</sub>-alquil ligados à superfície da sílica (octadecil silano). Outra fase estacionária bastante utilizada é a octil silano, com grupos C<sub>8</sub>-alquil ligados à superfície da sílica (Ardrey, 2003). As colunas avaliadas neste trabalho são preenchidas com a fase estacionária C<sub>18</sub>.

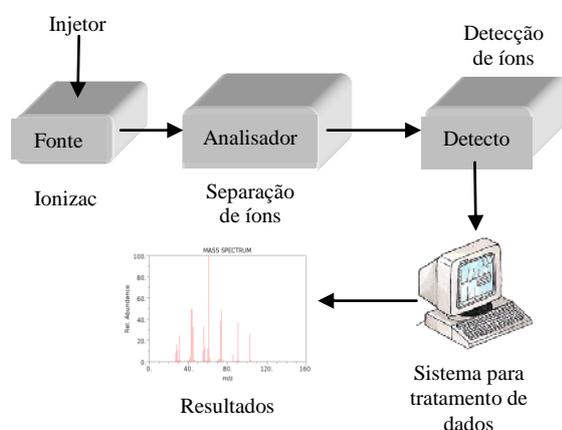
A eficiência da separação está relacionada ao tamanho das partículas do material que constitui a fase estacionária. Tipicamente em cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* - HPLC) as colunas empregadas têm as seguintes dimensões 100 a 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno recheadas com partículas de diâmetros entre 3 e 5  $\mu\text{m}$ . Estas colunas são capazes de trabalhar em pressões de até 40 MPa (6000 psi) com fluxos entre 1 a 10 ml/min. O volume de amostra injetado varia de 10 a 20  $\mu\text{l}$  (Niessen, 2006).

Maldaner e Jardim (2009) realizaram uma revisão sobre LC na qual apresentam o recente uso de partículas menores que 2  $\mu\text{m}$  no enchimento de colunas cromatográficas. Isto tem diminuído bastante o tempo de análise, porém, o máximo desempenho cromatográfico tem sido limitado pela pressão. Para contornar o obstáculo da pressão e fazer uso de partículas menores que 2  $\mu\text{m}$ , com o máximo de desempenho, tornando as análises até 20 vezes mais rápidas, foram desenvolvidos sistemas de bombeamento e colunas capazes de trabalhar em altas pressões, 100 MP (15000 psi). Estes, foram denominados cromatografia líquida de ultra eficiência (*ultra performance liquid chromatography* - UPLC).

## II.6.2 Espectrometria de massas - MS

Sensibilidade inigualável, limites de detecção cada vez mais baixos, velocidade e diversidade de aplicações, são algumas das características que levaram a espectrometria de massas a uma posição de destaque entre os métodos analíticos. Entre as inúmeras aplicações da técnica podemos citar: na bioquímica, aplicada em estudos de metabolômica; em controle de poluição ambiental; na garantia da qualidade e segurança dos alimentos; na ciência forense e na química de produtos naturais e muitas outras. Fornecendo informações valiosas para profissionais de diversas áreas: químicos, biólogos, farmacêuticos, físicos, astrônomos, etc (de Hoffmann, 2007; Ekman et al., 2009).

A Figura 15 apresenta representação esquemática de um espectrômetro de massas.



**Figura 15.** Representação esquemática de um espectrômetro de massas, com todas as partes constituintes.

### II.6.2.1 Fontes de ionização

Na espectrometria de massas, átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados na fonte, e a razão massa-carga ( $m/z$ ) de cada

íon é determinada pelo analisador. Os íons atingem o detector gerando sinais elétricos que são registrados na forma de um espectro de massas. A partir do valor de  $m/z$  de um íon consegue-se estimar ou obter o valor exato da massa nominal da molécula correspondente. Quase todas as substâncias podem ser analisadas por MS, já que existem diversos tipos de fontes de ionização, analisadores de massas e detectores (de Hoffmann, 2007; Ekman et al., 2009).

As técnicas de ionização mais comumente usadas pelos analistas de alimentos em espectrometria de massas são a ionização por elétrons (*electronic impact* - EI) e a ionização química (*chemical ionization* - CI) aplicadas principalmente em combinação com a cromatografia gasosa, GC-MS e GS-MS/MS. E as técnicas de ionização por eletrospray (*eletrospray ionization* - ESI), ionização a pressão atmosférica (*atmospheric pressure ionization* - API), fotoionização a pressão atmosférica (*atmospheric pressure photoionization* - APPI), comumente empregadas em combinação com a LC (de Hoffmann, 2007; Ekman et al., 2009). Há ainda diversas outras formas de ionização de uso específico e praticamente restritas à pesquisa.

Neste estudo, empregou-se exclusivamente a ionização ESI, informações mais detalhadas sobre esta técnica são a seguir apresentadas.

#### II.6.2.1.1 Fonte de ionização *electrospray*

O *electrospray* foi primeiramente sugerido por Dole em 1968, quando este estudava a determinação de espécies poliméricas não ionizadas em solução como o poliestireno. Porém, só em 1984, Yamashita e Fenn demonstraram a aplicabilidade do *electrospray* como uma fonte branda de ionização (de Hoffmann, 2007; Ekman et

al., 2009). Essa nova concepção possibilitou que moléculas e macromoléculas orgânicas fossem determinadas sem que houvesse perda de informação estrutural, em razão da fragmentação total ou parcial das moléculas permitindo também a determinação direta de biomoléculas polares e termoláveis sem a etapa de derivatização.

A ionização *electrospray* é considerada uma técnica de ionização branda, pois os íons gerados possuem, normalmente, baixa quantidade de energia interna. Conseqüentemente, nos espectros de massas, pouca ou nenhuma fragmentação pode ser usualmente observada. Neste tipo de ionização, a solução contendo a amostra é submetida a um *spray* eletrolítico sob pressão atmosférica que se forma na presença de um alto campo elétrico (4000V). Formam-se então, gotas com excesso de carga (positiva ou negativa). A evaporação do solvente, devido à ação do gás nebulizador, diminui o tamanho destas gotas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas. A tensão superficial das gotas vai se tornando cada vez menor até que a gota seja rompida (cone de Taylor - Figura 16). (Ekman et al., 2009)

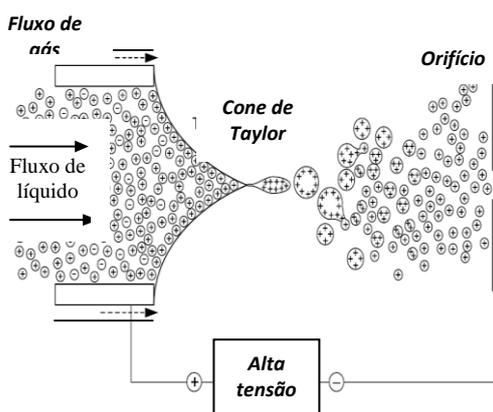


Figura 16. Representação do processo de ionização por "electrospray" e formação do cone de Taylor (Ekman et al., 2009).

Na ionização *electrospray*, pode-se escolher se serão analisados íons positivos (ESI+) ou negativos (ESI-), dependendo se o analito em questão é mais susceptível a formar cátions ou ânions. Moléculas que apresentam o grupo funcional amina em sua estrutura tendem a formar, facilmente, adutos protonados (ácido conjugado) em solução aquosa. Em razão deste comportamento, melhores resultados são obtidos quando se trabalha no modo positivo de ionização (Ekman et al., 2009).

A fonte de ionização pode ser empregada em modo ESI+ ou ESI- de ionização, conforme resposta individual de cada agrotóxico. Rotineiramente, aplica-se, preferencialmente, o modo de ionização positivo. Deixando o modo negativo para otimização da resposta de agrotóxicos ácidos, com valores de pKa maiores que 3 ou agrotóxicos que não ionizam bem em modo positivo.

### II.6.2.2 Analisadores de massas

Após a ionização, os íons formados são direcionados ao analisador de massas. Os analisadores mais comuns são: quadrupolo, *ion trap* e tempo de voo, *time of flight* (ToF).

Os analisadores ou filtros de massas são dispositivos responsáveis pela separação ou resolução dos íons conforme sua razão  $m/z$ . No sistema utilizado neste trabalho, como na maioria dos equipamentos recentes, os analisadores são do tipo quadrupolo. Estes são constituídos de quatro hastes condutoras paralelas e equidistantes entre si, sobre as quais são aplicados potenciais combinados de corrente contínua (CC) e radio frequência (RF), que variam em magnitude durante a passagem dos íons pelo quadrupolo. Conforme o campo elétrico gerado, consegue-se que somente íons com a relação massa/carga específica atinjam o detector, enquanto os não selecionados são desviados, levando-os a

colidir com as hastes, para a sua neutralização (Ekman et al., 2009).

O equipamento utilizado apresenta o sistema do tipo triplo quadrupolo (MS/MS), ou seja quadrupolos em sequência, também conhecido como “*tandem*” (Figura 17). Este é constituído por um sistema triploquadrupolar formado por três quadrupolos dispostos em série. A operação de um sistema triplo quadrupolo permite que os íons formados e seus fragmentos possam ser conduzidos em modos adequados, ESI+ ou ESI-, para a monitoração durante a análise (Ekman et al., 2009).

No modo de análise empregado, um íon denominado íon precursor ou íon pai, é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1) e posteriormente fragmentado na cela de colisão, localizada no segundo quadrupolo (Q2), por dissociação ativada por colisão, *Collision Activated Dissociation* (CAD). A fragmentação da molécula é produzida a partir da colisão com gás nitrogênio (CAD *gas*). Os fragmentos gerados, denominados íons produto ou íons filho, são selecionados pela razão  $m/z$  no terceiro quadrupolo (Q3) e transmitidos para o sistema de detecção (de Hoffmann, 2007; Ekman et al., 2009).

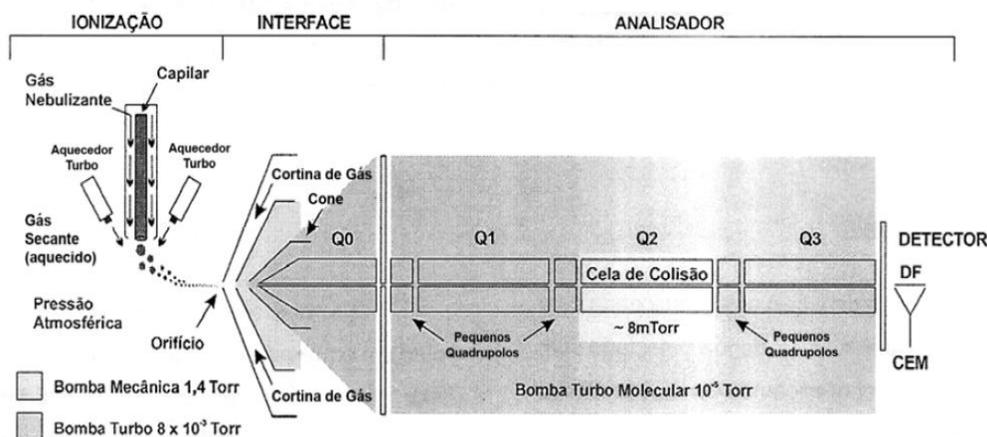


Figura 17. Esquema de um sistema triplo quadrupolo.

Fonte: <http://www.google.com.br/images>.

### II.6.3 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, LC-MS/MS

A cromatografia líquida é muito efetiva na separação dos analitos, enquanto que a espectrometria de massas em “*tandem*” permite a sua identificação e/ou confirmação em concentrações da ordem de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ou  $\text{ng.L}^{-1}$ .

Recentemente, a LC tem sido associada com diferentes tipos de analisadores de massas, incluindo quadrupolo único, ion

trap, triplo quadrupolo e ToF-MS para determinar resíduos de pesticidas em baixos níveis e/ou para elucidar as suas estruturas em solução aquosa e amostras ambientais, bem como em alimentos de origem vegetal, animal e alimentos para bebês (LeDoux, 2001).

O monitoramento dos produtos obtidos a partir da fragmentação que ocorre no Q2 conferem maior seletividade e permite distinguir de modo eficiente e inequívoco, os analitos de interesse dos interferentes da matriz mesmo que a separação

---

cromatográfica não tenha sido completa. A técnica, desta forma, se mostra efetiva na análise de agrotóxicos em níveis baixos de concentração, mesmo na presença de interferentes. A fragmentação controlada do MS/MS é uma ferramenta essencial para garantir a confiabilidade na identificação do composto alvo. Outra vantagem desta técnica de fragmentação é a obtenção de sinais mais limpos, melhorando a razão sinal/ruído e diminuindo, portanto os limites de detecção e quantificação (Garrido-Frenich et al., 2005).

LeDoux (2011) e Demolier et al.(2010) reportam que um grande número de agrotóxicos podem ser analisados por ambas as técnicas GC-MS e LC-MS. No entanto, modernamente, métodos baseados em LC-MS têm demonstrado ser capazes de cobrir um escopo mais amplo que aqueles baseados em GC-MS.

## **II.7 Validação de Métodos Analíticos**

A demonstração da qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem comprometer conclusões de estudos e conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação.

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência do método validado entre laboratórios ou instituições.

Cada vez mais, empresas, artigos científicos e os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologias analíticas e, para isso, a

maioria deles tem estabelecido documentos oficiais com diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas de medição são adequados para o uso desejado.

### **II.7.1 Conceito**

De Souza (2007) realizou extensa revisão sobre conceitos de validação e terminologias aplicadas ao tema.

Não há consenso sobre o conceito de validação visto não se tratar de termo específico (De Souza, 2007). Contudo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 “*Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*”, adotada mundialmente pelos laboratórios que desejam demonstrar competência analítica através da acreditação junto à ISO – “*International Organization for Standardizations*”, define validação como:

“Validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos.”

“Com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar os métodos não normalizados, métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliações e modificações de métodos normalizados. A validação deve ser suficientemente abrangente para atender às necessidades de uma determinada aplicação ou área de aplicação. O laboratório deve registrar os resultados obtidos, o procedimento utilizado para a validação e uma declaração de que o método é ou não adequado para o uso pretendido.”

---

### **II.7.2 Validação no Contexto de Sistemas de Gestão**

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005) representa a síntese da experiência acumulada em todo o mundo em avaliações e na demonstração da competência de laboratórios. Esta norma contém requisitos de direção e técnicos que devem ser atendidos pelos laboratórios para implementação e manutenção de um sistema de gestão laboratorial adequado. Como requisitos de direção são apresentados: organização; sistema de gestão; controle de documentos; análise de pedidos, propostas e contratos; subcontratação; aquisições; atendimento ao cliente; reclamações; controle de trabalhos não-conformes; melhoria; ações corretivas; ações preventivas; controle de registros; auditorias internas; e análise crítica pela direção. Os requisitos técnicos abordados são: pessoal; acomodações e condições ambientais; métodos e validação de métodos; equipamentos; rastreabilidade da medição; amostragem; manuseio de itens (amostras); garantia da qualidade de resultados; e apresentação dos resultados. Todos os requisitos exigidos pela norma são tidos como essenciais e estão integrados no âmbito de sistemas de gestão laboratoriais e de processos de acreditação. Desta forma, embora os objetivos específicos de ferramentas como validação de métodos, controle de qualidade interno e participação em programas de comparação interlaboratorial ou ensaios de proficiência sejam diferentes, estas ferramentas possuem características complementares no processo de garantia da confiabilidade e comparabilidade dos resultados.

### **II.7.3 Quando Validar**

A ABNT NBR ISO/IEC 17025 estabelece que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados; métodos não normalizados; e métodos

criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados. Apesar de não tratar a necessidade de validação para métodos normalizados, esta norma define que os laboratórios devem confirmar que têm condições de operar adequadamente os métodos normalizados antes da implantação dos ensaios (ABNT, 2005).

### **II.7.4 Desenvolvimento de métodos e parâmetros de validação**

O desenvolvimento de métodos analíticos, em geral, ocorre de diferentes maneiras, num extremo envolvendo adaptações a um método existente por meio de mudanças mínimas, em outro extremo partindo do delineando experimental para criação de um novo método. Nesta última, o processo de desenvolvimento exige muito trabalho e sempre existirá uma dúvida inicial acerca do sucesso do método desenvolvido (EURACHEM, 1998).

No processo de validação, deve-se levar em consideração todas as incertezas do processo analítico, incluindo àquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente (Ribani et al., 2004; SANCO, 2010). A validação faz parte de qualquer documentação submetida às agências governamentais de regulamentação da UE, Japão, Estados Unidos e outros países, quando se pretende o registro de métodos usados para a quantificação de produtos como fármacos em fluidos biológicos e determinação de resíduos de pesticidas em vários tipos de matrizes (Tate e Heiny, 1996; Ribani *et al.*, 2004; SANCO, 2010).

A validação de um método que emprega técnicas cromatográficas pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as

características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (Ribani et al., 2004; De Souza, 2007; SANCO, 2010).

No planejamento e execução da validação é conveniente que sejam seguidos os passos da seqüência de eventos abaixo (Codex Alimentarius, 2003; INMETRO, 2010):

- definir a aplicação, objetivo e escopo do método;
- definir os parâmetros de desempenho e critérios de aceitação;
- desenvolver um procedimento operacional para validação;
- definir os experimentos de validação;
- verificar se as características de desempenho do equipamento estão

compatíveis com o exigido pelo método em estudo;

- qualificar os materiais, por exemplo, padrões e reagentes;
- executar os experimentos preliminares de validação;
- ajustar parâmetros do método e/ou critérios de aceitação, se necessário;
- executar experimentos completos de validação;
- preparar um procedimento operacional para execução do método, na rotina;
- definir critérios de revalidação (por exemplo, mudanças de pessoal, condições ambientais, equipamentos, periodicidade, etc.);

A Figura 18 apresenta um fluxograma de validação de um método analítico com as principais etapas de tomada de decisão.

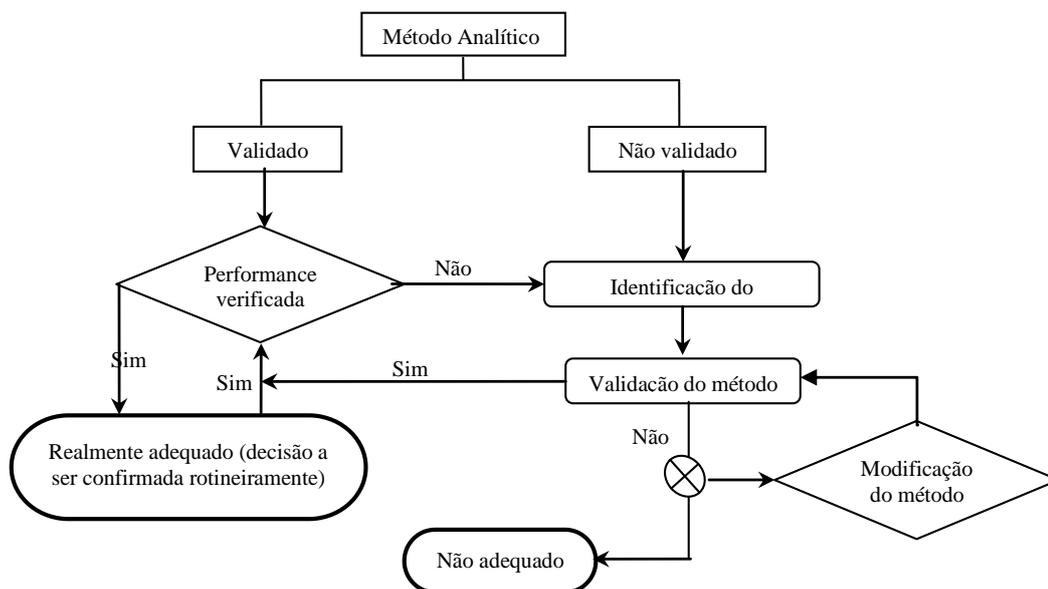


Figura 18. Esquema de validação de método analítico (Codex Alimentarius, 2003).

Os parâmetros geralmente envolvidos no procedimento de validação dos métodos

analíticos são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 7.** Parâmetros de validação conforme a natureza do ensaio. (SANCO, 2010; INMETRO, 2010; Pinho et al., 2009; Lanças, 2004, Ribani et al., 2007)

| Parâmetros                                  | Tipo de ensaio |                                      |                   |                      |
|---|----------------|--------------------------------------|-------------------|----------------------|
|   | Qualitativo    | Determinação do Principal Componente | Análise de Traços | Propriedades Físicas |
| Precisão                                    |                | √                                    | √                 | √                    |
| Especificidade/seletividade                 | √              | √                                    | √                 | √                    |
| Exatidão/recuperação                        |                | √                                    | √                 | √                    |
| Robutez                                     | √              | √                                    | √                 | √                    |
| Sensibilidade/linearidade/faixa de trabalho |                | √                                    | √                 | √                    |
| Limite de detecção                          | √              |                                      | √                 |                      |
| Limite de quantificação                     |                |                                      | √                 |                      |

#### II.7.4.1 Seletividade (ou especificidade)

É a habilidade de um método para determinar acuradamente e especificamente os analitos de interesse na presença de componentes de matriz sob as condições iniciais do ensaio (EURACHEM, 1998).

É sabido que a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração.

Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Quando não há disponibilidade de interferentes, alguns autores sugerem a avaliação da habilidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais (De Souza, 2007; INMETRO, 2010).

Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão do método estarão seriamente comprometidas.

#### II.7.4.2 Sensibilidade

É a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico expresso pela equação 1 (INMETRO, 2010; Brito et al., 2003)

$$S = \frac{dy}{dc} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:  $S$  = sensibilidade;  
 $dy$  = variação da resposta;  
 $dc$  = variação da concentração.

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito.

---

Entretanto, tornou-se comum o uso errôneo desse termo para designar método com baixo limite de detecção (LD). (Brito et al., 2003)

#### **II.7.4.3 Curva Analítica, Linearidade**

O termo calibração é mais pertinente para instrumentos de medição e padrões, assim sendo, neste trabalho, será empregado o termo curva analítica para expressar a relação sinal (resposta) em função da concentração do analito, em vez de curva de calibração como empregado por Brito (2003), De Souza (2007), ANVISA (Brasil, 2007) e SANCO (2010).

A qualquer método quantitativo, é possível determinar uma faixa de concentrações do analito na qual o método pode ser aplicado. Segundo a ANVISA (Brasil, 2007), a curva analítica representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito.

De acordo com as recomendações da FDA (US-FDA, 2001), a curva analítica deve ser construída usando uma amostra branca, amostra zero (amostra branca adicionada do padrão interno) e mais matrizes fortificadas com o analito para seis a oito níveis de concentração, abrangendo a faixa de concentração esperada e incluindo o limite de quantificação (LQ). Como critérios de avaliação, a FDA recomenda que os resultados devam ser analisados por métodos estatísticos (regressão linear pelo método dos mínimos quadrados) e que deva ser usado o modelo mais simples que adequadamente descreve a relação concentração-resposta. Modelos mais complexos podem ser empregados desde que devidamente justificado. Ainda, estabelece que os desvios sejam menores ou iguais a 20 e 15% em relação à concentração nominal para o LQ e à concentração nominal para as outras concentrações da curva analítica, respectivamente (no mínimo quatro dos seis

níveis de concentração da curva analítica devem atender esses critérios, incluindo o LQ e a maior concentração da curva analítica).

A ANVISA (Brasil, 2007) segue as recomendações da FDA (US-FDA, 2001) apontadas acima e acrescenta que devem ser apresentados os coeficientes linear e angular, o intercepto da reta e que o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC*), em seu relatório técnico resultante do *Symposium on Harmonization of Quality Assurance Systems for Analytical Laboratories* (Thompson et al., 2002) recomenda que os níveis de concentração da curva analítica devem ser igualmente espaçados entre si, estar sobre a faixa de concentração de interesse, e abranger a faixa de 0 a 150% do valor esperado. Os padrões analíticos devem ser analisados no mínimo em duplicata, e em ordem aleatória.

A União Européia (DIRECTIVE 657, 2002) recomenda que no mínimo cinco níveis de concentração (incluindo a amostra zero) sejam empregados na construção da curva analítica. Ainda, estabelece que sejam descritas a faixa de trabalho, a equação matemática e o modelo de regressão linear aplicado na construção da curva analítica.

Outro documento recomendado pela União Européia é o Documento N° SANCO/10684/2009 - Procedimentos de validação de metodologia e controle de qualidade para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para consumo humano e animal (SANCO, 2010). Este documento menciona que curvas analíticas alternativas podem ser obtidas, tais como:

- calibração por interpolação entre dois níveis, desde que estes não

---

difiram por um fator maior do que 4 e quando os fatores da resposta média, obtidos de determinações em replicata para cada nível, indicarem linearidade aceitável de resposta, com o maior fator não representando mais de 120% do mais baixo fator de resposta (110% nos casos em que o LMR é alcançado ou excedido).

- calibração em um único nível que, segundo o documento, pode fornecer resultados mais exatos que a calibração realizada em vários níveis se a resposta do detector for variável com o tempo.

O documento trata ainda da obtenção de curvas analíticas com três ou mais níveis de concentração. Recomenda que nestas curvas uma função de calibração apropriada (que pode ou não ser linear) não deve, em geral, ser forçada a passar pela origem. Ainda segundo o documento SANCO/10684/2009, o ajuste da função de calibração deve ser confeccionado e inspecionado visualmente e/ou pelo cálculo dos resíduos, evitando confiar somente nos coeficientes de correlação, para assegurar que o ajuste é satisfatório na região de interesse para os resíduos detectados. Se alguns resíduos isolados se desviarem mais que  $\pm 20\%$  ( $\pm 10\%$  em casos onde o LMR é alcançado ou ultrapassado) da curva de calibração na região de interesse, uma função de calibração alternativa deve ser usada. Em geral, o uso de regressão linear ponderada ( $1/x$ ) é recomendado, comparado à regressão linear (SANCO, 2010).

O exame dos resíduos é fundamental para que se possa avaliar a qualidade do ajuste. Estes devem ser pequenos, pois, se o modelo apresenta resíduos elevados, provavelmente é um modelo inadequado. (Neto et al., 2010). No modelo ideal todas as previsões coincidiriam exatamente com

as respostas observadas, não havendo, portanto, resíduo algum.

Segundo Sampaio (2007) e Neto e colaboradores (2010), o método mais empregado para se avaliar a qualidade do ajuste de um modelo é a Análise de Variância (*Analysis of Variance* - ANOVA).

O exame dos resíduos é fundamental para que se possa avaliar a qualidade do ajuste do modelo selecionado. Os resíduos devem ser os menores possíveis, pois, valores elevados para os resíduos indicam que provavelmente o modelo aplicado para o ajuste da curva analítica não é adequado. No modelo ideal, todas as previsões coincidiriam com as respostas observadas e não haveria resíduo algum (; Sampaio, 2007; Neto et al, 2010).

As tabelas de ANOVA comuns em diversos tipos de estudos estatísticos, e frequentemente incorporadas nos programas dedicados à regressão e nas folhas de cálculo que incluem este tipo de estudos seguem normalmente a organização dos valores indicada na Tabela 10.

#### ***II.7.4.3.1 Avaliação da qualidade do ajuste***

O teste é feito através do cálculo da razão das médias quadráticas, ou seja,

$$F_{(m-p);(n-m)} = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$$
 e compara-se o valor

obtido com  $F_{\text{tabelado}} = F_{(m-p);(n-m); \alpha/2}$ , para o nível de significância de 5%. Se  $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$ , aceita-se a linearidade, ou seja, o ajuste do modelo é considerado satisfatório. Caso contrário, novo modelo para o ajuste deverá ser proposto. Por exemplo, ajustes polinomiais.

**Tabela 8.** Tabela de ANOVA para o ajuste pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo linear dos parâmetros.

$n_i$ = número de repetições do nível  $i$ ;  $m$  = número de níveis distintos da variável independente;  $n = \sum n_i$  = número total de observações ;  $p$  = número de parâmetros do modelo.

| Fonte de variação | Nº de graus de liberdade | Soma quadrática   | Média quadrática                    | F  |
|-------------------|--------------------------|---|-------------------------------------|--|
| Regressão         | $p - 1$                  | $SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (x_{ij} - \bar{y})^2$       | $MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$         | $F_{(p-1);(n-p)} = \frac{MQ_R}{MQ_r}$        |
| Resíduos          | $n - p$                  | $SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (x_{ij} - \hat{y}_i)^2$     | $MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$         |  |
| Falta de ajuste   | $m - p$                  | $SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (x_{ij} - \bar{y}_i)^2$ | $MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$ | $F_{(m-p);(n-m)} = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$ |
| Erro puro         | $n - m$                  | $SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (x_{ij} - \bar{y}_i)^2$  | $MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$   |  |
| Total             | $n - 1$                  | $SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (x_{ij} - \bar{y})^2$       |                                     |  |

### II.7.4.3.2 Teste de Significância da Regressão

Compara-se  $F_{(p-1);(n-p)} = \frac{MQ_R}{MQ_r}$  com o

valor de  $F_{\text{tabelado}}$ , no nível de significância de 5%. Se  $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}}$ , aceita-se, no nível de confiança selecionado, que  $a \neq 0$ , o que indica que a inclinação da reta da regressão não é nula. Há, portanto, indicação de que a regressão é significativa. Se  $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$ , não há indicação de existência de relação linear entre as variáveis  $x$  e  $y$ ; e não tem sentido utilizar a regressão. Novamente, há evidências de que novo modelo para o ajuste deverá ser proposto.

### II.7.4.3.3 Coeficiente de correlação

O coeficiente de correlação ( $r$ ) é obtido pela equação

$$r = \sqrt{\frac{SQ_R}{SQ_T}} \quad \text{Equação 2.}$$

Ele representa o maior valor da correlação que uma combinação linear de variáveis independentes, na forma especificada pelo modelo, pode ter com os valores de  $y$  observados.

Um erro comum é interpretar o valor de  $r$ , a raiz quadrada de  $R^2$  (coeficiente de determinação) com o sinal algébrico apropriado, como o coeficiente de correlação entre  $X$  (variável independente) e  $y$  (variável dependente), numa regressão

qualquer. Isto só é válido para o ajuste de uma reta. Além do mais, na modelagem por mínimos quadrados, X nem sequer é uma variável aleatória. Na verdade o valor de r pode ser interpretado como um coeficiente de correlação, mas não entre as variáveis X e y. Pode-se demonstrar que em qualquer circunstância, para qualquer regressão linear com qualquer número de variáveis, R é o coeficiente de correlação entre as respostas observadas e os valores previstos pelo modelo ajustado: (Neto et al, 2010)

$$R = r(x, \hat{y})$$

Como os procedimentos recomendados pelas agências reguladoras para estabelecer a curva analítica e determinação da linearidade não são harmonizados. Seria desejável especificar que o primeiro nível de concentração da curva analítica seja abaixo do LMR ou LMDR – Limite Mínimo de Desempenho Requerido - estabelecido para o analito.

#### **II.7.4.4 Faixa de trabalho**

É o intervalo do método analítico correspondente à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

No limite inferior da faixa de concentrações, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (De Souza, 2007; INMETRO, 2010).

É desejável que na faixa de trabalho haja um intervalo de concentrações na qual a resposta do sinal do analito estudado terá

uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa deve ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho (*Codex Alimentarius*, 2003; Brasil, 2007; INMETRO, 2010).

#### **II.7.4.5 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)**

A detectabilidade de um método analítico pode ser definida considerando-se o LD e o LQ apresentado por este.

##### **II.7.4.5.1 Limites de Detecção**

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas constitui o limite de detecção (EURACHEM, 1998; Brito et al., 2003).

Freqüentemente, o limite de detecção é dado em termos do desvio-padrão de medidas do branco, de acordo com a equação 2 (EURACHEM, 1998; Thompson et al., 2002; Brito et al., 2003; De Souza, 2007;).

$$LD = 3 \cdot s_{\text{branco}} \quad \text{Equação 3}$$

Uma vez que o branco é composto por todos os reagentes, com exceção da amostra e do analito, não reproduz as mesmas condições a que o analito estará sujeito durante a análise. O LD assim determinado conduz a valores extremamente baixos que não representam a realidade da rotina analítica. Fundamentalmente, o LD calculado a partir da equação 3, pode avaliar mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos. O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta ou do coeficiente angular e por processos estatísticos (INMETRO, 2010).

Experimentalmente o LD é determinado através da análise de diluições sucessivas da

solução do analito em estudo até o nível de interesse ou, o nível de concentração que apresente relação sinal ruído maior que 3.

Todavia, há várias outras maneiras de se calcular e/ou estimar do valor do LD, tanto do instrumento de medição quanto do método, como através do método visual, método da relação sinal/ruído e aquele baseado em parâmetros da curva analítica.

Nesse estudo, a maneira utilizada para a obtenção dos valores de LD do instrumento e do método está descrita na parte experimental.

#### II.7.4.5.2 Limite de Quantificação

Definido como o menor nível de concentração fortificado, que pode ser quantificado na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis (recuperação média entre 70 e 120% e desvio padrão relativo (%RSD) ou coeficiente de variação (CV%) < 20%, sob as condições experimentais adotadas (SANCO, 2010).

Comumente é determinado através da análise de 20 replicatas do branco e posterior aplicação da equação 4. Embora, como no caso do LD, este procedimento conduza a valores extremamente baixos e muitas vezes distantes da realidade de uma rotina analítica (EURACHEM, 1998; Thompson et al., 2002; Brito et al., 2003; De Souza, 2007; INMETRO, 2010).

$$LQ = 10 \cdot S_{\text{branco}} \quad \text{Equação 4}$$

O LQ pode ser determinado experimentalmente através de ensaios de recuperação. Neste caso, o LQ será o menor nível de concentração que apresente recuperação média entre 70 e 120% e CV% < 20%.

De modo análogo ao que ocorre com o LD, há várias outras maneiras de se calcular e/ou estimar do valor do LD, tanto do

instrumento de medição quanto do método, como através do método visual, método da relação sinal/ruído e aquele baseado em parâmetros da curva analítica.

Nesse estudo, a maneira utilizada para a obtenção dos valores de LD do instrumento e do método está descrita na parte experimental.

#### II.7.4.6 Precisão

“Grau de concordância entre **indicações** ou **valores medidos**, obtidos por **medições** repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas.” (INMETRO, 2009).

Estudos de precisão avaliam a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções analíticas de referência, analisadas em condições definidas.

A precisão pode ser numericamente expressa em termos do desvio padrão relativo (RSD%) ou coeficiente de variação (CV%), pode ser calculada empregando-se a equação 5 (INMETRO, 2010).

$$RSD\% = \frac{s}{X_m} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

onde:

$s$  = estimativa do desvio padrão absoluto  
 $X_m$  = média das respostas das repetições para aquele nível de concentração de interesse.

Para métodos empregados em determinações em nível de traços, valores de RSD% de até 20% são aceitáveis (DIRECTIVE 657, 2002; *Codex Alimentarius*, 2003; SANCO, 2010; INMETRO, 2010).

A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (Ribani et al., 2004; De Souza, 2007).

#### II.7.4.7 Exatidão

“Grau de concordância entre um **valor medido** e um **valor verdadeiro** de um **mensurando**.” (INMETRO, 2009)

A exatidão representa a existência de erros sistemáticos, e é um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico.

Na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação (geralmente expressa em percentual), podendo esta ser calculada através da equação 6 (*Codex Alimentarius*, 2003).

$$\text{Re } c\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

C<sub>1</sub> = Concentração determinada na amostra fortificada (branco);

C<sub>2</sub> = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C<sub>3</sub> = Concentração usada para fortificação.

Em geral, são aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos (DIRECTIVE 657, 2002; *Codex Alimentarius*, 2003; SANCO, 2010; INMETRO, 2010).

#### II.7.4.8 Identificação de “outliers” pelo teste de Grubs (ISO, 1994).

Este teste de identificação de valores dispersos é um dos mais robustos dentre os diversos testes disponíveis. O teste é

primeiramente realizado verificando a existência de um valor disperso em cada extremidade do conjunto. Se nesta primeira análise, um dos dois valores for considerado disperso, ele é rejeitado, retirado do conjunto e novo teste, verificando a existência de um valor disperso em cada extremidade do conjunto, é realizado e assim sucessivamente, caso contrário, se nesta primeira análise, ambos os valores forem aceitos como não dispersos, o teste é então realizado verificando-se a existência de dois valores dispersos em cada extremidade do conjunto. Se nesta segunda análise os dois resultados de uma das extremidades forem considerados como dispersos, eles devem ser rejeitados, retirados do conjunto e novo teste verificando a existência de dois valores dispersos em cada extremidade do conjunto é realizado e assim sucessivamente (Oliveira, 2008).

O teste de Gubbs e então aplicado a cada um dos níveis de concentração da curva analítica, considerando o número de replicatas verdadeiras de cada concentração.

#### II.7.4.8.1 Teste para um valor discrepante (ISO, 1994)

O valor da estatística G é dado pela equação

$$G_{\text{calculado}} = \frac{(x_{\text{maior}} - \bar{x})}{s} \quad \text{Equação 7.}$$

$$G_{\text{calculado}} = \frac{(\bar{x} - x_{\text{menor}})}{s} \quad \text{Equação 8.}$$

Onde:  $x_i$  = resposta instrumental da  $i$ -ésima replicata do nível de concentração estudado;

$\bar{x}$  = médias das respostas instrumentais das  $i$  replicatas do nível de concentração estudado;

$s$  = desvio padrão das  $i$  replicatas do nível de concentração estudado;

---

O valor de  $G_{\text{calculado}}$  é comparado com um valor crítico, em um nível de significância definido conforme segue:

se  $G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}}$  a 5% de significância ( $G_{\text{tabelado}} = 1,887$ ;  $n = 6$ ) não há valores aberrantes na série de dados testados;

se  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{tabelado}}$  a 5% de significância e  $< G_{\text{tabelado}}$  a 1% de significância ( $G_{\text{tabelado}} = 1,973$ ;  $n = 6$ ) a resposta testada é considerada como suspeita.

se  $G_{\text{calculado}} > G_{\text{tabelado}}$  a 1% de significância o valor testado é considerado aberrante.

Aplica-se o teste ao maior e ao menor valor da série de dados. A identificação de um “*outlier*” pelo teste permite ao analista eliminar, com segurança o valor correspondente da série de dados. Contudo, antes da eliminação de valores indicados como “*outliers*”, uma análise crítica de todo o experimento foi realizada para verificar se realmente trata-se de um valor aberrante em relação à série de dados, uma vez que este irá influenciar diretamente os valores da média, exatidão, e desvio padrão, precisão do método. Os *outliers*, após a análise crítica, se eliminados, só podem sê-lo em até 22,2% do total de dados constituintes do nível considerado (Souza, 2007; Oliveira, 2008).

#### **II.7.4.9 Robustez**

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado (INMETRO, 2010).

O parâmetro robustez é freqüentemente considerado fora do processo de validação, como parte de estudos de desenvolvimento do método (EURACHEM, 1998; De Souza, 2007). Assim, o estudo da robustez em

processos de validação somente é considerado necessário quando os limites para os parâmetros experimentais e seus respectivos desvios permitidos não forem previamente estabelecidos (Thompson et al., 2002). De qualquer forma, a robustez é importante para fornecer informações sobre o efeito de parâmetros experimentais significativos para a estimativa da incerteza (EURACHEM/CITAC, 2002).

### **II.8 Incerteza de Medição**

Quando se relata o resultado de uma medição de uma grandeza, é desejável que seja dada uma indicação quantitativa da qualidade do resultado de forma tal que aqueles que o utilizam possam avaliar sua faixa de dúvidas. Sem esta indicação, resultados das medições não podem ser comparados, seja entre eles mesmos ou com valores de referência dados numa especificação ou numa norma. É, portanto, necessário que haja um procedimento prontamente implementado, facilmente compreendido e de aceitação geral para caracterizar a qualidade de um resultado de uma medição, isto é, para avaliar e expressar sua incerteza (ABNT, 2005).

Incerteza de medição é um parâmetro, associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentadamente atribuídos a um mensurando (EURACHEM/CITAC, 2002).

A medida da incerteza é um indicador quantitativo da confiabilidade dos dados analíticos e descreve o intervalo em torno de um resultado experimental no qual o valor verdadeiro se encontra com uma dada probabilidade (nível de confiança). Os intervalos de incerteza devem ser determinados considerando todas as fontes de erro.

Juntamente com a exatidão, constituem os dois mais importantes parâmetros de

---

qualidade de um resultado de medição, permitindo a comparabilidade e a avaliação da conformidade do resultado de medição em relação às normas, limites legais ou contratuais.

Um dos requisitos da norma ISO/IEC 17025 é que os laboratórios determinem e disponibilizem o valor da incerteza associada aos resultados (ABNT, 2005). Para isto o laboratório deve utilizar-se de dados, os quais serão aplicados para a determinação da incerteza associada, oriundos da validação/verificação metodológica, ensaios de proficiência e outros estudos interlaboratoriais e controle interno da qualidade analítica. A medida da incerteza é um indicador quantitativo da confiabilidade dos dados analíticos e descreve o resultado de uma avaliação com o propósito de determinar o intervalo dentro do qual estima-se que esteja o valor verdadeiro, geralmente associado a um nível de confiança (SANCO, 2010; Brasil, 2007).

Os dados da incerteza de medição devem ser aplicados cautelosamente para que se evite a falsa sensação de certeza sobre o valor verdadeiro da medição. Estimativas de incerteza típicas são baseadas em dados prévios e podem não refletir a incerteza associada à análise da amostra corrente (SANCO, 2010). Portanto, deve-se avaliar cuidadosamente quais são as principais fontes de incerteza envolvidas na metodologia empregada.

Na prática, existem muitas fontes possíveis de incerteza em uma medição, incluindo (EURACHEM/CITAC, 2002):

- a) definição incompleta do mensurando;
- b) realização imperfeita da definição do mensurando;
- c) amostragem não representativa - a amostra medida pode não representar o mensurando;

- d) conhecimento inadequado dos efeitos das condições ambientais sobre a medição ou medição imperfeita das condições ambientais;
- e) erro de tendência pessoal na leitura de instrumentos analógicos;
- f) resolução finita do instrumento ou limiar de mobilidade;
- g) valores inexatos dos padrões de medição e materiais de referência;
- h) valores inexatos de constantes e de outros parâmetros obtidos de fontes externas e usados no algoritmo de redução de dados;
- i) aproximação e suposições incorporadas ao método e procedimento de medição;
- j) variações nas observações repetidas do mensurando sob condições aparentemente idênticas.

Estas fontes não são necessariamente independentes e algumas das fontes de a) a i) podem contribuir para a fonte j). Naturalmente, um efeito sistemático não reconhecido não pode ser levado em consideração na avaliação da incerteza do resultado de medição, porém contribui para seu erro.

### ***II.8.1 Avaliação da Incerteza Padronizada***

A **incerteza padronizada ou padrão** de uma medição é a faixa de dispersão em torno do valor central equivalente a um desvio padrão (EURACHEM/CITAC, 2002).

A avaliação da incerteza padronizada pode ser classificada em Tipo A e Tipo B. O propósito de classificação Tipo A e Tipo B é indicar as duas maneiras diferentes de avaliar as componentes da incerteza e serve apenas para discussão, a classificação não se propõe a indicar que haja qualquer diferença na natureza dos componentes resultando dois tipos de avaliação. Ambos os tipos de avaliação são baseados em distribuições de probabilidade e os

componentes de incerteza resultantes de cada tipo são quantificados por variâncias ou desvios padrão (EURACHEM/CITAC, 2002).

### II.8.1.1 Avaliação do Tipo A

Método de avaliação da incerteza pela análise estatística de uma série de observações.

### II.8.1.2 Avaliação do Tipo B

Método de avaliação da incerteza por outros meios que não a análise estatística de uma série de observações.

### II.8.1.3 Determinação da incerteza de medição

A avaliação da incerteza requer que o analista se debruce cuidadosamente sobre todas as fontes possíveis de incerteza. Contudo e apesar de tal estudo requerer esforço considerável, é essencial que o esforço despendido não seja desmesurado. Um estudo preliminar identificará rapidamente as fontes mais significativas de incerteza e, como se pode ver nos exemplos disponíveis na literatura (EURACHEM/CITAC, 2000, EURACHEM/RELACRE, 2002; IPAC, 2007; Kmellár et al, 2008), o valor obtido para a incerteza total é praticamente controlado pelas contribuições majoritárias.

#### II.8.1.3.1 Cálculo da incerteza padrão para a medida de volume:

$$u(\text{Volume}) = \sqrt{u_{\text{temperatura}}^2 + u_{\text{leitura}}^2 + u_{\text{calibração}}^2}$$

Equação 9.

Contribuição da incerteza de calibração do equipamento:

$$u_{\text{calibração}} = \frac{u_{\text{certificado de calibração}}}{\sqrt{6}}$$

Equação 10.

Contribuição da incerteza da leitura (ajuste de volume a dispensar) do equipamento, obtida a partir da verificação de desempenho do equipamento.

$$u_{\text{leitura}} = \frac{V_{\text{medido}} \cdot \alpha_{\text{leitura}}}{\sqrt{6}}$$

Equação 11.

Contribuição da temperatura.

$$u_{\text{temperatura}} = \sqrt{\frac{\Delta t \cdot V_{\text{liquido}} \cdot \alpha}{\sqrt{3}}}$$

Equação 12.

Onde:  $\Delta t$  = faixa de temperatura aceitável ( $\pm t$  °C);

$\alpha$  = coeficiente de expansão para solventes orgânicos,  $\alpha = 0,001 \text{ K}^{-1}$

#### II.8.1.3.2 Cálculo da incerteza padrão para a medida de massa da amostra:

$$u(\text{massa}) = \sqrt{u_{\text{linearidade}}^2 + u_{\text{leitura}}^2 + u_{\text{legibilidade}}^2}$$

Equação 13.

Contribuição da incerteza de da linearidade da balança.

$$u_{\text{linearidade}} = \sqrt{\left(\frac{u_{\text{certificado de calibração}}}{\sqrt{3}}\right)^2 \cdot 2}$$

Equação 14.

A contribuição da linearidade deve ser considerada duas vezes, uma para a tara e outra para a massa bruta uma vez que são mediadas independentes.

Contribuição da incerteza da leitura da balança, obtida à partir das verificações de desempenho.

$$u_{\text{leitura}} = C \cdot ud \quad \text{Equação 15.}$$

Onde:  $C$  = multiplicador segundo o *Guia Eurachem* igual a 0,500;

$ud$  = último dígito significativo do desvio padrão da média das  $n$  leituras;

Contribuição incerteza de legibilidade da balança.

$$u_{\text{legibilidade}} = \frac{C \cdot ud}{\sqrt{3}} \quad \text{Equação 16.}$$

Estas equações são aplicadas a cada etapa do diagrama na qual é realizada alguma medida de volume e/ou massa.

### II.8.1.3.3 Cálculo da incerteza padrão dos ensaios de precisão intermediária

As incertezas associada à precisão intermediária são determinadas a partir dos dados dos ensaios de recuperação em condições de precisão intermediária, ou seja, execução do método num conjunto de condições, as quais compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo de um período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições que envolvam mudanças (INMETRO, 2009).

O valor desta incerteza é estimado através da Equação 17.

$$u(x)_{\text{rep}} = \hat{x} \cdot \left( \frac{s_{\text{Rec\%}}}{\bar{x}} \right) \quad \text{Equação 17.}$$

Onde:  $\hat{x}$  = nível de concentração avaliado.  
 $\left( \frac{s_{\text{Rec\%}}}{\bar{x}} \right)$  = desvio padrão da média das recuperações para os dois analistas

### II.8.1.3.4 Cálculo da incerteza padrão da curva analítica:

O cálculo será realizado a partir da equação abaixo para cada um dos níveis de fortificação da curva analítica.

$$u_{\text{curva analítica}} = \sqrt{\frac{s_y^2 + s_{b_0}^2 + \hat{x}^2 \cdot s_{b_1}^2 + 2 \cdot \hat{x} \cdot \text{cov}(b_0, b_1)}{b_1^2}} \quad \text{Equação 18.}$$

Onde:

$\hat{x}$  = valor da concentração do analito no nível de referência (ex.: LMR);

$s_y^2$  = variância da reposta instrumental estimada a partir dos parâmetros da curva de calibração;

$s_{b_0}^2$  = variância do intercepto da curva de calibração;

$s_{b_1}^2$  = variância da inclinação da curva de calibração;

$\text{cov}(b_0, b_1)$  = covariância entre o intercepto e a inclinação da curva de calibração;

### II.8.1.3.5 Determinação da incerteza expandida do método (U).

A incerteza expandida é determinada à partir da Equação 19.

$$U_{\text{nível}} = k \cdot u_{\text{nível}} \quad \text{Equação 19.}$$

Onde:  $k$  = fator de expansão

$u_{\text{nível}}$  = incerteza padrão combinada para um dados nível de concentração

A escolha do valor para o fator de expansão,  $k$ , deve considerar vários aspectos: o nível de confiança exigido, algum conhecimento das distribuições, algum conhecimento do número de valores usados na estimativa dos efeitos aleatórios dentre outros.

O número de graus de liberdade efetivos para obtenção do valor de  $t$  é dado pela Equação 20.

$$\nu_{ef} = \frac{(u_{parâmetro})^4}{\sum_{i=1}^n \frac{(u_i)^4}{\nu_i}} \quad \text{Equação 20.}$$

Onde:  $u_i$  = incerteza padrão de cada fonte de incerteza que contribuiu para o valor de  $u_{parâmetro}$ .

$\nu_i$  = número de graus de liberdade de cada fonte de incerteza.

O valor de  $k$  é, então, dados por  $k = t_{(\nu; 0,05)}$ .

### II.8.1.3.6 Determinação da incerteza padrão combinada ( $u$ ).

A incerteza padrão combinada por nível de concentração é obtida através da aplicação da Equação 21.

$$\frac{u(C_{analito})}{C_{analito}} = \sqrt{\left(\frac{u_{prep\ padrões}}{C_{padrões}}\right)^2 + \left(\frac{u_{cur\ anali}}{C_{nível}}\right)^2 + \left(\frac{u_{prec.inter}}{C_{nível}}\right)^2 + \left(\frac{u_{vol\ amos}}{V_{amos}}\right)^2 + \left(\frac{u_{m.amos}}{m_{amos}}\right)^2}$$

Equação 21.

## II.9 Estabilidade dos Padrões e das Amostras

Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes usados devem ser estáveis por um período razoável (por ex. um dia, uma semana, um mês, dependendo da necessidade). Frequentemente, em equipamentos automatizados, as corridas cromatográficas são realizadas durante a noite para melhor aproveitamento do funcionamento do laboratório. Esta prática requer maior estabilidade das soluções. A estabilidade das amostras e padrões é importante em termos de temperatura e tempo. Se uma solução não for estável em temperaturas ambientes, a diminuição da temperatura pode aumentar a estabilidade das amostras e padrões. Com relação ao tempo, estabilidade de dias ou meses é mais desejável, entretanto em alguns casos, as soluções precisam ser preparadas cada vez que forem realizadas as análises (Ribani et al., 2004).

Em certos tipos de amostras, faz-se necessário avaliar a estabilidade da substância para determinar o tempo de estocagem das amostras. Tempos longos de estocagem de amostras biológicas, por exemplo, aumentam a probabilidade de degradação dos compostos de interesse, com subsequente formação de metabólitos. Conhecendo a estabilidade, as análises podem ser completadas antes de ocorrer a degradação (Ribani et al., 2004).

Dados de publicações científicas podem ser utilizados para demonstrar a estabilidade do analito em solução e/ou na matriz, desde que haja similaridade entre as condições estabelecidas no estudo e no laboratório em questão (Codex Alimentarius, 2003; Ribani et al., 2004).

## III - MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na otimização dos parâmetros instrumentais

---

para a detecção dos agrotóxicos empregando o sistema LC-MS/MS, através da infusão dos padrões analíticos; otimização das condições cromatográficas; avaliação de diferentes metodologias de extração e “clean up” de resíduos de agrotóxicos em leite para seleção da melhor técnica de extração a ser aplicada no desenvolvimento e validação do método. As análises instrumentais foram realizadas no sistema LC-MS/MS Triple Quad 5500.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesticidas do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG), Pedro Leopoldo, MG.

### III.1 Instrumentação

A instrumentação utilizada no desenvolvimento do método está descrita a seguir:

- Centrífuga refrigerada Jouan CR 4i, Thermo Electron Corporation (Ohio, USA);
- *Preppy Vacuum Manifold for SPE*, para a pré-concentração simultânea de 12 amostras, Supelco (Bellefonte, USA);
- Ultra-som *UltraClean* 1400, Unique (Inadaiatuba, SP);
- Balança analítica de precisão modelo AUW200D, com resolução de 0,00001g, calibrada junto a RBC (Rede Brasileira de Calibração), Shimadzu (Kyoto, Japão);
- Balança semianalítica, modelo MARK 500, com resolução de 0,001g, calibrada junto a RBC, BELEngineering (Piracicaba, SP);
- Dispensador automático de solventes *Dispensette III*, com faixa de trabalho de 1 a 25 mL, calibrado junto a RBC (Wertheim, Alemanha);
- Micropipeta eletrônica Linear, com faixa de trabalho de 100 a 1000  $\mu\text{L}$ , calibrada junto a RBC (Curitiba, PR);
- Micropipeta eletrônica PIPETMAN *Concept*, com faixa de trabalho de 5 a 100  $\mu\text{L}$ , calibrada junto a RBC, Gilson (Middleton, USA);
- Micropipeta eletrônica *FISHERBrant* e5000, com faixa de trabalho de 100 a 5000  $\mu\text{L}$ , calibrada junto a RBC, Fisher Scientific (Finlândia);
- Banho Maria com agitação e controle de temperatura, modelo MA093, Marconi (Piracicaba, SP);
- Agitador orbital tipo vortex, modelo MS 3 basic, IKA® Works INC., (Wilmington, USA);
- Freezer Biomédico Sanyo, modelo MDF-U537/U537D, com capacidade para atingir temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$  (Osaka, Japão);
- Evaporador centrífugo com *Trap* refrigerado, LABCONCO (Kansas City, USA);
- Sistema de purificação de água Direct-Q UV3 Millipore (Molsheim, França);
- Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência, Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por:
  - duas bombas binárias modelo LC20ADXR;
  - injetor automático modelo SIL20ACXR;
  - forno de coluna modelo;
- Detector MS, *Triple Quad 5500* (Applied Biosystems, Canadá) com fonte API, utilizando o modo de ionização por *Electrospray*;
  - Sistema de aquisição de dados através do *software* Analyst 1.5.1 (Applied Biosystems, Canadá).
- Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics Instruments Ltda. (Escócia).

### III.2 Reagentes solventes e materiais

- Acetonitrila grau HPLC, pureza mínima 99,0%, Lote: I478830, Lichrosolv, Merck (Darmsdat, Alemanha);
- Acetato de etila grau espectroscópico; pureza mínima 99,0%, lote CR484, Burdick e Jackson (Muskegon, USA);
- Metanol grau HPLC, pureza mínima 99,0%, lote 9093-03, J. T. Baker (Xalostoc, México);
- Ácido fórmico 96%, lote FR0629-015, Tedia (Ohio, USA);
- Ácido acético glacial, lote K37658163, Merck (Darmsdat, Alemanha);
- Sulfato de magnésio anidro, pureza mínima 97%, lote 07818JH Sigma-Aldrich (Sant Louis, USA);
- Acetato de amônio p.a. ACS, pureza mínima 98%, lote 0701036, Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
- Bondesil –PSA, 40  $\mu\text{m}$ , lote 1210508, Varian (Palo Alto, USA);
- Bondesil – C18, 40  $\mu\text{m}$ , lote 0726809, Varian (Palo Alto, USA);
- Sulfato de sódio anidro p.a.r., pureza mínima 99,0%, lote 6A178246C, Carlo Erba (Rodano, USA);
- Bicarbonato de sódio ACS, pureza 99,7-100,3%, lote 106K0107, Sigma-Aldrich (St Louis, USA);
- Água destilada e deionizada;
- Água purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade 18,2 MW cm);
- Cartuchos para SPE Strata® C18-E, 500 mg/3 mL e Strata-X® 200 mg/6 mL Phenomenex (EUA);
- Tubo de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Tubos de centrífuga graduados de 2,0 mL de polipropileno, tipo Eppendorf (Sarstedt, Alemanha);

- Balões volumétricos calibrados junto a RCB de 10, 25, 50, 100 e 1000 mL.
- Pesa padrão ou similar;
- Espátulas metálicas;
- Funil de Buchner;
- Garrafas lavadeiras;
- Proveta de 1000 mL;
- Grades para tubo de 2,0 e 50 mL;
- Frascos de vidro de 2 mL com tampa e septos de silicone ou teflon (PTFE).

### III.3 Padrões analíticos dos agrotóxicos estudados

Todos os padrões analíticos utilizados neste trabalho apresentam grau de pureza superior a 98% e foram adquiridos da Riedel-de Haën grau PESTANAL (Selze, Germany) ou Sigma-Aldrich (Sant Louis, USA).

Os agrotóxicos selecionados para este estudo são listados na Tabela 11, bem como sua classe, grupo químico, classificação toxicológica, e LMR.

As soluções analíticas estoque dos agrotóxicos foram preparadas individualmente através da dissolução em acetonitrila de não menos que 10,0 mg de padrão para um volume final de solução de 10,0 mL. Este procedimento permite obter soluções estoque de concentrações em torno de 1000  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , conforme recomendação do documento SANCO/10684/2009 (2010).

Após o preparo, as soluções foram transferidas para frascos âmbar (tampa contendo batoque de PTFE) rotulados de forma indelével, e armazenadas em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Estas soluções estoques apresentam estabilidade de cerca de dois anos, desde que armazenadas nas condições citadas e corretamente manipuladas.

---

### ***III.3.1 Preparação de pools de trabalho***

Preparou-se 100 mL de uma mistura (*pool*) de concentração  $4,0 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , contendo todos os pesticidas a serem estudados. Para isso, transferiu-se o volume adequado de cada solução estoque, para um balão volumétrico de 100 mL, já contendo um pequeno volume de acetonitrila, sendo, posteriormente, o volume completado com este mesmo solvente. O *pool* assim obtido foi armazenado em frascos âmbar (tampa contendo batoque de PTFE), com capacidade de 40 mL, rotulados de forma indelével, para evitar manipulação constante do volume total das soluções, evitando-se com isso, problemas de contaminações e/ou evaporação, tendo assim, estabilidade por cerca de dois anos (SANCO, 2010).

Esses pools foram utilizados para os ensaios de fortificação e também para preparar as soluções analíticas, através de sua diluição, nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e  $2,0 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (estabilidade de cerca de dois anos), para o estudo de linearidade e confecção das curvas analíticas, de cada composto.

Todas as soluções analíticas foram preparadas em acetonitrila e armazenadas em freezer a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Antes da utilização das mesmas, estas foram retiradas do freezer, deixadas para atingir a temperatura ambiente e em seguida, agitadas para completa homogeneização.

**Tabela 9.** Agrotóxicos selecionados para o desenvolvimento do método.

| Agrotóxico                               | Classe **       | Grupo Químico          | Fórmula Molecular   | Classificação toxicológica * | LMR                        |   |                                       |
|--|-----------------|------------------------|---|------------------------------|----------------------------|---|---------------------------------------|
|  |                 |                        |   |                              | MAPA (mg.L <sup>-1</sup> ) | Codex Alimentarius (mg.kg <sup>-1</sup> ) | União Européia (mg.kg <sup>-1</sup> ) |
| 2,4,5-T                                  | H               | Ácido ariloxialcanóico | C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>5</sub> O <sub>3</sub>                  | III                          |                            |   |                                       |
| 2,4-D                                    | H               | Ácido ariloxialcanóico | C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                  | I                            |                            | 0,01                                      | 0,01                                  |
| 2,4-DB                                   | H               | Ácido ariloxialcanóico | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                | II                           |                            |   | 0,01                                  |
| 3-hidroxycarbofurano                     | I               | Carbamato              | C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>                               | I                            |                            |   | 0,1                                   |
| Acefato                                  | I               | Organofosforado        | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> PS                             | III                          | 0,02                       | 0,02                                      | 0,02                                  |
| Acetamiprido                             | I               | Neonicotóide           | C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>                              | II                           |                            |   | 0,05                                  |
| Aldicarbe                                | I               | Carbamato              | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S                | Ia                           |                            | 0,01                                      | 0,01                                  |
| Aldicarbe sulfona                        | I (metabólito)  | Carbamato              | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S                | Ia                           |                            | 0,01                                      | 0,01                                  |
| Aldicarbe sulfóxido                      | I (metabólito)  | Carbamato              | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S                | Ia                           |                            | 0,01                                      | 0,01                                  |
| Amitraz                                  | A / I           | Amidina                | C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub>                                 | II                           |                            | 0,01                                      |                                       |
| Aramita                                  | A               | Éster sulfito          | C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> ClO <sub>4</sub> S                            | n. e.                        |                            |   | 0,01                                  |
| Azinfós etil                             | A / I           | Organofosforado        | C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub> | Ib                           | 0,05                       |   | 0,01                                  |
| Azinfós metil                            | I               | Organofosforado        | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub> | Ib                           | 0,05                       |   | 0,01                                  |
| Azoxistrobina                            | Fg              | Estrobirulina          | C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>                 | III                          |                            |   | 0,01                                  |
| Barban                                   | H               | Carbamato              | C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>                | n. e.                        |                            |   | 0,05                                  |
| Benalaxil                                | H               | Acilalanina            | C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>                               | III                          |                            |   | 0,05                                  |
| Benfuracarbe                             | I / N           | Carbamato              | C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S               | II                           |                            |   | 0,05                                  |
| Benomil                                  | Fg              | Benzimidazol           | C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>                 | U                            |                            |   |                                       |
| Bentazona                                | H               | Benzotiadiazinona      | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S               | II                           |                            | 0,05                                      | 0,05                                  |
| BF 500-3 (metabólito da piraclostrobina) | Fg (metabólito) | N-demetoxilado         | C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> Cl N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>              | II                           |                            |   | 0,01                                  |
| Bifentrina                               | A / I           | Piretróide             | C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>               | II                           |                            | 0,05                                      | 0,01                                  |
| Boscalida                                | Fg              | Carboxamida            | C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O              | III                          |                            |   | 0,05                                  |
| Carbaril                                 | I               | Carbamato              | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                               | II                           | 0,02                       | 0,05                                      | 0,05                                  |
| Carbendazim                              | Fg              | Benzimidazol           | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>                   | III                          |                            | 0,05                                      | 0,05                                  |
| Carbofurano                              | I               | Carbamato              | C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>                               | Ib                           | 0,1                        | 0,05                                      | 0,1                                   |
| Carbossulfano                            | I               | Carbamato              | C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S               | II                           |                            | 0,03                                      | 0,05                                  |
| Ciazofamida                              | Fg              | Imidazol               | C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S             | III                          |                            |   |                                       |
| Cimoxanil                                | Fg              | Cianoacetamida óximo   | C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>                  | III                          |                            |   | 0,05                                  |
| Cinidon etílico                          | H               | Fitalimida             | C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>               | n. e.                        |                            |   |                                       |
| Ciproconazol                             | Fg              | Triazol                | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>5</sub> O                            | III                          |                            |   | 0,05                                  |
| Ciprodinil                               | Fg              | Anilino piridina       | C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub>                                | III                          |                            |   | 0,05                                  |
| Ciromazina                               | I               | Triazina               | C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub>                                 | III                          |                            | 0,01                                      | 0,02                                  |
| Clorbufan                                | H               | Carbamato              | C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> ClNO <sub>2</sub>                             | n. e.                        |                            |   | 0,05                                  |
| Clorfenvinfós                            | A / I           | Organofosforado        | C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P              | Ib                           |                            |   | 0,01                                  |
| Cloroxuron                               | H               | Uréia                  | C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>               | n. e.                        |                            |   | 0,05                                  |
| Clorpirifós                              | A / I           | Organofosforado        | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS             | II                           | 0,01                       | 0,02                                      | 0,01                                  |

| Agrotóxico             | Classe **          | Grupo Químico          | Fórmula Molecular  | Classificação toxicológica * | LMR                        |   |                                       |
|------------------------|--------------------|------------------------|--|------------------------------|----------------------------|---|---------------------------------------|
|                        |                    |                        |  |                              | MAPA (mg.L <sup>-1</sup> ) | Codex Alimentarius (mg.kg <sup>-1</sup> ) | União Européia (mg.kg <sup>-1</sup> ) |
| Clorpirifós metil      | A / I              | Organofosforado        | C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS                             | III                          | 0,01                       | 0,01                                      | 0,01                                  |
| Cresoxim metil         | Fg                 | Estrobirulina          | C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>  | III                          |                            | 0,01                                      | 0,05                                  |
| Deltametrina           | I / F              | Piretróide             | C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>                              | III                          |                            | 0,05                                      | 0,05                                  |
| Di-alato               | A / H              | Tiocarbamato           | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> NOS  | n. e.                        |                            |   | 0,2                                   |
| Diazinona              | A / I / N          | Organofosforado        | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS                             | II                           | 0,01                       | 0,02                                      | 0,01                                  |
| Diclofluanida          | Fg                 | Sulfamida              | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> | U                            |                            |   |                                       |
| Diclorprope            | R / N              | Ácido ariloxialcanóico | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                                 | II                           |                            |   | 0,05                                  |
| Diclorvós              | I                  | Organofosforado        | C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> C <sub>12</sub> O <sub>4</sub> P                               | Ib                           |                            | 0,02                                      |                                       |
| Difenoconazol          | Fg                 | Triazol                | C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>                | III                          |                            | 0,005                                     | 0,01                                  |
| Diflubenzuron          | I                  | Benzoiluréia           | C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                | III                          |                            | 0,02                                      | 0,05                                  |
| Dimetoato              | I                  | Organofosforado        | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>                               | II                           |                            | 0,05                                      |                                       |
| Dinocape               | A / Fg             | Dinitrofenol           | C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>                                | II                           |                            |   | 0,05                                  |
| Dinosebe               | H                  | Dinitrofenol           | C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>                                | n. e.                        |                            |   | 0,01                                  |
| Dinoterbe              | H                  | Dinitrofenol           | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>                                | Ib                           |                            |   | 0,05                                  |
| Dissulfotona           | A / I              | Organofosforado        | C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>3</sub>                                | Ia                           |                            | 0,01                                      | 0,02                                  |
| Dissulfotona sulfona   | A / I (metabólito) | Organofosforado        | C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>                                | Ia                           |                            |   | 0,02                                  |
| Dissulfotona sulfóxido | A / I (metabólito) | Organofosforado        | C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>3</sub>                                | Ia                           |                            |   | 0,02                                  |
| Espiroxamina           | Fg                 | Morfolino              | C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>2</sub>  | II                           |                            |   |                                       |
| Etiona                 | A / I              | Organofosforado        | C <sub>9</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> P <sub>2</sub> S <sub>4</sub>                  |                              |                            |   |                                       |
| Etofumesato            | H                  | Benzofurano            | C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> S   | U                            |                            |   |                                       |
| Etoprofós              | I / N              | Organofosforado        | C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>2</sub>                                | Ia                           |                            | 0,01                                      | 0,01                                  |
| Etoxissulfurom         | H                  | Sulfoniluréia          | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S                              | n. e.                        |                            |   |                                       |
| Etrinifós              | A / I              | Organofosforado        | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> OPS   | n. e.                        |                            |   |                                       |
| Famoxadona             | Fg                 | Oxazol                 | C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>                                | U                            |                            |   | 0,05                                  |
| Fenamidona             | Fg                 | Imidazolinona          | C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> OS  | III                          |                            |   | 0,01                                  |
| Fenamifós              | N                  | Organofosforado        | C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>3</sub> PS   | Ib                           |                            | 0,005                                     | 0,005                                 |
| Fenamifós sulfona      | N (metabólito)     | Organofosforado        | C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>5</sub> PS   | Ib                           |                            |   | 0,005                                 |
| Fenamifós sulfóxido    | N (metabólito)     | Organofosforado        | C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>4</sub> PS   | Ib                           |                            |   | 0,005                                 |
| Fenarimol              | Fg                 | Pirimidina             | C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O                             | III                          |                            |   | 0,02                                  |
| Fenexamida             | Fg                 | Hidroxianilida         | C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>                              | U                            |                            | 0,01                                      | 0,05                                  |
| Fenpropimorfe          | Fg                 | Morfolínico            | C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> NO   | III                          |                            | 0,01                                      | 0,01                                  |
| Fentiona               | I                  | Organofosforado        | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>                               | II                           |                            |   | 0,01                                  |
| Fentiona sulfóxido     | I (metabólito)     | Organofosforado        | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>                               | II                           |                            |   | 0,01                                  |
| Fentoato               | A / I              | Organofosforado        | C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>                               | II                           |                            |   |                                       |

| Agrotóxico            | Classe **              | Grupo Químico                 | Fórmula Molecular   | Classificação toxicológica * | LMR                        |   |                                       |
|-----------------------|------------------------|-------------------------------|---|------------------------------|----------------------------|---|---------------------------------------|
|                       |                        |                               |   |                              | MAPA (mg.L <sup>-1</sup> ) | Codex Alimentarius (mg.kg <sup>-1</sup> ) | União Européia (mg.kg <sup>-1</sup> ) |
| Fipronil              | I                      | Pirazol                       | C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> OS               | II                           |                            | 0,02                                      | 0,005                                 |
| Fipronil sulfona      | I                      | Pirazol                       | C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S | II                           |                            | 0,02                                      | 0,005                                 |
| Fluasifope p-butílico | H                      | Ácido ariloxifenoxipropiônico | C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>                                | III                          |                            |   | 0,1                                   |
| Fludioxonil           | Fg                     | Fenilpirrol                   | C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                   | U                            |                            | 0,01                                      | 0,05                                  |
| Flumetrina            | I                      | Piretróide                    | C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> FNO <sub>3</sub>                              | n. e.                        |                            |   |                                       |
| Fluquinconazol        | Fg                     | Triazol                       | C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>5</sub> O                              | III                          |                            |   | 0,03                                  |
| Fluroxipir            | H                      | Ácido piridinocarboxílico     | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                  | U                            |                            |   | 0,05                                  |
| Flutriafol            | Fg                     | Traizol                       | C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O                               | III                          |                            |   | 0,01                                  |
| Foransulfurom         | H                      | Sulfoniluréia                 | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S.                              | n. e.                        |                            |   |                                       |
| Forato                | A / I / N              | Organofosforado               | C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> PS <sub>3</sub>                                 | Ia                           |                            | 0,01                                      | 0,02                                  |
| Forato sulfóxido      | A / I / N (metabólito) | Organofosforado               | C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>3</sub>                                 | Ia                           |                            |   | 0,02                                  |
| Fosalona              | A / I                  | Organofosforado               | C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> ClNO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>                             | II                           |                            |   | 0,01                                  |
| Fosmete               | A / I / TV             | Organofosforado               | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>                               | II                           |                            |   | 0,05                                  |
| Furatiocarbe          | I                      | Carbamato                     | C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S                               | II                           |                            |   | 0,05                                  |
| Hexaconazol           | Fg                     | Triazol                       | C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O                              | U                            |                            |   |                                       |
| Hexitiazoxi           | A                      | Tiazolidinacarboxamida        | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S                             | U                            |                            |   | 0,02                                  |
| Imazalil              | Fg                     | Imidazol                      | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O                              | II                           |                            |   | 0,05                                  |
| Imidacloprido         | I                      | neonicoticoide                | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>                                | II                           |                            | 0,02                                      | 0,1                                   |
| Indoxacarbe           | I                      | Oxadiazina                    | C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>                | I                            |                            | 0,1                                       | 0,02                                  |
| Iprodiona             | Fg                     | Dicarbimida                   | C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>                 | III                          |                            |   | 0,05                                  |
| Iprovalicarbe         | Fg                     | Carbamato                     | C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                                 | U                            |                            |   |                                       |
| Isoproturon           | H                      | Uréia                         | C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O  | II                           |                            |   |                                       |
| Isoxaflutol           | H                      | Isoxazol                      | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub> S.                             | III                          |                            |   |                                       |
| Linuron               | H                      | Uréia                         | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                  | III                          |                            |   |                                       |
| Malationa             | I                      | Organofosforado               | C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>                                | III                          |                            |   | 0,02                                  |
| Metalaxil             | Fg                     | Fenilamida                    | C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>   | II                           |                            |   | 0,05                                  |
| Metamidofós           | I                      | Organofosforado               | C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>2</sub> PS  | Ib                           | 0,01                       | 0,02                                      |                                       |
| Metazaclor            | H                      | Cloroacetamida                | C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O  | III                          |                            |   | 0,05                                  |
| Meticonazol           | Fg                     | Triazol                       | C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O  | III                          |                            |   | 0,01                                  |
| Metidationa           | I                      | Organofosforado               | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS <sub>3</sub>                  | Ib                           | 0,02                       | 0,001                                     | 0,02                                  |
| Metissulfotom metil   | H (metabólito)         | Sulfoniluréia                 | C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S                               | U                            |                            |   |                                       |
| Metomil               | I                      | Carbamato                     | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S                                | Ib                           | 0,02                       | 0,02                                      | 0,02                                  |
| Mevinfós              | A / I                  | Organofosforado               | C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> P   | Ia                           | 0,05                       |   |                                       |
| Miclobutanil          | Fg                     | Triazol                       | C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>  | II                           |                            | 0,01                                      | 0,01                                  |
| Monocrotofós          | I                      | Organofosforado               | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>3</sub> P  | Ib                           |                            |   |                                       |
| Monolinuron           | H                      | Uréia                         | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                | III                          |                            |   | 0,05                                  |

| Agrotóxico                   | Classe ** | Grupo Químico      | Fórmula Molecular   | Classificação toxicológica * | LMR                        |   |                                       |
|------------------------------|-----------|--------------------|---|------------------------------|----------------------------|---|---------------------------------------|
|                              |           |                    |   |                              | MAPA (mg.L <sup>-1</sup> ) | Codex Alimentarius (mg.kg <sup>-1</sup> ) | União Européia (mg.kg <sup>-1</sup> ) |
| Ometoato                     | I         | Organofosforado    | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>4</sub> PS   | Ib                           |                            |   |                                       |
| Oxamil                       | I         | Carbamato          | C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S                                | Ib                           | 0,05                       | 0,02                                      |                                       |
| Oxassulfurom                 | H         | Sulfoniluréia      | C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S                               | n. e.                        |                            |   |                                       |
| Oxifluorfem                  | H         | Difenil éter       | C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>                              | U                            |                            |   | 0,05                                  |
| Parationa etílica            | A / I     | Organofosforado    | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>3</sub> PS  | Ia                           | 0,02                       |   | 0,05                                  |
| Pencicuron                   | Fg        | Feniluréia         | C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O  | U                            |                            |   | 0,05                                  |
| Penconazol                   | Fg        | Traizol            | C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub>                                | III                          |                            | 0,01                                      | 0,01                                  |
| Pendimetalina                | H         | Dinitroanilina     | C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>                                 | II                           |                            |   | 0,05                                  |
| Picolinafen                  | H         | Piridínico         | C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> F <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                  | n. e.                        |                            |   |                                       |
| Pimetrozina                  | I         | Triazina           | C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O  | III                          |                            |   | 0,01                                  |
| Piraclostrobina              | Fg        | Metoxicarbamto     | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>                               | n. e.                        |                            | 0,03                                      | 0,01                                  |
| Pirazofós                    | Fg        | Fosforotiolato     | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> PS                              | II                           |                            |   | 0,01                                  |
| Piridaben                    | I         | Organoclorado      | C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> OS   | II                           |                            |   | 0,02                                  |
| Piridato                     | H         | Fenilpiridazina    | C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S                             | III                          |                            |   | 0,05                                  |
| Primetanil                   | Fg        | Anilino pirimidina | C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub>  | III                          |                            | 0,01                                      |                                       |
| Pirimicarbe                  | I         | Carbamato          | C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>                                 | II                           |                            | 0,01                                      | 0,05                                  |
| Pirimifós etil               | A / I     | Organofosforado    | C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS                              | n. e.                        | 0,02                       |   |                                       |
| Pirimifós metil              | A / I     | Organofosforado    | C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS                              | II                           | 0,05                       | 0,01                                      | 0,05                                  |
| Procloraz                    | Fg        | Imidazol           | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>                 | II                           |                            | 0,05                                      | 0,02                                  |
| Profam                       | H / R     | Carbamato          | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>   | U                            |                            |   | 0,05                                  |
| Profenofós                   | I         | Organofosforado    | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> BrClO <sub>3</sub> PS   | II                           |                            | 0,01                                      | 0,05                                  |
| Propargito                   | H         | Éster sulfito      | C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> S  | III                          |                            | 0,1                                       | 0,1                                   |
| Propiconazol                 | Fg        | Traizol            | C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>                 | II                           |                            | 0,01                                      | 0,01                                  |
| Propizamida                  | H         | Benzimidazol       | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO  | U                            |                            |   | 0,01                                  |
| Propoxur                     | I         | Carbamato          | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>   | II                           | 0,05                       |   | 0,05                                  |
| Prossulfuron                 | H         | Sulfoniluréia      | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S                | n. e.                        |                            |   |                                       |
| Quinalfós                    | A / I     | Organofosforado    | C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS                              | II                           |                            |   |                                       |
| Tebuconazol                  | Fg        | Triazol            | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O  | II                           |                            | 0,01                                      | 0,05                                  |
| Tebufenozida                 | I         | Diacilhidrazina    | C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                 | III                          |                            |   | 0,05                                  |
| TEPP (tetraetil pirofosfato) | A / I     | Organofosforado    | C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub>                                  | n. e.                        |                            |   |                                       |
| Tiabendazol                  | Fg        | benzimidazol       | C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S   | III                          |                            | 0,2                                       |                                       |
| Tiacloprido                  | I         | Neonicotóide       | C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> S   | II                           |                            | 0,05                                      | 0,03                                  |
| Tiametoxam                   | I         | Neonicotóide       | C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S                              | III                          |                            |   | 0,02                                  |
| Tifensulfurom metil          | H         | Sulfoniluréia      | C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>                  | U                            |                            |   |                                       |
| Tiodicarbe                   | I         | Carbamato oxima    | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>3</sub>                  | II                           |                            |   |                                       |
| Tiofanato metílico           | Fg        | Benzimidazol       | C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>                  | U                            |                            |   | 0,05                                  |
| Tolilfluanaida               | Fg        | Fenilsulfamida     | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> | Ib                           |                            |   | 0,02                                  |

| Agrotóxico       | Classe ** | Grupo Químico   | Fórmula Molecular   | Classificação toxicológica * | LMR                        |   |                                       |
|------------------|-----------|-----------------|---|------------------------------|----------------------------|---|---------------------------------------|
|                  |           |                 |   |                              | MAPA (mg.L <sup>-1</sup> ) | Codex Alimentarius (mg.kg <sup>-1</sup> ) | União Européia (mg.kg <sup>-1</sup> ) |
| Triadimefon      | Fg        | Triazol         | C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>               | II                           |                            | 0,01                                      | 0,01                                  |
| Triadimenol      | Fg        | Traizol         | C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>               | II                           |                            | 0,01                                      |                                       |
| Triassulfurom    | H         | Sulfoniluréia   | C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S             | U                            |                            |   |                                       |
| Triazofós        | I / A / N | Organofosforado | C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS              | Ib                           |                            |   | 0,01                                  |
| Triclorfon       | I         | Organofosforado | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P                | II                           |                            |   | 0,1                                   |
| Tridemorfe       | Fg        | Morfolina       | C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> NO  | II                           |                            |   | 0,05                                  |
| Trifloxistrobina | Fg        | Oximinoacetato  | C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>  | III                          |                            | 0,02                                      | 0,01                                  |
| Triforin         | Fg        | Piperazina      | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | U                            |                            |   | 0,05                                  |

\*\*Classes:

A: Acaricida; F: Formicida; Fg.: Fungicida; H: Herbicida; I: Inseticida; N: Nematicida; R: Regulador do crescimento; TV: tratamento veterinário.

\*Classificação Toxicológica

n.e.: não encontrado

Fontes: Brasil, 2010; FOOT Print, 2011; Brasil, 2011; EC, 2011; Codex Alimentarius, 2011.

### III.4 Otimização do sistema de detecção de massas

A otimização das condições de MS/MS, escolha do modo de ionização dos padrões de agrotóxicos, identificação do íon precursor/pai e dos íons produtos/filhos, a seleção do potencial de declusterização (DP), da energia de colisão (CE) e do potencial de saída da célula de colisão (CXP, do inglês “*Collision Cell Exit Potential*”), mais favoráveis para a análise dos agrotóxicos alvo, foram realizadas através da infusão das soluções individuais de cada agrotóxico no espectrômetro de massas, em ambos os modos de detecção, positivo e negativo. As soluções de infusão, de cada agrotóxico, foram obtidas por diluição das soluções estoque até a concentração de  $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , em uma mistura de metanol / água / acetato de amônio  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  na seguinte proporção, 4:3:3. A otimização foi conduzida no modo semi-automático para todos os compostos. O controle do sistema analítico, a aquisição e o tratamento de dados foram executados através do software Analyst versão 1.5.1.

Um espectrometro de massas *Triple Quad 5500* equipado com fonte de ionização *electrospray* (ESI) ortogonal foi empregado. *Curtain* gás e o gás nebulizador foram nitrogênio gerado por um gerador de nitrogênio da Peak Scientifics Instruments Ltda. Os experimentos foram conduzidos em uma faixa de massas de 50-1000  $m/z$ .

#### III.4.1 Otimização dos parâmetros da fonte de ionização

A otimização dos parâmetros da fonte de ionização ESI foi executada por meio da análise por injeção de fluxo (FIA do inglês “*flow injection analysis*”). As condições de operação ótimas foram determinadas para um fluxo de fase móvel de  $0,5 \text{ mL/min}$ .

Após a escolha destas condições foram selecionadas duas diferentes transições íon precursor-íon filho para cada agrotóxico. Uma para a quantificação, denominado íon quantificador, e outro para confirmação ou qualificação, denominado íon qualificador. Estes íons foram monitorados empregando o modo *full scan* ou *schedule-time*, empregando o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês “*multiple reaction monitoring*”).

### III.5 Otimização das condições cromatográficas

Sendo a fonte de íons ESI um método de ionização extremamente suave, acompanhada por muito pouca fragmentação dos íons moleculares formados, esta técnica é especialmente susceptível a efeitos de interferentes que por ventura estejam presentes no extrato da amostra. Um dos principais efeitos que pode ocorrer é a supressão do sinal do analito provocada pela concorrência de carga entre eletrólitos. Este fenômeno é um grande problema na ESI e pode, na prática, impedir a análise aprofundada de misturas complexas se pré-fracionamento cromatográfico não é aplicado. Estes fenômenos de concorrência de carga, bem como o sinal do analito apresentam forte dependência das condições experimentais, tais como pH, composição da fase móvel, concentração de sais e complexidade do extrato da matriz.

Para minimizar o risco de gerar resultados equivocados, a utilização de um sistema de separação cromatográfica eficiente e de metodologia de extração que minimize a presença de interferentes é de fundamental importância no planejamento do desenvolvimento de um método quantitativo. Isto se torna ainda mais crítico quando se trata de um método multirresíduos.

### III.5.1 Seleção da coluna cromatográfica

A coluna cromatográfica a ser empregada no processo de pré-fracionamento do extrato é um item crítico do processo. Neste trabalho foram avaliadas quando ao desempenho na separação de agrotóxicos duas colunas de diferentes fabricantes disponíveis no Laboratório de Pesticidas do LANAGRO-MG. São elas:

- Shim-Pack XR-ODS II (2,0 x 100 mm, 2,2  $\mu\text{m}$ ) da Shimadzu.
- Synergi Fusion-RP (50 x 2,0 mm; 2,5  $\mu\text{m}$ ) da Phenomenex.

As colunas foram avaliadas quanto ao perfil do cromatograma total obtido a partir da injeção de uma solução de concentração 0,1  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  contendo todos os analitos a serem estudados. As injeções foram realizadas no sistema LC-MS/MS sob as seguintes condições: fluxo 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; volume de injeção 2  $\mu\text{L}$ ; temperatura do forno de coluna 60  $^{\circ}\text{C}$ ; temperatura do amostrador automático 20 $^{\circ}\text{C}$ . Estas condições foram estabelecidas internamente pelo laboratório e são empregadas nos métodos validados e estudos realizados em matrizes de origem vegetal. A composição da fase móvel empregada foi adaptada do trabalho de Kovalczuk et al.(2008) e é apresentada na Tabela 12.

**Tabela 10.** Composição da fase móvel para o teste de desempenho de coluna.

| Tempo (min) | % Acetato de amônio 10 mM / 0,1% ácido fórmico aquoso | % Metanol |
|-------------|---|-----------|
| 0,0         | 65  | 35        |
| 2,5         | 65  | 35        |
| 7,5         | 20  | 80        |
| 9,5         | 20  | 80        |
| 12,0        | 90  | 10        |
| 12,0        | 90  | 10        |

### III.5.2 Otimização da separação cromatográfica

A otimização da separação cromatográfica foi desenvolvida com base em três parâmetros: a composição da fase móvel, o fluxo de fase móvel através do sistema cromatográfico e a temperatura do forno de coluna.

Foram testadas, inicialmente, três composições diferentes para a fase móvel estabelecidas através de modificações da mistura de eluentes empregada nos experimentos que determinaram a escolha da coluna cromatográfica, Tabelas 13, 14 e 15.

Em todos os experimentos a fase móvel foi composta por uma fração aquosa, e outra orgânica. A fração aquosa foi composta de uma mistura de uma solução aquosa de acetato de amônio 10  $\text{mmol/L}$  acidificada com 0,01% de ácido fórmico, denominada Solução A, preparada como segue:

- pesar 0,770 g de acetato de amônio em um béquer;
- transferir, quantitativamente o conteúdo do béquer para um balão volumétrico de 1 L;
- acrescentar 100  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico;
- avolumar com água ultra pura até 1 L;
- armazenar em frasco âmbar de borossilicato de 1L

A Solução A foi misturada à fase orgânica, composta de metanol, durante a corrida cromatográfica conforme indicado nas Tabelas 13, 14 e 15, de modo a obter o melhor desempenho para o conjunto de parâmetros de avaliação previamente estabelecidos. As injeções foram do *pool* de analitos de concentração 0,1  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  foram realizadas sob fluxo de 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e temperatura do forno de coluna de 60  $^{\circ}\text{C}$ ,

com volume de injeção foi de 2  $\mu\text{L}$ . O tempo total de corrida foi de 13,0 min.

Neste ensaio, os padrões de agrotóxicos foram injetados em quadruplicata e o resultado foi avaliado quanto ao perfil de resposta cromatográfica para o cromatograma total de todos os padrões de agrotóxicos estudados (Tabela 11).

**Tabela 11.** Composição do gradiente de fase móvel A

| Tempo (min) | Solução de acetato de amônio 10 mmol/L acidificada a 0,01 % com ácido fórmico (%) | Metanol (%) |
|-------------|---|-------------|
| 1.00        | 60  | 40          |
| 8.00        | 30  | 70          |
| 9.00        | 10  | 90          |
| 11.00       | 10  | 90          |
| 11.50       | 60  | 60          |
| 13.00       | 60  | 60          |

**Tabela 12.** Composição do gradiente de fase móvel B

| Tempo (min) | Solução de acetato de amônio 10 mmol/L acidificada a 0,01 % com ácido fórmico (%) | Metanol (%) |
|-------------|---|-------------|
| 1.00        | 60  | 40          |
| 6.00        | 20  | 80          |
| 11.00       | 10  | 90          |
| 11.50       | 60  | 40          |
| 13.00       | 60  | 40          |

**Tabela 13.** Composição do gradiente de fase móvel C

| Tempo (min) | Solução de acetato de amônio 10 mmol/L acidificada a 0,01 % com ácido fórmico (%) | Metanol (%) |
|-------------|---|-------------|
| 1.00        | 50  | 50          |
| 7.00        | 20  | 80          |
| 11.00       | 10  | 90          |
| 11.50       | 50  | 50          |
| 13.00       | 50  | 50          |

Segundo o documento SANCO/10684/2009 e o guia de validação “*in house*” da IUPAC

(Thompson et al., 2002), a razão sinal/ruído (S/R) mínima para diferenciação inequívoca do sinal do analito dos sinais de interferentes é 3:1. Os cromatogramas totais das transições  $m/z$  obtidos foram avaliados quanto ao formato dos picos, resolução cromatográfica, e razão sinal/ruído para 20 agrotóxicos selecionados dentre aqueles que compõem o escopo de estudo deste trabalho (Tabela 16).

**Tabela 14.** Agrotóxicos selecionados para a realização dos experimentos piloto.

|                       |                      |                  |
|-----------------------|----------------------|------------------|
| 3-hidroxi carbofurano | clorpirifós          | iprodiona        |
| acefato               | diazinona            | ometoato         |
| aldicarbe             | dissulfo-tona        | piraclos-trobina |
| azoxistro-bina        | etiona               | propiconazol     |
| bifentrina            | famoxadona           | tebucona-zol     |
| carbaril              | flusifope p-butílico | triadime-nol     |
| carbofura-no          | imidaclo-prido       |                  |

### III.6 Comparação de metodologias de extração de resíduos de agrotóxicos

Foram comparadas quatro metodologias de extração distintas. Duas empregando como solvente extrator acetoneitrila com diferentes etapas de *clean up*, uma empregando metanol e outra acetato de etila como solventes extratores. O experimento piloto foi realizado empregando-se uma curva analítica preparada por diluições do *pool* de agrotóxicos de concentração 4,0  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  em acetoneitrila e por ensaios de recuperação em dois níveis de concentração 10,0 e 50,0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Para cada nível foram produzidas seis replicatas verdadeiras (amostra fortificada e submetida a todo o processo de extração), cada replicata foi lida no sistema de detecção apenas uma vez. Os resultados foram avaliados quanto à porcentagem de recuperação (Rec%) e ao coeficiente de variação (CV%). Neste experimento foram avaliados os mesmo padrões de agrotóxicos listados na Tabela 16.

A curva de analítica foi construída com os seguintes níveis de concentração 5,0; 10,0;

20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 100,0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  em acetonitrila, para uniformizar os resultados de recuperação e simplificar o experimento.

Os métodos de extração avaliados, denominados Métodos A, B, C e D, respectivamente, são descritos sucintamente a seguir:

### III.6.1 Método A

Baseado no método desenvolvido por Salste et al. (Salste, 2010), emprega como solvente extrator acetato de etila e não possui etapa de *clean up*. A Figura 19 mostra o fluxograma da marcha analítica do método proposto por Salste.

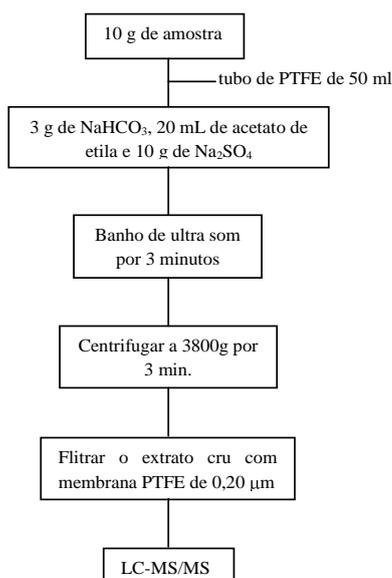


Figura 19. Marcha analítica do Método A.

### III.6.2 Método B

Metodologia semelhante ao método QuEChERS (Anastassiades et al., 2003), adaptada por Dagnac et al. (2009), que emprega metanol como solvente extrator. Além da substituição da acetonitrila por

metanol, outra alteração em relação ao método QuEChERS é a inclusão de uma etapa de secagem adicional do extrato com a utilização de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . A Figura 20 apresenta o fluxograma da marcha analítica do método.

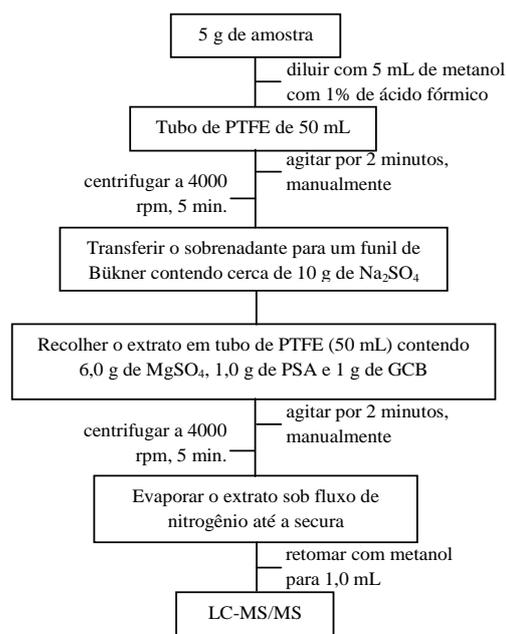


Figura 20. Marcha analítica do Método B.

### III.6.3 Método C

Este método fundamenta-se no método QuEChERS com modificações desenvolvidas internamente pelo Laboratório de Pesticidas do LANAGRO-MG para matrizes de origem vegetal. Foi introduzida uma etapa adicional no método que consiste em deixar os extratos, obtidos após a segunda adição de sulfato de magnésio, em repouso a uma temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por, no mínimo, 2 horas. Tipicamente não há etapa de *clean up* com utilização de reagentes. A marcha analítica do método C é mostrada na Figura 21.

#### 6.4 Método D

Este método foi adaptado do trabalho de Stolker et al.(2008). O método emprega acetonitrila como solvente extrator e, na

etapa de *clean up*, utiliza extração em fase sólida (SPE) além da troca do solvente de acetonitrila para metanol ao final do processo. A marcha analítica do método esta esquematizada na Figura 22.

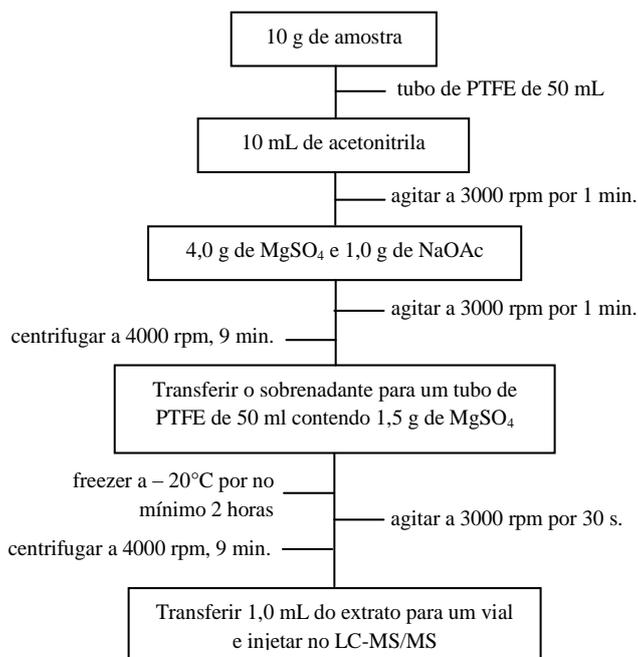


Figura 19. Marcha analítica do Método C.

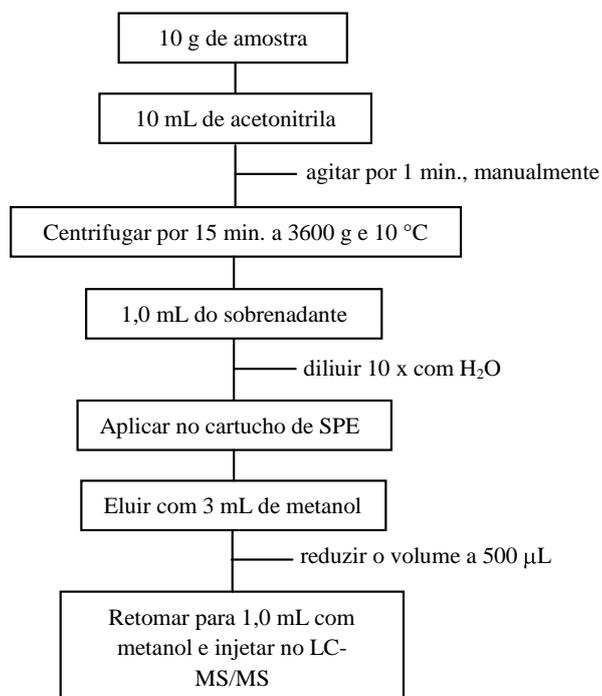


Figura 22 Marcha analítica do Método D. O cartucho de SPE foi inicialmente condicionado com uma mistura de 3 mL de metanol e 3,0 mL de água. e finalmente lavado com 3,0 mL de água.

---

### **III.7 Validação do Método QuEChERS modificado (Método C) para determinação / quantificação de resíduos de agrotóxicos em leite**

#### **III.7.1 Seletividade**

Os estudos de seletividade foram realizados concomitantemente com os ensaios de linearidade. Empregando as mesmas condições experimentais (experimento único) e os dados obtidos pelo ensaio para avaliação da seletividade para as amostras brancas de matriz e de reagentes. Os cromatogramas obtidos foram avaliados quanto à presença de sinais dos íons monitorados para cada um dos agrotóxicos ensaiados nos estudos de validação (Tabela 11).

#### **III.7.2 Estudos de linearidade**

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas a partir das soluções preparadas no item **Preparação de pools de trabalho**, tanto em solvente, quanto no extrato de leite, nas concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Todos os níveis de concentração foram preparados em três replicatas verdadeiras. As amostras apresentadas ao sistema LC-MS/MS consistiram de: um branco de matriz, um branco de reagentes, metanol, três replicatas de cada de concentração preparadas em extrato de matriz branca e três replicatas de cada nível de contração preparadas em metanol. As injeções foram feitas de forma aleatória a fim de eliminar possíveis efeitos de memória que são muito comuns quando se injetam níveis de concentração distintos de modo seqüencial, minimizando o risco de se chegar a conclusões errôneas. Cada nível de concentração foi injetado duas vezes. Posteriormente, realizaram-se as inspeções visuais das curvas analíticas obtidas, os cálculos da média das áreas dos picos cromatográficos através da integração dos

mesmos, equação da curva analítica bem como do coeficiente de determinação ( $r^2$ ), e análise dos resíduos para avaliação da linearidade e, finalmente, estabelecida a faixa linear de trabalho.

#### **III.7.3 Análise dos Solventes e Reagentes pelo Método de Extração Quechers modificado**

Este procedimento tem a finalidade de verificar a pureza dos solventes e reagentes utilizados, com relação à contaminações com resíduos dos pesticidas estudados. Consiste em realizar todo o procedimento normal de extração das amostras, porém sem a presença da matriz leite e, conseqüentemente, sem a fortificação dessa matriz. O extrato assim obtido é denominado branco de reagentes.

Adicionou-se, através de *dispenser*, 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético, em cada tubo de PTFE com tampa rosqueada (capacidade de 50 mL), e após fechá-los, efetuou-se agitação em vortex a 3000 rpm por 1 min.

Em seguida, acrescentou-se 4,0 e 1,0 g, respectivamente, de sulfato de magnésio anidro e acetato de sódio anidro (tendo-se o cuidado para que esses sólidos não ficassem nas bordas superiores dos tubos, prejudicando o contato com o líquido). Repetiu-se a agitação em vortex, assegurando-se da completa interação entre o extrato líquido e os reagentes sólidos.

Logo após, os tubos tampados foram levados para centrifugação a 4000 rpm, por 9 minutos, e posteriormente transferiu-se o extrato líquido para outro tubo idêntico, já contendo 1,5 g de sulfato de magnésio anidro, sendo novamente agitados a 3000 rpm por 30 s, e também centrifugados como citado anteriormente.

### III.7.4 Ensaios de Fortificação e Extração com o Método QuEChERS para Avaliação da Recuperação

Os ensaios de fortificação e de recuperação têm por objetivo a avaliação da exatidão do método como um todo, uma vez que se calcula a concentração real medida, no final de todo o procedimento, em comparação com a concentração conhecida adicionada inicialmente na matriz. Assim, através das recuperações obtidas dos pesticidas, pode-se avaliar a exatidão do método, e através dos CV% calculados, obtêm-se informações a cerca da repetitividade (precisão) dos dados obtidos.

Exatidão foi investigada por meio da média de recuperação aparente obtida para as seis replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. Os critérios adotados para considerar os resultados como satisfatórios foram recuperações de 70 % a 120 % (SANCO, 2010).

Este procedimento de fortificação foi realizado seis vezes ( $n = 6$ ), para cada nível de fortificação (5 níveis), e também para leite “branco”, que é aquele sem a adição dos agrotóxicos, para verificação da real ausência desses compostos na matriz. Este extrato da matriz é chamado de branco de matriz e também foi utilizado para o preparo das soluções analíticas, quando em extrato da matriz.

Os ensaios foram repetidos mais duas vezes, por pelo menos dois analistas diferentes, a fim de permitir a determinação de precisão intermediária e reprodutibilidade do método, totalizando três dias de validação.

#### III.7.4.1 Fortificação antes da Etapa de Extração

Mediu-se  $10,00 \pm 0,01$  g de leite, diretamente em tubos de PTFE com tampa rosqueada (capacidade de 50 mL), e logo

após, efetuou-se a fortificação, utilizando-se micropipetas calibradas. Os níveis de concentração empregados neste estudo, a concentração do *pool* de trabalho (contendo os agrotóxicos a serem analisados (Tabela 11) e os volumes adicionados a cada amostra são apresentados na Tabela 17.

Tabela 15. Preparo das amostras fortificadas.

| Nível de fortificação ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Massa amostra (g) | Conc. do pool ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) | Volume adicionado do pool ( $\mu\text{L}$ ) |
|---|-------------------|---|---|
| 1,00  | 10,0              | 5,0                                       | 20,0  |
| 1,25  | 10,0              | 5,0                                       | 25,0  |
| 1,50  | 10,0              | 5,0                                       | 30,0  |
| 1,75  | 10,0              | 5,0                                       | 35,0  |
| 2,00  | 10,0              | 5,0                                       | 40,0  |

Após as fortificações, os tubos foram tampados e levados ao ultra-som por 10 min. Para garantir a completa absorção dos agrotóxicos pela matriz. Após este período, adicionou-se, através de *dispenser*, 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético, em cada tubo, e após fechá-los efetuou-se agitação em vortex (3000 rpm, 1 min). Em seguida, acrescentou-se 4,0 e 1,0 g, respectivamente, de sulfato de magnésio anidro e acetato de sódio anidro (cuidou-se para que estes sólidos não ficassem nas bordas superiores dos tubos, prejudicando o contato com o líquido). Repetiram-se as agitações, assegurando-se da completa interação entre o extrato líquido e os reagentes sólidos.

Em seguida, os tubos tampados foram levados para centrifugação a 4000 rpm, durante 9 minutos, e posteriormente transferiu-se, com auxílio de micropipeta, o extrato líquido para outro tubo idêntico, já contendo outros 1,5 g de sulfato de magnésio anidro, sendo novamente agitados a 3000 rpm, por cerca de 30 segundos. Os tubos foram então deixados em repouso, em freezer a  $-20$  °C, por 3 horas. Em seguida foram centrifugados a 4000 rpm por 9 minutos.

Alíquotas de 1,0 mL do extrato final foram transferidas, com o auxílio de micropipetas,

para *vials* e levados diretamente para a análise por LC-MS/MS.

### III.7.5 Preparação dos extratos para a construção da curva analítica

Para a construção da curva analítica foram injetados seis níveis de concentração em 6 replicadas cada correspondendo respectivamente a 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; 20,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , obtido conforme procedimento descrito a seguir.

Foram empregados na construção da curva analítica 10 extratos brancos obtidos conforme descrito no item 7.3.1, exceto pela não adição de padrões antes do procedimento de extração.

Para os estudos de validação, todas as soluções foram preparadas de maneira independente. Alíquotas de 1,00 mL do extrato branco foram transferidas para tubos de centrifuga tipo Ependorf® de 2,5 mL e evaporadas até cerca de 0,5 mL utilizando centrifuga de evaporação, a uma temperatura não superior a 35 °C. A cada alíquota foi adicionado o volume requerido de solução padrão para a obtenção de uma curva matrizada nos níveis mostrados na Tabela 18. O volume final foi completado para 1,0 mL com extrato branco de matriz. Todos os níveis foram preparados em três replicatas, com duas leituras por nível, totalizando seis leituras por nível de concentração da curva analítica.

**Tabela 16.** Preparo da curva de calibração matrizada.

| Concentração ( $\mu\text{g/kg}$ ) | Volume final solução (mL) | Conc. do pool (ng/ $\mu\text{L}$ ) | Vol. sol. padrão adicionada ( $\mu\text{L}$ ) |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------------------------|---|
| 5,0                               | 1,00                      | 0,20                               |   |
| 7,5                               | 1,00                      | 0,20                               |   |
| 10,0                              | 1,00                      | 0,20                               |   |
| 12,5                              | 1,00                      | 0,20                               |   |
| 15,0                              | 1,00                      | 0,50                               |   |
| 17,5                              | 1,00                      | 0,50                               |   |
| 20,0                              | 1,00                      | 0,50                               |   |

### III.7.6 Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do instrumento e do método

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas de cada um dos agrotóxicos estudados, procedeu-se à determinação da estimativa do LD do instrumento (LDi), bem como do LQ do instrumento (LQi). (Thompson et al., 2002).

Com os valores das áreas das respostas instrumentais para cada replicata, por nível de concentração e, do RSD% ( $n = 6$ ), de cada composto presente nas amostras ensaiadas, aplicando-se a Equação 22, obteve-se a estimativa do LDi, em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

$$\text{LDi} (\mu\text{g kg}^{-1}) = 3 \times \text{RSD} \times \text{C} \quad \text{Equação 22}$$

onde:

RSD: Desvio padrão relativo das áreas obtidas;

C: Nível de concentração.

A partir do LDi, aplicando-se a Equação 23, obtém-se o LQi.

$$\text{LQi} (\mu\text{g kg}^{-1}) = \text{LDi} \times 3,33 \quad \text{Equação 23}$$

Os valores de  $\text{LD}_m$  do método e  $\text{LQ}_m$  do método foram determinados experimentalmente. Tomou-se como  $\text{LD}_m$  o menor nível de concentração para o qual houve detecção inequívoca das duas transições do analito nas amostras adicionadas de padrão, empregadas na construção da curva analítica. Distinguindo de zero (sinal da amostra adicionada / ruído da amostra branca  $\geq 3$ ), mas não necessariamente quantificada. O  $\text{LQ}_m$  será a menor concentração que, ao ser fortificado na matriz, apresentar recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20%.

Estes limites foram determinados com base nos resultados médios de recuperações e

CV% obtidos para as replicatas de amostras adicionadas nos diferentes níveis de concentração estudados no primeiro dia de validação.

### **III.8 Determinação da incerteza de medição**

Os ensaios de quantificação da incerteza de medição associada à determinação/quantificação de cada analito foram realizados através dos dados gerados pelos quatro dias de validação. Preliminarmente foram levantadas, através do diagrama de causa e efeito, ou diagrama de Hishikawa (EURACHEM/CITAC, 2002), as principais fontes de incerteza do método. Baseando-se nos parâmetros levantados pelo diagrama de causa e efeito, os dados dos ensaios de validação foram tratados e a incerteza de medição do método determinada para cada agrotóxico individualmente.

## **IV RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **IV.1 Otimização do sistema de detecção de massas**

A etapa inicial da infusão consistiu na determinação do íon precursor (íon pai) para cada padrão. Este íon é obtido através da formação de um aduto entre a molécula neutra do agrotóxico e um dos seguintes íons  $H^+$ ,  $NH_4^+$  ou  $Na^+$ , em modo ESI+, e  $H^-$  em do ESI-, gerando uma espécie carregada de massa igual a massa molecular do agrotóxico somada à massa do íon  $[M + \text{massa do íon}]^+ \text{ ou }^-$ . A seleção do íon precursor foi baseada na intensidade do mesmo em um espectro de massas em “full scan” obtido no primeiro quadrupolo (Q1). Neste experimento foram estabelecidos os valores da energia de declusterização (DP) característica de cada composto através da infusão individual de cada um dos

agrotóxicos estudados no desenvolvimento do método (Tabela 11).

Os íons produzidos pela fragmentação do íon precursor no segundo quadrupolo (Q2), íons produto, foram otimizados em modo semi automático no qual foram selecionados os cinco íons mais intensos. Cada um dos íons foi otimizado em relação à energia de colisão (CE) e ao potencial de saída da célula de colisão (CXP), que são responsáveis pela ótima fragmentação do íon pai no Q2 e sua posterior passagem pelo terceiro quadrupolo (Q3). Os resultados experimentais obtidos para os valores de Dp, CE e CXP para cada um dos agrotóxicos infundidos são apresentados na Tabela 19.

Os parâmetros otimizados para as condições de operação da fonte ESI foram estabelecidos através do experimento FIA: voltagem do capilar de *electrospray* (IS), 5500 V; *curtain gas*, 20 psi; gás nebulizador (GS 1) 30 psi; gás auxiliar (GS 2) 30 psi, temperatura da *probe* de 550 °C e potencial de entrada (EP) 10 V. O gás de colisão (CAD) foi otimizado a 8 psi. Estes parâmetros aplicam-se a ambos os modos de ionização ESI+ e ESI-.

O número de transições  $m/z$  para cada composto deve ser tal que permita a identificação inequívoca do mesmo. A Diretiva 2002/657 (DIRECTIVE 657, 2002) estabelece um sistema de pontuação, quando se emprega a técnica de detecção de íons por MRM em espectrometria de massas, que leva em consideração o número de íons gerados de acordo com a técnica empregada. Para a LC-MS/MS é atribuído 1,0 ponto para cada íon pai e 1,5 pontos para cada íon filho selecionado. A diretiva estabelece ainda que deve-se atingir um número mínimo de 4 pontos de identificação para garantir a confiabilidade dos resultados analíticos. Desta forma, foram selecionados, no mínimo, um íon pai e dois íons filhos para cada um dos

compostos estudados. Um número maior de transições  $m/z$  poderia ser selecionado, somando mais pontos de identificação por agrotóxico, contudo, este procedimento comprometeria a resolução do sinal já que o sistema de detecção estaria monitorando um número elevado de transições em um pequeno intervalo de tempo. Assim, a escolha de duas transições por íon pai permite otimizar o sistema de detecção de massas e a resolução dos sinais.

A injeção do *pool* de agrotóxicos sob as condições otimizadas acima e nas condições de cromatografia estabelecidas na Tabela 12 possibilitou que, das cinco transições  $m/z$  geradas na infusão fossem selecionadas as duas (íon precursor-íon filho) mais intensas e com melhor resposta cromatográfica. A mais intensa será empregada como íon quantificador, e a segunda, como íon qualificador.

**Tabela 17.** Condições operacionais e transições MRM (1ª transição/quantificadora e a 2ª transição/qualificadora) utilizadas no desenvolvimento e validação do método.

a) Agrotóxicos otimizados em modo positivo (ESI+).

| Composto               | TR (min.)<br>aproximado | Íon precursor | Tipo de íon                         | Íon Produto           | DP (V) | CE (MR1,<br>MR2) (V) | CXP (MR1,<br>MR2) (V) |
|------------------------|-------------------------|---------------|-------------------------------------|-----------------------|--------|----------------------|-----------------------|
| 1 3-hidroxicarbofurano | 0,76-0,80               | 238,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 163,1 / 181,2         | 82     | (21, 15)             | (4, 2)                |
| 2 Acefato              | 0,45-0,48               | 183,9         | [M + H] <sup>+</sup>                | 143,0 / 125,0 / 95,0  | 51     | (13, 25, 31)         | (12, 10, 12)          |
| 3 Acetamiprido         | 0,74-0,78               | 223,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 126,0 / 73,0          | 51     | (29, 71)             | (12, 8)               |
| 4 Aldicarbe            | 1,18-1,25               | 208,1         | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 116,0 / 88,9          | 51     | (11, 20)             | (3, 3)                |
| 5 Aldicarbe sulfona    | 0,50-0,53               | 223,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 86,1 / 76,1           | 101    | (21, 11)             | (8, 8)                |
| 6 Aldicarbe sulfóxido  | 0,47-0,50               | 207,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 132,0 / 89,0          | 86     | (9, 21)              | (12, 8)               |
| 7 Amitraz              | 9,36-9,90               | 294,2         | [M + H] <sup>+</sup>                | 163,1 / 122,2         | 46     | (21, 43)             | (14, 12)              |
| 8 Aramita              | 7,86-8,27               | 352,0         | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 191,2 / 57,1          | 61     | (17, 35)             | (18, 8)               |
| 9 Azinfós etil         | 5,07-5,33               | 346,0         | [M + H] <sup>+</sup>                | 132,2 / 160,2         | 76     | (23, 15)             | (12, 12)              |
| 10 Azinfós metil       | 3,34-3,52               | 318,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 132,1 / 261,1 / 160,0 | 106    | (23, 9, 11)          | (12, 24, 16)          |
| 11 Azoxistrobina       | 3,99-4,20               | 404,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 371,9 / 343,9         | 101    | (21, 29)             | (34, 34)              |
| 12 Barban              | 4,41-4,64               | 258,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 178,0 / 143,1         | 81     | (13, 27)             | (16, 14)              |
| 13 Benalaxil           | 6,21-6,52               | 326,0         | [M + H] <sup>+</sup>                | 148,0 / 294,0         | 81     | (31, 15)             | (12, 28)              |
| 14 Benfuracarbe        | 7,57-7,96               | 411,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 190,1 / 102,1         | 86     | (17, 43)             | (18, 8)               |
| 15 Benomil             | 0,58-0,62               | 382,1         | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 167,0 / 198,9         | 61     | (18, 38)             | (3, 3)                |
| 16 BF 500-3            | 6,42-6,75               | 358,0         | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 132,1 / 164,1         | 56     | (41, 19)             | (12, 16)              |
| 16 Bifentrina          | 10,94-11,51             | 440,1         | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 181,2 / 166,2         | 66     | (19, 55)             | (16, 16)              |
| 17 Boscalida           | 4,36-4,92               | 343,0         | [M + H] <sup>+</sup>                | 307,0 / 139,9         | 126    | (27, 27)             | (28, 28)              |
| 19 Carbaril            | 1,95-2,05               | 202,2         | [M + H] <sup>+</sup>                | 145,1 / 127,1         | 66     | (15, 39)             | (14, 12)              |
| 20 Carbendazim         | 0,95-1,00               | 192,0         | [M + H] <sup>+</sup>                | 160,1 / 132,1         | 56     | (25, 41)             | (14, 12)              |
| 21 Carbofurano         | 1,75-1,84               | 222,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 165,2 / 123,0         | 70     | (17, 29)             | (2, 2)                |
| 22 Carbossulfano       | 10,21-10,74             | 381,2         | [M + H] <sup>+</sup>                | 118,0 / 160,2         | 72     | (27, 20)             | (3, 3)                |
| 23 Ciazofamida         | 5,25-5,52               | 324,9         | [M + H] <sup>+</sup>                | 108,0 / 261,0         | 66     | (19, 13)             | (10, 24)              |
| 24 Cimoxanil           | 0,91-0,96               | 199,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 128,0 / 110,9         | 96     | (13, 25)             | (12, 12)              |
| 25 Cinidon etílico     | 7,68-8,10               | 410,9         | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 347,9 / 365,9         | 51     | (31, 25)             | (32, 34)              |
| 26 Ciproconazol        | 4,74-5,00               | 292,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 70,1 / 125,0          | 81     | (23, 37)             | (8, 12)               |

| Composto | TR (min.)<br>aproximado | Íon precursor | Tipo de íon | Íon Produto                         | DP (V)        | CE (MR1,<br>MR2) (V) | CXP (MR1,<br>MR2) (V) |          |
|----------|-------------------------|---------------|-------------|-------------------------------------|---------------|----------------------|-----------------------|----------|
| 27       | Ciprodinil              | 5,98-6,28     | 226,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 92,9 / 76,9   | 71                   | (45, 63)              | (34, 34) |
| 28       | Ciromazina              | 0,45-0,48     | 167,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 68,1 / 85,0   | 61                   | (45, 25)              | (8, 8)   |
| 29       | Clorbufan               | 3,86-4,06     | 241,1       | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 172,0 / 154,0 | 51                   | (17, 29)              | (16, 14) |
| 30       | Clorfenvinfós           | 6,53-6,86     | 359,9       | [M + H] <sup>+</sup>                | 155,0 / 99,2  | 111                  | (17, 43)              | (14, 14) |
| 31       | Cloroxuron              | 4,68-4,92     | 291,2       | [M + H] <sup>+</sup>                | 72,0 / 218,0  | 96                   | (53, 33)              | (8, 20)  |
| 32       | Clorpirifós             | 8,13-8,54     | 350,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 97,0 / 197,9  | 91                   | (45, 25)              | (10, 10) |
| 33       | Clorpirifós metil       | 6,77-7,12     | 321,9       | [M + H] <sup>+</sup>                | 125,0 / 289,8 | 106                  | (27, 23)              | (12, 26) |
| 34       | Cresoxim metil          | 5,95-6,26     | 314,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 222,1 / 116,0 | 76                   | (21, 19)              | (20, 10) |
| 35       | Deltametrina            | 9,33-9,80     | 522,9       | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 280,7 / 181,3 | 61                   | (23, 51)              | (26, 26) |
| 36       | Di-alato                | 7,27-7,64     | 271,0       | [M + H] <sup>+</sup>                | 86,1 / 87,1   | 71                   | (21, 21)              | (8, 8)   |
| 37       | Diazinona               | 6,32-6,65     | 305,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 97,0 / 169,1  | 71                   | (49, 31)              | (10,16)  |
| 38       | Diclorvós               | 1,60-1,69     | 223,0       | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 109,0 / 79,0  | 61                   | (23, 37)              | (10, 8)  |
| 39       | Difenoconazol           | 6,63-6,97     | 406,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 250,9 / 337,2 | 96                   | (35, 23)              | (24, 24) |
| 40       | Dimetoato               | 0,78-0,82     | 230,0       | [M + H] <sup>+</sup>                | 125,0 / 198,8 | 71                   | (31, 13)              | (12, 12) |
| 41       | Dissulfotona            | 6,64-6,99     | 275,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 89,1 / 61,1   | 66                   | (19, 45)              | (8, 10)  |
| 42       | Dissulfotona sulfona    | 2,57-2,71     | 307,0       | [M + H] <sup>+</sup>                | 153,0 / 171,0 | 91                   | (17, 17)              | (14, 14) |
| 43       | Dissulfotona sulfóxido  | 2,45-2,58     | 291,0       | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 185,0 / 157,0 | 61                   | (21, 31)              | (18, 18) |
| 44       | Espiroxamina            | 7,30-7,67     | 298,2       | [M + H] <sup>+</sup>                | 144,2 / 100,1 | 61                   | (27, 41)              | (14, 10) |
| 45       | Etiona                  | 7,93-8,34     | 385,0       | [M + H] <sup>+</sup>                | 199,1 / 171,0 | 91                   | (15, 23)              | (18, 18) |
| 46       | Etofumesato             | 3,93-4,14     | 304,1       | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 121,1 / 161,2 | 71                   | (29, 31)              | (12, 12) |
| 47       | Etoprofós               | 5,29-5,57     | 243,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 131,0 / 96,6  | 91                   | (27, 41)              | (12, 10) |
| 48       | Etoxissulfurom          | 1,60-1,69     | 399,0       | [M + H] <sup>+</sup>                | 261,0 / 218,0 | 81                   | (23, 35)              | (24, 20) |
| 49       | Etrinfós                | 5,98-6,29     | 293,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 125,0 / 265,1 | 66                   | (33, 21)              | (12, 12) |
| 50       | Fenamidona              | 4,26-4,48     | 312,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 92,1 / 236,1  | 71                   | (35, 19)              | (8, 22)  |
| 51       | Fenamifós               | 5,58-5,87     | 304,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 217,1 / 202,0 | 11                   | (29, 45)              | (20, 20) |
| 52       | Fenamifós sulfona       | 1,82-1,92     | 336,0       | [M + H] <sup>+</sup>                | 188,0 / 266,0 | 131                  | (39, 27)              | (16, 24) |
| 53       | Fenamifós sulfóxido     | 1,66-1,75     | 320,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 232,9 / 171,1 | 131                  | (33,31)               | (20, 16) |
| 54       | Fenarimol               | 5,07-5,34     | 330,9       | [M + H] <sup>+</sup>                | 268,0 / 139,0 | 101                  | (31, 47)              | (24, 12) |
| 55       | Fenexamida              | 5,13-5,40     | 302,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 97,2 / 55,1   | 116                  | (31, 55)              | (10, 8)  |
| 56       | Fenpropimorfe           | 10,47-11,00   | 304,3       | [M + H] <sup>+</sup>                | 147,1 / 117,1 | 66                   | (37, 73)              | (14, 10) |
| 57       | Fentiona                | 5,97-6,28     | 279,0       | [M + H] <sup>+</sup>                | 247,0 / 169,0 | 58                   | (19, 25)              | (22, 14) |
| 58       | Fentiona sulfóxido      | 1,76-1,85     | 294,9       | [M + H] <sup>+</sup>                | 279,9 / 109,0 | 101                  | (25, 41)              | (26, 10) |
| 59       | Fentoato                | 5,80-6,10     | 321,0       | [M + H] <sup>+</sup>                | 79,1 / 163,1  | 101                  | (51, 17)              | (16, 16) |
| 60       | Fipronil                | 5,66-5,96     | 453,9       | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 368,1 / 255,1 | 56                   | (31,51)               | (34, 34) |
| 61       | Fluasifope p-butílico   | 7,75-8,15     | 384,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 282,0 / 328,0 | 116                  | (29, 23)              | (26, 30) |
| 62       | Flumetrina              | 10,68-11,2    | 527,0       | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 267,0 / 239,0 | 46                   | (21, 31)              | (24, 22) |
| 63       | Fluquinconazol          | 4,92-5,17     | 376,0       | [M + H] <sup>+</sup>                | 307,0-349,0   | 11                   | (33, 33)              | (28, 28) |
| 64       | Flutriafol              | 2,70-2,83     | 302,1       | [M + H] <sup>+</sup>                | 122,9 / 109,0 | 85                   | (35, 43)              | (12, 12) |

|     | <b>Composto</b>     | <b>TR (min.)<br/>aproximado</b> | <b>Íon precursor</b> | <b>Tipo de íon</b>                  | <b>Íon Produto</b>    | <b>DP (V)</b> | <b>CE (MR1,<br/>MR2) (V)</b> | <b>CXP (MR1,<br/>MR2) (V)</b> |
|-----|---------------------|---------------------------------|----------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------|------------------------------|-------------------------------|
| 65  | Foransulfurom       | 0,74-0,78                       | 453,1                | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 182,1 / 272,1         | 86            | (27, 19)                     | (16, 26)                      |
| 66  | Forato              | 2,47-2,60                       | 278,1                | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 97,0 / 171,0          | 21            | (43, 25)                     | (10,16)                       |
| 67  | Forato sulfóxido    | 2,46-2,60                       | 276,9                | [M + H] <sup>+</sup>                | 199,0 / 142,9         | 111           | (13, 27)                     | (18, 12)                      |
| 68  | Fosalona            | 6,54-6,88                       | 367,9                | [M + H] <sup>+</sup>                | 182,0 / 111,0         | 121           | (21, 57)                     | (16, 10)                      |
| 69  | Fosmete             | 3,42-3,59                       | 318,0                | [M + H] <sup>+</sup>                | 133,0 / 130,1 / 160,0 | 96            | (51, 51, 19)                 | (12, 12, 14)                  |
| 70  | Furatiocarbe        | 7,64-8,04                       | 383,2                | [M + H] <sup>+</sup>                | 195,2 / 252,2         | 72            | (17, 24)                     | (3, 3)                        |
| 71  | Hexaconazol         | 6,29-6,61                       | 314,2                | [M + H] <sup>+</sup>                | 70,0 / 159,2          | 86            | (53, 37)                     | (12, 12)                      |
| 72  | Hexitiazoxi         | 8,18-8,60                       | 353,0                | [M + H] <sup>+</sup>                | 228,0 / 168,1         | 61            | (21, 35)                     | (20, 16)                      |
| 73  | Imazalil            | 5,92-6,23                       | 297,0                | [M + H] <sup>+</sup>                | 159,0 / 200,9         | 81            | (29, 23)                     | (14, 14)                      |
| 74  | Imidacloprido       | 0,62-0,66                       | 256,2                | [M + H] <sup>+</sup>                | 175,1 / 209,1         | 66            | (27, 21)                     | (16, 20)                      |
| 75  | Indoxacarbe         | 7,15-7,52                       | 528,0                | [M + H] <sup>+</sup>                | 203,1 / 150,1         | 136           | (59, 31)                     | (18, 14)                      |
| 76  | Iprodiona           | 5,55-5,84                       | 329,9 / 331,9        | [M + H] <sup>+</sup>                | 245,0 / 246,9         | 111           | (21, 21)                     | (22, 22)                      |
| 77  | Iprovalicarbe       | 5,14-5,41                       | 321,2                | [M + H] <sup>+</sup>                | 203,2 / 119,0         | 61            | (23, 12)                     | (3, 2)                        |
| 78  | Isoproturon         | 2,86-3,01                       | 207,3                | [M + H] <sup>+</sup>                | 72,1 / 165,1          | 71            | (23, 19)                     | (8, 14)                       |
| 79  | Linuron             | 3,71-3,90                       | 249,1                | [M + H] <sup>+</sup>                | 159,2 / 182,0         | 76            | (25, 21)                     | (4, 4)                        |
| 80  | Malationa           | 4,48-4,72                       | 330,9                | [M + H] <sup>+</sup>                | 127,1 / 285,1         | 111           | (17, 11)                     | (12, 26)                      |
| 81  | Metaxil             | 3,05-3,21                       | 280,2                | [M + H] <sup>+</sup>                | 220,1 / 192,2         | 66            | (19, 25)                     | (20, 18)                      |
| 82  | Metamidofós         | 0,44-0,47                       | 142,0                | [M + H] <sup>+</sup>                | 93,9 / 124,9          | 76            | (19, 19)                     | (12, 12)                      |
| 83  | Metazaclor          | 2,89-3,04                       | 278,1                | [M + H] <sup>+</sup>                | 134,1 / 210,1         | 51            | (29, 15)                     | (12, 18)                      |
| 84  | Meticonazol         | 6,39-6,72                       | 320,1                | [M + H] <sup>+</sup>                | 70,1 / 125,1          | 96            | (59, 57)                     | (6, 12)                       |
| 85  | Metidationa         | 3,15-3,32                       | 303,0                | [M + H] <sup>+</sup>                | 145,0 / 85,1          | 86            | (13, 29)                     | (14, 8)                       |
| 86  | Metissulfutom metil | 0,57-0,60                       | 383,0                | [M + H] <sup>+</sup>                | 167,1 / 168,1         | 51            | (23, 21)                     | (16, 16)                      |
| 87  | Metomil             | 0,55-0,58                       | 163,1                | [M + H] <sup>+</sup>                | 88,1 / 106,1          | 55            | (13, 13)                     | (3, 3)                        |
| 88  | Mevinfós            | 0,83-0,89                       | 225,1                | [M + H] <sup>+</sup>                | 127,1 / 193,0         | 66            | (21, 11)                     | (12, 16)                      |
| 89  | Miclobutanil        | 4,64-4,88                       | 289,1                | [M + H] <sup>+</sup>                | 70,1 / 125,1          | 91            | (33, 39)                     | (10, 10)                      |
| 90  | Monocrotofós        | 0,54-0,57                       | 224,1                | [M + H] <sup>+</sup>                | 127,0 / 98,0          | 71            | (23, 17)                     | (12, 12)                      |
| 91  | Monolinuron         | 2,16-2,28                       | 215,1                | [M + H] <sup>+</sup>                | 125,9 / 148,0         | 91            | (27, 19)                     | (12, 12)                      |
| 92  | Ometoato            | 0,44-0,47                       | 214,1                | [M + H] <sup>+</sup>                | 183,0 / 125,0         | 56            | (15, 29)                     | (16, 12)                      |
| 93  | Oxamil              | 0,50-0,53                       | 237,1                | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 72,1 / 90,0           | 51            | (25, 11)                     | (8, 10)                       |
| 94  | Oxassulfurom        | 0,70-0,74                       | 407,1                | [M + H] <sup>+</sup>                | 150,1 / 107,1         | 111           | (25, 63)                     | (14, 10)                      |
| 95  | Oxifluorfem         | 7,64-8,04                       | 378,9                | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 315,9 / 237,1         | 36            | (25, 39)                     | (28, 22)                      |
| 96  | Parationa etílica   | 5,66-5,95                       | 292,0                | [M + H] <sup>+</sup>                | 235,9 / 97,0          | 66            | (21, 37)                     | (22, 10)                      |
| 97  | Pencicuron          | 6,72-7,07                       | 329,0                | [M + H] <sup>+</sup>                | 125,0 / 218,0         | 91            | (31, 23)                     | (12, 20)                      |
| 98  | Penconazol          | 5,90-6,21                       | 284,2                | [M + H] <sup>+</sup>                | 70,1 / 159,0          | 66            | (21, 41)                     | (8, 14)                       |
| 99  | Pendimetalina       | 8,15-8,57                       | 282,2                | [M + H] <sup>+</sup>                | 212,1 / 91,0          | 36            | (15, 33)                     | (20, 8)                       |
| 100 | Picolinafen         | 7,71-8,10                       | 377,2                | [M + H] <sup>+</sup>                | 238,3 / 145,0         | 91            | (35, 69)                     | (14, 14)                      |
| 11  | Pimetrozina         | 0,44-0,47                       | 218,0                | [M + H] <sup>+</sup>                | 105,0 / 79,0          | 16            | (25, 47)                     | (12, 12)                      |
| 102 | Piraclostrobina     | 6,46-6,80                       | 388,0                | [M + H] <sup>+</sup>                | 194,1 / 163,1         | 51            | (17, 33)                     | (18, 14)                      |

| Composto                | TR (min.)<br>aproximado | Íon precursor | Tipo de íon                         | Íon Produto   | DP (V) | CE (MR1,<br>MR2) (V) | CXP (MR1,<br>MR2) (V) |
|-------------------------|-------------------------|---------------|-------------------------------------|---------------|--------|----------------------|-----------------------|
| 103 Pirazofós           | 6,51-6,85               | 374,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 222,1 / 194,1 | 91     | (29, 43)             | (20, 20)              |
| 104 Piridaben           | 9,43-9,95               | 365,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 309,1 / 147,2 | 41     | (17, 31)             | (30, 30)              |
| 105 Piridato            | 10,08-10,60             | 379,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 207,1 / 104,1 | 61     | (23, 55)             | (18, 10)              |
| 106 Pirimetanil         | 4,00-4,21               | 200,2         | [M + H] <sup>+</sup>                | 107,1 / 80,0  | 41     | (33, 39)             | (10, 8)               |
| 107 Pirimicarbe         | 2,71-2,84               | 239,2         | [M + H] <sup>+</sup>                | 72,1 / 182,2  | 73     | (34, 21)             | (3, 2)                |
| 108 Pirimifós etil      | 7,85-8,26               | 334,2         | [M + H] <sup>+</sup>                | 198,0 / 182,1 | 61     | (32, 31)             | (18, 18)              |
| 109 Pirimifós metil     | 6,63-6,97               | 306,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 164,1 / 108,1 | 51     | (29, 39)             | (14, 10)              |
| 110 Procloraz           | 6,51-6,85               | 376,0         | [M + H] <sup>+</sup>                | 308,0 / 265,9 | 61     | (17, 25)             | (28, 28)              |
| 111 Profam              | 2,61-2,74               | 180,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 138,1 / 120,1 | 61     | (13, 25)             | (14, 14)              |
| 112 Profenofós          | 7,42-7,81               | 372,9         | [M + H] <sup>+</sup> I              | 302,9 / 97,0  | 126    | (25, 35)             | (28, 28)              |
| 113 Propargito          | 8,56-9,00               | 368,1         | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 231,1 / 175,1 | 41     | (15, 23)             | (20, 16)              |
| 114 Propiconazol        | 6,24-6,57               | 342,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 159,1 / 89,1  | 76     | (37, 99)             | (14, 8)               |
| 115 Propizamida         | 4,36-4,59               | 256,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 190,0 / 173,0 | 61     | (19, 31)             | (16, 16)              |
| 116 Propoxur            | 1,68-1,77               | 210,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 111,0 / 168,1 | 61     | (19, 11)             | (3, 3)                |
| 117 Prossulfuron        | 1,77-1,87               | 419,9         | [M + H] <sup>+</sup>                | 167,1 / 109,1 | 86     | (25, 69)             | (16, 10)              |
| 118 Quinalfós           | 5,73-6,03               | 299,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 163,1 / 147,1 | 61     | (33, 31)             | (14, 14)              |
| 119 Tebuconazol         | 5,98-6,29               | 308,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 70,1 / 125,1  | 71     | (57, 53)             | (8, 12)               |
| 120 Tebufenozida        | 5,73-6,03               | 353,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 133,1 / 297,1 | 56     | (25, 11)             | (12, 28)              |
| 121 TEPP                | 1,26-1,33               | 291,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 179,0 / 99,0  | 76     | (29, 45)             | (16, 10)              |
| 123 Tiabendazol         | 1,20-1,27               | 202,16        | [M + H] <sup>+</sup>                | 175,1 / 131,1 | 116    | (35, 45)             | (16, 12)              |
| 124 Tiacloprido         | 0,80-0,85               | 253,3         | [M + H] <sup>+</sup>                | 126,0 / 186,0 | 101    | (29, 21)             | (12, 12)              |
| 125 Tiametoxam          | 0,54-0,57               | 292,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 211,1 / 181,1 | 76     | (17,31)              | (20, 16)              |
| 126 Tifensulfurom metil | 0,54-0,57               | 388,0         | [M + H] <sup>+</sup>                | 167,1 / 205,0 | 51     | (21, 37)             | (14, 18)              |
| 127 Tiodicarbe          | 2,05-2,16               | 355,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 88,1 / 108,0  | 60     | (27, 21)             | (3, 3)                |
| 128 Tiofanato metílico  | 0,47-0,50               | 342,9         | [M + H] <sup>+</sup>                | 151,1 / 93,1  | 86     | (29, 69)             | (14, 8)               |
| 129 Tolilfluanaida      | 6,02-6,33               | 363,9         | [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 238,0 / 137,1 | 46     | (19, 39)             | (22, 12)              |
| 130 Triadimefon         | 4,67-4,91               | 294,0         | [M + H] <sup>+</sup>                | 197,0 / 225,0 | 66     | (21, 17)             | (18, 20)              |
| 131 Triadimenol         | 4,84-5,09               | 296,1 / 298,0 | [M + H] <sup>+</sup>                | 70,1 / 70,0   | 46     | (31, 33)             | (8, 8)                |
| 132 Triassulfurom       | 0,80-0,85               | 402,0         | [M + H] <sup>+</sup>                | 167,1 / 141,1 | 76     | (23, 27)             | (14, 12)              |
| 133 Triazofós           | 4,80-5,05               | 314,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 97,0 / 65,1   | 81     | (45, 85)             | (10, 10)              |
| 134 Triclorfon          | 0,79-0,84               | 257,0         | [M + H] <sup>+</sup>                | 109,0 / 221,0 | 101    | (23, 15)             | (10, 20)              |
| 135 Tridemorfe          | 11,3-12,0               | 298,3         | [M + H] <sup>+</sup>                | 130,1 / 98,1  | 121    | (35, 37)             | (12, 10)              |
| 136 Trifloxistrobina    | 7,20-7,57               | 409,1         | [M + H] <sup>+</sup>                | 186,1 / 145,1 | 66     | (23, 63)             | (16, 14)              |
| 137 Triforin            | 3,51-3,69               | 434,9         | [M + H] <sup>+</sup>                | 389,8 / 215,1 | 56     | (17, 37)             | (36, 20)              |

**b) Agrotóxicos otimizados em modo negativo (ESI-).**

| Composto  | TR (min.)<br>aproximado | Transição de<br>Quantificação | Tipo de íon          | Transição de<br>Confirmação | DP (V) | CE (MR1,<br>MR2) (V) | CXP (MR1,<br>MR2) (V) |
|-----------|-------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------|----------------------|-----------------------|
| 1 2,4,5-T | 1,97-2,08               | 252,7                         | [M - H] <sup>-</sup> | 195,0 / 158,9               | -15    | (-18, -40)           | (-1, -15)             |
| 2 2,4-D   | 1,17-1,24               | 218,9                         | [M - H] <sup>-</sup> | 160,9 / 125,0               | -55    | (-20, -40)           | (-5, -11)             |

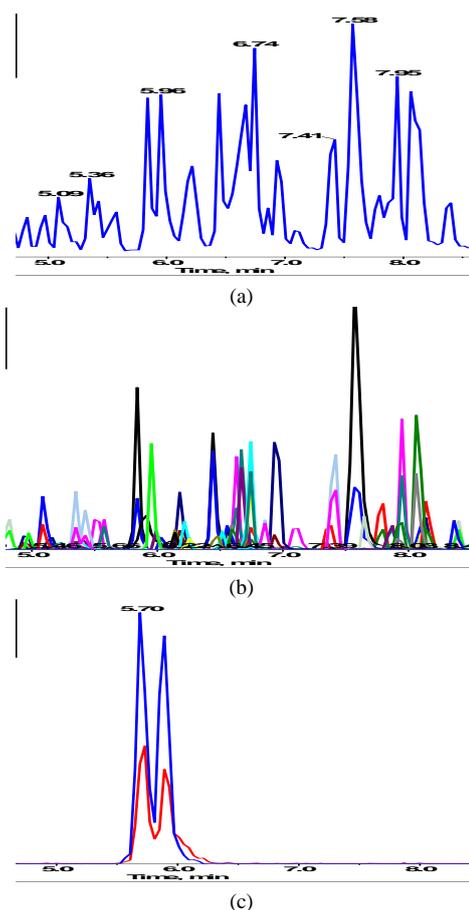
| Composto            | TR (min.) aproximado | Transição de Quantificação | Tipo de íon          | Transição de Confirmação | DP (V) | CE (MR1, MR2) (V) | CXP (MR1, MR2) (V) |
|---------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------|--------|-------------------|--------------------|
| 3 2,4-DB            | 2,97-3,13            | 246,8                      | [M - H] <sup>-</sup> | 161,0 / 125,0            | -65    | (-22, -36)        | (-17, -13)         |
| 4 Bentazona         | 0,59-0,63            | 238,9                      | [M - H] <sup>-</sup> | 132,0 / 197,0            | -95    | (-38, -28)        | (-13, -19)         |
| 5 Diclorprope       | 1,67-1,76            | 233,0                      | [M - H] <sup>-</sup> | 161,0 / 125,0            | -95    | (-22, -38)        | (-13, -11)         |
| 6 Diflubenzuron     | 5,34-5,62            | 309,0                      | [M - H] <sup>-</sup> | 156,0 / 289,0            | -70    | (-14, -14)        | (-17, -23)         |
| 7 Dinocape          | 6,02-6,58            | 295,0                      | [M - H] <sup>-</sup> | 134,1 / 193,0            | -95    | (-68, -40)        | (-11, -9)          |
| 8 Dinosebe          | 2,28-2,39            | 238,8                      | [M - H] <sup>-</sup> | 133,9 / 193,0            | -55    | (-58, -36)        | (-17, -9)          |
| 9 Dinoterbe         | 2,51-2,64            | 239,0                      | [M - H] <sup>-</sup> | 206,9 / 175,9            | -80    | (-36, -54)        | (-23, -21)         |
| 10 Fipronil sulfona | 6,15-6,47            | 450,7                      | [M - H] <sup>-</sup> | 282,0 / 414,2            | -80    | (-38, -24)        | (-27, -35)         |
| 11 Fludioxonil      | 3,92-4,13            | 246,9                      | [M - H] <sup>-</sup> | 126,0 / 169,0            | -110   | (-42, -42)        | (-17, -15)         |
| 12 Fluroxipir       | 1,96-2,07            | 252,9                      | [M - H] <sup>-</sup> | 194,9 / 158,9            | -80    | (-22, -32)        | (-17, -15)         |
| 13 Isoxaflutol      | 2,95-3,11            | 357,8                      | [M - H] <sup>-</sup> | 79,0 / 63,9              | -85    | (-20, -80)        | (-9, -9)           |

## IV.2 Otimização das condições cromatográficas

### IV.2.1 Seleção da coluna cromatográfica

O emprego da técnica LC-MS/MS permite a análise de multirresíduos em uma única corrida sem, contudo, comprometer a qualidade da resposta de cada agrotóxico à cromatografia, mesmo em cromatogramas visualmente de alta complexidade. Isto é possível porque o sistema de detecção de massas monitora individualmente cada transição  $m/z$ . Gerando para cada transição monitorada seu próprio cromatograma que pode ser extraído do cromatograma total com o auxílio do software de controle do sistema e tratamento de dados. Isto pode ser visto na Figura 23.

O cromatograma total, Figura 23a representa a resposta de todos os padrões de agrotóxicos contidos na janela de tempo selecionada que respondem à cromatografia. Este cromatograma sugere que a separação não foi efetiva. No cromatograma em modo *full scan* (Figura 23 b) são apresentadas as respostas cromatográficas para as duas transições de confirmação (íons produto) para selecionadas para os mesmo agrotóxicos.



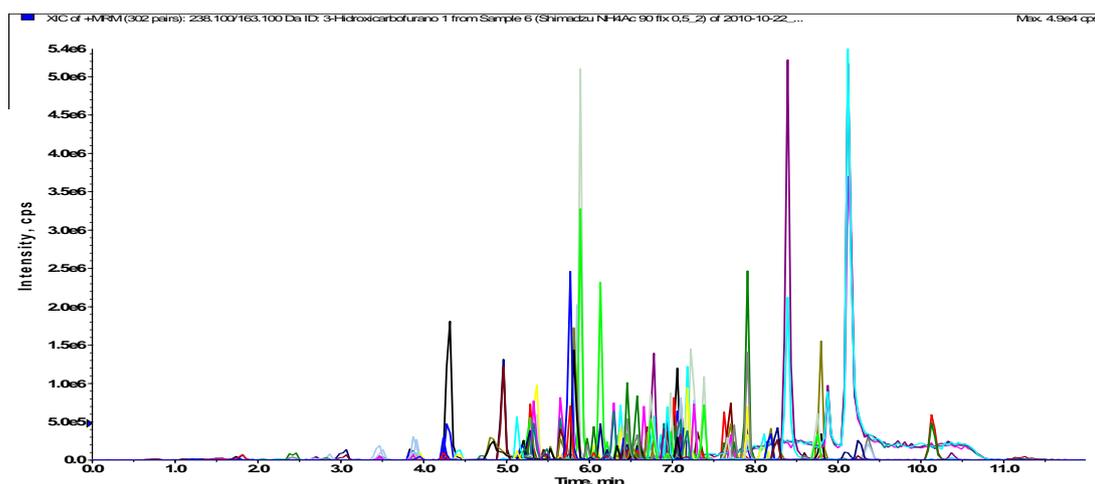
**Figura 20.** Região do cromatogram situada entre 6,0 e 8,0 min., apresentado: o cromatograma total (a), cromatograma total de transições  $m/z$  (b) e o cromatograma extraído para transições  $m/z$  selecionadas do agrotóxicos tridemorfe (c).

Na figura é possível perceber significativa melhora na separação cromatográfica, com os picos melhor resolvidos.

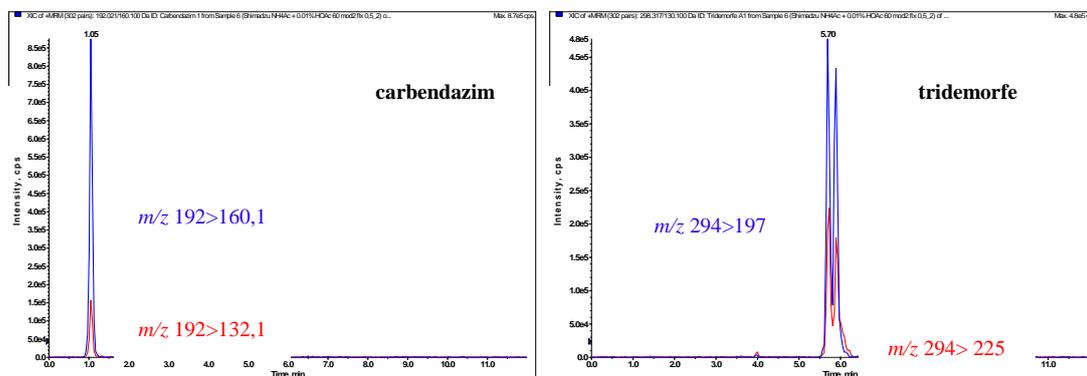
A Figura 23c mostra o cromatograma das transições selecionadas para o agrotóxico tridomorfe. A transição mais intensa, indicada em azul, representa o íon quantificador. Nota-se claramente que o analito foi possível isolar, completamente os cromatogramas das duas transições  $m/z$  selecionadas para quantificação e confirmação para o tridomorfe dos demais e que praticamente não há ruídos na janela de tempo visualizada. Este exemplo mostra claramente a alta seletividade da espectrometria de massas, sendo capaz de resolver um cromatograma complexo em

um cromatograma de transições de apenas um analito, justificando a relevância da técnica para análises multirresíduos.

O cromatograma das transições  $m/z$  do agrotóxico apresenta perfil com pico duplo. Este é o comportamento característico do agrotóxico mesmo quando analisado em solvente. Este resultado deve-se ao fato de que o padrão analítico do mesmo constituiu-se em uma mistura de 4-alkil-2,6-dimetilmorfolinas homólogas C11-C14 cujo principal componente é o homólogo tridecila (2,6-dimetil-4-tridecilmorfolina) oficialmente denominado tridomorfe.



(a)



(b)

**Figura 21.** Cromatograma total (a) e das transições  $m/z$  monitoradas para os agrotóxicos carbendazim e tridomorfe (b) obtidos com a coluna Shim-Pack XR-ODS II no nível de concentração  $0,1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

As Figuras 24 e 25 apresentam os cromatogramas totais, em modo *full scan*, de todos os agrotóxicos a serem validados e os cromatogramas extraídos das transições selecionadas para os agrotóxicos carbendazim a tridemorfe, obtidos pelas colunas avaliadas nas condições empregadas no teste.

A análise dos cromatogramas apresentados na Figura 24a revela que embora a coluna Shim-Pack XR-ODS II tenha concentrado a maioria dos analitos na região central do cromatograma, o formato dos picos obtidos é melhor definido, com a maioria dos picos apresentando-se estreitos e sem caudas, evidenciando boa separação cromatográfica. A Figura 24b exemplifica o exposto, evidenciando a qualidade e resolução dos sinais cromatográficos para transições  $m/z$

de agrotóxicos extraídos do cromatograma total.

Ao analisar o cromatograma da Figura 25a percebe-se imediatamente que embora os picos estejam mais distribuídos ao longo da janela cromatográfica, o formato geral dos mesmos não é de boa qualidade, apresentando picos largos e com cauda à direita o que sugere que as interações entre os analitos e a coluna persistem por um período de tempo superior ao ideal para alcançar boa resolução. A Figura 25b revela a presença de um pico cromatográfico de ponta dupla e que apresenta um “ombro” à direita, para o composto carbendazim. A análise do cromatograma do agrotóxico tridemorfe revela o pico duplo típico, porém, com resolução muito inferior ao da Figura 24b.

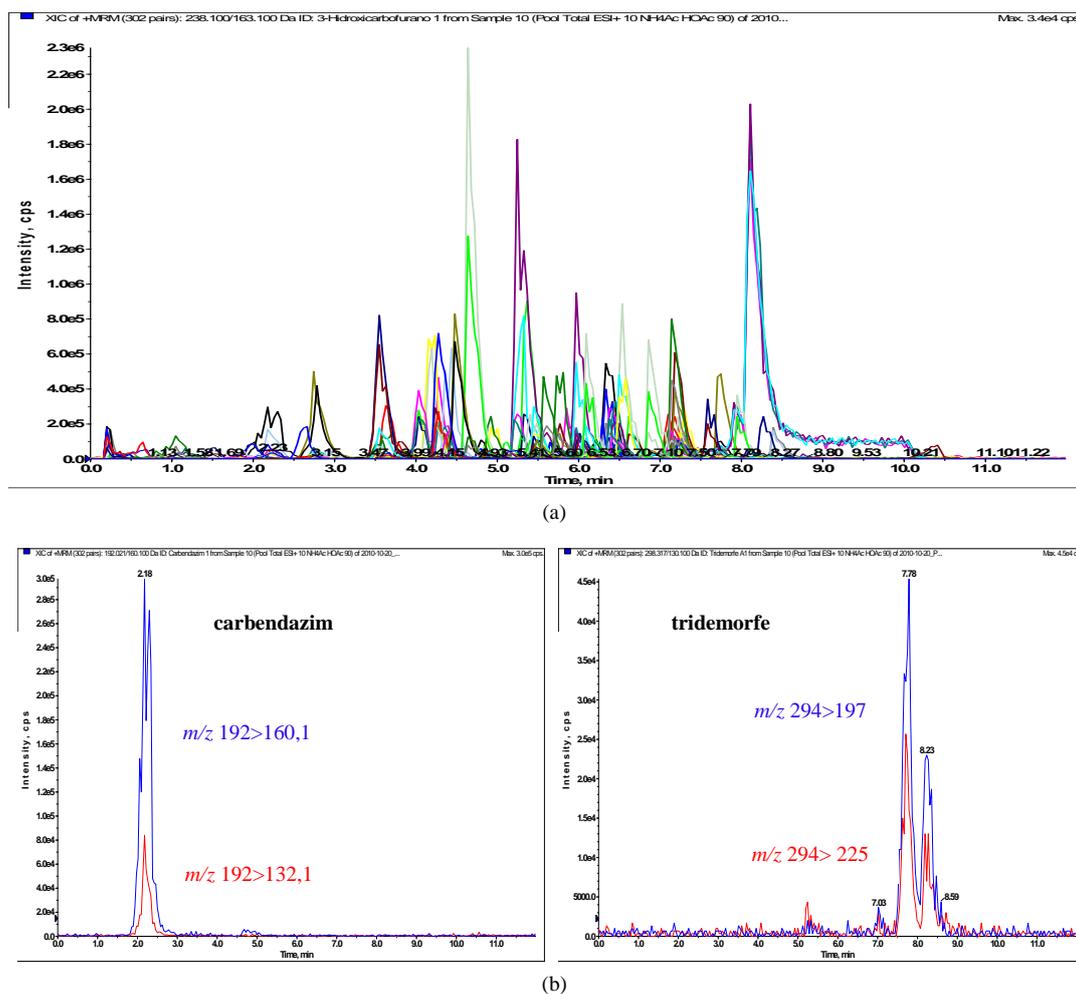


Figura 22. Cromatograma total (a) e das transições  $m/z$  monitoradas para os agrotóxicos carbendazim e tridemorfe (b) obtidos com a coluna Synergi Fusion-RP no nível de concentração  $0,1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

Portanto, a coluna selecionada para os experimentos de validação foi a coluna Shim-Pack XR-ODS II (2,0 x 100 mm, 2,2  $\mu$ m) da Shimadzu por apresentar melhor desempenho nas condições de realização do teste.

#### IV.2.2 Escolha da fase móvel

Os experimentos de otimização de fase móvel foram executados buscando obter uma composição do gradiente que permita otimizar a separação obtida pela coluna cromatográfica selecionada para os experimentos de validação. Foram necessários ajustes na composição da fase móvel em relação ao experimento descrito no item 2.1 da parte experimental de modo a melhorar o perfil cromatográfico total e corrigir algumas falhas do método, como por exemplo, a presença de alguns picos com cauda observados na Figura 24. Os resultados obtidos nos testes para as

diferentes composições de fase móvel descritas nas Tabelas 13, 14 e 15 são discutidos a seguir.

Os cromatogramas totais para as transições  $m/z$  obtidos para as três composições de fase móvel testadas (Tabelas 13 a 15) são apresentados nas Figuras 26, 27 e 28.

A fase móvel representada pelo gradiente A, cujo cromatograma total é apresentado na Figura 26 revela a presença de picos largos e diversos picos com pontas duplas. A presença destas incorreções pode comprometer a qualidade da resposta analítica já que, com raras exceções, são transmitidas para os picos das transições monitoradas que eluem no mesmo tempo de retenção. Nota-se ainda um acúmulo de grande número de picos na região do cromatograma situada entre 9,0 e 11,0 minutos, demonstrando que a fase móvel não promove boa separação dos padrões de agrotóxicos.

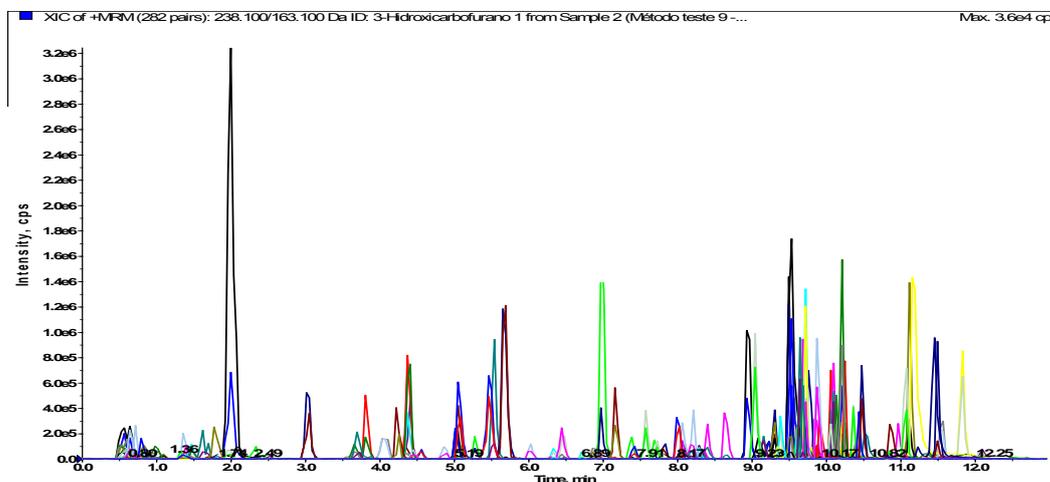


Figura 23. Cromatograma total do Gradiente A.

A despeito da capacidade da espectrometria de massas em resolver cromatogramas complexos em cromatogramas de íons isolados por suas transições  $m/z$ , a presença de um grande número de picos

cromatográficos em uma região do cromatograma deve ser evitada. Isto se deve ao fato do sistema de detecção de massas monitorar continuamente as transições selecionadas para os analitos a serem

pesquisados, o que pode acarretar o fenômeno de *cross talk*. Este ocorre quando picos de agrotóxicos muito próximos e que apresentem transições em comum trocam informações entre si, fenômeno conhecido como “*cross talk*”, causando erros na detecção e quantificação dos agrotóxicos envolvidos.

O gradiente B (Figura 27) foi proposto como uma correção do gradiente A na tentativa de obter-se melhor distribuição

dos picos ao longo da janela cromatográfica o que melhoraria significativamente a resolução cromatográfica. Observa-se que houve melhoria na região entre 9,0 e 11,0 min. Contudo, a maioria dos picos concentrou-se na região situada entre 3,5 e 8,5 min. É possível perceber que houve o alargamento de alguns picos cromatográficos em relação ao gradiente A, evidenciando a necessidade da elaboração de um novo gradiente.

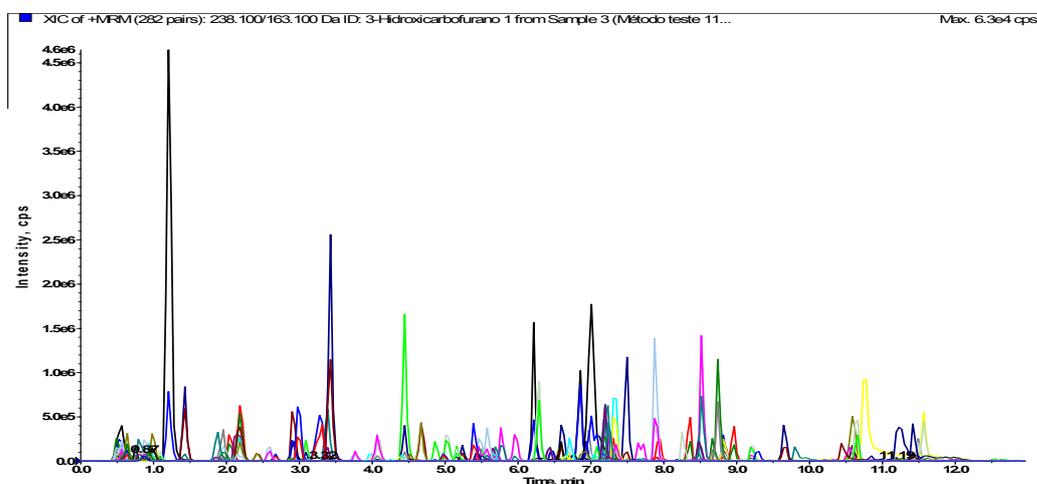


Figura 24. Cromatograma total do Gradiente B.

O cromatograma total de íons obtido com o gradiente C (Figura 28), estabelecido através de pequenas alterações no gradiente B, apresentou o melhor perfil dentre os três gradientes avaliados. Observa-se que os picos estão mais homoganeamente distribuídos ao longo da janela

cromatográfica e que o formato geral dos mesmos é mais simétrico e os picos estão melhor resolvidos. Na avaliação global dos resultados obtidos neste experimento, o gradiente eleito para a condução dos trabalhos de validação foi o gradiente C (Tabela 15).

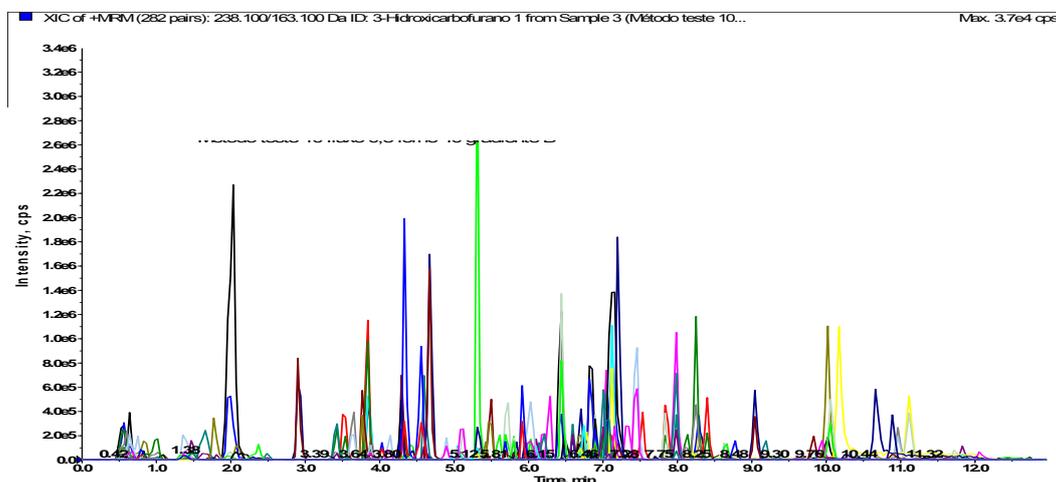


Figura 25. Cromatograma total do Gradiente C.

### IV.2.3 Otimização das condições de temperatura e fluxo de fase móvel

O fluxo de fase móvel através da coluna e a temperatura do forno de coluna são parâmetros que interferem diretamente na qualidade da separação cromatográfica obtida. Valores de fluxo muito elevados podem levar a excessivo aumento de pressão sobre a coluna com conseqüente vazamento, ocasionando a perda de analitos. Além disso, o fluxo de fase móvel interfere nas interações entre a fase

estacionária e os analitos, na medida em que, dependendo da velocidade com que a fase móvel passa pela coluna, os analitos não dispõem de tempo suficiente para interagir com a fase estacionária, prejudicando a eficiência do processo de separação.

A temperatura do forno de coluna tem efeito sobre a viscosidade da fase móvel, podendo auxiliar na mistura de seus componentes e alterando a viscosidade desta. Estes efeitos podem ser benéficos para o desenvolvimento da separação cromatográfica ótima.

**Tabela 18.** Valores de razão sinal/ruído para os agrotóxicos avaliados no experimento de otimização das condições cromatográficas com o gradiente C, na concentração de 50,0 µg.kg<sup>-1</sup>.

| Agrotóxicos           | Razão sinal/ruído | Agrotóxicos            | Razão sinal/ruído |
|-----------------------|-------------------|------------------------|-------------------|
| 3-hidroxi carbofurano | 5,9               | etiona                 | 11,6              |
| acefato               | 25,3              | famoxadona             | 110,3             |
| aldicarbe             | 56,0              | flusisifope p-butílico | 139,3             |
| azoxistrobina         | 862,0             | imidacloprido          | 20,5              |
| bifentrina            | 43,6              | iprodiona              | 5,5               |
| carbaril              | 124,9             | ometoato               | 117,8             |
| carbofurano           | 206,0             | piraclostrobina        | 252,8             |
| clorpirifós           | 7,0               | propiconazol           | 191,4             |
| diazinona             | 81,4              | tebuconazol            | 11,2              |
| dissulfotona          | 7,6               | triadimenol            | 42,6              |

O fluxo e a temperatura de forno de coluna escolhido para o início dos trabalhos de otimização do método foram pré estabelecidos pelo laboratório em trabalhos desenvolvidos com matrizes vegetais. Os testes foram realizados simultaneamente com os experimentos de seleção da fase móvel e, quando necessário, modificações nestas condições foram realizadas para otimização do método.

A combinação da fase móvel composta pelo gradiente C com um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura de forno de coluna de 60 °C, mostrou-se ideal para a aplicação na matriz leite. Este conjunto de parâmetros permitiu que fosse alcançada excelente separação entre os analitos constituintes do método em uma corrida de apenas 13 min. Foram avaliados neste experimento os 20 agrotóxicos listados na Tabela 16, quanto

aos parâmetros de formato do pico, resolução e razão sinal ruído (S/R). Para estes agrotóxicos observou-se que os picos cromatográficos apresentaram-se bem resolvidos e com razão S/R > 3, como mostram os resultados apresentados na Tabela 20, não havendo necessidade de alterações nos dois últimos parâmetros.

O valor S/R > 3 é o valor mínimo para esta razão aceitável para garantir a adequada identificação do analito quando comparado aos interferentes da matriz. Valores inferiores a 3 não garantem a identificação inequívoca do analito no extrato de matriz.

A Figura 29 apresenta os cromatogramas de íons extraídos do cromatograma total para os agrotóxicos bifentrina e clorpirifós onde é possível visualizar a razão sinal ruído.

Embora todos os compostos tenham sido injetados simultaneamente, em *pool* único, de concentração  $50,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , os agrotóxicos respondem de modo distinto à

técnica sendo a grande variabilidade dos valores de S/R apresentados na Tabela 20 resultado das características individuais de cada agrotóxico quando analisados pelo espectrômetro de massas.

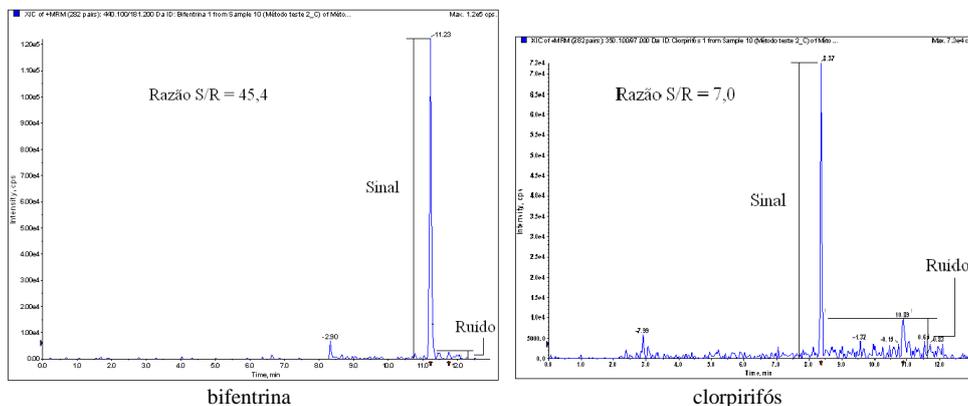


Figura 26. Determinação da razão S/R para os agrotóxicos bifentrina e clorpirifós.

#### IV. 2.4 Comparação de metodologias de extração de resíduos de agrotóxicos

A Tabela 21 apresenta os resultados de recuperação média (Rec%) e dos coeficientes de variação (CV%) para os extratos obtidos pelos métodos de extração avaliados (métodos A, B, C e D).

O agrotóxico ometoato não apresentou recuperações no nível de concentração  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  em nenhum dos quatro métodos avaliados. Este resultado sugere que em baixas concentrações podem ocorrer interações entre os componentes do leite e o agrotóxico, dificultando sua extração.

Os resultados revelam que o método C apresentou melhor desempenho para praticamente todos os agrotóxicos. As recuperações obtidas por este método nos dois níveis de concentração estudados encontram-se dentro da faixa de 70 a 120% e com CV% menores que 20%, conforme recomendam o INMETRO (2010), o documento SANCO/10684/2009 (SANCO, 2010), a Diretiva 2002/657 (DIRECTIVE 657, 2002) e o *Codex Alimentarius* (2003).

Apenas os agrotóxicos bifentrina, nos dois níveis de concentração, e acefato no nível  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , não apresentaram recuperações dentro da faixa. Contudo, os valores de CV% para estes agrotóxicos foram inferiores a 15% em ambos os níveis de concentração, o que sugere boa precisão para o método.

O método A apresenta valores de recuperação dentro da faixa para a maior parte dos agrotóxicos. Contudo, em alguns casos os valores de CV% são muito elevados, 32,6% para carbofurano, 31,6% para dissulfotona, 81,9% para famoxadona e 62,8 % para imidacloprido na concentração  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  indicando que o método não apresenta precisão aceitável para estes agrotóxicos nesta concentração.

O método B foi o que apresentou um resultado mais próximo do desempenho alcançado pelo método C. Todavia, há recuperações extremamente baixas, como por exemplo, 11,0 e 9,5% para bifentrina nas duas concentrações respectivamente. O agrotóxico famoxadona, apresentou uma recuperação de 181% no nível de

concentração de  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , valor inaceitável para aplicação em um método quantitativo.

O pior desempenho no estudo foi apresentado pelo método D. A Tabela 21 revela que este método não foi capaz de extrair os agrotóxicos acefato, famoxadona e ometoato em nenhum dos níveis de

concentração testados. Os agrotóxicos clorpirifós, flusifope p-butílico e piraclostrobina não foram extraídos no nível de concentração mais baixo. É possível observar ainda que muitos dos agrotóxicos extraídos pelo método apresentaram recuperações muito baixas, inferiores a 70% e, há casos nos quais o valor de CV% supera o limite de 20%.

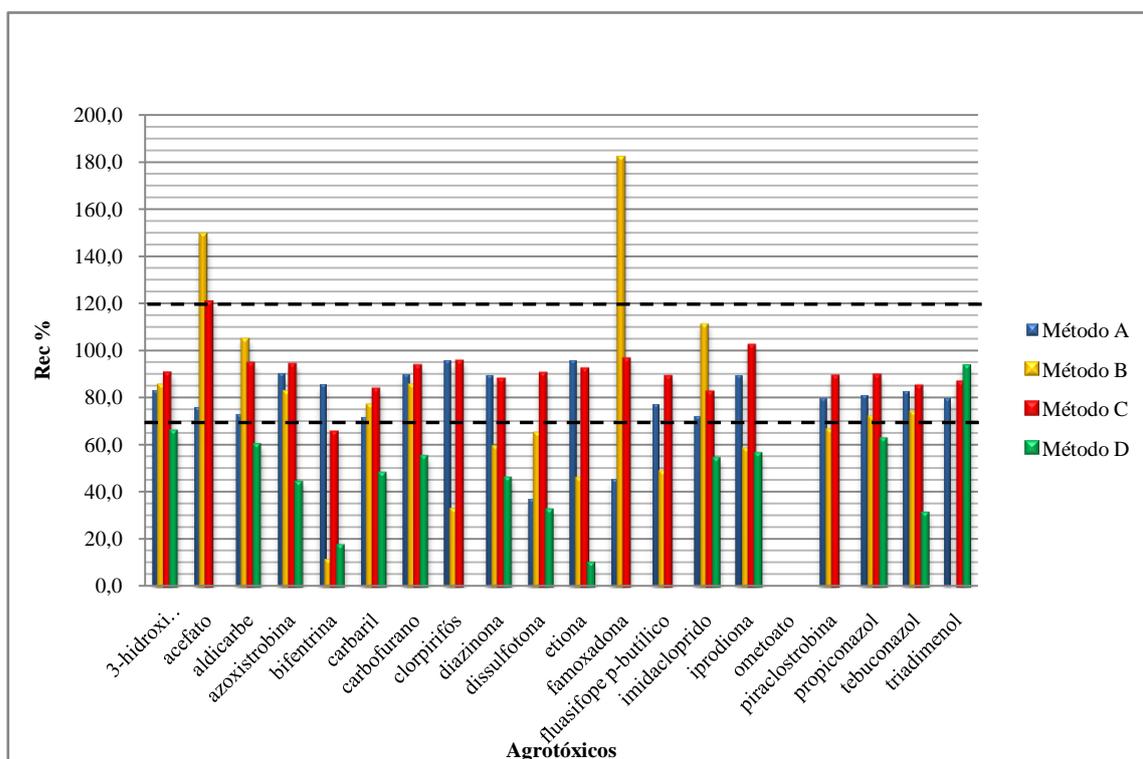


Figura 27. Recuperações (Rec%) para os diferentes métodos de extração testados por agrotóxico no nível  $10,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

**Tabela 19.** Recuperações médias (Rec %) e coeficiente de variação (CV %) para os diferentes métodos de extração testados para os 20 agrotóxicos constantes da Tabela 16.

| AGROTÓXICO            | Método A                 |      |                          |      | Método B                 |      |                          |      | Método C                 |      |                          |      | Método D                 |      |                          |      |
|-----------------------|--------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|
|                       | 10,0 µg.kg <sup>-1</sup> |      | 50,0 µg.kg <sup>-1</sup> |      | 10,0 µg.kg <sup>-1</sup> |      | 50,0 µg.kg <sup>-1</sup> |      | 10,0 µg.kg <sup>-1</sup> |      | 50,0 µg.kg <sup>-1</sup> |      | 10,0 µg.kg <sup>-1</sup> |      | 50,0 µg.kg <sup>-1</sup> |      |
|                       | Rec %                    | CV % |
| 3-hidroxi carbofurano | 82,5                     | 12,6 | 85,3                     | 8,7  | 85,2                     | 12,6 | 85,3                     | 8,7  | 90,1                     | 1,9  | 93,6                     | 0,3  | 65,5                     | 5,7  | 66,0                     | 5,2  |
| acefato               | 75,1                     | 18,0 | 35,9                     | 15,0 | 149,0                    | 14,5 | 52,5                     | 8,9  | 120,0                    | 13,0 | 42,2                     | 11,4 | ND                       | --   | ND                       | --   |
| aldicarbe             | 72,5                     | 15,0 | 70,0                     | 11,6 | 104,6                    | 18,1 | 89,6                     | 2,9  | 94,1                     | 11,6 | 94,3                     | 5,6  | 59,8                     | 23,3 | 77,3                     | 9,9  |
| azoxistrobina         | 89,7                     | 12,0 | 94,0                     | 19,0 | 82,4                     | 11,1 | 89,4                     | 6,8  | 93,7                     | 1,2  | 99,7                     | 1,4  | 44,0                     | 7,1  | 70,0                     | 2,6  |
| bifentrina            | 85,0                     | 24,6 | 75,0                     | 44,9 | 11,0                     | 8,3  | 9,5                      | 3,9  | 65,1                     | 2,9  | 32,7                     | 9,4  | 17,3                     | 11,6 | 17,8                     | 7,3  |
| carbaril              | 71,2                     | 19,5 | 75,0                     | 22,4 | 76,8                     | 2,2  | 88,8                     | 2,1  | 83,3                     | 0,2  | 94,1                     | 0,6  | 47,8                     | 8,1  | 75,5                     | 5,0  |
| carbofurano           | 89,4                     | 32,6 | 79,8                     | 23,0 | 85,2                     | 2,7  | 97,9                     | 3,8  | 93,2                     | 3,9  | 101,8                    | 3,9  | 54,8                     | 14,2 | 77,3                     | 0,6  |
| clorpirifós           | 95,0                     | 11,0 | 92,0                     | 17,8 | 32,5                     | 10,2 | 38,7                     | 2,9  | 95,0                     | 6,1  | 91,3                     | 0,3  | ND                       | --   | 12,5                     | --   |
| diazinona             | 89,0                     | 19,0 | 88,7                     | 10,8 | 59,2                     | 4,3  | 67,2                     | 4,2  | 87,5                     | 6,3  | 97,3                     | 1,9  | 45,8                     | 5,9  | 63,5                     | 8,9  |
| dissulfotona          | 36,3                     | 31,6 | 7,7                      | 36,6 | 64,8                     | 11,3 | 60,6                     | 7,8  | 89,9                     | 19,4 | 88,6                     | 4,9  | 32,3                     | 39,4 | 28,3                     | 7,2  |
| etiona                | 95,1                     | 14,7 | 92,6                     | 19,9 | 45,7                     | 2,9  | 52,2                     | 2,7  | 91,8                     | 2,0  | 96,9                     | 4,8  | 9,8                      | 16,0 | 27,5                     | 1,6  |
| famoxadona            | 44,7                     | 81,9 | 56,8                     | 37,5 | 181,5                    | 51,5 | 67,2                     | 10,9 | 96,0                     | 19,7 | 73,3                     | 23,1 | ND                       | --   | ND                       | --   |
| fluasifope p-butílico | 76,4                     | 15,2 | 78,9                     | 11,0 | 48,6                     | 4,2  | 62,2                     | 2,6  | 88,5                     | 2,1  | 98,1                     | 4,0  | ND                       | --   | 29,3                     | 5,7  |
| imidacloprido         | 71,5                     | 62,8 | 71,3                     | 31,8 | 110,7                    | 4,2  | 86,7                     | 7,4  | 82,0                     | 16,5 | 78,9                     | 11,1 | 54,0                     | 12,8 | 58,0                     | 8,2  |
| iprodiona             | 89,2                     | 19,5 | 95,0                     | 14,0 | 58,2                     | 62,4 | 75,1                     | 8,4  | 101,7                    | 8,9  | 109,3                    | 1,1  | 56,0                     | 15,5 | 58,0                     | 8,2  |
| ometoato              | ND                       | --   | 65,0                     | 25,0 | ND                       | --   | 17,4                     | 43,8 | ND                       | --   | 97,8                     | 11,9 | ND                       | --   | ND                       | --   |
| piraclostrobina       | 79,4                     | 21,0 | 85,6                     | 11,0 | 66,2                     | 7,8  | 72,8                     | 1,0  | 88,7                     | 5,1  | 94,1                     | 2,0  | ND                       | --   | 14,0                     | 27,9 |
| propiconazol          | 80,6                     | 5,8  | 81,3                     | 9,0  | 71,7                     | 4,7  | 69,5                     | 6,0  | 89,1                     | 2,5  | 89,4                     | 0,9  | 62,3                     | 7,5  | 63,5                     | 7,6  |
| tebuconazol           | 82,1                     | 15,0 | 86,1                     | 15,9 | 73,7                     | 16,6 | 82,4                     | 10,5 | 84,5                     | 7,6  | 94,1                     | 1,1  | 31,0                     | 11,4 | 61,8                     | 2,8  |
| triadimenol           | 79,1                     | 19,6 | 91,0                     | 22,1 | 1,4                      | 12,9 | 85,0                     | 10,2 | 86,3                     | 12,6 | 91,8                     | 4,1  | 93,0                     | 3,3  | 60,8                     | 9,4  |

As Figuras 30, 31, 32 e 33 apresentam os resultados de recuperação e coeficiente de variação, para os agrotóxicos avaliados por nível de concentração, em relação aos limites normativos, 70-120% para a recuperação e 20% para CV%. Os gráficos revelam que o melhor método de extração, dentre os que foram avaliados neste

experimento é o método C. Este método apresentou recuperações dentro da faixa para todos os agrotóxicos, nos dois níveis de concentração estudados. O mesmo ocorreu com os valores de CV%, a exceção do agrotóxico famoxadona, na concentração de 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , que apresentou um CV% de 23,1.

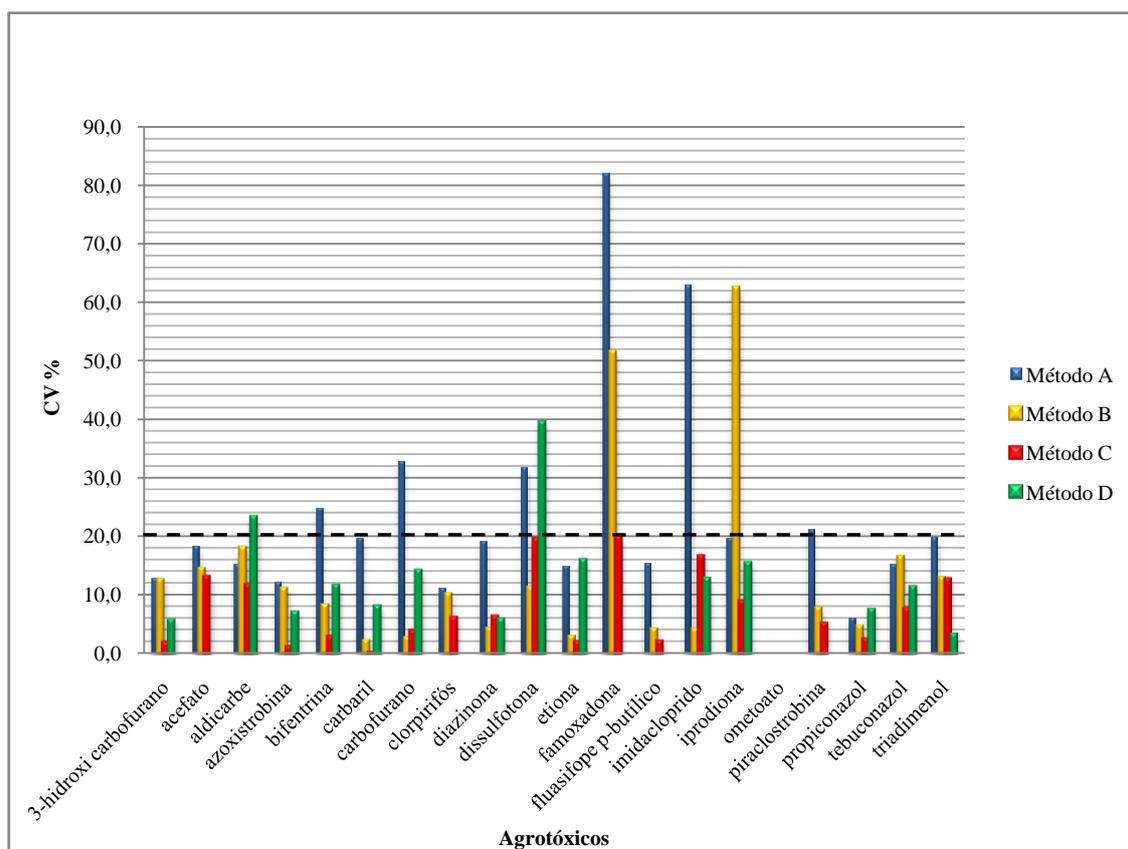


Figura 28. Coeficientes de variação (CV%) para os diferentes métodos de extração testados por agrotóxico no nível 10,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

O conjunto de resultados mostra claramente que o método C apresenta a melhor capacidade de extração dos resíduos de agrotóxicos em leite além de boa precisão,

características ideais para os ensaios de validação. Sendo, por tanto, o método de extração adotado em todos os experimentos de validação.

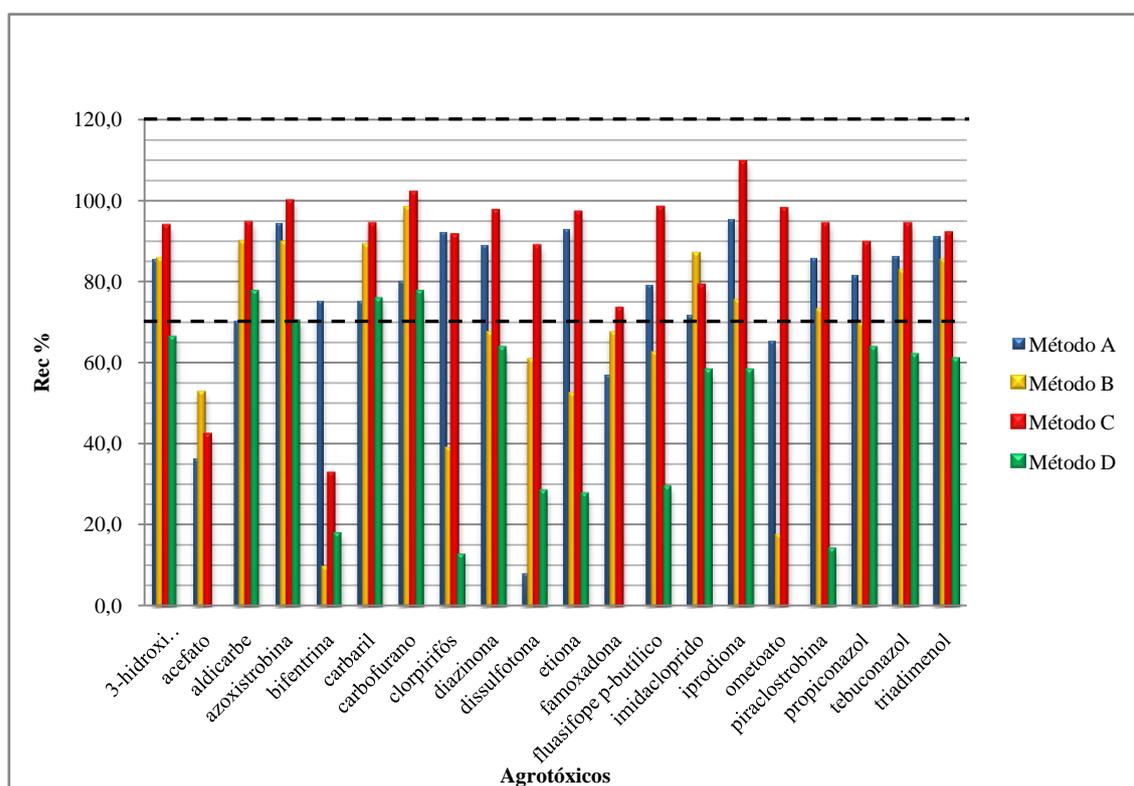


Figura 29. Recuperações (Rec%) para os diferentes métodos de extração testados por agrotóxico no nível 50,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

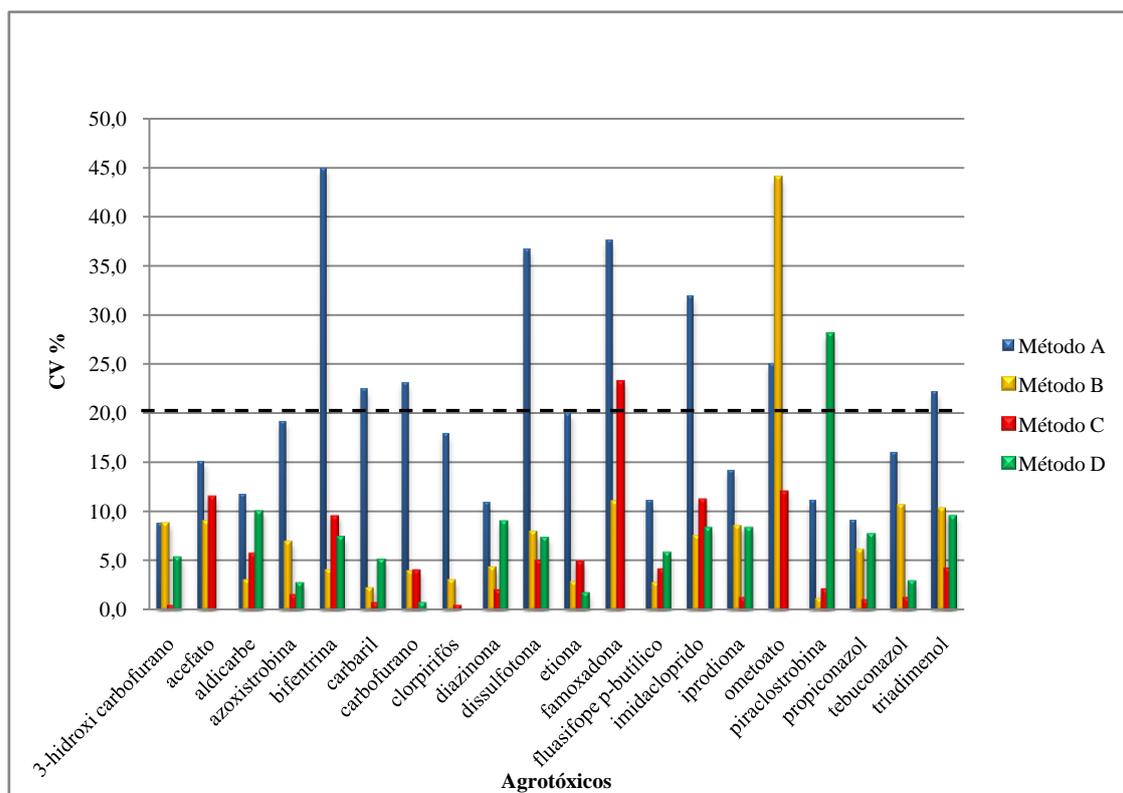


Figura 30. Coeficientes de Variação (CV%) para os diferentes métodos de extração testados por agrotóxico no nível 50,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

### ***IV.3 Validação do método QuEChERS para determinação/quantificação de resíduos de agrotóxicos em leite***

Após o estabelecimento das condições cromatográficas, de detecção pelo espectrômetro de massas e a seleção do método de extração a ser empregado nos experimentos de validação, foram iniciados os trabalhos de validação da metodologia analítica com a utilização do *pool* de trabalho contendo todos os analitos listados na Tabela 11.

Os resultados obtidos em cada uma das etapas de validação são discutidos nos itens subsequentes. Todo o tratamento estatístico dos dados oriundos dos experimentos de validação foi realizado em planilha do Excel<sup>TM</sup> desenvolvida no laboratório de pesticidas do Lanagro-MG para este fim.

#### ***IV.3.1 Seletividade***

Considerando que a técnica de detecção e quantificação do método (LC-MS/MS) apresenta alta seletividade como característica intrínseca, sendo esta seletividade raramente comprometida por interferentes da matriz e a técnica frequentemente requerida em situações regulamentares e legais, a ausência de resultados falsos positivos para as amostras brancas, associada a um perfil indistinguível dos analitos estudados entre amostras fortificadas e padrões, com  $S/R > 3$ , foram considerados suficientes para determinação da seletividade.

A seletividade foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos para extratos de amostras brancas e de reagentes com os de soluções que continham o analito. A ausência de sinais provenientes de compostos interferentes da matriz no mesmo tempo de retenção dos analitos, considerando as respectivas transições  $m/z$ , e a razão  $S/R$ , confirmou a seletividade do método.

Nos casos para os quais os brancos de matriz apresentaram sinais relativos às transições dos analitos, verificou-se a presença destes sinais para as duas transições monitoradas. A ausência de sinais relativos ao analito para pelo menos uma das transições indica que o método é seletivo e os trabalhos de validação podem ser conduzidos normalmente, pois não se trata da detecção da presença do analito no branco.

Em caso de resultado positivo para as duas transições monitoradas, tem-se um indício de que o(s) branco(s) não está(ão) totalmente livre(s) do analito em questão. Contudo, tal resultado não inviabiliza os trabalhos de validação desde que a relação entre a intensidade do referido sinal no menor nível de concentração selecionado para a curva analítica ( $10,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e a intensidade do sinal observado no(s) branco(s) seja menor ou igual a 3. Um valor dentro deste limite para a relação entre as intensidades indica que, apesar de o(s) branco(s) encontrar(em)-se contaminado(s) pelo analito, sua presença não irá interferir significativamente na seletividade do método.

A Figura 34 mostra os cromatogramas obtidos das análises de amostras brancas, respectivamente, branco de matriz (Figura 34a) e branco de reagente (Figura 34b)

A análise da Figura 34a revela a presença de três picos definidos sobrepondo-se aos sinais dos ruídos do equipamento. O primeiro deles, localizado no tempo de retenção 0,48 min. Corresponde às transições  $m/z$  do agrotóxico acefato. Este pico sugere a presença de acefato no extrato da matriz branca. Contudo, não é verificada a presença das três transições empregadas para quantificação e qualificação deste composto, conforme pode-se observar na Figura 35 onde apenas duas transições são visíveis (quantificadora em azul e confirmatórias em vermelho e verde). Desta

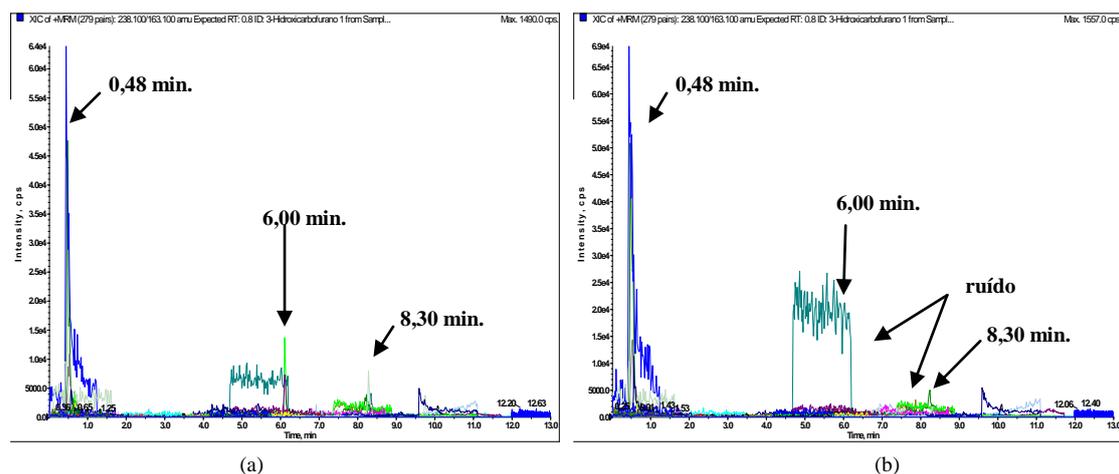


Figura 31. Cromatogramas totais das amostras branco de matriz (a) e branco de reagente (b).

forma, pode-se afirmar com segurança que o acefato não está presente no branco de matriz.

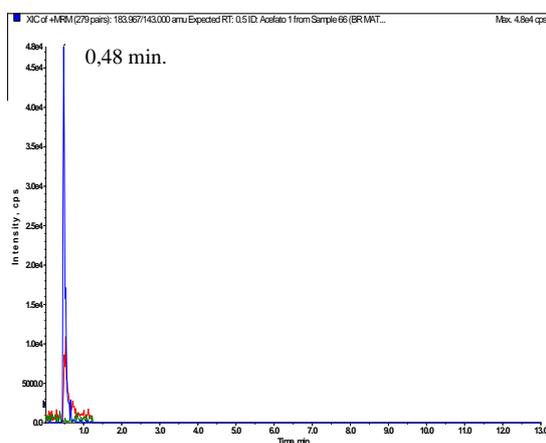


Figura 32. Cromatograma das transições  $m/z$  para o agrotóxico acefato (transição quantificadora em azul).

Todavia, o estudo da razão da intensidade do sinal da transição correspondente ao íon quantificador para o menor nível de concentração da curva analítica e o sinal presente no branco, revelou que estas apresentam a mesma intensidade. Logo, não será possível prosseguir com os trabalhos de validação para este agrotóxico pois os resultados das amostras fortificadas poderão ser influenciados pela presença do sinal das transições no extrato da matriz.

Durante a realização dos experimentos de validação, em todas as amostras de leite que foram empregadas como branco a presença dos sinais relativos a duas das três transições do agrotóxico acefato foi

registrada. Análises adicionais comprovaram que estas transições têm origem na mistura extratora composta por acetonitrila e ácido acético. Marcas diferentes de acetonitrila e ácido acético foram avaliadas quanto à presença destas transições e em todos os testes os resultados foram positivos. Não sendo, portanto, possível, eliminar a fonte de interferentes.

No tempo de retenção aproximado de 6,0 min., observa-se outro pico, com boa simetria, sobreposto aos sinais de ruído. A deconvolução do cromatograma para a extração das transições  $m/z$  correspondentes a este pico é dada na Figura 36.

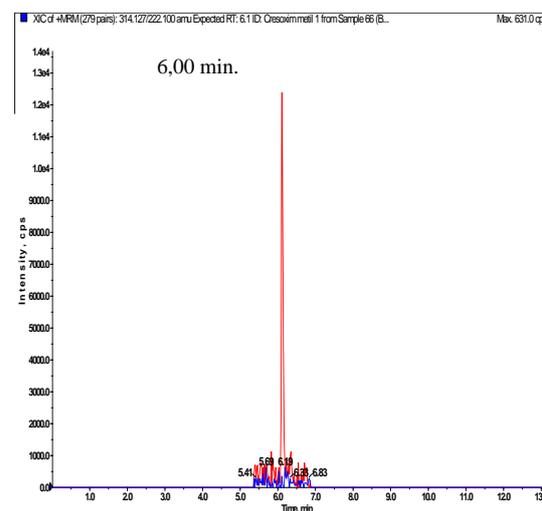
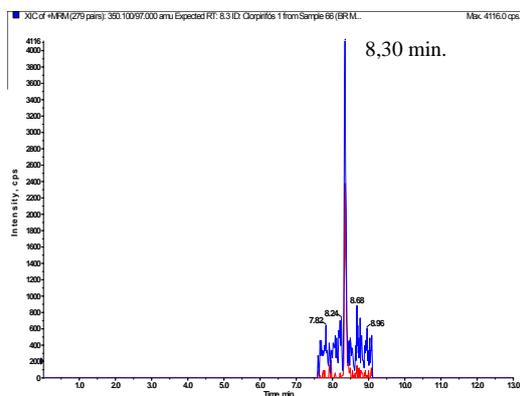


Figura 33. Cromatograma das transições  $m/z$  para o agrotóxico cresoxim metil (transição quantificadora em azul).

Nela observa-se a presença de uma das transições do agrotóxico cresoxim metil, correspondente ao íon qualificador. Para o íon quantificador não se observa o pico cromatográfico. Estes resultados permitem afirmar que a matriz é realmente branca para o agrotóxico. Como a transição do íon quantificador não foi identificada, os experimentos de validação para este agrotóxico podem ser conduzidos normalmente sem o risco de interferências nos resultados analíticos, pois todos os cálculos são realizados tomando por base as integrações realizadas sobre este íon. Este raciocínio estende-se a todos os agrotóxicos estudados neste trabalho.

Outro pico é ainda observado no cromatograma da Figura 34a no  $T_R$  aproximado de 8,3 min. Este pico corresponde às transições do agrotóxico clorpirifós. Ao extrair os picos referentes a estas transições  $m/z$ , Figura 37, observa-se que as duas transições, dos íons quantificador e qualificador, estão presentes na amostra branca. Embora a contaminação do branco tenha sido confirmada, a validação para este agrotóxico pode ser levada adiante porque a intensidade dos picos observada no branco é muito inferior, menor que 10 vezes, àquela observada nas amostras fortificadas no menor nível de concentração em pregado para a construção da curva analítica ( $10,0 \mu\text{g};\text{kg}^{-1}$ ).



**Figura 34.** Cromatograma das transições  $m/z$  para o agrotóxico clorpirifós

Os resultados obtidos permitem considerar, com segurança, que o método é seletivo para os agrotóxicos estudados a exceção do acefato, presente tanto no branco de reagentes quanto no branco de matriz.

### IV.3.2 Estudos de linearidade

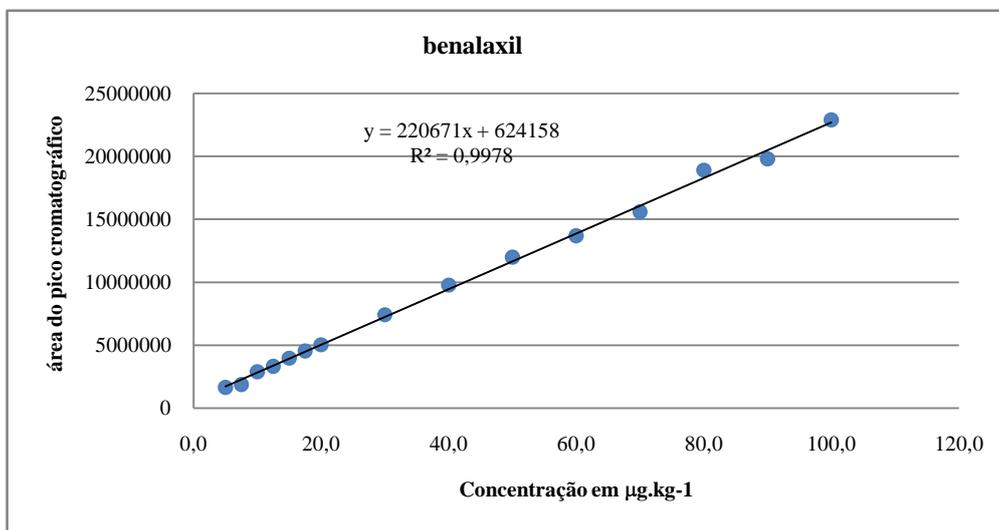
A avaliação da linearidade foi conduzida através da plotagem dos dados experimentais, áreas dos picos cromatográficos em função do nível de concentração. Foram empregados para a construção da curva analítica os seguintes níveis 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e  $100,0 \mu\text{g};\text{kg}^{-1}$ , afim de verificar a premissa de linearidade. As curvas analíticas foram ajustadas pelo MMQO sob a premissa de que o desvio padrão dos resíduos da regressão é constante (homocedasticidade).

Foi feita a inspeção das curvas analíticas para os agrotóxicos avaliados e a análise gráfica dos resíduos da regressão. Esta análise é uma ferramenta poderosa para a identificação visual de desvios das premissas de linearidade e desvio padrão constante. Se a dispersão dos resíduos apresentar aumento significativo ao longo da faixa de concentrações sugerindo que o desvio padrão dos resíduos da regressão não é constante, estimar a curva de calibração linear sob a premissa de que o desvio padrão dos resíduos da regressão é proporcional a concentração. Então, a faixa de trabalho deverá ser ajustada para um intervalo menor. Se, após definida a nova faixa de trabalho o desvio de linearidade persistir, adotar um modelo alternativo, por exemplo, regressão ponderada por  $1/x$  ou  $1/s^2$  (ISO, 1996; SANCO, 2010).

As Figuras 38, 39, 40, 44, 45 e 46 apresentam as curvas de calibração obtidas para os analitos acetamiprido, benalaxil, fenariomol, iprodiona, monocrotofós e piridato. Estes agrotóxicos são representativos do comportamento da

resposta instrumental em função da concentração de todos os agrotóxicos constantes do método e foram selecionados

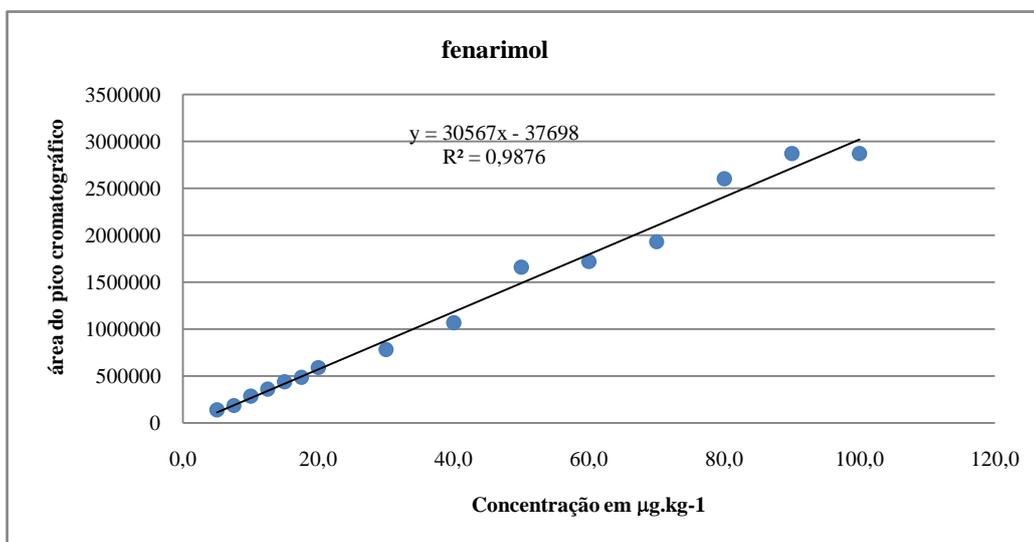
para exemplificar o procedimento de avaliação e tomada de decisão quanto a linearidade e faixa de trabalho.



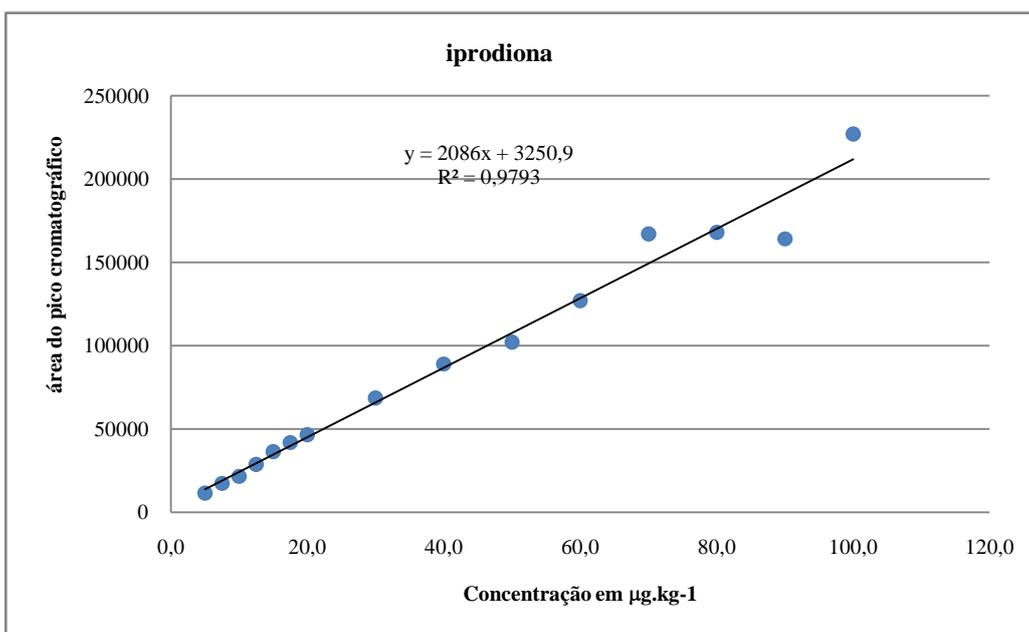
**Figura 35.** Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico benalaxil, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método dos mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de determinação.

Para todos os seis agrotóxicos avaliados é possível perceber, através da inspeção visual das curvas analíticas na faixa de concentrações estudada, que, de modo geral, ocorre maior dispersão dos valores experimentais obtidos, para as áreas dos picos cromatográficos, em relação ao modelo ajustado pelo método dos mínimos quadrados ordinário, a partir da concentração de  $40,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Os agrotóxicos benalaxil (Figura 38), fenarimol (Figura 39) e iprodiona (Figura 40), mostraram, na curva analítica ajustada, um comportamento linear em praticamente toda a faixa, com valores de  $R^2$  iguais a 0,9978; 0,9876 e 0,9793 respectivamente, o que sugere boa linearidade.



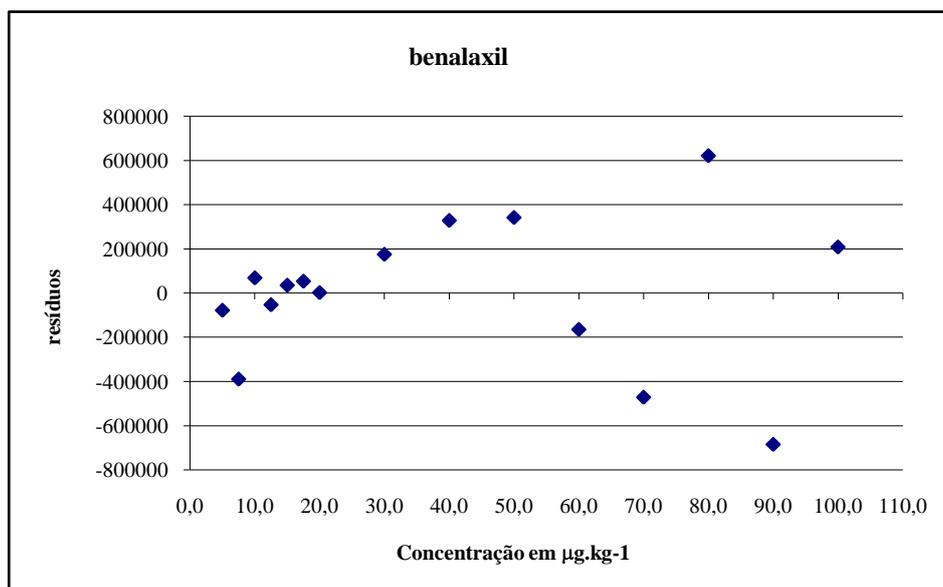
**Figura 36.** Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico fenarimol, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método dos mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de determinação.



**Figura 37.** Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico iprodiona, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método dos mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de determinação.

Contudo, a análise dos gráficos de resíduos para estes agrotóxicos, Figuras 41, 42 e 43, revela que a partir de  $40,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  há um significativo aumento da dispersão dos resíduos. Este comportamento sugere elevada heterocedasticidade dos dados, indicando que, a faixa de trabalho deverá ser ajustada para um intervalo menor e, persistindo a heterocedasticidade, um novo modelo de ajuste deverá ser empregado. Os dados sugerem que a faixa de trabalho mais

adequada é a compreendida entre  $5,00$  e  $20,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Na Figura 41 é possível visualizar que o resíduo da regressão para a concentração  $7,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para benalaxil desviou-se significativamente do comportamento dos resíduos no intervalo até  $20,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , possivelmente, trata-se de um *outlier*. Apesar da presença deste resíduo anômalo, a avaliação da faixa de trabalho não fica comprometida.



**Figura 38.** Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico benalaxil.

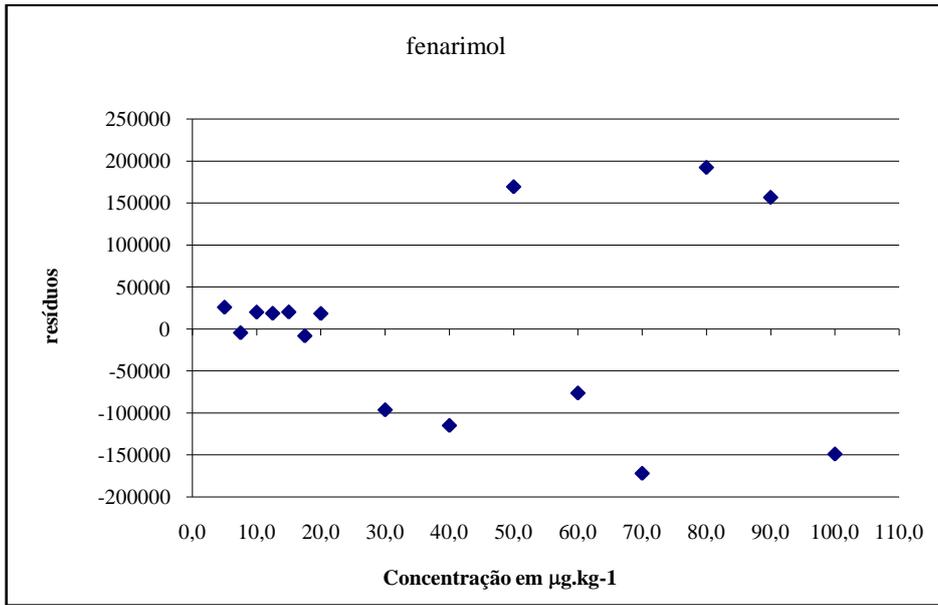


Figura 40. Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico fenarimol.

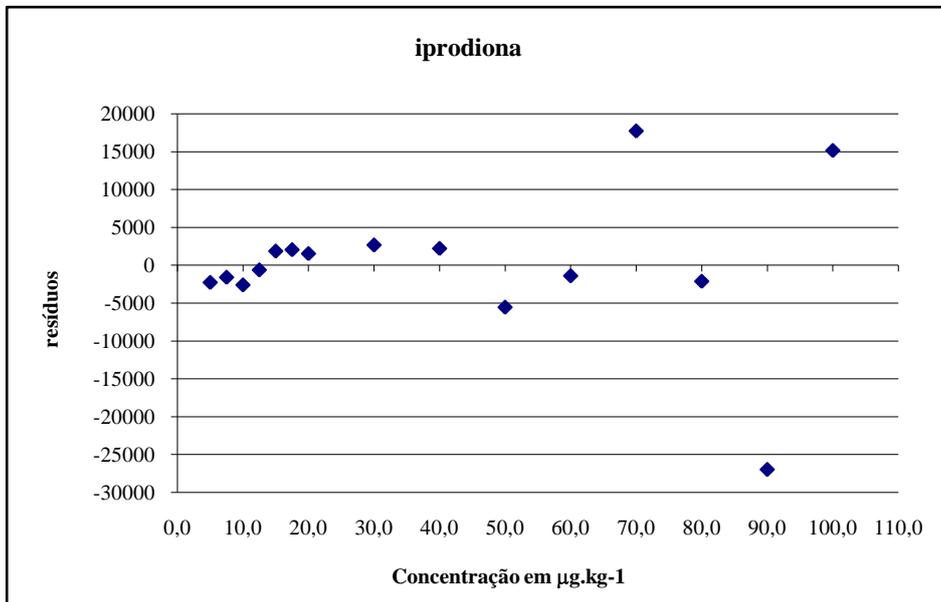
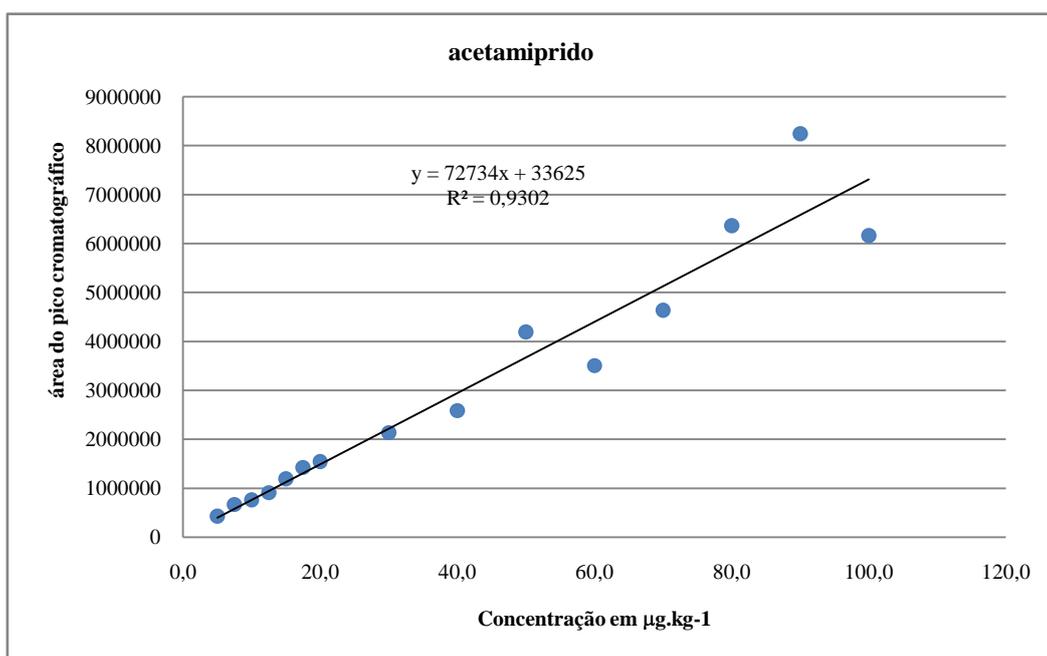


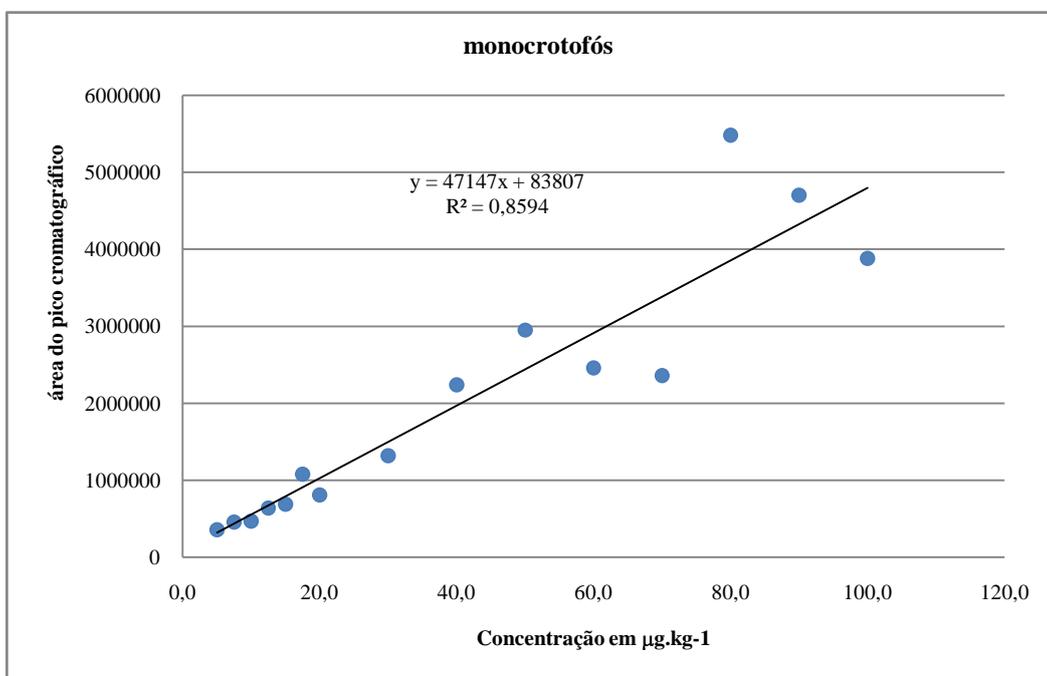
Figura 39. Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico iprodiona.



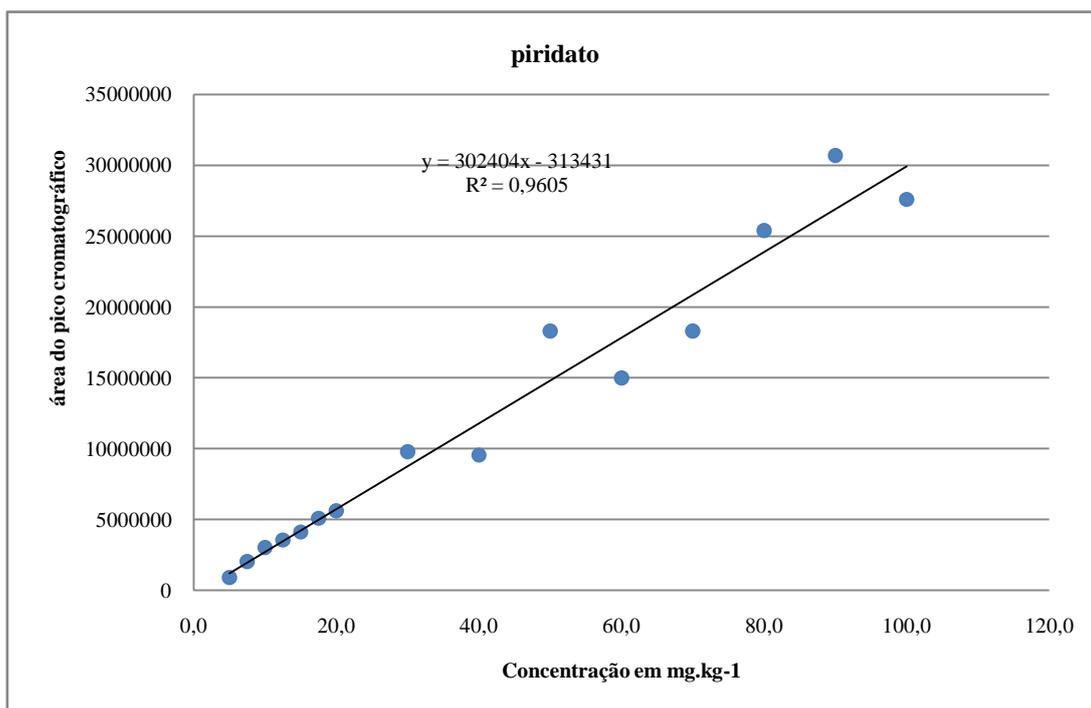
**Figura 42.** Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico acetamiprido, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método dos mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de determinação.

Os demais agrotóxicos, Figuras 44, 45 e 46, não apresentaram ajuste significativo ao modelo em toda faixa estudada, com aumento da dispersão dos resultados em

relação ao modelo a partir de  $40,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , especialmente monocrotofós e piridato.



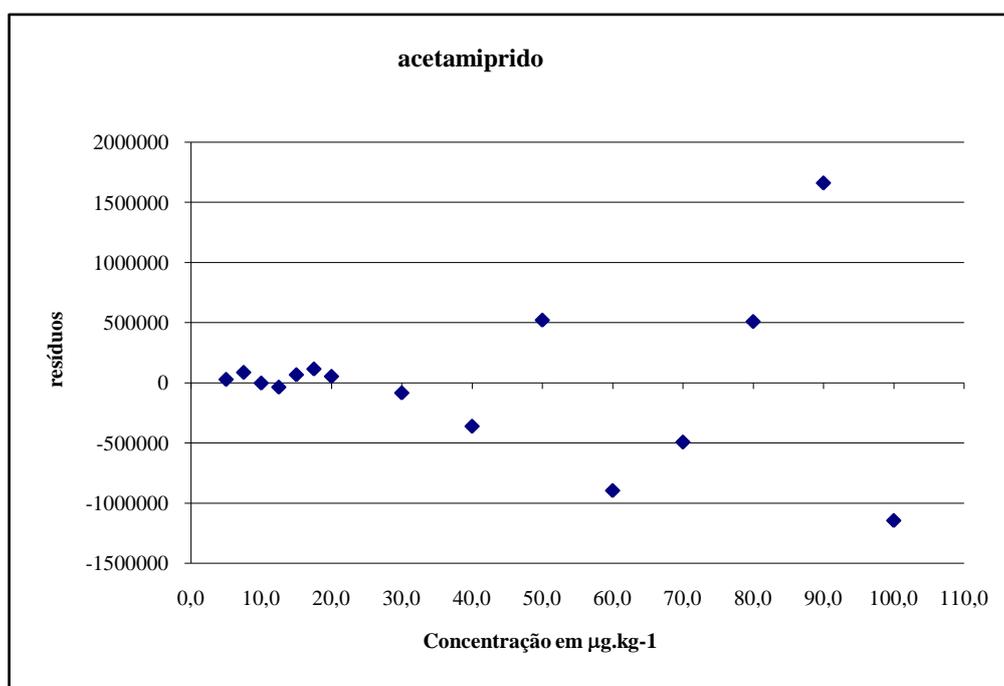
**Figura 41.** Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico monocrotofós, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método dos mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de determinação.



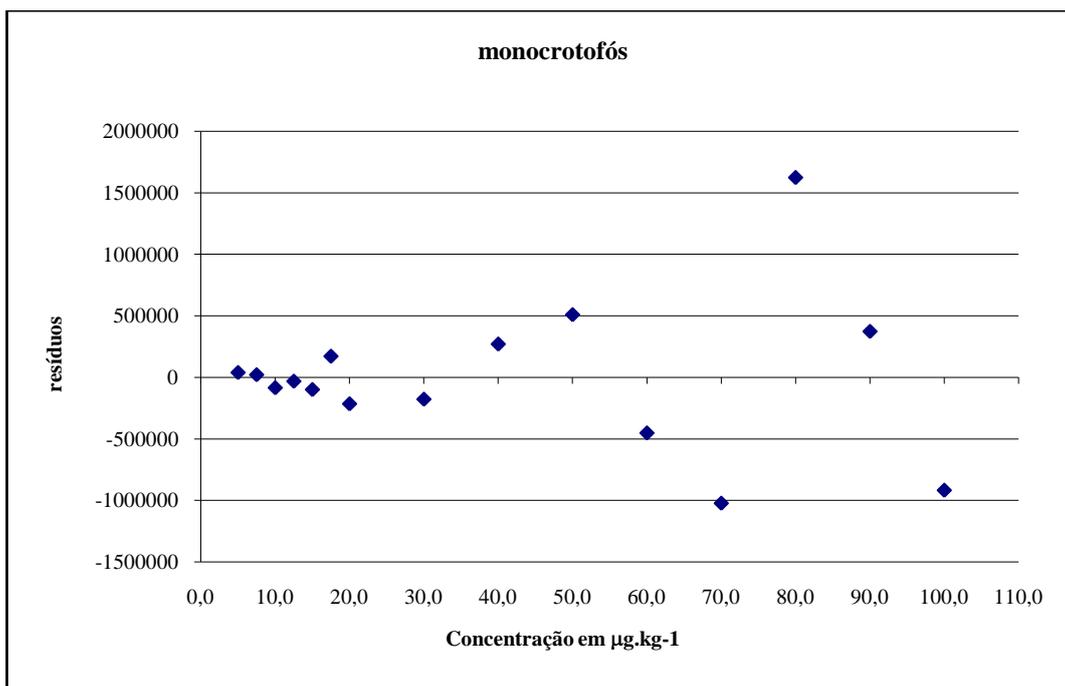
**Figura 43.** Curva analítica obtida no estudo de linearidade para o agrotóxico piridato, apresentando a equação do modelo ajustado pelo método dos mínimos quadrados ordinários e o valor do coeficiente de determinação.

A análise dos gráficos de resíduos da regressão para estes agrotóxicos, Figuras 47, 48 e 49, confirma a acentuada dispersão dos resíduos da regressão a partir de 40,0 mg.kg<sup>-1</sup>. Estes resultados, novamente,

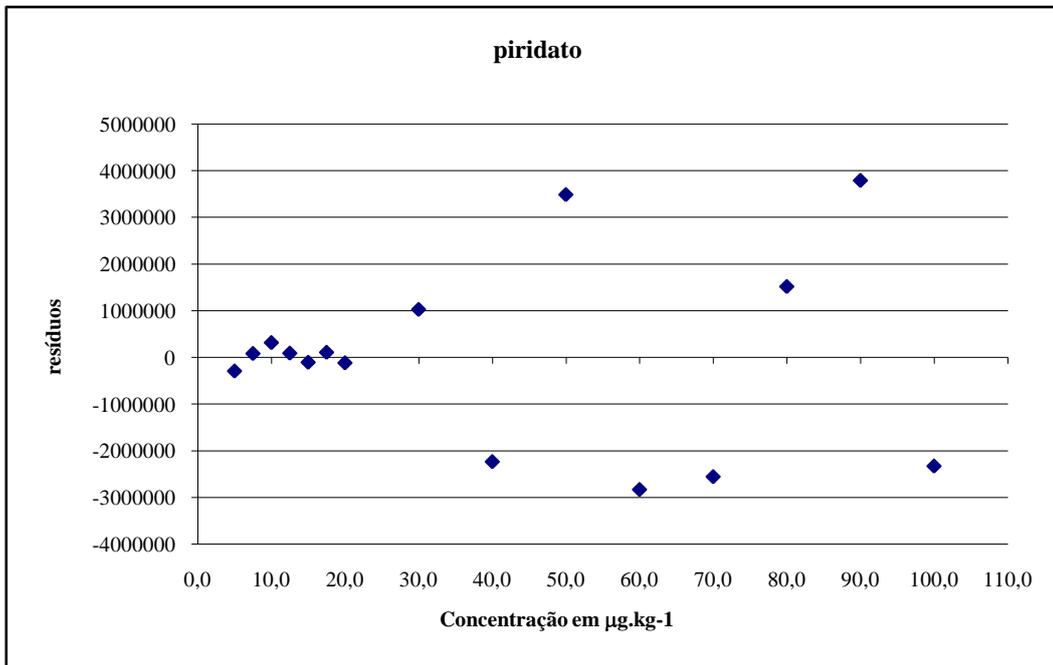
indicam elevada heterocedasticidade. Ajustes na faixa de trabalho serão necessários para a continuidade dos trabalhos de validação do método.



**Figura 47** Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico acetamiprido.



**Figura 44.** Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico monocrotofós.



**Figura 49** Gráfico dos resíduos do ajuste linear para o agrotóxico piridato.

A faixa de trabalho definida após a avaliação das curvas analíticas e dos gráficos de resíduos dos agrotóxicos ensaiados foi estabelecida no intervalo de 5,0 a 20,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Os experimentos de validação serão conduzidos nesta faixa de concentrações. As curvas analíticas serão construídas na faixa de 10,0 a 20,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e avaliadas por meio de ANOVA dos resíduos da regressão. Os níveis 5,0 e 7,5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  serão empregados para a determinação do LD do método. O LQ será determinado, experimentalmente, dentro da faixa analítica, uma vez que os ensaios de recuperação serão realizados dentro desta faixa.

#### ***IV.3.3 Análise dos solventes e reagentes empregados no método QuEChERS***

A análise de solventes e reagentes foi realizada concomitantemente às injeções das amostras experimentais empregadas nos ensaios de validação do método, através dos brancos de reagente. A ausência de picos relativos aos agrotóxicos e de interferentes que possam dificultar a identificação inequívoca e a quantificação dos agrotóxicos assegura a qualidade necessária de solventes e reagentes para a realização das análises.

O cromatograma da Figura 34b representa o resultado da análise de um branco de reagente e demonstra claramente que não há evidências da presença de interferentes na mesma faixa de transições  $m/z$  utilizada para determinação e quantificação dos agrotóxicos constantes do método. Assim, a qualidade de reagentes e solventes para as condições de ensaio estabelecidas é adequada. Exceção se faz em relação as transições  $m/z$  do acefato, conforme discutido no item 3.1 da discussão dos resultados.

#### ***IV.3.4 Curvas analíticas***

O tratamento dos dados produzidos nos ensaios de validação para todos os agrotóxicos constantes na Tabela 11 foi realizado de acordo com a sequência a seguir:

##### ***IV.3.4.1 Identificação de “outliers”.***

A identificação de valores dispersos ou aberrantes, “outliers” foi conduzida pela aplicação do teste de Grubbs para identificação de dispersos. O teste foi aplicado ao conjunto de dados empregado na construção da curva analítica, por nível de concentração. Em caso de indicação de valores aberrantes pelo teste, o mesmo foi investigado quando às possíveis causas de seu aparecimento no conjunto de dados e, em se tratando realmente de um valor aberrante o mesmo foi descartado.

Os descartes de valores aberrantes foi realizando, quando necessário, respeitando o limite máximo de 22% do conjunto de dados avaliados, conforme definido no item II.7.4.8.1.

##### ***IV.3.4.2 Verificação da homocedasticidade das respostas instrumentais.***

Antes da definição do modelo de ajuste da curva analítica foi feita a verificação da homocedasticidade das variâncias das respostas instrumentais ao longo de toda a faixa de trabalho. A estatística empregada foi F de Fisher.

O teste é realizado através do cálculo do desvio-padrão das replicatas ( $n = 6$ ) com o menor e ao mais alto nível da faixa de trabalho. O valor calculado de F é obtido dividindo-se a maior pela menor variância da série de replicatas por nível de concentração, conforme a equação:

$$F_{\text{calculado}} = \frac{s_{\text{maior}}^2}{s_{\text{menor}}^2} \quad \text{Equação 24.}$$

---

O valor de  $F_{\text{calculado}}$  assim obtido é comparado com o valor de  $F_{\text{tabelados}}$  para o nível de significância de 5% e graus de liberdade (n-1, n-1).

Se  $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ , o desvio padrão não é muito diferente e os dados podem ser considerados homocedásticos.

Se  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ , o desvio padrão é muito diferente e os dados são considerados heterocedásticos

A homogeneidade das variâncias ao longo de toda a faixa de trabalho é um pré-requisito para uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Caso esta não se verifique, uma regressão linear ponderada deverá ser aplicada ponderada.

O teste F foi aplicado a cada agrotóxico por dia de ensaio e, quando observada homocedasticidade das variâncias, o modelo de ajuste para a curva analítica de cada agrotóxico no ensaio de validação aplicado foi o ajuste linear simples (MMQO). Se o F-teste indicar que as variâncias são heterocedásticas ao longo da faixa de trabalho o ajuste aplicado à curva analítica será ponderado, com pesos iguais a  $1/s^2$  (inverso das variâncias de cada nível de concentração) e  $1/x$ . (inverso do valor de concentração correspondente aquele nível dentro da curva analítica) ou o ajuste quadrático.

#### ***IV.3.4.3 Análise de variância dos resíduos do modelo ajustado***

A análise de variância foi aplicada à curva analítica de cada agrotóxico, por dia de validação, para verificação da qualidade do ajuste e da adequação da faixa de trabalho ao propósito do método.

Dos modelos de ajuste disponíveis, para aplicação na construção da curva analítica, a saber: ajuste linear simples pelo MMQO,

ajuste linear ponderado, com peso igual a  $1/s^2$ , ajuste linear ponderado, com peso igual a  $1/x$  e ajuste quadrático, o mais aplicado foi o ajuste ponderado ( $1/s^2$ ). Para todos os modelos de ajuste linear empregados, especialmente  $1/s^2$ , a aplicação da estatística ANOVA demonstrou que tanto a regressão quanto a qualidade do ajuste são estatisticamente significativos para as curvas às quais foram aplicados os modelos. Isto demonstra que embora as variâncias dos dados experimentais não sejam homogêneas, o ajuste linear ponderado é eficiente no modelamento das curvas analíticas, não havendo a necessidade de se recorrer a modelos mais complexos como o quadrático. Dentre todos os agrotóxicos avaliados no primeiro dia de ensaios, apenas azinfós metil teve sua curva analítica ajustada pelo MMQO (Tabela 22), ou seja, apresentou variâncias homogêneas ao longo da faixa de trabalho.

Este comportamento heterocedástico das respostas mostrou-se frequente em todos os demais experimentos realizados, indicando que parece ser esta uma característica das respostas instrumentais da técnica LC-MS/MS, para os analitos ensaiados, mesmo com um intervalo de concentrações relativamente estreito.

A Figura 50 apresenta, a título de exemplo, a planilha de cálculos empregada no tratamento dos dados experimentais para o agrotóxico triassulfuron.

A Figura 50 mostra que o modelo escolhido para ajuste, para triassulfuron, foi o ajuste ponderado por  $1/s^2$ . Os valores de  $G_{\text{calculado}}$  para o maior e menor valor de cada nível de concentração são inferiores ao valor tabelado de  $G$  para um nível de significância de 5%, 1,887, evidenciando a ausência de valores aberrantes na série de dados apresentada.

Na tabela de ANOVA para os resíduos da regressão o valor de  $F_{\text{calculado}}$  para a análise

---

da significância da regressão, 132,4296 é significativamente maior que o valor de  $F_{\text{tabelado}} = 4,1960$  para um nível de significância de 5%. O mesmo ocorre com a avaliação da qualidade do ajuste, onde o valor de  $F_{\text{calculado}}, 2,1551$ , é menor que o de  $F_{\text{tabelado}} = 2,9752$  para um nível de significância de 5%. Estes resultados indicam claramente que o ajuste pelo modelo ponderado ( $1/s^2$ ) é adequado aos dados experimentais.

O valor do coeficiente de correlação obtido para o ajuste,  $r = 0,9086$  é inferior a 0,95, valor empregado como referência por diversos autores (Chan, et al., 2004; Chui, 2006; Cassiano et al., 2009; SANCO, 2010). Todavia, Brito et al.(2003) estabelecem uma relação entre os valores de  $r$  e o grau de correlação entre as variáveis ( $y$  e  $\hat{y}$ ) explicado pelo modelo ajustado.

TRIASSULFURON 2 [Modo de Compatibilidade] - Microsoft Excel

### Planilha para ajuste da curva analítica

|    | Unidade de Concentração         | Resposta instrumental (Ri) | Defina o Modelo do Ajuste a ser empregado | Teste de Grubs para detecção de outlier - para detecção de uma observação por vez de acordo com a ISO 5725-2:1994(E) |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
|----|---------------------------------|----------------------------|---|--|-------------|-------------|---|--|--|--|--|--|--|--|
| 6  |                                 |                            |   |  |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 7  | Campos preenchidos pelo usuário |                            | MMQP (1/s2)                               |  |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 8  | i                               | xi / ppb                   | yi  | Y(calculado)   | menor valor | maior valor |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 9  | 1                               | 0,01                       | 189000                                    | 1,7459E+05   | 1,186       | 1,305       |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 10 | 2                               | 0,01                       | 153000                                    | 1,7459E+05   |             |             | Valores críticos para o teste de Grubbs<br>para 5% 1,887<br>para 1% 1,973 |  |  |  |  |  |  |  |
| 11 | 3                               | 0,01                       | 169000                                    | 1,7459E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 12 | 4                               | 0,01                       | 145000                                    | 1,7459E+05   | aceitar     | aceitar     |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 13 | 5                               | 0,01                       | 194000                                    | 1,7459E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 14 | 6                               | 0,01                       | 160000                                    | 1,7459E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 15 | 7                               | 0,0125                     | 235000                                    | 2,1585E+05   | 1,678       | 0,911       |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 16 | 8                               | 0,0125                     | 198000                                    | 2,1585E+05   |             |             | Heterocedásticos  |  |  |  |  |  |  |  |
| 17 | 9                               | 0,0125                     | 228000                                    | 2,1585E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 18 | 10                              | 0,0125                     | 172000                                    | 2,1585E+05   | aceitar     | aceitar     |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 19 | 11                              | 0,0125                     | 244000                                    | 2,1585E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 20 | 12                              | 0,0125                     | 235000                                    | 2,1585E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 21 | 13                              | 0,015                      | 207000                                    | 2,5711E+05   | 1,446       | 1,296       |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 22 | 14                              | 0,015                      | 244000                                    | 2,5711E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 23 | 15                              | 0,015                      | 311000                                    | 2,5711E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 24 | 16                              | 0,015                      | 280000                                    | 2,5711E+05   | aceitar     | aceitar     |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 25 | 17                              | 0,015                      | 241000                                    | 2,5711E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 26 | 18                              | 0,015                      | 288000                                    | 2,5711E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 27 | 19                              | 0,0175                     | 333000                                    | 2,9837E+05   | 1,032       | 1,088       |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 28 | 20                              | 0,0175                     | 330000                                    | 2,9837E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 29 | 21                              | 0,0175                     | 297000                                    | 2,9837E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 30 | 22                              | 0,0175                     | 326000                                    | 2,9837E+05   | aceitar     | aceitar     |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 31 | 23                              | 0,0175                     | 295000                                    | 2,9837E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 32 | 24                              | 0,0175                     | 300000                                    | 2,9837E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 33 | 25                              | 0,02                       | 288000                                    | 3,3963E+05   | 1,341       | 1,585       |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 34 | 26                              | 0,02                       | 302000                                    | 3,3963E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 35 | 27                              | 0,02                       | 319000                                    | 3,3963E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 36 | 28                              | 0,02                       | 327000                                    | 3,3963E+05   | aceitar     | aceitar     |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 37 | 29                              | 0,02                       | 323000                                    | 3,3963E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |
| 38 | 30                              | 0,02                       | 356000                                    | 3,3963E+05   |             |             |   |  |  |  |  |  |  |  |

| ANOVA DA REGRESSÃO (com base em Y) |                   |                   |            |                    |                      |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|------------|--------------------|----------------------|
| Fonte de variação                  | Grau de liberdade | SQ                | MQ         | F <sub>teste</sub> | F <sub>crítico</sub> |
| Regressão                          | 1                 | 1,0216E+11        | 1,0216E+11 | 132,4296           | 4,1960               |
| Resíduos                           | 28                | 2,1600E+10        | 7,7142E+08 |                    |                      |
| Falta de ajuste                    | 3                 | 4,3020E+09        | 1,4340E+09 | 2,1554             | 2,9752               |
| Erro puro                          | 26                | 1,7298E+10        | 6,6530E+08 |                    |                      |
| <b>Total</b>                       | <b>29</b>         | <b>1,2376E+11</b> |            |                    |                      |

|                             |                                |
|-----------------------------|--------------------------------|
| Qualidade do ajuste:        | <b>Ajuste significativo</b>    |
| Significância da regressão: | <b>Regressão significativa</b> |

| Parâmetros da Curva Analítica               |            |
|---|------------|
| Parâ Ordem 0 (b <sub>0</sub> ) = intercepto | 9,5510E+03 |
| Parâ Ordem 1 (b <sub>1</sub> ) =            | 1,6504E+07 |
| Parâ Ordem 2 (b <sub>2</sub> ) =            |            |

| Varâncias e Covariâncias                |             |
|---|-------------|
| Var(b <sub>0</sub> ) =                  | 2,9191E+08  |
| Var(b <sub>1</sub> ) =                  | 1,2045E+12  |
| Var(b <sub>2</sub> ) =                  |             |
| Cov (b <sub>0</sub> ,b <sub>1</sub> ) = | -1,8182E+10 |
| Cov (b <sub>0</sub> ,b <sub>2</sub> ) = |             |
| Cov (b <sub>1</sub> ,b <sub>2</sub> ) = |             |
| s <sub>e</sub> (ŷ)                      | 1,0174E+04  |

| Coeficientes de determinação e correlação |        |
|---|--------|
| R <sup>2</sup> =                          | 0,8255 |
| r =                                       | 0,9086 |

Figura 45. Imagem em *printscreen* da planilha de cálculos empregada para o ajuste da curva analítica do agrotóxico triassulfurom, com visualização dos dados experimentais e das estatísticas aplicadas.

Os autores dividem o grau de correlação em faixas, como segue:

- $r = 1$  Correlação perfeita
- $0,91 < r < 0,99$  Correlação fortíssima
- $0,61 < r < 0,91$  Correlação forte
- $0,31 < r < 0,60$  Correlação média
- $0,01 < r < 0,30$  Correlação fraca
- $r = \text{zero}$  Correlação nula

Segundo os autores, valores de  $r = 0,9086$  indica forte correlação entre as variáveis. Neste trabalho foi empregado a estatística  $t$  para avaliar a adequação da correlação indicada pelo valor  $r$ . O valor de  $t_{\text{calculado}}$ , dado pela Equação 12 é comparado com o valor de  $t_{\text{tabelado}} = t_{(m-2); \alpha}$ , que, para a série de dados obtida é de 1,7011.

$$t_{\text{calculado}} = r \cdot \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}} \quad \text{Equação 25.}$$

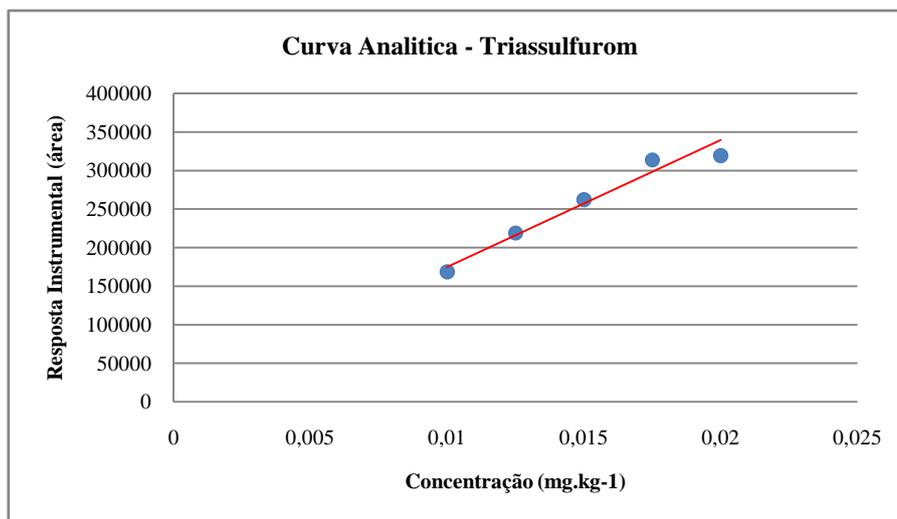
onde:  $n$  = número total de observações.

Se  $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$  o valor de  $r$  é considerado adequado. A Figura 51 apresenta o resultado do  $t$ -teste para  $r$  realizado na planilha para o agrotóxico triassulfurom.

**Figura 47.**  $t$ -teste para o valor do coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva analítica para o agrotóxico triassulfurom.

| Teste t para o Coeficiente de Correlação |  |
|--|--|
| $t_{\text{calculado}} =$                 | <b>1,7011</b> $t_{\text{teste}} =$ 16,6790 |
| $r =$                                    | <b>Adequado</b>                            |

A curva analítica obtida para o agrotóxico triassulfurom (Figura 52), construída com base nas médias das resposta instrumentais para cada nível de concentração. Observa-se que o ajuste do modelo, representado pela linha cheia, mostrou-se adequado à série de dados, conforme indicaram os resultados dos testes aplicados à esta.



**Figura 46.** Curva analítica do agrotóxico triassulfurom.

---

Os resultados das estatísticas ANOVA e *t*-teste para *r*, aplicados a cada agrotóxico permitiu a seleção do melhor modelo para o ajuste da curva analítica para cada um dos compostos estudados durante de validação do método. A aplicação destas ferramentas estatísticas auxilia, sobremaneira, na tomada de decisão sobre qual o modelo a ser empregado e confere maior credibilidade aos resultados gerados através das curvas analíticas empregadas uma vez que os mesmos são obtidos a partir do modelo mais adequado as condições de desenvolvimento dos experimentos.

A Tabela 22 apresenta as equações das curvas analíticas, valores de *r*, o tipo de ajuste do modelo e os valores estimados para LD<sub>*i*</sub> e LQ<sub>*i*</sub> do instrumento, para cada agrotóxico, relativos ao primeiro dia de ensaios de validação.

Os dados de validação do agrotóxico acefato, não foram tratados devido à presença de interferentes nos brancos de matriz e de reagentes. Desta forma não será possível conduzir os trabalhos de validação para este agrotóxico.

Para os 150 agrotóxicos restantes foram conseguidos ajustes significativos de acordo com a ANOVA. Os valores de *r*

foram também bastantes significativos, com 97,3% dos agrotóxicos apresentando valores de  $r > 0,95$ . Em apenas quatro casos foram obtidos valores de  $r < 0,95$ .

Para o agrotóxico clorfenvinfós, o valor de *r* foi de 0,7965, que segundo Brito et al.(2003), levaria, ainda assim, a uma correlação forte. A aplicação do *t*-teste para os valores de *r* mostrou que todos são adequados ao modelo.

Os limites LD<sub>*i*</sub> e LQ<sub>*i*</sub> do método foram estimados através dos valores das respostas instrumentais de cada agrotóxico, considerando o menor nível de concentração para o qual todas as respostas foram diferentes de zero, já excluídos os valores extremos, se necessário. Para estes, foi calculado o coeficiente de variação e aplicadas as Equações 6 e 7 para obtenção dos valores de LD<sub>*i*</sub> e LQ<sub>*i*</sub>. Os valores obtidos para LD<sub>*i*</sub> e LQ<sub>*i*</sub> sugerem que estes limites experimentais devem ser aproximadamente 0,005 para o LD e 0,01 para LQ. A confirmação destes valores será realizada através dos ensaios de recuperação e precisão.

**Tabela 20.** Valores dos parâmetros da regressão, coeficiente de correlação, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do instrumento e tipo de ajuste do modelo por agrotóxico para o primeiro dia de ensaios de validação.

Os valores de LD<sub>i</sub> e LQ<sub>i</sub> foram estimados pelo modelo matemático de ajuste da curva analítica. O LD<sub>m</sub> e o LQ<sub>m</sub> do método serão determinados experimentalmente conforme descrito anteriormente.

| Agrotóxicos            | Equação da curva analítica ajustada            | Valor de r | Tipo de ajuste                | LD <sub>i</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> ) | LQ <sub>i</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|--|------------|-------------------------------|--|--|
| 2,4,5-T                | $y = 4,3023 \cdot 10^6 x + 1,4704 \cdot 10^3$  | 0,9982     | Ponderado (1/x)               | 0,003                                  | 0,008                                  |
| 2,4-D                  | $y = 3,7650 \cdot 10^6 x + 5,3405 \cdot 10^3$  | 0,9988     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| 2,4-DB                 | $y = 5,0533 \cdot 10^6 x + 8,0662 \cdot 10^2$  | 0,9975     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| 3-hidroxycarbofurano   | $y = 5,0533 \cdot 10^6 x + 8,0662 \cdot 10^2$  | 0,9975     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Acefato                |  |            |                               |  |  |
| Acetamiprido           | $y = 2,1208 \cdot 10^7 x - 1,2033 \cdot 10^4$  | 0,9965     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Aldicarbe              | $y = 3,7654 \cdot 10^6 x + 2,6857 \cdot 10^3$  | 0,9953     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,009                                  |
| Aldicarbe sulfona      | $y = 1,5845 \cdot 10^6 x + 2,7098 \cdot 10^3$  | 0,9970     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |
| Aldicarbe sulfóxido    | $y = 2,9077 \cdot 10^6 x + 2,3397 \cdot 10^4$  | 0,9936     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Amitraz                | $y = 6,5523 \cdot 10^7 x + 1,7871 \cdot 10^3$  | 0,9995     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Aramita                | $y = 2,6939 \cdot 10^7 x + 1,0375 \cdot 10^4$  | 0,9959     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |
| Azinfós etil           | $y = 1,0162 \cdot 10^7 x + 2,3828 \cdot 10^4$  | 0,9968     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,004                                  | 0,01                                   |
| Azinfós metil          | $y = 4,7793 \cdot 10^6 x + 2,9800 \cdot 10^3$  | 0,9861     | MMQO                          | 0,001                                  | 0,006                                  |
| Azoxistrobina          | $y = 1,4374 \cdot 10^8 x + 1,8410 \cdot 10^3$  | 0,9962     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Barban                 | $y = 4,0940 \cdot 10^5 x - 3,3559 \cdot 10^2$  | 0,9917     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Benalaxil              | $y = 1,0431 \cdot 10^8 x + 1,5577 \cdot 10^5$  | 0,9993     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,007                                  |
| Benfuracarbe           | $y = 3,8545 \cdot 10^7 x - 3,3517 \cdot 10^3$  | 0,9920     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,009                                  |
| Benomil                | $y = 1,6453 \cdot 10^7 x + 2,6268 \cdot 10^3$  | 0,9946     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,009                                  |
| Bentazona              | $y = 3,3005 \cdot 10^7 x + 2,7981 \cdot 10^4$  | 0,9978     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| BF 500-3               | $y = 6,9555 \cdot 10^7 x + 1,6858 \cdot 10^3$  | 0,9964     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Bifentrina             | $y = 7,8360 \cdot 10^6 x + 1,0807 \cdot 10^4$  | 0,9950     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Boscalida              | $y = 1,8348 \cdot 10^7 x + 3,0466 \cdot 10^4$  | 0,9995     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |
| Carbaril               | $y = 1,0799 \cdot 10^7 x + 5,1953 \cdot 10^3$  | 0,9941     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Carbendazim            | $y = 2,0104 \cdot 10^8 x + 2,1478 \cdot 10^3$  | 0,9882     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Carbofurano            | $y = 3,4183 \cdot 10^7 x + 1,5326 \cdot 10^4$  | 0,9859     | Ponderado (1/x)               | 0,003                                  | 0,009                                  |
| Carbossulfano          | $y = 1,1777 \cdot 10^7 x + 1,2412 \cdot 10^3$  | 0,9978     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Ciazofamida            | $y = 4,6395 \cdot 10^7 x + 4,0806 \cdot 10^4$  | 0,9859     | Ponderado (1/x)               | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Cimoxamil              | $y = 2,7864 \cdot 10^6 x + 3,2651 \cdot 10^3$  | 0,9860     | Ponderado (1/x)               | 0,002                                  | 0,004                                  |
| Cinidon etílico        | $y = 6,4789 \cdot 10^6 x + 9,1628 \cdot 10^2$  | 0,9860     | Ponderado (1/x)               | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Ciproconazol           | $y = 3,3485 \cdot 10^7 x + 8,9744 \cdot 10^4$  | 0,9860     | Ponderado (1/x)               | 0,001                                  | 0,004                                  |
| Ciprodinil             | $y = 6,3844 \cdot 10^6 x + 5,3233 \cdot 10^3$  | 0,9859     | Ponderado (1/x)               | 0,002                                  | 0,005                                  |
| Ciromazina             | $y = 1,4193 \cdot 10^6 x + 2,6163 \cdot 10^2$  | 0,9860     | Ponderado (1/x)               | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Clorbufan              | $y = 1,4149 \cdot 10^6 x + 3,2733 \cdot 10^2$  | 0,9372     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,005                                  | 0,01                                   |
| Clorfenvinfós          | $y = 2,4697 \cdot 10^7 x + 4,1060 \cdot 10^4$  | 0,7956     | Ponderado (1/x)               | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Cloroxuron             | $y = 3,0019 \cdot 10^7 x + 1,1832 \cdot 10^4$  | 0,9993     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,001                                  | 0,005                                  |
| Clorpirifós            | $y = 7,3607 \cdot 10^6 x + 1,0827 \cdot 10^4$  | 0,9870     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Clorpirifós metil      | $y = 2,7033 \cdot 10^6 x + 1,0133 \cdot 10^3$  | 0,9490     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Cresoxim metil         | $y = 5,9653 \cdot 10^6 x + 6,5033 \cdot 10^3$  | 0,9562     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Deltametrina           | $y = 3,8670 \cdot 10^6 x + 1,4707 \cdot 10^3$  | 0,9971     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,009                                  |
| Di-alato               | $y = 2,2599 \cdot 10^3 x + 1,3772 \cdot 10^2$  | 0,9908     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,01                                   |
| Diazinona              | $y = 1,7132 \cdot 10^7 x + 3,3926 \cdot 10^4$  | 0,9887     | Ponderado (1/x)               | 0,005                                  | 0,01                                   |
| Dicloflanida           | $y = 5,9777 \cdot 10^6 x + 2,7192 \cdot 10^3$  | 0,9881     | Ponderado (1/x)               | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Diclorprope            | $y = 3,8470 \cdot 10^6 x + 8,8269 \cdot 10^3$  | 0,9882     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Diclorvós              | $y = 1,6135 \cdot 10^6 x + 5,0852 \cdot 10^3$  | 0,9965     | Ponderado (1/x)               | 0,005                                  | 0,01                                   |
| Difenoconazol          | $y = 5,4145 \cdot 10^7 x + 6,8315 \cdot 10^4$  | 0,9982     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Diiflubenzuron         | $y = 4,5832 \cdot 10^6 x + 3,0487 \cdot 10^3$  | 0,9990     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,001                                  | 0,005                                  |
| Dimetoato              | $y = 41,6523 \cdot 10^7 x - 9,1623 \cdot 10^3$ | 0,9961     | Ponderado (1/x)               | 0,003                                  | 0,005                                  |
| Dinocape               | $y = 3,1172 \cdot 10^7 x + 2,2013 \cdot 10^3$  | 0,9997     | Ponderado (1/x)               | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Dinosebe               | $y = 9,6644 \cdot 10^7 x + 1,8476 \cdot 10^3$  | 0,9960     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Dinoterbe              | $y = 1,5406 \cdot 10^8 x + 1,2529 \cdot 10^3$  | 0,9988     | Ponderado (1/x)               | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Dissulfotona           | $y = 2,4186 \cdot 10^6 x + 2,7844 \cdot 10^3$  | 0,9964     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,004                                  | 0,01                                   |
| Dissulfotona sulfona   | $y = 1,1764 \cdot 10^7 x + 1,9100 \cdot 10^4$  | 0,9989     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Dissulfotona sulfóxido | $y = 3,2619 \cdot 10^7 x + 4,7616 \cdot 10^4$  | 0,9988     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Espiroxamina           | $y = 3,8337 \cdot 10^8 x + 1,0167 \cdot 10^3$  | 0,9995     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,005                                  |
| Etiona                 | $y = 4,1318 \cdot 10^7 x + 4,6037 \cdot 10^2$  | 0,9980     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,005                                  |
| Etofumesato            | $y = 9,7257 \cdot 10^6 x + 1,5467 \cdot 10^4$  | 0,9661     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Etopofós               | $y = 2,3118 \cdot 10^7 x + 9,2082 \cdot 10^3$  | 0,9985     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,001                                  | 0,004                                  |
| Etoxissulfurom         | $y = 1,0066 \cdot 10^5 x - 1,9683 \cdot 10^3$  | 0,9859     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |
| Etrinifós              | $y = 1,8931 \cdot 10^7 x + 1,9368 \cdot 10^4$  | 0,9859     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Famoxadona             | $y = 1,3215 \cdot 10^4 x + 3,1780 \cdot 10^2$  | 0,9833     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Fenamidona             | $y = 6,1155 \cdot 10^7 x + 5,3880 \cdot 10^4$  | 0,9991     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |

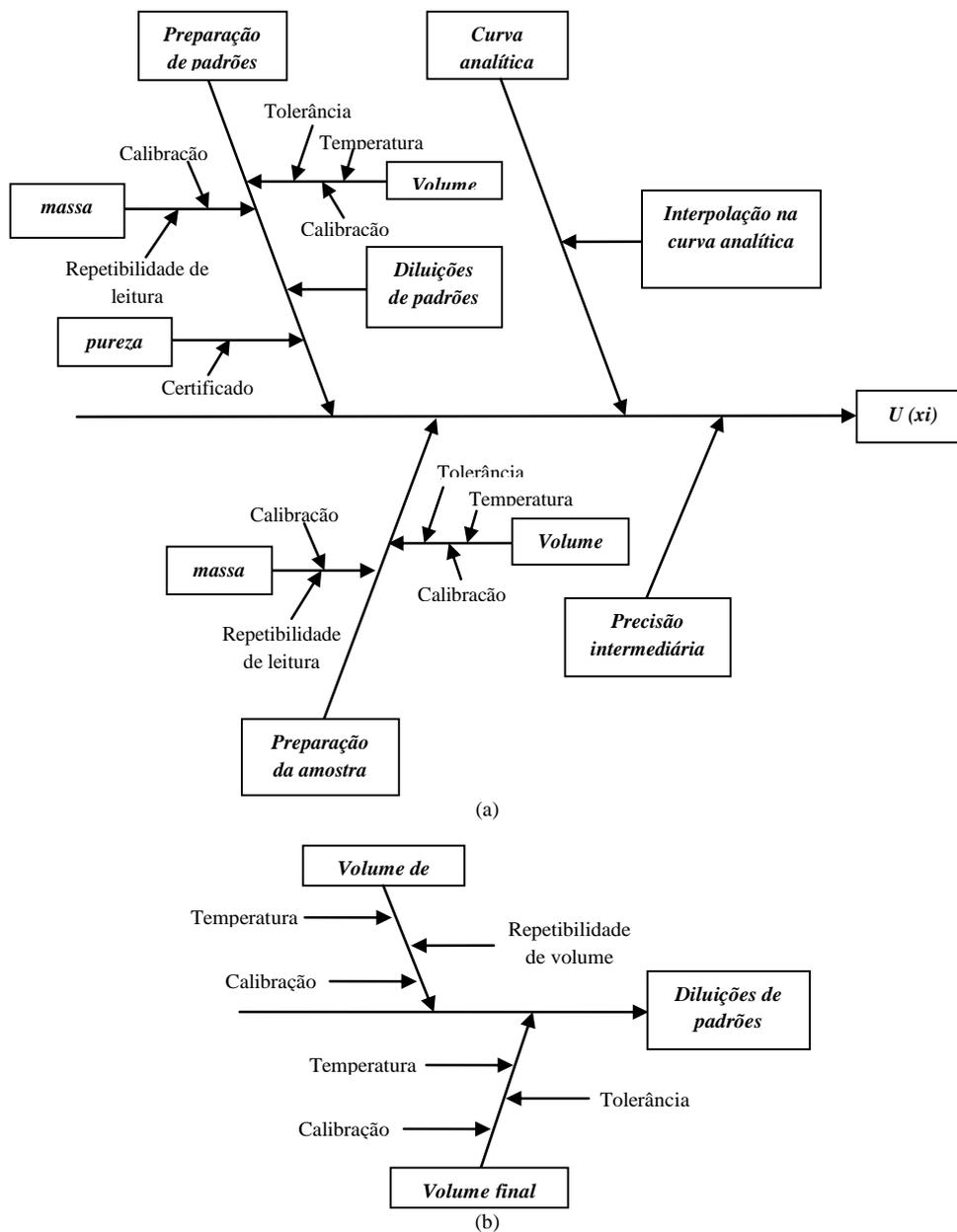
| Agrotóxicos           | Equação da curva analítica ajustada              | Valor de r | Tipo de ajuste                | LD <sub>i</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> ) | LQ <sub>i</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------|--|------------|-------------------------------|--|--|
| Fenamifós             | $y = 1,1722 \cdot 10^8 x + 1,3327 \cdot 10^5$    | 0,9608     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Fenamifós sulfona     | $y = 4,6370 \cdot 10^7 x + 4,6394 \cdot 10^4$    | 0,9974     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Fenamifós sulfóxido   | $y = 2,8770 \cdot 10^7 x + 4,6719 \cdot 10^4$    | 0,9991     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Fenarimol             | $y = 1,0910 \cdot 10^7 x - 1,1739 \cdot 10^4$    | 0,9990     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |
| Fenexamida            | $y = 1,4086 \cdot 10^7 x + 5,7169 \cdot 10^3$    | 0,9988     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Fenpropimorfe         | $y = 1,1536 \cdot 10^8 x + 1,3357 \cdot 10^5$    | 0,9995     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Fentiona              | $y = 9,3866 \cdot 10^6 x - 2,1068 \cdot 10^3$    | 0,9986     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |
| Fentiona sulfóxido    | $y = 3,7668 \cdot 10^7 x + 3,6068 \cdot 10^4$    | 0,9983     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Fentoato              | $y = 1,4517 \cdot 10^7 x - 8,8552 \cdot 10^2$    | 0,9981     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,005                                  |
| Fipronil              | $y = 1,2789 \cdot 10^6 x + 2,0643 \cdot 10^3$    | 0,9967     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,006                                  | 0,01                                   |
| Fipronil sulfona      | $y = 2,1418 \cdot 10^8 x + 6,8914 \cdot 10^3$    | 0,9992     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Fluasifope p-butílico | $y = 1,0805 \cdot 10^8 x + 1,3491 \cdot 10^5$    | 0,9972     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,004                                  |
| Fludioxonil           | $y = 2,5634 \cdot 10^7 x + 2,6899 \cdot 10^4$    | 0,9991     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Flumetrina            | $y = 9,6415 \cdot 10^5 x + 7,9837 \cdot 10^{-1}$ | 0,9956     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |
| Fluquinconazol        | $y = 7,1120 \cdot 10^6 x - 1,2000 \cdot 10^3$    | 0,9997     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Fluroxipir            | $y = 5,4604 \cdot 10^6 x + 2,7661 \cdot 10^3$    | 0,9985     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Flutriafol            | $y = 1,1814 \cdot 10^7 x + 8,5547 \cdot 10^3$    | 0,9989     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Foransulfurom         | $y = 1,5630 \cdot 10^7 x + 3,7566 \cdot 10^4$    | 0,9940     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Forato                | $y = 2,7438 \cdot 10^6 x + 1,2616 \cdot 10^3$    | 0,9990     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Forato sulfóxido      | $y = 1,6789 \cdot 10^7 x + 2,1322 \cdot 10^4$    | 0,9985     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,005                                  | 0,01                                   |
| Fosalona              | $y = 1,9283 \cdot 10^7 x + 1,8662 \cdot 10^4$    | 0,9992     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Fosmete               | $y = 5,3225 \cdot 10^6 x + 2,7875 \cdot 10^3$    | 0,9837     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Furatiocarbe          | $y = 3,3185 \cdot 10^7 x + 7,1768 \cdot 10^4$    | 0,9984     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,005                                  |
| Hexaconazol           | $y = 1,6309 \cdot 10^7 x + 2,0412 \cdot 10^4$    | 0,9960     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Hexitiazoxi           | $y = 2,5799 \cdot 10^7 x + 1,3221 \cdot 10^4$    | 0,9996     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,007                                  |
| Imazalil              | $y = 4,8333 \cdot 10^7 x + 1,0187 \cdot 10^3$    | 0,9983     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,009                                  |
| Imidacloprido         | $y = 3,2462 \cdot 10^6 x + 4,5404 \cdot 10^3$    | 0,9965     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,009                                  |
| Indoxacarbe           | $y = 7,7294 \cdot 10^5 x - 2,4982 \cdot 10^3$    | 0,9994     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Iprodiona             | $y = 2,3873 \cdot 10^6 x + 2,1215 \cdot 10^3$    | 0,9962     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Iprovalicarbe         | $y = 8,5208 \cdot 10^7 x + 3,1982 \cdot 10^4$    | 0,9992     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Isoproturon           | $y = 5,9057 \cdot 10^7 x + 1,2165 \cdot 10^5$    | 0,9954     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |
| Isoxaflutol           | $y = 1,3309 \cdot 10^7 x + 8,1404 \cdot 10^3$    | 0,9816     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Linuron               | $y = 5,4938 \cdot 10^6 x + 9,1554 \cdot 10^3$    | 0,9991     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Malationa             | $y = 3,5350 \cdot 10^7 x + 3,1820 \cdot 10^3$    | 0,9989     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,009                                  |
| Metalaxil             | $y = 2,1102 \cdot 10^8 x + 2,6054 \cdot 10^3$    | 0,9991     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Metamidofós           | $y = 5,5399 \cdot 10^6 x + 2,1913 \cdot 10^3$    | 0,9991     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Metazaclor            | $y = 7,8737 \cdot 10^7 x + 3,9673 \cdot 10^4$    | 0,9988     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,004                                  |
| Meticonazol           | $y = 4,2360 \cdot 10^7 x + 8,1832 \cdot 10^3$    | 0,9982     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Metidationa           | $y = 1,1971 \cdot 10^7 x + 3,7008 \cdot 10^3$    | 0,9991     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,001                                  | 0,004                                  |
| Metissulfurom metil   | $y = 2,9326 \cdot 10^6 x - 1,1028 \cdot 10^3$    | 0,9929     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,005                                  |
| Metomil               | $y = 5,4068 \cdot 10^6 x - 9,3826 \cdot 10^2$    | 0,9966     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Mevinfós              | $y = 6,7547 \cdot 10^6 x + 3,4567 \cdot 10^3$    | 0,9937     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,005                                  | 0,01                                   |
| Miclobutanil          | $y = 1,3343 \cdot 10^7 x + 1,4670 \cdot 10^4$    | 0,9991     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Monocrotofós          | $y = 1,4266 \cdot 10^7 x - 7,9962 \cdot 10^3$    | 0,9949     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,001                                  | 0,005                                  |
| Monolinuron           | $y = 5,9342 \cdot 10^6 x + 5,2725 \cdot 10^3$    | 0,9959     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Ometoato              | $y = 7,6963 \cdot 10^6 x + 3,1985 \cdot 10^3$    | 0,9974     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Oxamil                | $y = 1,8785 \cdot 10^7 x - 3,4523 \cdot 10^4$    | 0,9979     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Oxassulfurom          | $y = 5,0116 \cdot 10^7 x - 2,1421 \cdot 10^4$    | 0,9969     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,009                                  |
| Oxifluorfem           | $y = 4,3560 \cdot 10^5 x + 9,4744 \cdot 10^2$    | 0,9888     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,01                                   |
| Parationa etílica     | $y = 4,0586 \cdot 10^6 x - 2,1957 \cdot 10^3$    | 0,9980     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,005                                  | 0,01                                   |
| Pencicuron            | $y = 1,6126 \cdot 10^8 x + 1,1085 \cdot 10^3$    | 0,9982     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Penconazol            | $y = 2,7981 \cdot 10^7 x + 2,0162 \cdot 10^4$    | 0,9989     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Pendimetalina         | $y = 1,7808 \cdot 10^7 x + 8,7396 \cdot 10^4$    | 0,9995     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,005                                  | 0,01                                   |
| Picolinafen           | $y = 2,6812 \cdot 10^7 x - 1,8583 \cdot 10^3$    | 0,9979     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Pimetrozina           | $y = 7,6334 \cdot 10^6 x + 1,8755 \cdot 10^4$    | 0,9984     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,001                                  | 0,005                                  |
| Piraclostrobina       | $y = 6,8333 \cdot 10^7 x + 2,2279 \cdot 10^4$    | 0,9939     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,005                                  |
| Pirazofós             | $y = 8,0922 \cdot 10^7 x + 4,1923 \cdot 10^4$    | 0,9967     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Piridaben             | $y = 9,9286 \cdot 10^7 x + 2,3534 \cdot 10^4$    | 0,9994     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Piridato              | $y = 1,3415 \cdot 10^8 x - 1,6942 \cdot 10^2$    | 0,9997     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Pirimetanil           | $y = 5,9757 \cdot 10^6 x + 5,2795 \cdot 10^2$    | 0,9910     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,004                                  | 0,01                                   |
| Pirimicarbe           | $y = 8,1272 \cdot 10^3 x + 4,5664 \cdot 10^4$    | 0,9982     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Pirimifós etil        | $y = 1,4076 \cdot 10^8 x + 1,7774 \cdot 10^3$    | 0,9994     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Pirimifós metil       | $y = 2,3324 \cdot 10^7 x + 4,1245 \cdot 10^4$    | 0,9993     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,005                                  |
| Procloraz             | $y = 7,4379 \cdot 10^7 x + 1,1280 \cdot 10^5$    | 0,9973     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,005                                  |
| Profam                | $y = 1,1540 \cdot 10^6 x + 2,0010 \cdot 10^3$    | 0,9837     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Profenofós            | $y = 3,0468 \cdot 10^7 x - 1,2800 \cdot 10^3$    | 0,9964     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,001                                  | 0,004                                  |
| Propargito            | $y = 5,3537 \cdot 10^7 x + 7,9674 \cdot 10^4$    | 0,9980     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |

| Agrotóxicos         | Equação da curva analítica ajustada           | Valor de r | Tipo de ajuste                | LD <sub>i</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> ) | LQ <sub>i</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|---|------------|-------------------------------|--|--|
| Propiconazol        | $y = 2,5223 \cdot 10^7 x + 3,5198 \cdot 10^4$ | 0,9992     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Propizamida         | $y = 1,2389 \cdot 10^7 x + 2,1427 \cdot 10^3$ | 0,9992     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Propoxur            | $y = 1,0644 \cdot 10^7 x + 1,0524 \cdot 10^4$ | 0,9960     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Prossulfuron        | $y = 8,5954 \cdot 10^6 x + 5,7861 \cdot 10^2$ | 0,9978     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Quinalfós           | $y = 2,0222 \cdot 10^7 x + 3,9707 \cdot 10^3$ | 0,9984     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Tebuconazol         | $y = 4,4022 \cdot 10^7 x + 7,9369 \cdot 10^4$ | 0,9990     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Tebufenozida        | $y = 9,3451 \cdot 10^7 x + 9,6442 \cdot 10^3$ | 0,9965     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |
| TEPP                | $y = 6,4250 \cdot 10^7 x - 2,5274 \cdot 10^4$ | 0,9978     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,004                                  | 0,01                                   |
| Tiabendazol         | $y = 6,4250 \cdot 10^7 x - 2,5274 \cdot 10^4$ | 0,9978     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Tiacloprido         | $y = 1,8123 \cdot 10^8 x + 2,4629 \cdot 10^3$ | 0,9980     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |
| Tiametoxam          | $y = 2,1581 \cdot 10^7 x + 1,9531 \cdot 10^4$ | 0,9973     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Tifensulfurom metil | $y = 5,7357 \cdot 10^6 x + 1,2185 \cdot 10^4$ | 0,9981     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,005                                  |
| Tiodicarbe          | $y = 2,4741 \cdot 10^7 x + 2,8663 \cdot 10^4$ | 0,9951     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,006                                  | 0,01                                   |
| Tiofanato metílico  | $y = 1,7481 \cdot 10^7 x + 1,3070 \cdot 10^4$ | 0,9983     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Tolilfluanida       | $y = 1,5365 \cdot 10^7 x + 1,1433 \cdot 10^4$ | 0,9962     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,004                                  |
| Triadimefon         | $y = 1,7280 \cdot 10^7 x + 6,3331 \cdot 10^3$ | 0,9991     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,01                                   |
| Triadimenol         | $y = 1,1759 \cdot 10^7 x + 2,3215 \cdot 10^4$ | 0,9990     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,003                                  | 0,008                                  |
| Triassulfurom       | $y = 1,6504 \cdot 10^7 x + 9,5510 \cdot 10^3$ | 0,9086     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Triazofós           | $y = 4,5213 \cdot 10^7 x - 1,1871 \cdot 10^4$ | 0,9994     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Triclorfon          | $y = 8,4029 \cdot 10^6 x + 7,7619 \cdot 10^3$ | 0,9969     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,008                                  |
| Tridemorfe          | $y = 2,5418 \cdot 10^7 x + 1,7039 \cdot 10^4$ | 0,9995     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,007                                  |
| Trifloxistrobina    | $y = 1,1648 \cdot 10^8 x + 4,3890 \cdot 10^4$ | 0,9959     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,002                                  | 0,006                                  |
| Triforin            | $y = 1,7455 \cdot 10^6 x + 1,6860 \cdot 10^3$ | 0,9977     | Ponderado (1/s <sup>2</sup> ) | 0,005                                  | 0,01                                   |

### IV.3.5 Determinação da estimativa da incerteza do método

construção de um diagrama de causa e efeito (EURACHEM/CITAC, 2000) apresentado na Figura 53.

O levantamento das principais fontes de incerteza do método foi realizado através da



**Figura 48.** Diagrama de causa e efeito com levantamento das principais fontes de incerteza (a), detalhamento das fontes de incerteza presentes na diluição dos padrões (b).

As principais fontes de incerteza para o método são apresentadas nas extremidades das ramificações do diagrama da Figura 53a, São elas: a preparação dos padrões, a curva analítica, os ensaios de precisão intermediária e a preparação da amostra.

No diagrama tem-se um detalhamento completo das fontes de incerteza que mais contribuem para a incerteza total do método com os fatores que contribuem uma dada fonte. Por exemplo, para a preparação da amostra, temos contribuições de medidas de massa e volume, que por sua vez são afetadas pela calibração dos equipamentos, repetitividade de leitura, tolerância e temperatura.

Estas fontes e contribuições foram tratadas individualmente e agrupadas segundo a lei da propagação da incerteza (EURACHEM/CITAC, 2000) para a obtenção da incerteza total do método, *incerteza expandida (U)*, através da combinação das *incertezas padrões (u)* associadas a cada uma das fontes identificadas no diagrama.

As incertezas relacionadas às mediadas de massa e volume foram determinadas com base em dados de certificados de calibração dos equipamentos e em medições internas de controle de desempenho realizadas regularmente pelo laboratório.

#### ***IV.3.5.2 Cálculo da incerteza padrão dos ensaios de precisão intermediária***

As incertezas associada à precisão intermediária foram determinadas a partir dos dados dos ensaios de recuperação, combinados de três dias, em condições de precisão intermediária, ou seja, execução do método num conjunto de condições, as quais compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo de um período extenso de tempo, mas pode incluir outras

condições que envolvam mudanças (INMETRO, 2009).

O valor desta incerteza foi estimado através da Equação 17. Para cada um dos níveis de fortificação validados.

#### ***IV.3.5.3 Cálculo da incerteza padrão da curva analítica:***

Foi determinada pela aplicação da Equação 18 aos valores de  $s_{\hat{y}}^2, s_{b_b}^2, s_{b_1}^2, cov(b_o, b_i)$  e  $b_1$ , obtidos A partir do modelo de ajuste linear escolhido para a construção da curva analítica.

A incerteza padrão da curva analítica foi determinada para cada nível de concentração no qual foi realizado experimentos de recuperação, para o conjunto de todos os três dias de validação.

#### ***IV.3.5.4 Determinação das incertezas padrão (u) e expandida (U) do método.***

A incerteza padrão do método (*u*) foi determinada pela aplicação da Equação 21 aos valores da incertezas determinadas para cada uma das contribuições para a incerteza total do método.

Uma vez determinada a incerteza padrão (*u*) do método, a aplicação das Equações 19 e 20 aos valores de *u* para cada um dos níveis de fortificação validados, permitiu obter o valor da incerteza expandida.

A Figura 54 apresenta a imagem em “*printscreen*” da planilha empregada para o cálculo da incerteza de medição do método, com o valor da incerteza para todas as fontes que contribuem para a incerteza total do método, para o agrotóxico acetamiprido. Para efeito de simplificação na aplicação deste valor aos dados oriundos de uma análise, no ato da emissão dos resultados, os valores finais das incertezas padrão (*u*) e expandida (*U*), são apresentados em valores percentuais *u%* e *U%*.

acetamiprido [Modo de Compatibilidade] - Microsoft Excel

### Cálculo da Incerteza

|                                | Fonte de incerteza                                 | Contribuições à fonte de incerteza  | Estimativa da fonte de incerteza | Tipo    | Distribuição de Probabilidade | Divisor       | Incerteza Padrão | Coefficiente de Sensibilidade | Contribuição da Incerteza | Graus de Liberdade |  |
|--------------------------------|--|---|----------------------------------|---------|-------------------------------|---------------|------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------|--|
| <b>Preparação das amostras</b> |  |   |                                  |         |                               |               |                  |                               |                           |                    |  |
| 4                              | <b>u(massa)</b>                                    | incerteza associada à pesagem da amostra  | 10,000 g                         | 0,0010  | A                             |               | 0,00100          | 1                             | 0,00100                   |                    |  |
| 6                              |  | contribuição da incerteza de linearidade da balança   |                                  | 0,0010  | B                             | retangular    | 1,73205          | 0,00058                       | 1                         | 0,00058            |  |
| 7                              |  | contribuição da incerteza da leitura corrida a corrida (verificação de desempenho) da balança |                                  | 0,0005  | A                             | não aplicável | "-----"          | 0,00050                       | 1                         | 0,00050            |  |
| 8                              |  | contribuição da incerteza de legibilidade da balança  |                                  | 0,0005  | B                             | retangular    | 1,73205          | 0,00029                       | 1                         | 0,00029            |  |
| 9                              | <b>u(volume)</b>                                   | incerteza associada ao volume de extração   | 10,0 mL                          | 0,2764  |                               |               | 0,27637          | 1                             | 0,27637                   |                    |  |
| 10                             |  | contribuição da incerteza de leitura  |                                  | 0,0078  | B                             | triangular    | 2,44949          | 0,00317                       | 1                         | 0,00317            |  |
| 11                             |  | contribuição da incerteza da leitura (ajuste de Volume a dispensar) do dispensador            |                                  | 0,0673  | A                             | não aplicável | 2,44949          | 0,02748                       | 1                         | 0,02748            |  |
| 12                             |  | contribuição da temperatura   |                                  | 0,0500  | B                             | retangular    | 1,73205          | 0,02887                       | 1                         | 0,02887            |  |
| <b>Preparação de padrões</b>   |  |   |                                  |         |                               |               |                  |                               |                           |                    |  |
| 14                             | <b>u(massa)</b>                                    | incerteza associada à pesagem do padrão   | 0,0100 g                         | 0,0006  |                               |               | 0,00061          | 1                             | 0,00061                   |                    |  |
| 15                             |  | contribuição da incerteza de linearidade da balança   |                                  | 0,0003  | B                             | retangular    | 1,73205          | 0,00014                       | 1,00000                   | 0,00014            |  |
| 16                             |  | contribuição da incerteza da leitura corrida a corrida (verificação de desempenho) da balança |                                  | 0,0005  | A                             | não aplicável | "-----"          | 0,00050                       | 1,00000                   | 0,00050            |  |
| 17                             |  | contribuição da incerteza de legibilidade da balança  |                                  | 0,0005  | B                             | retangular    | 1,73205          | 0,00029                       | 1,00000                   | 0,00029            |  |
| 18                             | <b>u(volume)</b>                                   | incerteza associada ao volume de solução  | 10,0 mL                          | 0,0300  |                               |               | 0,03002          | 1                             | 0,03002                   |                    |  |
| 19                             |  | contribuição da incerteza de calibração do balão volumétrico                                  |                                  | 0,0025  | B                             | triangular    | 2,44949          | 0,00102                       | 1,00000                   | 0,00102            |  |
| 20                             |  | contribuição da incerteza da leitura do balão volumétrico                                     |                                  | 0,0020  | A                             | não aplicável | 2,44949          | 0,00082                       | 1,00000                   | 0,00082            |  |
| 21                             |  | contribuição da temperatura   |                                  | 0,0500  | B                             | retangular    | 1,73205          | 0,02887                       | 1,00000                   | 0,02887            |  |
| 22                             | <b>Diluição de padrões</b>                         |   | nível de                         | 0,010   | mg/kg                         |               |                  |                               | 0,00005                   |                    |  |
| 23                             | <b>u(volume)</b>                                   | incerteza associada ao volume de solução  | 10,0000 mL                       | 0,0300  |                               |               | 0,03002          | 1                             | 0,03002                   |                    |  |
| 24                             |  | contribuição da incerteza de calibração do balão volumétrico                                  |                                  | 0,00250 | B                             | triangular    | 2,44949          | 0,00102                       | 1,00000                   | 0,00102            |  |
| 25                             |  | contribuição da incerteza da leitura do balão volumétrico                                     |                                  | 0,00200 | A                             | não aplicável | 2,44949          | 0,00082                       | 1,00000                   | 0,00082            |  |
| 26                             |  | contribuição da temperatura   |                                  | 0,05000 | B                             | retangular    | 1,73205          | 0,02887                       | 1,00000                   | 0,02887            |  |
| 27                             | <b>u(volume)</b>                                   | incerteza associada à micropipeta 1   | 0,1000 mL                        | 0,0003  |                               |               | 0,00034          | 1                             | 0,00034                   |                    |  |
| 28                             |  | contribuição da incerteza de calibração da micropipeta 1                                      |                                  | 0,00039 | B                             | triangular    | 2,44949          | 0,00016                       | 1,00000                   | 0,00016            |  |
| 29                             |  | contribuição da incerteza da leitura (ajuste de Volume a dispensar) da micropipeta 1          |                                  | 0,00018 | A                             | não aplicável | "-----"          | 0,00018                       | 1,00000                   | 0,00018            |  |
| 30                             |  | contribuição da temperatura   |                                  | 0,05000 | B                             | retangular    | 1,73205          | 0,02887                       | 1,00000                   | 0,02887            |  |
| 31                             | <b>u(volume)</b>                                   | incerteza associada à micropipeta 2   | 0,0500 mL                        | 0,0002  |                               |               | 0,00015          | 1                             | 0,00015                   |                    |  |
| 32                             |  | contribuição da incerteza de calibração da micropipeta 2                                      |                                  | 0,00012 | B                             | triangular    | 2,44949          | 0,00005                       | 1,00000                   | 0,00005            |  |
| 33                             |  | contribuição da incerteza da leitura (ajuste de Volume a dispensar) da micropipeta 2          |                                  | 0,00005 | A                             | não aplicável | "-----"          | 0,00005                       | 1,00000                   | 0,00005            |  |
| 34                             |  | contribuição da temperatura   |                                  | 0,0500  | B                             | retangular    | 1,73205          | 0,02887                       | 1,00000                   | 0,02887            |  |
| 35                             | <b>u(pureza)</b>                                   | incerteza associada à pureza do padrão  | 98,0 %                           | 0,4900  | B                             | não aplicável | 1,73205          | 0,28290                       | 1                         | 0,28290            |  |
| 36                             | <b>Curva analítica (por nível de concentração)</b> |   |                                  |         |                               |               |                  |                               |                           |                    |  |

(a) fontes de incerteza: preparação de amostras, preparação e diluição de padrões;

|    | A | B   | C                                      | D | E             | F           | G     | H              | I  | J                                   | K              | L                | M             | N              | O        | P |
|----|---|---|--|---|---------------|-------------|-------|----------------|----|-------------------------------------|----------------|------------------|---------------|----------------|----------|---|
| 34 |   |   | contribuição da temperatura            |   |               |             |       | 0,0500         | B  | retangular                          | 1,73205        | 0,02887          | 1,00000       | 0,02887        | infinito |   |
| 35 |   | <b>u(pureza)</b>  | incerteza associada à pureza do padrão |   |               | <b>98,0</b> | %     | <b>0,4900</b>  | B  | não aplicável                       | <b>1,73205</b> | <b>0,28290</b>   | <b>1</b>      | <b>0,28290</b> |          |   |
| 36 |   | <b>Curva analítica (por nível de concentração)</b>        |  |   |               |             |       |                |    |                                     |                |                  |               |                |          |   |
| 37 |   | 0,0100  | mg/kg                                  |   |               |             |       | <b>0,00109</b> | A  |                                     |                |                  |               | <b>0,00109</b> | 23       |   |
| 38 |   | 0,0125  | mg/kg                                  |   |               |             |       | <b>0,00096</b> | A  |                                     |                |                  |               | <b>0,00096</b> | 23       |   |
| 39 |   | 0,0150  | mg/kg                                  |   |               |             |       | <b>0,00100</b> | A  |                                     |                |                  |               | <b>0,00100</b> | 23       |   |
| 40 |   | 0,0175  | mg/kg                                  |   |               |             |       | <b>0,00122</b> | A  |                                     |                |                  |               | <b>0,00122</b> | 23       |   |
| 41 |   | <b>Precisão intermediária (por nível de concentração)</b> |  |   |               |             |       |                |    |                                     |                |                  |               |                |          |   |
| 42 |   | 0,0100  | mg/kg                                  |   |               |             |       | <b>0,00014</b> | A  |                                     |                |                  |               | <b>0,00014</b> | 23       |   |
| 43 |   | 0,0125  | mg/kg                                  |   |               |             |       | <b>0,00032</b> | A  |                                     |                |                  |               | <b>0,00032</b> | 23       |   |
| 44 |   | 0,0150  | mg/kg                                  |   |               |             |       | <b>0,00034</b> | A  |                                     |                |                  |               | <b>0,00034</b> | 23       |   |
| 45 |   | 0,0175  | mg/kg                                  |   |               |             |       | <b>0,00049</b> | A  |                                     |                |                  |               | <b>0,00049</b> | 23       |   |
| 46 |   |   |  |   |               |             |       |                |    |                                     |                |                  |               |                |          |   |
| 47 |   | <b>Incerteza combinada (por nível de concentração)</b>    |  |   |               |             |       |                |    |                                     |                |                  |               |                |          |   |
| 48 |   | 0,0100  | mg/kg                                  |   | <b>0,0013</b> | mg/kg       | 12,9% | veff =         | 36 | K (segundo distribuição de Student) | 2,03           | <b>U (conc.)</b> | <b>0,0026</b> | mg/kg          | 26,2%    |   |
| 49 |   | 0,0125  | mg/kg                                  |   | <b>0,0013</b> | mg/kg       | 10,5% | veff =         | 58 |                                     | 2,00           |                  | <b>0,0026</b> | mg/kg          | 21,1%    |   |
| 50 |   | 0,0150  | mg/kg                                  |   | <b>0,0015</b> | mg/kg       | 9,8%  | veff =         | 79 |                                     | 1,99           |                  | <b>0,0029</b> | mg/kg          | 19,4%    |   |
| 51 |   | 0,0175  | mg/kg                                  |   | <b>0,0018</b> | mg/kg       | 10,1% | veff =         | 86 |                                     | 1,99           |                  | <b>0,0035</b> | mg/kg          | 20,1%    |   |
| 52 |   |   |  |   |               |             |       |                |    |                                     |                |                  |               |                |          |   |

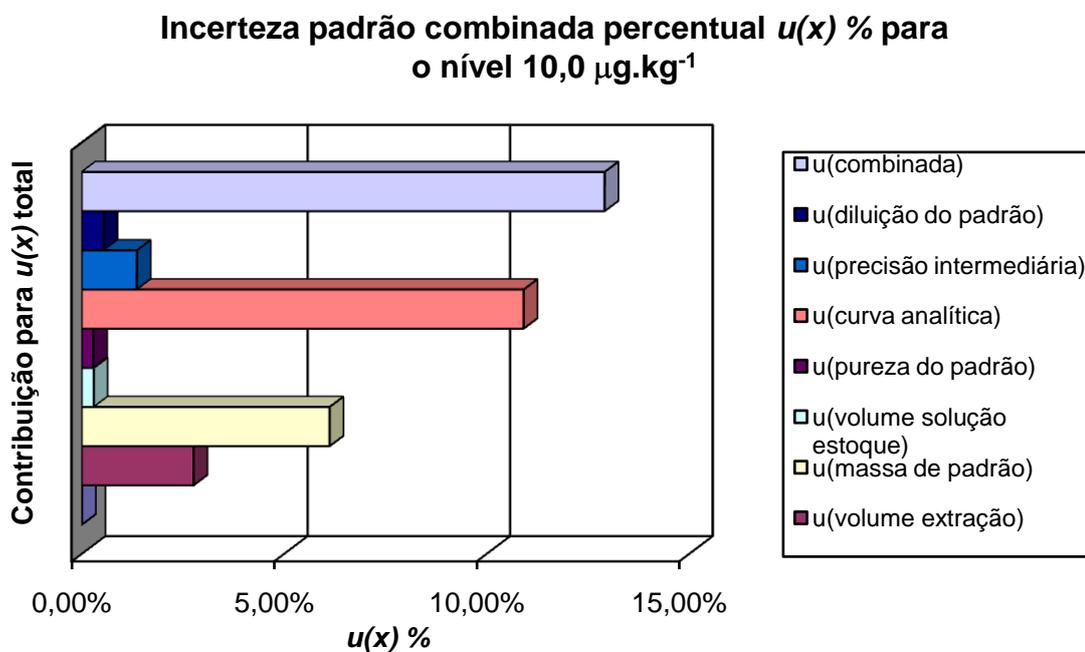
(b) fontes relativas à curva analítica, aos ensaios de precisão intermediária e valores obtidos para  $u$  e  $U$  do método por nível de concentração

**Figura 49.** Imagem em "printscreen" da planilha de cálculo empregada na estimativa da incerteza de medição do método.

Os valores  $U\%$  dos quatro níveis de fortificação para todos os agrotóxicos validados são apresentados na Tabela 23. Valores extremamente elevados não são apresentados. De modo geral, os valores de  $U\%$  são inferiores a 50%, limite estabelecido pelo Documento SANCO/10684/2009 (SANCO, 2010).

A Figura 55 mostra as principais fontes de incerteza e suas contribuições percentuais para a incerteza padrão ( $u$ ) total do método para o nível  $10,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

validados. O ajuste ponderado. Este tipo de modelo confere pesos aos diferentes níveis de concentração em função da variância dos resíduos dos resultados experimentais em relação ao valor predito pela equação ajustada da curva analítica. Neste caso, os pontos com menor variância tendem a apresentar maior peso. Em uma curva heterocedástica, os resíduos após o ajuste podem ser significativos no que tange à estimativa da incerteza de medição, levando à significativa contribuição da  $u$  curva analítica) para a incerteza do método.



**Figura 50.** Contribuição das principais fontes de incerteza para a incerteza padrão total do método, no nível de concentração  $10,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

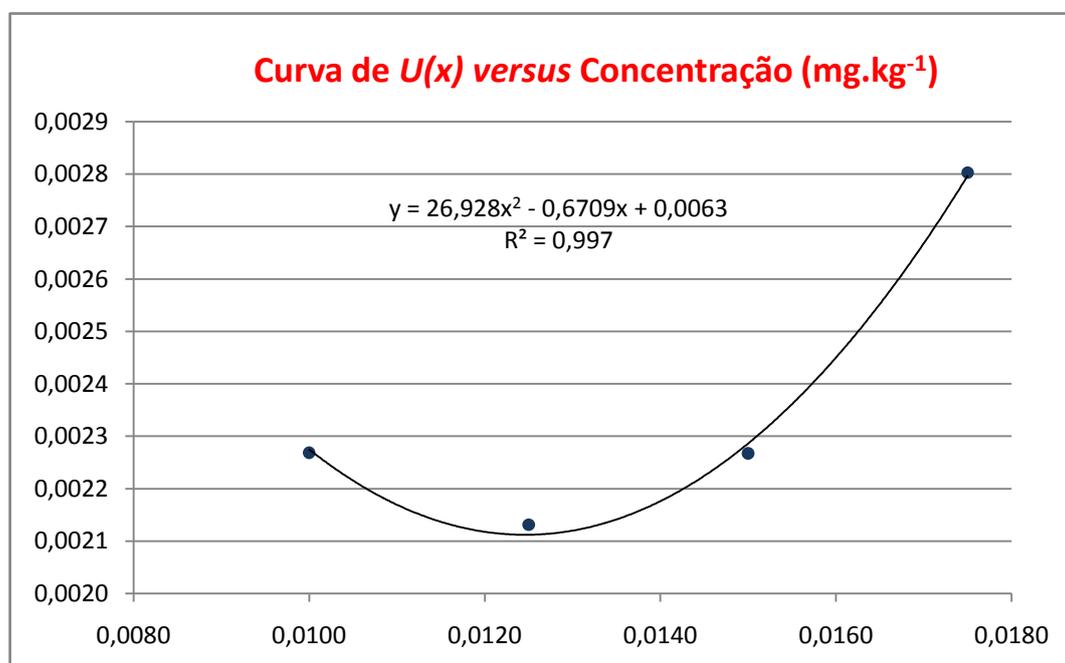
Na Figura 55 percebe-se claramente que as principais contribuições para a incerteza do método são as incertezas associadas à curva analítica e à medição da massa do padrão para o preparo da solução estoque. Para a curva analítica, tal resultado pode ser explicado pelo modelo de ajuste definido para a maioria dos agrotóxicos

Em relação à incerteza de medição da massa dos padrões a elevada contribuição deve-se ao fato de a quantidade medida de cada padrão ser muito pequena, em torno de 10, mg para cada agrotóxico. Assim, a incerteza da balança, embora pequena, torna-se significativa diante de massas muito pequenas.

A Figura 56 apresenta a curva de incerteza expandida  $U(x)$  do método em função do nível de concentração para o analito acetamiprido. Claramente observa-se que os valores da incerteza, refletem a estimativa de incerteza para a curva analítica com valores de  $U(x)$  menores para os níveis de concentração com menor variância. O ajuste escolhido para modelagem dos valores de  $U(x)$  X *concentração* e o ajuste quadrático. Este foi o ajuste aplicado para todos os agrotóxicos validados.

O objetivo deste gráfico é permitir a obtenção rápida do valor da incerteza de medição para um determinado analito presente em uma amostra nas análises de rotina.

Nas análises de rotina, a incerteza da medida analítica da concentração do analito presente na amostra será obtida por interpolação do valor da concentração calculada para o analito na curva de  $U(x)$  X *Concentração*.



**Figura 51.** Curva de incerteza expandida  $U(x)$  em função da concentração para o método. O valor da incerteza é dados em mg.kg<sup>-1</sup>.

#### IV.3.5 Estudos de precisão e exatidão do método

A Tabela 23 apresenta os resultados das recuperações médias (n=6) percentuais e o CV%, para os 150 agrotóxicos que foram fortificados em leite, aos níveis de 10,0; 12,5; 15,0 e 17,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , extraídos pelo método QuEChERS e analisados por LC-MS/MS em modos de ionização ESI+ e

ESI- conforme condições de detecção otimizadas (Tabela 19).

Os resultados demonstraram que apenas o agrotóxico tiofanato metílico não foi detectado em nenhum dos níveis de fortificação estudados, indicando que o método de extração não foi eficiente para este agrotóxico.

---

Valores extremos foram investigados nos resultados de recuperação obtidos para cada nível de concentração pelo teste de Grubbs (ISO, 1994). Neste teste, empregou-se a estatística de Grubbs para dois valores extremos. Após a eliminação dos valores extremos, se necessário, o teste foi aplicado sucessivamente até que novos valores não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados (HORWITZ, 1995).

Os valores dos limites de detecção ( $LD_m$ ) e quantificação ( $LQ_m$ ) do método apresentados na Tabela 23 foram obtidos experimentalmente. O valor de  $LD_m$  foi obtido através da análise dos cromatogramas individuais de cada agrotóxico em relação à seletividade e a razão sinal/ruído. O menor nível de concentração que apresentou  $S/R > 3$  e seletividade adequada para todos os agrotóxicos foi o nível  $5,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , sendo este definido como o  $LD_m$  do método, valor muito próximo do estimado para o equipamento (Tabela 22).

O valor de  $LQ_m$  foi obtido experimentalmente e tomado como o menor nível de fortificação que apresentou precisão satisfatória  $CV\% < 20\%$  para cada um dos analitos. Sendo este igual a  $10,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , valor correspondente ao LMR para a maioria dos agrotóxicos validados e muito próximo daquele estimado para o  $LQ_i$  do equipamento (Tabela 22). Este nível de concentração é definido na legislação vigente como o nível de referência para a tomada de decisão aplicado à agrotóxicos para os quais não há LMR definido em leite.

Os agrotóxicos 2,4,5-T; 2,4-D e fluroxipir apresentaram recuperações fora da faixa de aceitação (70 – 120%), contudo, a análise dos resultados dos três dias de validação revela que este comportamento é característico destes compostos, como demonstram os valores de  $CV\%$ , todos abaixo do limite de 20%, evidenciando que,

embora estes agrotóxicos não apresentem boa recuperação em leite, apresentam boa precisão nos ensaios de recuperação. Em relação às incertezas calculadas para estes agrotóxicos, todas encontram-se abaixo do limite máximo recomendado de 50% (SANCO, 2010). Assim, os agrotóxicos 2,4,5-T; 2,4-D e fluroxipir foram considerados validados no método quantitativo.

Nenhum dos parâmetros de desempenho definidos para aceitação de um determinado agrotóxico como validado para o método quantitativo foram atendidos por 4,7% dos agrotóxicos ensaiados, são eles: amitraz, carbossulfano, cimoxanil, famoxadona, flumetrina, isoxaflutol e tiodicarbe. Estes apresentaram valores de  $Rec\%$  fora da faixa de aceitação (70 – 120%) e  $CV\%$  e  $U\%$  acima dos limites máximos estabelecidos, 20 e 50% respectivamente.

O agrotóxico iprodiona apresentou em todos os níveis de concentração para os quais foram realizados experimentos de recuperação, valores de  $CV\% > 20\%$ . Para este agrotóxico os valores de incerteza calculados foram anormalmente elevados, não sendo, portanto apresentados na Tabela 23. Diante destes resultados a iprodiona não pode ser considerada validada no método quantitativo nem no método qualitativo (“*screening*”).

Os valores obtidos de  $CV\%$  para o agrotóxico 3-hidroxycarbofurano estão todos acima de 20%, embora as  $Rec\%$  e as incertezas estejam dentro dos limites aceitáveis. A não aceitação dos valores de  $CV\%$  para este agrotóxico demonstra que o mesmo não apresenta precisão nas condições nas quais o método foi validado, não gerando, portanto, resultados confiáveis para quantificação deste agrotóxicos em leite. Todavia, os resultados dos testes de seletividade para este agrotóxico permitem seu emprego em um método de “*screening*”.

---

Benfuracarbe apresentou valores de CV% > 20% em três dos quatro níveis de fortificação, não apresentando desempenho adequado quanto à precisão dos resultados obtidos. A incerteza calculada para o nível de fortificação de 10,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de 74,7% apresenta-se muito acima do limite de 50%, revelando o mau desempenho deste agrotóxico no método.

Oxifluorfen apresentou de CV% >20% e no nível de fortificação de 10,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e incertezas anormalmente elevadas em todos os níveis de fortificação (valores não apresentados na Tabela 23), inviabilizando sua validação, de modo análogo ao observado para a iprodiona.

Para o agrotóxico diclorprope os valores de Rec% obtidos foram, inferiores a 70% nos níveis de fortificação de 10,0 e 12,5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , para os demais níveis, os valores encontram-se dentro da faixa. Contudo, este comportamento não é sistemático como revela a análise dos dados de recuperação dos três dias de ensaio. Soma-se a isto o valor da incerteza de 58,3%, para o primeiro nível de fortificação, acima do limite de aceitação.

Aldicarbe e pimetozina apresentaram valores de incerteza calculada para o nível de fortificação de 10,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  acima de 50%, 52,3% e 54,0% respectivamente. Os demais parâmetros avaliados encontram-se dentro dos limites estabelecidos. Como os valores dos LMRs para estes agrotóxicos são de 10,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , os mesmos não podem ser validados para um método quantitativo neste nível de concentração por apresentarem incertezas elevadas no mesmo.

Todos os 10 agrotóxicos não validados no método quantitativo, 6,7% do total, por não atenderem, a um ou mais critérios de desempenho, apresentaram desempenho satisfatório em relação à seletividade do método e à razão sinal/ruído, superior a 6

para todos no menor nível de concentração estudado, sendo portanto considerados validados para método de screening.

Os demais agrotóxicos, 140 (93,3% do total), atenderam a todos os critérios de aceitação em todos os níveis de fortificação avaliados e foram validados para aplicação no método de determinação e quantificação de resíduos de agrotóxicos em leite. Carbendazim e profam, que apresentaram incertezas de 55,0% e 66,3% no nível de fortificação de 10,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  foram validados no método quantitativo devido ao valor do LMR, para ambos, ser de 50,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , o que permite a análise destes agrotóxicos, em níveis superiores, para os quais os valores de incerteza são inferiores a 50%.

Os resultados obtidos para Rec% e CV% de todos os 140 agrotóxicos validados estão em conformidade com os dados de validações de resíduos em agrotóxicos disponíveis na literatura, González-Rodríguez et al.(2005) obteve valores de LOD<sub>mínimo</sub> iguais a 0,01  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e LOQ<sub>mínimo</sub> iguais a 0,02  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para 40 agrotóxicos validados por GC-MS/MS, os valores das recuperações médias dos três níveis de concentração avaliados obtidas pelos autores oscilaram na faixa de 81 a 110% com CV% < 15%. Estes dados comparados aos obtidos para o método validado neste trabalho, para o qual foram validados 140 agrotóxicos de diversas classes químicas diferentes, para os quais as recuperações médias, em quatro níveis de concentração, variam entre 82 a 105% com CV% <15 com LOD de 0,005  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e LOQ de 0,01  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para todos os agrotóxicos validados, demonstram a qualidade do método validado, usando uma metodologia de extração muito mais simples que aquela empregada pelos autores. Bogialli et al.(2006) obtiveram resultados semelhantes aos de González-Rodríguez et al.(2005), para 30 agrotóxicos distintos, empregados como herbicidas e fungicidas, em três níveis de concentração, empregando a

técnica de LC-MS/MS como sistema de detecção/quantificação.

Fernandez-Álvares et al.(2008) avaliaram 30 piretróides e organofosforados por GC com detecção por captura microeletrônica, que permitiu aos autores alcançar níveis de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) próximos à sub nanogramas por quilo. Todavia a metodologia de extração envolve aquecimento do extrato a temperatura de até 100°C, o que pode provocar a degradação de agrotóxicos termolábeis, reduzindo, assim, o escopo analítico do método. As recuperações e os coeficientes de variação obtidos pelos autores são comparáveis aos obtidos neste trabalho.

Dagnac et al.(2009) validaram 44 agrotóxicos por LC-MS/MS, empregando como metodologia de extração a aplicação de *clean-up* através da utilização de carbono grafitizado, C18 em combinação com sulfato de sódio, sulfato de magnésio e sílica polimericamente ligado à fase etilenodiaminopropil. Foram obtidas recuperações entre 60 e 113% com CV% < 17%. Comparando-se estes dados com os obtidos neste trabalho e levando-se em consideração que a metodologia aqui

aplicada é bem mais simples e barata que aquela aplicada por Dagnac e colaboradores e que os valores de recuperações e CV% são melhores do ponto de vista da eficiência do processo, pode-se dizer, com segurança, que a metodologia aqui apresentada é mais eficiente, além de contemplar um escopo mais amplo

Chung e Chan (2010) validaram 98 agrotóxicos pela técnica LC-MS/MS e obtiveram resultados muito semelhantes aos apresentados neste trabalho. Novamente tem-se evidências da eficiência do método validado aqui apresentado. Dentre todos os autores mencionados acima, apenas Chung e colaboradores determinaram a incerteza expandida do método por eles proposto. Esta apresenta valores muito próximos aos obtidos nos ensaios aqui realizados.

Os comentários apresentados nos parágrafos anteriores quanto ao desempenho do método, não deixam dúvidas quanto a confiabilidade dos resultados do mesmo e sua potencialidade para aplicação em análises de rotina.

**Tabela 21.** Recuperações médias (%), coeficientes de variação (CV%), incerteza expandida do método, limites de detecção, limites de quantificação do método, obtidos em leite, e valores de LMR para cada agrotóxico.

| Agrotóxicos/nível de concentração | 10,0 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 12,5 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 15,0 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 17,5 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | LD mg/kg | LQ mg/kg | LMR mg/kg           |
|-----------------------------------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|----------|----------|---------------------|
|                                   | Média                    | CV (%) | U (%) |          |          |                     |
| 2,4,5-T                           | 67,9                     | 16,6   | 40,3  | 65,2                     | 9,6    | 27,8  | 70,2                     | 12,8   | 23,9  | 65,1                     | 10,0   | 24,1  | 0,005    | 0,010    | n.d.                |
| 2,4-D                             | 62,2                     | 13,1   | 41,5  | 58,2                     | 12,1   | 27,6  | 66,1                     | 18,2   | 23,8  | 60,9                     | 12,0   | 24,3  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2,3</sup> |
| 2,4-DB                            | 101,7                    | 17,3   | 36,5  | 102,8                    | 16,3   | 26,0  | 103,9                    | 18,9   | 22,4  | 98,5                     | 15,4   | 21,4  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>   |
| 3-hidroxicarbofurano              | 97,3                     | 33,2   | 49,1  | 107,0                    | 22,8   | 32,2  | 105,9                    | 29,5   | 26,1  | 109,5                    | 27,6   | 23,6  | 0,005    | ---      | 0,1 <sup>3</sup>    |
| Acefato                           | Não validado             |        |       |                          |        |       |                          |        |       |                          |        |       |          |          |                     |
| Acetamiprido                      | 101,2                    | 6,7    | 26,2  | 106,9                    | 12,5   | 21,1  | 106,8                    | 11,1   | 19,4  | 99,7                     | 13,7   | 20,1  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>   |
| Aldicarbe                         | 105,3                    | 12,6   | 52,3  | 114,2                    | 19,7   | 36,6  | 113,7                    | 10,9   | 30,0  | 111,8                    | 21,7   | 30,4  | 0,005    | 0,05     | 0,01 <sup>2,3</sup> |
| Aldicarbe sulfona                 | 102,0                    | 15,9   | 29,4  | 111,0                    | 15,5   | 22,9  | 114,0                    | 16,1   | 20,7  | 102,1                    | 16,2   | 20,4  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2,3</sup> |
| Aldicarbe sulfóxido               | 96,5                     | 14,0   | 48,5  | 91,5                     | 16,9   | 33,4  | 102,5                    | 14,1   | 26,5  | 99,4                     | 14,2   | 25,0  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2,3</sup> |

| Agrotóxicos/nível de concentração | 10,0 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 12,5 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 15,0 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 17,5 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | LD mg/kg | LQ mg/kg | LMR mg/kg             |
|-----------------------------------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|----------|----------|-----------------------|
|                                   | Média                    | CV (%) | U (%) |          |          |                       |
| Amitraz                           | 354,9                    | 82,5   |       | 279,3                    | 102,6  |       | 380,3                    | 98,2   |       | 276,7                    | 101,2  |       | 0,005    | ---      | 0,01 <sup>2</sup>     |
| Aramita                           | 97,9                     | 8,1    | 24,4  | 102,5                    | 8,9    | 19,5  | 104,6                    | 8,9    | 17,9  | 101,7                    | 9,8    | 18,0  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>     |
| Azinfós etil                      | 97,5                     | 13,3   | 30,0  | 101,9                    | 10,5   | 21,6  | 105,9                    | 10,2   | 18,8  | 102,1                    | 15,8   | 19,5  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>1</sup>     |
| Azinfós metil                     | 100,1                    | 9,6    | 18,3  | 102,3                    | 7,1    | 16,2  | 103,0                    | 9,1    | 15,7  | 99,3                     | 7,2    | 15,3  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>1</sup>     |
| Azoxistrobina                     | 103,4                    | 6,3    | 37,7  | 105,0                    | 9,4    | 26,1  | 108,4                    | 10,0   | 21,5  | 104,1                    | 8,2    | 20,3  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>     |
| Barban                            | 101,2                    | 17,5   | 46,4  | 98,0                     | 16,3   | 34,3  | 100,6                    | 18,8   | 30,3  | 95,7                     | 14,5   | 30,0  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Benalaxil                         | 100,4                    | 9,3    | 23,6  | 103,8                    | 12,1   | 18,9  | 106,6                    | 10,4   | 16,8  | 103,7                    | 8,5    | 15,9  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Benfuracarbe                      | 77,3                     | 11,9   | 74,7  | 71,1                     | 25,9   | 49,0  | 76,0                     | 27,5   | 39,3  | 68,3                     | 29,2   | 39,5  | 0,005    | ----     | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Benomil                           | 94,6                     | 16,4   | 30,1  | 97,2                     | 18,2   | 24,8  | 103,7                    | 15,8   | 23,0  | 93,9                     | 14,2   | 23,4  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Bentazona                         | 95,2                     | 8,5    | 44,9  | 96,1                     | 11,4   | 30,6  | 95,5                     | 9,6    | 24,8  | 94,8                     | 14,7   | 24,6  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| BF 500-3                          | 96,1                     | 12,8   | 27,4  | 103,1                    | 13,6   | 20,9  | 112,3                    | 18,4   | 19,3  | 105,4                    | 17,2   | 19,0  | 0,005    | 0,010    |                       |
| Bifentrina                        | 75,8                     | 10,6   | 45,0  | 82,3                     | 17,7   | 31,1  | 83,5                     | 17,2   | 24,9  | 81,9                     | 19,8   | 23,8  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>2</sup>     |
| Boscalida                         | 101,1                    | 9,5    | 22,0  | 104,3                    | 7,9    | 18,0  | 105,8                    | 7,6    | 16,6  | 97,0                     | 7,7    | 16,4  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Carbaril                          | 100,6                    | 8,4    | 35,2  | 108,3                    | 11,7   | 25,1  | 115,5                    | 14,0   | 21,7  | 103,9                    | 13,5   | 21,6  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Carbendazim                       | 97,4                     | 10,8   | 55,0  | 103,4                    | 13,1   | 34,9  | 104,5                    | 15,3   | 28,1  | 104,8                    | 15,7   | 29,3  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Carbofurano                       | 104,2                    | 10,5   | 27,5  | 108,8                    | 12,1   | 20,7  | 115,5                    | 12,9   | 18,5  | 104,4                    | 14,9   | 18,9  | 0,005    | 0,010    | 0,1 <sup>1</sup>      |
| Carbossulfano                     | 41,3                     | 25,7   |       | 36,3                     | 33,6   |       | 36,2                     | 34,1   |       | 32,5                     | 36,9   |       | 0,005    | ----     | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Ciazofamida                       | 102,8                    | 7,3    | 18,9  | 104,4                    | 7,6    | 16,2  | 104,1                    | 6,7    | 15,5  | 100,6                    | 8,7    | 15,9  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Cimoxanil                         | 206,0                    | 886,7  |       | 101,7                    | 82,1   |       | 166,9                    | 114,2  |       | 92,3                     | 132,3  |       | 0,005    | ----     | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Cinidon etílico                   | 100,9                    | 15,9   | 30,9  | 101,7                    | 11,8   | 23,4  | 109,6                    | 14,6   | 20,6  | 104,2                    | 16,3   | 19,9  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Ciproconazol                      | 103,1                    | 12,7   | 31,1  | 101,4                    | 10,1   | 23,5  | 100,4                    | 9,1    | 19,8  | 92,9                     | 14,4   | 18,8  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Ciprodinil                        | 92,0                     | 18,7   | 36,0  | 95,1                     | 12,8   | 24,8  | 103,0                    | 10,2   | 20,1  | 98,7                     | 12,3   | 19,5  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Ciromazina                        | 93,0                     | 13,8   | 26,9  | 94,5                     | 10,6   | 19,9  | 90,5                     | 16,2   | 18,3  | 88,1                     | 10,7   | 17,6  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2</sup>     |
| Clorbufan                         | 93,2                     | 14,4   | 27,9  | 95,3                     | 10,7   | 21,4  | 91,0                     | 16,0   | 20,0  | 88,4                     | 10,7   | 19,6  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Clorfenvinfós                     | 98,3                     | 10,3   | 22,4  | 108,8                    | 16,2   | 19,2  | 112,0                    | 18,9   | 18,6  | 101,3                    | 17,0   | 18,6  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>     |
| Cloroxuron                        | 99,8                     | 9,8    | 31,7  | 103,5                    | 10,7   | 21,5  | 102,8                    | 10,3   | 18,1  | 98,7                     | 10,1   | 18,4  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Clorpirifós                       | 96,0                     | 8,7    | 20,5  | 96,0                     | 9,1    | 16,8  | 97,6                     | 7,5    | 15,3  | 94,0                     | 7,4    | 14,8  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>1,3</sup>   |
| Clorpirifós metil                 | 99,1                     | 14,0   | 25,0  | 99,2                     | 10,3   | 19,9  | 101,8                    | 5,9    | 17,7  | 96,1                     | 9,9    | 17,6  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>1,2,3</sup> |
| Cresoxim metil                    | 98,7                     | 8,4    | 23,0  | 104,7                    | 10,4   | 19,0  | 104,4                    | 11,8   | 17,8  | 100,9                    | 10,8   | 17,7  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2</sup>     |
| Deltametrina                      | 92,2                     | 15,2   | 28,0  | 97,0                     | 16,9   | 21,8  | 98,2                     | 13,5   | 19,3  | 96,3                     | 18,9   | 19,9  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>2,3</sup>   |
| Di-alato                          | 99,7                     | 21,9   | 37,7  | 103,6                    | 19,2   | 30,8  | 107,1                    | 16,5   | 28,8  | 96,2                     | 13,1   | 29,2  | 0,005    | 0,010    | 0,2 <sup>3</sup>      |
| Diazinona                         | 99,3                     | 12,2   | 24,9  | 101,3                    | 6,9    | 18,7  | 105,6                    | 9,0    | 16,6  | 99,4                     | 9,9    | 16,1  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>1,3</sup>   |
| Dicloflanida                      | 100,9                    | 10,5   | 23,7  | 107,0                    | 10,7   | 19,5  | 109,9                    | 7,8    | 17,7  | 103,4                    | 7,2    | 17,2  | 0,005    | 0,010    |                       |
| Diclorprope                       | 66,0                     | 18,6   | 58,3  | 64,1                     | 14,9   | 38,8  | 76,1                     | 16,5   | 33,3  | 70,4                     | 19,9   | 35,8  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Diclorvós                         | 102,8                    | 16,7   | 35,3  | 104,5                    | 15,3   | 27,0  | 106,9                    | 15,9   | 23,0  | 94,6                     | 15,3   | 21,2  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>2</sup>     |
| Difenoconazol                     | 101,5                    | 5,6    | 24,0  | 104,5                    | 8,9    | 19,1  | 108,2                    | 9,4    | 17,3  | 100,0                    | 9,2    | 17,0  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>     |
| Diflubenzuron                     | 101,4                    | 12,8   | 42,6  | 103,1                    | 12,0   | 27,1  | 107,6                    | 14,5   | 21,8  | 99,5                     | 9,9    | 22,1  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Dimetoato                         | 101,4                    | 12,3   | 32,8  | 106,1                    | 10,0   | 23,8  | 111,2                    | 10,0   | 20,5  | 100,6                    | 10,6   | 20,5  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>2</sup>     |
| Dinocape                          | 97,2                     | 6,6    | 36,4  | 99,1                     | 6,6    | 23,6  | 99,1                     | 8,1    | 18,9  | 92,2                     | 5,8    | 18,7  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Dinosebe                          | 97,1                     | 11,9   | 36,2  | 87,5                     | 10,7   | 25,3  | 95,8                     | 10,5   | 21,3  | 92,0                     | 10,7   | 21,2  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>     |
| Dinoterbe                         | 97,9                     | 7,6    | 31,1  | 95,6                     | 9,9    | 22,2  | 99,6                     | 13,8   | 19,3  | 93,3                     | 7,8    | 18,7  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |

| Agrotóxicos/nível de concentração | 10,0 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 12,5 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 15,0 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 17,5 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | LD mg/kg | LQ mg/kg | LMR mg/kg            |
|-----------------------------------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|----------|----------|----------------------|
|                                   | Média                    | CV (%) | U (%) |          |          |                      |
| Dissulfotona                      | 89,7                     | 19,1   | 31,1  | 97,0                     | 18,7   | 23,9  | 96,6                     | 17,3   | 21,0  | 93,6                     | 14,7   | 20,1  | 0,005    | n.d.     | 0,02 <sup>3</sup>    |
| Dissulfotona sulfona              | 98,9                     | 10,6   | 22,9  | 103,7                    | 10,3   | 18,4  | 107,1                    | 10,4   | 16,5  | 101,7                    | 9,9    | 15,7  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>3</sup>    |
| Dissulfotona sulfóxido            | 101,8                    | 7,2    | 19,1  | 104,0                    | 8,9    | 16,6  | 106,4                    | 10,3   | 15,9  | 102,1                    | 7,5    | 15,8  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>3</sup>    |
| Espiroxamina                      | 103,9                    | 5,2    | 22,8  | 104,9                    | 7,6    | 17,2  | 106,0                    | 7,6    | 15,4  | 101,4                    | 6,2    | 15,1  | 0,005    | 0,010    | n.d.                 |
| Etiona                            | 96,2                     | 9,5    | 23,7  | 102,4                    | 12,0   | 19,1  | 104,7                    | 11,8   | 17,9  | 100,1                    | 14,0   | 18,9  | 0,005    | 0,010    | n.d.                 |
| Etofumesato                       | 98,9                     | 8,2    | 21,4  | 103,5                    | 10,5   | 18,2  | 108,9                    | 10,0   | 16,8  | 100,7                    | 6,7    | 16,2  | 0,005    | 0,010    | n.d.                 |
| Etoprofós                         | 101,5                    | 6,9    | 23,3  | 104,7                    | 8,8    | 18,8  | 110,8                    | 10,2   | 17,4  | 103,7                    | 11,3   | 17,6  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2,3</sup>  |
| Etoxissulfurom                    | 86,5                     | 9,0    | 38,3  | 94,1                     | 12,3   | 25,7  | 98,2                     | 10,5   | 21,1  | 94,1                     | 11,7   | 21,5  | 0,005    | 0,010    | n.d.                 |
| Etrinós                           | 96,9                     | 6,9    | 22,3  | 102,6                    | 9,2    | 17,9  | 104,4                    | 9,0    | 16,3  | 97,2                     | 8,5    | 16,0  | 0,005    | 0,010    | n.d.                 |
| Famoxadona                        | 124,7                    | 110,5  |       | 112,2                    | 123,9  |       | 78,2                     | 119,1  |       | 102,2                    | 76,9   |       | 0,005    | ---      | <sup>3</sup>         |
| Fenamidona                        | 101,0                    | 8,5    | 26,1  | 101,5                    | 9,8    | 20,1  | 104,3                    | 9,3    | 18,1  | 98,7                     | 9,3    | 18,1  | 0,005    | 0,010    | 0,01                 |
| Fenamifós                         | 101,0                    | 6,6    | 21,7  | 104,4                    | 7,1    | 17,8  | 104,8                    | 9,4    | 16,6  | 98,7                     | 8,8    | 16,3  | 0,005    | 0,010    | 0,005 <sup>2,3</sup> |
| Fenamifós sulfona                 | 101,5                    | 6,9    | 22,6  | 103,8                    | 8,6    | 18,2  | 109,2                    | 8,6    | 16,7  | 101,9                    | 7,4    | 16,4  | 0,005    | 0,010    | 0,005 <sup>2,3</sup> |
| Fenamifós sulfóxido               | 98,5                     | 6,9    | 18,6  | 102,5                    | 9,0    | 16,3  | 106,7                    | 8,0    | 15,3  | 100,9                    | 6,9    | 15,0  | 0,005    | 0,010    | 0,005 <sup>2,3</sup> |
| Fenarimol                         | 103,3                    | 8,2    | 26,6  | 101,9                    | 7,9    | 21,1  | 101,1                    | 9,9    | 18,8  | 96,3                     | 8,8    | 17,8  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>3</sup>    |
| Fenexamida                        | 103,4                    | 7,8    | 23,0  | 103,2                    | 8,9    | 18,7  | 101,5                    | 9,6    | 17,3  | 97,0                     | 6,9    | 16,9  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2</sup>    |
| Fenpropimorfe                     | 90,2                     | 6,6    | 19,9  | 91,2                     | 9,1    | 16,7  | 92,7                     | 7,9    | 15,4  | 88,2                     | 7,7    | 15,3  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2,3</sup>  |
| Fentiona                          | 90,6                     | 9,8    | 21,9  | 93,3                     | 9,2    | 18    | 87,7                     | 9,6    | 16,6  | 82,9                     | 7,8    | 16,3  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>    |
| Fentiona sulfóxido                | 98,7                     | 6,9    | 21,1  | 102,7                    | 6,9    | 17,6  | 107,5                    | 7,0    | 16,2  | 99,6                     | 7,1    | 15,8  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>    |
| Fentoato                          | 102,1                    | 9,3    | 20,8  | 103,6                    | 9,7    | 17,3  | 107,6                    | 9,8    | 16,3  | 99,8                     | 9,0    | 16,2  | 0,005    | 0,010    | n.d.                 |
| Fipronil                          | 98,4                     | 7,5    | 33,8  | 107,4                    | 13,8   | 24,6  | 109,4                    | 13,0   | 21,3  | 99,2                     | 16,0   | 21,7  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>2</sup>    |
| Fipronil sulfona                  | 100,6                    | 10,4   | 35,2  | 104,1                    | 11,6   | 23,5  | 102,6                    | 13,0   | 19,4  | 99,3                     | 9,0    | 19,0  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>2</sup>    |
| Fluasifope p-butilico             | 95,5                     | 7,9    | 28,6  | 102,1                    | 12,0   | 21,0  | 109,6                    | 13,6   | 18,7  | 102,0                    | 16,7   | 19,6  | 0,005    | 0,010    | 0,1 <sup>3</sup>     |
| Fludioxonil                       | 99,5                     | 6,7    | 36,1  | 101,2                    | 8,8    | 24,2  | 101,0                    | 7,9    | 19,8  | 98,6                     | 8,2    | 19,8  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2</sup>    |
| Flumetrina                        | 80,6                     | 45,7   |       | 100,0                    | 29,9   |       | 101,9                    | 38,7   |       | 112,5                    | 37,5   |       | 0,005    | 0,010    | n.d.                 |
| Fluquinconazol                    | 100,5                    | 11,4   | 29,5  | 100,7                    | 10,6   | 21,0  | 105,2                    | 10,5   | 18,1  | 97,1                     | 8,6    | 17,9  | 0,005    | 0,010    | 0,03 <sup>3</sup>    |
| Fluroxipir                        | 65,7                     | 11,4   | 43,8  | 64,1                     | 8,0    | 29,1  | 70,2                     | 16,4   | 24,5  | 64,5                     | 12,1   | 24,4  | 0,005    | .        | 0,05 <sup>3</sup>    |
| Flutriafol                        | 100,5                    | 12,8   | 31,4  | 101,2                    | 13,0   | 22,6  | 101,8                    | 12,3   | 19,6  | 96,6                     | 11,4   | 19,7  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>    |
| Foransulfurom                     | 101,5                    | 16,4   | 30,2  | 97,0                     | 15,1   | 24,4  | 94,3                     | 16,5   | 22,6  | 94,5                     | 18,5   | 22,7  | 0,005    | 0,010    | n.d.                 |
| Forato                            | 100,3                    | 11,8   | 23,4  | 101,2                    | 9,0    | 19,0  | 107,1                    | 9,2    | 17,5  | 100,6                    | 6,6    | 17,0  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>3</sup>    |
| Forato sulfóxido                  | 98,9                     | 8,2    | 17,5  | 103,9                    | 8,4    | 15,9  | 106,7                    | 8,4    | 15,6  | 99,5                     | 7,7    | 15,9  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>3</sup>    |
| Fosalona                          | 99,5                     | 10,0   | 23,8  | 106,2                    | 12,7   | 19,0  | 108,8                    | 13,7   | 17,7  | 102,8                    | 10,1   | 17,5  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>    |
| Fosmete                           | 102,0                    | 8,3    | 21,5  | 102,0                    | 8,1    | 17,9  | 103,6                    | 8,9    | 16,7  | 99,2                     | 7,7    | 16,3  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>    |
| Furatiocarbe                      | 99,1                     | 7,9    | 25,0  | 103,4                    | 8,1    | 18,8  | 109,3                    | 9,9    | 16,9  | 100,9                    | 8,7    | 16,7  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>    |
| Hexaconazol                       | 94,4                     | 12,3   | 26,6  | 102,4                    | 13,2   | 21,6  | 104,1                    | 13,7   | 19,7  | 100,7                    | 15,6   | 19,5  | 0,005    | 0,010    | n.d.                 |
| Hexitiazoxi                       | 95,8                     | 6,3    | 20,6  | 96,0                     | 8,7    | 16,7  | 98,5                     | 7,6    | 15,4  | 95,0                     | 7,9    | 15,4  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>3</sup>    |
| Imazalil                          | 100,2                    | 17,0   | 29,2  | 99,3                     | 8,4    | 20,7  | 100,9                    | 9,3    | 17,4  | 100,5                    | 18,1   | 17,4  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>    |
| Imidacloprido                     | 105,8                    | 10,2   | 33,0  | 106,1                    | 11,1   | 24,1  | 106,5                    | 11,7   | 20,1  | 97,4                     | 16,4   | 19,2  | 0,005    | 0,010    | 0,1 <sup>3</sup>     |
| Indoxacarbe                       | 102,1                    | 8,6    | 23,2  | 104,6                    | 9,1    | 18,1  | 105,8                    | 5,8    | 16,4  | 98,1                     | 7,3    | 16,7  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>3</sup>    |
| Iprodiona                         | 100,0                    | 18,2   |       | 101,9                    | 11,3   |       | 100,5                    | 13,7   |       | 99,9                     | 16,4   |       | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>    |

| Agrotóxicos/nível de concentração | 10,0 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 12,5 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 15,0 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 17,5 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | LD mg/kg | LQ mg/kg | LMR mg/kg             |
|-----------------------------------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|----------|----------|-----------------------|
|                                   | Média                    | CV (%) | U (%) |          |          |                       |
| Iprovalicarbe                     | 101,3                    | 7,6    | 21,7  | 101,3                    | 7,4    | 17,4  | 103,6                    | 8,5    | 15,8  | 99,6                     | 9,6    | 15,4  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Isoproturon                       | 99,7                     | 9,2    | 36,9  | 106,6                    | 12,3   | 25,7  | 110,5                    | 13,1   | 22,1  | 100,6                    | 11,0   | 22,4  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Isoxaflutol                       | 224,7                    | 54,4   |       | 212,0                    | 62,7   |       | 206,6                    | 63,9   |       | 215,5                    | 60,8   |       | 0,005    | n.d.     | n.d.                  |
| Linuron                           | 95,6                     | 10,3   | 28,0  | 102,6                    | 11,6   | 21,1  | 104,5                    | 9,8    | 18,0  | 97,4                     | 9,8    | 17,2  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Malationa                         | 101,8                    | 7,6    | 17,6  | 104,5                    | 9,0    | 15,9  | 106,6                    | 7,0    | 15,3  | 99,4                     | 6,3    | 15,5  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>3</sup>     |
| Metalaxil                         | 102,1                    | 10,6   | 20,1  | 104,0                    | 7,3    | 16,9  | 104,6                    | 8,2    | 15,6  | 101,6                    | 10,0   | 15,3  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Metamidofós                       | 91,8                     | 12,8   | 30,2  | 100,0                    | 15,8   | 22,0  | 101,5                    | 12,8   | 18,2  | 92,8                     | 13,1   | 17,5  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>1</sup>     |
| Metazaclor                        | 98,8                     | 8,2    | 19,6  | 102,8                    | 8,0    | 16,4  | 103,5                    | 7,2    | 15,3  | 98,7                     | 9,3    | 15,5  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Meticonazol                       | 99,9                     | 11,4   | 23,1  | 105,1                    | 10,1   | 19,6  | 105,3                    | 12,1   | 18,5  | 99,6                     | 13,3   | 18,6  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>     |
| Metidationa                       | 101,2                    | 8,4    | 20,2  | 103,0                    | 7,1    | 17,2  | 103,7                    | 8,6    | 16,2  | 98,6                     | 7,1    | 15,8  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>1,3</sup>   |
| Metissulfurom metil               | 103,8                    | 16,8   | 32,0  | 104,5                    | 12,9   | 24,8  | 99,8                     | 17,9   | 22,6  | 98,8                     | 15,4   | 21,9  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Metomil                           | 100,3                    | 15,2   | 35,8  | 111,8                    | 17,0   | 25,4  | 118,3                    | 19,7   | 22,5  | 104,6                    | 18,2   | 23,0  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>1,2,3</sup> |
| Mevinfós                          | 102,8                    | 18,2   | 36,0  | 110,2                    | 13,6   | 25,7  | 108,0                    | 14,9   | 22,1  | 101,0                    | 17,2   | 22,3  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>1</sup>     |
| Miclobutanil                      | 106,2                    | 8,3    | 23,2  | 102,3                    | 7,8    | 18,8  | 104,6                    | 10,2   | 17,3  | 97,8                     | 7,6    | 16,7  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2,3</sup>   |
| Monocrotofós                      | 99,7                     | 18,8   | 39,5  | 110,3                    | 15,5   | 28,8  | 105,1                    | 15,1   | 24,1  | 98,1                     | 14,2   | 22,5  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Monolinuron                       | 100,4                    | 10,7   | 30,6  | 104,5                    | 17,1   | 22,9  | 110,7                    | 14,5   | 19,7  | 99,3                     | 15,2   | 19,6  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Ometoato                          | 93,6                     | 15,0   | 33,7  | 110,3                    | 19,7   | 23,8  | 105,4                    | 12,6   | 19,6  | 101,9                    | 19,6   | 21,0  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Oxamil                            | 103,4                    | 9,8    | 23,2  | 101,2                    | 10,1   | 18,5  | 101,7                    | 9,5    | 16,8  | 99,5                     | 9,5    | 16,6  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Oxassulfurom                      | 93,6                     | 14,1   | 34,9  | 94,4                     | 16,0   | 24,7  | 96,8                     | 17,7   | 21,5  | 95,8                     | 15,4   | 21,3  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Oxifluorfem                       | 94,7                     | 33,3   |       | 111,6                    | 20,3   |       | 108,4                    | 13,2   |       | 93,3                     | 20,0   |       | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Parationa etílica                 | 91,9                     | 15,7   | 31,0  | 93,0                     | 14,0   | 24,7  | 84,7                     | 12,4   | 22,0  | 86,0                     | 15,9   | 21,8  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>1</sup>     |
| Pencicuron                        | 99,1                     | 4,3    | 19,0  | 101,8                    | 6,5    | 16,5  | 106,8                    | 7,2    | 15,6  | 101,2                    | 6,7    | 15,4  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Penconazol                        | 100,1                    | 9,8    | 19,8  | 102,1                    | 8,0    | 17,2  | 100,7                    | 8,6    | 16,2  | 96,5                     | 6,6    | 15,7  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2,3</sup>   |
| Pendimetalina                     | 94,2                     | 5,3    | 17,4  | 94,6                     | 7,5    | 15,6  | 96,6                     | 7,5    | 14,8  | 93,0                     | 7,2    | 14,6  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Picolinafen                       | 98,4                     | 6,7    | 21,1  | 101,1                    | 10,6   | 17,5  | 104,8                    | 8,7    | 16,3  | 96,5                     | 10,4   | 16,7  | 0,005    | 0,010    | n.d.                  |
| Pimetrozina                       | 96,7                     | 14,3   | 54,0  | 101,0                    | 14,6   | 34,6  | 102,5                    | 16,4   | 26,1  | 98,0                     | 19,8   | 24,6  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>     |
| Piraclostrobina                   | 100,8                    | 13,2   | 35,9  | 107,2                    | 13,8   | 25,9  | 113,3                    | 16,2   | 21,8  | 101,3                    | 15,4   | 22,4  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>     |
| Pirazofós                         | 100,3                    | 9,0    | 24,0  | 102,3                    | 10,7   | 19,0  | 108,3                    | 10,3   | 17,4  | 99,7                     | 9,5    | 17,3  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>     |
| Piridaben                         | 92,8                     | 6,3    | 18,8  | 92,4                     | 9,6    | 16,1  | 93,8                     | 7,1    | 15,1  | 90,7                     | 8,1    | 15,1  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>3</sup>     |
| Piridato                          | 82,6                     | 12,8   | 28,0  | 86,2                     | 17,6   | 20,8  | 89,9                     | 15,2   | 17,9  | 84,5                     | 16,0   | 17,9  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Pirimetanil                       | 96,5                     | 10,5   | 30,5  | 101,4                    | 10,8   | 21,9  | 106,8                    | 12,2   | 19,8  | 98,3                     | 13,3   | 21,1  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2</sup>     |
| Pirimicarbe                       | 96,1                     | 5,6    | 26,9  | 101,3                    | 6,6    | 19,2  | 103,9                    | 9,3    | 16,7  | 97,3                     | 8,7    | 16,4  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2</sup>     |
| Pirimifós etil                    | 93,7                     | 6,0    | 17,5  | 98,0                     | 6,2    | 15,5  | 100,5                    | 5,8    | 14,6  | 95,6                     | 5,5    | 14,3  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>1</sup>     |
| Pirimifós metil                   | 94,4                     | 10,4   | 18,5  | 98,2                     | 7,4    | 15,9  | 102,2                    | 9,1    | 15,3  | 98,8                     | 8,0    | 15,1  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>1</sup>     |
| Procloraz                         | 95,2                     | 6,7    | 24,7  | 104,0                    | 11,1   | 19,4  | 108,9                    | 11,5   | 18,0  | 101,1                    | 11,2   | 18,5  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>3</sup>     |
| Profam                            | 94,6                     | 18,6   | 66,3  | 107,0                    | 15,1   | 43,8  | 116,0                    | 16,1   | 33,9  | 102,                     | 19,9   | 32,1  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>     |
| Profenofós                        | 98,2                     | 7,6    | 24,0  | 102,0                    | 10,2   | 18,9  | 104,7                    | 8,0    | 17,1  | 95,8                     | 6,9    | 17,4  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>     |
| Propargito                        | 97,0                     | 12,8   | 25,0  | 102,0                    | 11,6   | 19,3  | 106,9                    | 13,1   | 17,8  | 103,1                    | 14,8   | 18,2  | 0,005    | 0,010    | 0,1 <sup>2,3</sup>    |
| Propiconazol                      | 99,2                     | 7,9    | 20,7  | 103,4                    | 13,6   | 18,1  | 107,7                    | 14,7   | 17,2  | 102,0                    | 14,6   | 17,2  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2,3</sup>   |
| Propizamida                       | 99,6                     | 10,1   | 25,0  | 103,4                    | 9,0    | 19,3  | 102,0                    | 7,8    | 17,3  | 98,6                     | 10,7   | 17,4  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>     |

| Agrotóxicos/nível de concentração | 10,0 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 12,5 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 15,0 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | 17,5 µg.kg <sup>-1</sup> |        |       | LD mg/kg | LQ mg/kg | LMR mg/kg           |
|-----------------------------------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|----------|----------|---------------------|
|                                   | Média                    | CV (%) | U (%) |          |          |                     |
| Propoxur                          | 98,8                     | 9,6    | 33,7  | 106,6                    | 14,7   | 24,3  | 114,4                    | 16,5   | 21,6  | 104,0                    | 15,1   | 21,9  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>1,3</sup> |
| Prossulfuron                      | 95,1                     | 10,2   | 30,7  | 97,0                     | 10,8   | 21,8  | 98,8                     | 8,7    | 18,6  | 95,0                     | 7,9    | 18,8  | 0,005    | 0,010    | n.d.                |
| Quinalfós                         | 98,2                     | 9,7    | 20,1  | 100,6                    | 7,7    | 17,0  | 104,3                    | 9,5    | 16,1  | 97,9                     | 6,3    | 15,7  | 0,005    | 0,010    | n.d.                |
| Tebuconazol                       | 98,8                     | 13,7   | 24,7  | 100,6                    | 10,2   | 19,6  | 104,4                    | 9,6    | 17,6  | 93,0                     | 15,3   | 17,8  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2</sup>   |
| Tebufenozida                      | 99,2                     | 7,7    | 33,5  | 105,5                    | 10,2   | 24,0  | 107,3                    | 13,7   | 20,3  | 96,7                     | 7,7    | 19,0  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>   |
| TEPP                              | 91,4                     | 11,4   | 47,9  | 89,8                     | 14,6   | 32,3  | 97,7                     | 16,7   | 25,8  | 80,0                     | 13,4   | 24,4  | 0,005    | n.d.     | n.d.                |
| Tiabendazol                       | 96,7                     | 11,7   | 30,7  | 99,1                     | 11,5   | 22,2  | 99,5                     | 13,9   | 19,3  | 94,3                     | 9,3    | 18,5  | 0,005    | 0,010    | 0,2 <sup>2</sup>    |
| Tiacloprido                       | 104,5                    | 14,8   | 23,2  | 107,6                    | 10,1   | 19,4  | 101,6                    | 12,3   | 18,3  | 92,2                     | 18,6   | 18,8  | 0,005    | 0,010    | 0,03 <sup>3</sup>   |
| Tiametoxam                        | 104,1                    | 13,8   | 31,8  | 102,0                    | 13,0   | 23,4  | 104,5                    | 13,2   | 20,1  | 98,3                     | 21,3   | 20,5  | 0,005    | 0,010    | 0,02 <sup>3</sup>   |
| Tifensulfurom metil               | 94,2                     | 14,6   | 36,7  | 99,0                     | 16,3   | 25,7  | 99,8                     | 15,7   | 22,6  | 95,7                     | 16,4   | 24,2  | 0,005    | 0,010    | n.d.                |
| Tiodicarbe                        | 67,1                     | 43,8   |       | 46,8                     | 81,4   |       | 68,3                     | 42,3   |       | 55,9                     | 67,9   |       |          |          | n.d.                |
| Tiofanato metílico                |                          |        |       |                          |        |       |                          |        |       |                          |        |       |          |          | 0,05 <sup>3</sup>   |
| Tolilfluanaida                    | 100,2                    | 11,9   | 24,0  | 104,4                    | 11,9   | 19,5  | 104,9                    | 10,7   | 17,7  | 100,8                    | 16,9   | 18,2  | 0,005    | n.d.     | 0,02 <sup>3</sup>   |
| Triadimefon                       | 103,8                    | 8,3    | 24,0  | 104,0                    | 7,8    | 18,8  | 104,6                    | 7,1    | 16,8  | 99,9                     | 8,1    | 16,4  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2,3</sup> |
| Triadimenol                       | 98,1                     | 9,4    | 28,0  | 103,7                    | 9,4    | 21,1  | 105,4                    | 8,5    | 18,5  | 99,0                     | 11,2   | 18,2  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>2</sup>   |
| Triasulfurom                      | 97,6                     | 13,0   | 29,9  | 99,9                     | 13,1   | 22,4  | 107,8                    | 16,5   | 19,8  | 97,3                     | 17,5   | 19,3  | 0,005    | 0,010    | n.d.                |
| Triazofós                         | 102,4                    | 10,3   | 17,1  | 104,7                    | 6,5    | 15,4  | 104,7                    | 8,8    | 15,2  | 101,6                    | 7,4    | 15,2  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>   |
| Triclorfon                        | 99,7                     | 15,7   | 31,6  | 102,4                    | 12,9   | 23,3  | 105,5                    | 8,2    | 19,2  | 94,5                     | 12,6   | 18,3  | 0,005    | 0,010    | 0,1 <sup>3</sup>    |
| Tridemorfe                        | 92,2                     | 7,0    | 24,8  | 94,5                     | 7,8    | 18,2  | 95,3                     | 8,3    | 16,1  | 93,6                     | 10,6   | 16,4  | 0,005    | 0,010    | 0,05 <sup>3</sup>   |
| Trifloxistrobina                  | 102,7                    | 12,0   | 26,1  | 106,3                    | 11,9   | 20,3  | 110,7                    | 9,5    | 18,0  | 106,7                    | 13,8   | 18,2  | 0,005    | 0,010    | 0,01 <sup>3</sup>   |
| Triforin                          | 101,9                    | 7,6    | 38,1  | 105,4                    | 7,0    | 25,5  | 103,5                    | 10,1   | 21,3  | 101,4                    | 9,2    | 21,7  | 0,001    | 0,004    | 0,05 <sup>3</sup>   |

n.d. – agrotóxico sem LMR definido para leite;

1 – Brasil, 2010;

2 – Codex Alimentarius, 2011;

3- EC, 2011;

Para agrotóxicos com diferentes valores de LMR estabelecidos, é apresentado o menor valor. Exceto se houver LMR estabelecido pela legislação brasileira. Neste caso o valor listado é aquele estabelecido pelas autoridades brasileiras.

### 3.6 Robustez

O estudo da robustez é geralmente parte do desenvolvimento do método. Se não fossem realizados estudos durante as fases iniciais de desenvolvimento do método para otimização das condições de separação cromatográfica, do sistema de detecção de massas, da composição da fase móvel e do método de extração mais adequado ao propósito do trabalho a ser desenvolvido, dificilmente se chegaria aos resultados obtidos.

Na prática, isso significa que uma série de parâmetros de aptidão foram estabelecidos para assegurar que a validade do método analítico e da qualidade dos resultados obtidos pela aplicação do método são

mantidos sempre que este é usado. Assim, as variações dos parâmetros citados no parágrafo anterior avaliadas, e o conjunto de resultados obtidos na fase de otimização do método foram suficientes para assegurar a robustez método em condições laboratoriais de rotina.

## IV CONCLUSÕES

O método QuEChERS modificado utilizado para a extração dos agrotóxicos, demonstrou ser um método eficiente apresentando resultados de recuperação entre 90,0 e 105% para a maioria dos agrotóxicos validados, comprovando a confiabilidade do método desenvolvido. Os

---

valores de precisão obtidos ficaram, em sua maioria, abaixo de 15%, encontrando-se dentro dos limites considerados aceitáveis ( $CV \leq 20\%$ ). Os valores da incerteza expandida percentual ( $U\%$ ) ficaram abaixo do limite de 50%, portanto, aceitáveis.

Os valores de limite de quantificação do método foram:  $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$  para todos os 140 agrotóxicos validados no método quantitativo. Os limites de detecção estabelecidos para todos os agrotóxicos foram de  $5,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Os agrotóxicos amitraz, benfuracarbe, carbossulfano, cimoxanil, diclorprope, famoxadona, flumetrina, iprodiona, isoxaflutol, oxifluorfem e tiodicarbe, não validados para aplicação no método quantitativo, foram validados para método de screening. A metodologia de extração de resíduos destes agrotóxicos em leite deverá ser adequada ao grupo ou a cada um individualmente conforme necessário, para que os mesmo possam ser quantificados em amostras de rotina.

O procedimento proposto para a validação intralaboratorial, desenvolvido empregando a forma direta de validação com uso de padrões, permitiu a validação do método quantitativo e qualitativo para análise de resíduos de agrotóxicos em leite. Os parâmetros de desempenho seletividade, linearidade, exatidão, precisão intermediária, limite de detecção e limite de quantificação foram apropriados para a avaliação da adequação para uso do método.

A fundamentação do delineamento experimental e dos testes de hipóteses nas características de cada parâmetro de

desempenho e nas particularidades da análise de resíduos de agrotóxicos em leite conferiu eficiência ao processo de validação, além de praticidade de aplicação.

O método proposto é sensível, preciso, exato, robusto e possibilita a identificação e quantificação dos agrotóxicos estudados em leite, podendo ser usado na rotina de análises de resíduos de agrotóxico do laboratório de pesticidas do LANAGRO-MG, na análise de amostras dos programas oficiais de monitoramento desenvolvidos pelo MAPA, visto que todos os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos. O método será monitorado continuamente para garantir a qualidade dos resultados e os dados oriundos deste monitoramento serão analisados permitindo, assim, que se detecte em tempo hábil qualquer alteração nas condições do mesmo, corroborando sua robustez ou indicando a necessidade de interferência no mesmo.

## V. PERSPECTIVAS FUTURAS

O método poderá ser expandido para as demais matrizes derivadas de leite, como por exemplo, manteiga. Sendo necessária a avaliação da precisão de cada agrotóxico constante do escopo do método para as novas matrizes a serem introduzidas no escopo do método. Esta avaliação poderá ser feita através dos controles de qualidade (fortificados) inseridos em cada bateria de análise.

O método será colocado na rotina de análise do laboratório e seu desempenho monitorado continuamente através de amostras fortificadas, de nominadas controle de qualidade. As recuperações destas amostras serão determinadas e utilizadas na construção de uma série

---

histórica que demonstre a estabilidade do método.

Será solicitada junto ao INMETRO acreditação do método pela norma ISO/IEC 17025 a fim de garantir o reconhecimento em nível internacional da qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos pela aplicação do mesmo.

## VI BIBLIOGRAFIA

ABIA. *Anuário ABIA 2010: Guia Oficial da Associação Brasileira das indústrias de Alimentação*. São Paulo. ABIA - Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, 2010. 178 p.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. *ABNT NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro, 43 p, 2005.

AMARAL, D. A. *Intoxicações por agrotóxicos: diagnóstico e tratamento*. Florianópolis: CIT/SC; 1998. 25 p.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ARDREY, R. E. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd., 2003. 269 p.

BLASCO, C.; PICO, Y.; ANDREU, V. Analytical method for simultaneous determination of pesticide and veterinary drug residues in milk by CE-MS. *Electrophoresis I*, v. 30, p. 1698-1707, 2009.

BOGIALLI, S.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; LAGANÀ, A.; STABILE, A.; STURCHIO, E. Development of a multiresidue method for analyzing herbicide and fungicide residues in bovine milk based on solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, n. 1102, p. 1-10, 2006.

BOXTEL, A. L. V.; PIETERSE, B.; CENIJN, P.; KAMSTRA, J. H.; BROUWER, A.; WIERINGEN, W. V.; BOER, J.; LEGLER, J. Dithiocarbamates Induce Craniofacial Abnormalities and Downregulate *sox9a* during Zebrafish Development. *Toxicological Sciences*, v. 117, n. 1, p. 209–217, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Monografias de Agrotóxicos*. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia?cat=Monografias+de+Agrotoxicos&cat1=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM\\_Category%2FMonografias+de+Agrotoxicos%2F1c4830004f5fe4aaad62af067ac26136%2FPUBLISHED&on=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM\\_Content%2FMonografias%2F3a461a0044779e0f84ff7d15359461%2FPUBLISHED&showForm=no&siteArea=Agrotoxicos+e+Toxicologia&WCM\\_GLOBAL\\_CONTEXT=/wps/wcm/connect/Anvisa/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Publicacao+Agrotoxicos+e+Toxicologia/Monografias](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia?cat=Monografias+de+Agrotoxicos&cat1=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Category%2FMonografias+de+Agrotoxicos%2F1c4830004f5fe4aaad62af067ac26136%2FPUBLISHED&on=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Content%2FMonografias%2F3a461a0044779e0f84ff7d15359461%2FPUBLISHED&showForm=no&siteArea=Agrotoxicos+e+Toxicologia&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/Anvisa/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Publicacao+Agrotoxicos+e+Toxicologia/Monografias)>. Acesso em: 19 fev 2011.

BRASIL. *Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável*. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Brasília, 2006a, 210 p.

BRASIL. *Guia para o controle da qualidade para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrantes do PARA*. Agência

- 
- Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Gerência-Geral de Laboratórios de Saúde Pública – GGLAS, 2007. 46p.
- BRASIL. Lei n. 11.346. 15 set 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada e dá outras providências. *Diário Oficial da União – seção 1*, Brasília, 18 set 2006b. p. 1-2.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 8, 29 abr 2010. *Diário Oficial da União*, Brasília, 03 mai 2010. Seção 1, p. 27-30.
- BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129-146, 2003.
- CACHO, C.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; PÉREZ-CONDE, C.; CÁMARA, C. Clean-up of triazines in vegetable extracts by molecularly imprinted solid-phase extraction using a propazine-imprinted polymer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 376, p. 491-496, 2003.
- CAJKA, T.; HAJŠLOVA, J.; LACINA, O.; MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Rapid analysis of multiple pesticide in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection low-pressure gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1186, n. 2, p. 281-294, 2008.
- CARVALHO, G. R. *A Indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro*. Circular Técnica n.102. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2010. 12 p.
- CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.
- CAVALIERE, M. J.; CALORE, E. E.; PEREZ, N. M.; PUGA, F. R. Miotoxicidade por organofosforados. *Revista de Saúde Pública*, v. 30, n. 3, p. 267-72, 1996.
- CHAN, C. C.; LAM, H.; LEE, Y. C.; ZHANG, XUE-MING. Analytical Method Validation And Instrument Performance Verification. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2004. 303 p.
- CHANTAL J. G. M.; SMULDERS, R. G. D. M.; VAN KLEEF, A. G.; GOTTI, C.; VIJVERBERG, H. P. M. A Noncompetitive, Sequential Mechanism for Inhibition of Rat  $\alpha 4\beta 2$  Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors by Carbamate Pesticides. *Toxicological Sciences*, v. 82, p. 221-227, 2004.
- CHUI, Q. S. H. Qualidade em Curvas de Calibração. In: CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 17º, 2006, Foz do Iguaçu, Brasil. Anais...Foz do Iguaçu, 2006, p. 7773-7784.
- 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*, n. 1217, p. 4815-4824, 2010.
- CODEX ALIMENTARIUS. *Guidelines on Good Laboratory Practice In Residue Analysis: CAC/GL 40-1993*. v. 1. Roma: 2003. 36 p.

---

CODEX ALIMENTARIUS. *Pesticide Residues in Food: Maximum Residue Limits; Extraneous Maximum Residue Limits*. Disponível em:

[http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/PesticideServlet?Pesticides=0&Items=36&Items=%3E36&out\\_style=by+substance&Domain=PesticideMRLs&Language=english&query\\_form=%2Fmrls%2Fpestdes%2Fpest\\_q-e.htm](http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/PesticideServlet?Pesticides=0&Items=36&Items=%3E36&out_style=by+substance&Domain=PesticideMRLs&Language=english&query_form=%2Fmrls%2Fpestdes%2Fpest_q-e.htm). Acesso em: 11 set 2010

CODEX ALIMENTARIUS. *Pesticide Residues in Food: Maximum Residue Limits; Extraneous Maximum Residue Limits*. Roma. Disponível em:

<[http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/PesticideServlet?Pesticides=0&Items=36&Items=%3E36&out\\_style=by+substance&Domain=PesticideMRLs&Language=english&query\\_form=%2Fmrls%2Fpestdes%2Fpest\\_q-e.htm](http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/PesticideServlet?Pesticides=0&Items=36&Items=%3E36&out_style=by+substance&Domain=PesticideMRLs&Language=english&query_form=%2Fmrls%2Fpestdes%2Fpest_q-e.htm)>. Acesso em: 04 fev 2011.

COHEN, S. D. Mechanisms of Toxicological Interactions Involving Organophosphate Insecticides. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 4, p. 315-324, 1984.

COPE, W. G.; LEIDY, R. B.; HODGSON, E. Classes of Toxicants: Use Classes. In ERNEST HODGSON (Ed.). *Textbook of Modern Toxicology*. 3 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004. Cap. 5, p. 49-74.

CRL – DATA POLL. 2011. Disponível em: <<http://www.crl-pesticides-datapool.eu>>. Acesso em: 22 jan 2011.

DAGNAC, T.; GARCIA-CHAO, M.; PULLEIRO, P.; GARCIA-JARES, C.; LLOMPART, M. Dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of pesticides in raw bovine milk. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 3702-3709, 2009.

De HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. 3 ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2007. 489p.

De SOUZA, S. V. C. *Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análises de Alimentos*. 2007. 296 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Dell'OMO, G.; PLESKACHEVA, M. G.; WOLFER, D. P.; LIPP, H. P.; SHORE, R. F. Comparative Effects of Exposure to an Organophosphate Pesticide on Locomotor Activity of Laboratory Mice and Five Species of Wild Rodents. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 70, p. 138–145, 2003.

DeMICCO, A.; COOPER, K. R.; RICHARDSON, J. R.; WHITE, L. A. Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides in Zebrafish Embryos. *Toxicological Sciences*, v. 113, n. 1, p. 177–186, 2010.

DEMOLINER, A.; CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; GONÇALVES, F. F.; CLEMENTIN, R. M.; MILANI, M. R.; PRIMEL, E. G. 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. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 8, p. 1424-1433, 2010.

DIRECTIVE 657, EC. European Commission. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*. Bruxelas. 12 Ago 2002, L 221/8.

- 
- EC (European Commission). Directorate General for Health & Consumers. *Pesticides EU-MRLs* : Updated on 11/10/2010.. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm)>. Acesso em: 05 fev 2011.
- EC (European Commission). Regulamento (CE) n° 1213/2008. Relativo a um programa comunitário coordenado plurianual de controlo para 2009, 2010 e 2011, destinado a garantir o respeito dos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos alimentos de origem vegetal e animal e avaliar a exposição dos consumidores a estes resíduos. Jornal Oficial da União Européia, Bruxelas. 5 dez. 2008.
- ECOBICHON, D.J. Toxic effects of pesticides. In CASARETT e DOULL'S. *Toxicology: the basic science of poisons*. 4 ed. New York: Pergamon Press, 1991. Cap 22, p. 763-810.
- EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A. *Mass Spectrometry: Instrumentation, interpretation and applications*. 3 ed. Jhon Wiley & Sons, 2009. 388 p.
- ETO, M. *Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry*. Cleveland, Ohio: CRC, 1977. 387p.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC, Dez 1998, 61 p.
- EURACHEM/CITAC. *Quantifying uncertainty in analytical measurements*. Teddington: LGC, 2000. 120 p.
- EURACHEM/RELACRE. *Exemplos de Cálculos de Incertezas*. EURACHEM/RELACRE 1. Lisboa: RELACRE – Associação de Laboratórios Acreditados, 2002. 46 p.
- FERNANDEZ-ALVAREZ, M.; LLOMPART, M.; LAMAS, J. P.; LORES, M.; GARCIA-JARES, C.; CELA, R.; DAGNAC, T. Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine Milk. *Analytica Chimica Acta*, n. 617, p. 37-50, 2008.
- FOOt Print PDB. *Creating Tools for Pesticide Risk Assessment and Management in Europe*. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>>. Acesso em: 19 fev 2011.
- FOOtPrint PDB. *Creating Tools for Pesticide Risk Assessment and Management in Europe*. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>>. Acesso em: 19 fev 2011.
- FUKUTO T. R. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environmental Health Perspectives*, v. 87, p. 245-254, 1990
- GARRIDO-FRENICH, A.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, I.; ARREBOLA, F. J.; MARTINEZ VIDAL, J. L. Potentiality of Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry in Vanguard and Rearguard Methods of Pesticide Residues in Vegetables. *Analytical Chemistry*, v. 77, p. 4640-4648, 2005.
- GASSNER, B.; THRICH, A. W.; SCHOLTYSIK, G.; SOLIOZ, M. The Pyrethroids Permethrin and Cyhalothrin are Potent Inhibitors of the Mitochondrial Complex I. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 281, n. 2, p. 855-860, 1997.
- GOMES, A. T.; ALVES, E. R. A.; GOMES, A. L.; ZOCCAL, R. Mercado de leite: Uma análise dos preços recebidos pelos produtores nos últimos anos. *Revista de Política Agrícola*, n. 3, p. 5-12, 2004.

- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. J.; LIÉBANAS, F. J. A.; GARRIDO FRENICH, A.; VIDAL, J. L. M.; LÓPEZ, F. J. S. Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, n. 382, p. 164-172, 2005.
- GOULART, S. M.; de QUEIROS, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; de QUEIROS, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. *Talanta*, v. 75, p. 1320-1323, 2008.
- HEINZOW, B. e ANDERSEN, H. R. Biocides and Pesticides. . In DUFFUS, J. H. (Ed) & WORTH, H. G. J. (Ed). *Fundamental Toxicology*. Londres: The Royal Society of Chemistry, 2006. Cap. 22. p.291-302
- HERNANDEZ, F.; POZO, O. J.; SANCHO, J. V.; BIJLSMA, L., BARREDA, M.; PITARCH, E. Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. *Journal of Chromatography A*, v. 1109, n. 2, p.242-252, 2006.
- HIRAHARA, Y.; KIMURA, M.; INOUE, T.; UCHIKAWA, S.; OTANI, S.; HAGANUMA, A.; MATSUMOTO, N.; HIRATA, A.; MARUYAMA, S.; TIZUKA, T.; UKYO, M.; OTA, M.; HIROSE, H.; SUZUKI, S.; UCHIDA, Y. Validation of multiresidue screening methods for the determination of 186 pesticides in 11 agricultural products using gas chromatography. *Journal of Health Science*, v. 51, n. 5, p. 617-627, 2005.
- HODGSON E. (Ed.). *A Textbook of Modern Toxicology*. 3<sup>th</sup> ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2004. 582 p.
- HONG, J.; KIM, H.-Y.; KIM, D.-G.; SEO, J.; KIM, K. J. Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1038, n. 1, p. 2-35, 2004.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Analytical. Chemistry*, v. 54, p. 67A-76A, 1982.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure and Applied. Chemistry*, v. 67, p. 331-343, 1995.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados*. 1 ed Brasileira. Rio de Janeiro: 2009. 78 p.
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008*. 3 rev. Rio de Janeiro: Fev 2010. 20 p.
- IPAC -Instituto Português de Acreditação. Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos. Lisboa: IPAC, 2007. 19 p.
- ISO - International Organization for Standardizations. *ISO 5725-2. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*. Geneva: ISO, 1994. 42 p. (b)

---

ISO - International Organization for Standardizations. *ISO 5725-4. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method*. Geneva: ISO, 1994. 23 p. (d)

ISO (International Standards Organization). *ISO 11095. Linear calibration using reference materials*. Geneva: ISO, 1996. 29 p.

KHALILI-ZANJANI, M. R.; YAMINI, Y.; YAZDANFAR, N.; SHARIATI, S. Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction-gas chromatography-flame photometric detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 606, n. 2, p. 202-208, 2008.

KMELLÁR, B.; FODOR, P.; PAREJA, L.; FERRER, C.; MARTINEZ-UROZ, M. A.; VALVERDE, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. 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, p. 37-50, 2008a.

KMELLÁR, L.; HERNÁNDEZ-BROGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.. Multi-walled carbon nanotubes as efficient solid-phase extraction materials of organophosphorus pesticides from apple, grape, orange and pineapple fruit juices. *Journal of Chromatography A*, v. 1211, n. 1, p.33-42, 2008b.

KÖRBES, D.; DA SILVEIRA, A. F.; HYPOLITO, M. A.; MUNARO G. Organophosphate-related ototoxicity: Description of the vestibulocochlear system ultrastructural aspects of guinea pigs. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 76, n. 2, p. 238-44, 2010.

KOVALCZUK, T.; LACINA, O.; JECH, M.; POUSTKA, J.; HAJŠ;LOVÁ, J. Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Food Additives and Contaminants*, v. 25, n. 4, p. 444-457, 2008.

KRIEGER, R. (Ed.) *Hayes's Handbook of Pesticide Toxicology*. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego, CA, USA: Elsevier Inc., 2010. 522 p., v.1.

LANÇAS, F. M. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise. São Carlos: RiMa, 2004, 62 p.

LANDGRAF, M.; BEHRENS, J. H., BARCELLOS, M. N., FREWER, L. J.; NUNES, T. P.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Consumer purchase habits and views on food safety: A Brazilian study. *Food Control*, v. 21, p. 963-969, 2010.

LARA, W. H.; DE BATISTA, G. C. *Química Nova*, v. 15, n. 2, p. 161, 1992.

LeDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 1021-1036, 2011.

LEHOTAY, S. J., DE KOK, A., HIEMSTRA, M., van BODEGRAVEN, PETER. 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 the Association of Official Analytical Chemists International*, v.88, n.2, p.595-614, 2005.

LUKE, M. A., FROBERG, J. E., MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and

---

hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v.58, n.5, p.1020-1026, 1975.

McDOUGALL, P. The global agrochemical and seed markets: Industry prospects. In: CPDA ANNUAL MEETING. 2008, São Francisco. Disponível em: <<http://cpda.kma.net/index.asp?bid=151>>. Acesso em: 10/12/2010.

MACIEL, E. *Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica de Multiresíduos para Quantificação de Resíduos de Pesticidas em Manga (Mangifera Indica)*. 2005. 70f.. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistema) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piraciba.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MARGNI, M.; ROSSIER, D.; CRETZAZ, P.; JOLLIET, O. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 93, p. 379-392, 2002.

MARTINEZ-VIDAL, J. L.; ARREBOLA, F. J.; MATEU-SANCHEZ, M., Application to routine analysis of a method to determine multiclass pesticide residues in fresh vegetables by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.16, p.1106-1115, 2002.

MASTRANTONIO, G.; MACK, HANS-GEORG; VÉDOVA, C. O. D. Interpretation of the mechanism of acetylcholinesterase inhibition ability by organophosphorus compounds through a new conformational descriptor. an experimental and theoretical study. *Journal*

*of Molecular Modeling*, v. 14, p. 813–821, 2008.

MEDEIROS, R. J.; MONTEIRO, F. O.; SILVA, G. C.; NASCIMENTO JUNIOR, A. Casos de intoxicações exógenas em cães e gatos atendidos na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense durante o período de 2002 a 2008. *Ciencia Rural*. v. 39, n. 7, p. 2105-2110. 2009.

MELGAR, M. J.; SANTAUFEMIA, M.; GRACIA, M. A. Organophosphorus pesticide residues in milk and infant formulas from Spanish northwest. *Journal of environmental Science & Health*, v. 45, n. 7, p. 595-600, 2010.

MELO, M. M.; OLIVEIRA, N. J. F.; LAGO, L. A. Intoxicações causadas por pesticidas em cães e galos. Parte I. Organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. *Revista de Educação Continuada CRMV-SP*, v. 5, n. 2, p. 188 – 195, 2002.

MEZCUA, M.; REPETTI, M. R.; AGÜERA, A.; FERRER, C.; GARCÍA-REYES, J. F.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticides in milk-based infant formulas by pressurized liquid extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 389, n. 6, p. 1833-1840, 2007.

MILK POINT. Estatísticas-Série exportações. 2010.. Disponível em: <[http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/serie\\_exportacoes.htm](http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/serie_exportacoes.htm)>. Acesso em: 27 mai 2010.

MIRANDA, A. C.; MOREIRA, J. C.; CARVALHO, R.; PERES, F. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 12, n. 1, p. 7-14, 2007.

- MOL, H. G. J.; PLAZA-BOLANOS, P.; ZOMER, P.; De RIJK, T. C.; STOLKER, A. A. M.; MULDER, P. P. J. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 9450-9459, 2008.
- MOR, F.; OZMEN, O. Endosulfan-induced neurotoxicity and serum acetylcholinesterase inhibition in rabbits: The protective effect of Vit C. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 96, p. 108–112, 2010.
- MOSER, V. C.; CASEY, M.; HAMM, A.; CARTER, W. H.; SIMMONS, J. E.; GENNINGS; C. Neurotoxicological and Statistical Analyses of a Mixture of Five Organophosphorus Pesticides Using a Ray Design. *Toxicological Sciences*, v. 86, n. 1, p. 101–115, 2005.
- NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de Resíduos de Antibióticos do Leite Comercializado em Piracicaba, SP. *Revista de Nutrição*, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001
- NEAL A, P., YUAN Y., ATCHISON, W. D. Allethrin Differentially Modulates Voltage-Gated Calcium Channel. *Toxicological Sciences*, v. 116, n. 2, p. 604–613, 2010.
- NELSON, L.S.; PERRONE, J.; DeROOS, F.; STORK, C.; HOFFMAN, R. S. Aldicarb poisoning by an illicit rodenticide imported into the United States: Tres Pasitos. *Journal of toxicology*, v. 39, n. 5, p. 447-52, 2001.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in non-Pasteurized Milk on Retail Sale in Brazil: Prevalence of *Salmonella* Spp, *Listeria Monocytogenes* and Chemical Residues. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 211-215, 2004.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 201-204, 2007.
- NETHERLANDS. *General Inspectorate for Health Protection: Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*. 6 ed. The Hague: Ministry of Health, Welfare and Sport, 1996.
- NETO, B. B., SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como Fazer Experimentos*. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 413 p.
- NIESSEN, W. M. A. *Current Practice of Gas Chromatography – Mass Spectrometry*. New York: Marcel Dekker, Inc, 2001. 507 p.
- NIESSEN, W. M. A. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*. 3 ed. Nova York: Taylor & Francis Group, 2006. 543 p.
- OBANA, H.; AKUTSU, K.; OKIHASHI, M.; KAKIMOTO, S.; HORI, S. Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits using a high capacity absorbent polymer for water. *The Analyst*, v. 124, p. 1159-1165, 1999.
- OEHME, F. W.; MANNALA, S. Pesticide Use in Veterinary Medicine. IN: ROBERT KRIEGER. *Handbook of Pesticide Toxicology*. 2 ed. San Diego: Academic Press, 2001. v. 1, Cap. 8, p.263-264.
- OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a

---

qualidade do leite. *Higiene Alimentar*, v. 13, n. 62, p. 10-16, 1999.

OLIVEIRA, E. C. Comparação das Diferentes Técnicas para a Exclusão de “Outliers”. In: ENQUALAB- – Congresso da Qualidade em Metrologia, 2008, São Paulo, Brasil. *Anais...* São Paulo, Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP, 2008.

PAGLIUCA, G.; SERRAINO, A.; GAZZOTTI, T.; ZIRONI, E.; BORSARI, A.; ROSMINI, R. Organophosphorus pesticides residues in Italian raw milk. *Journal of Dairy Research*, v. 73, n. 3, p. 340–344, 2006.

PANCETTI, F.; OLMOS, C.; DAGNINO-SUBIABRE, A. S.; ROZAS, C. Noncholinesterase Effects Induced by Organophosphate Pesticides and their Relationship to Cognitive Processes: Implication for the Action of Acylpeptide Hydrolase. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 10, p. 623–630. 2007.

PANG, GUO-FANG; FAN, C. L.; LIU, Y. M.; CAO, Y. Z.; ZHANG, J. J.; LI, X. M.; LI, Z. Y.; YAN-PINGWU; GUO, T. T. Determination of Residues of 446 Pesticides in Fruits and Vegetables by Three-Cartridge Solid-Phase Extraction–Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, v. 89, n. 3, p. 740-771, 2006.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de Métodos Cromatográficos para a Determinação de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PERES, F.; PASTORELLO, T.; MOREIRA, J. C. Serão os Carrapaticidas

Agrotóxicos? Implicações na Saúde e na Percepção de Riscos de Trabalhadores da Pecuária Leiteira. *Ciência & Saúde Coletiva* [no prelo], 2011.

PICÓ, Y.; FARRÉ, M.; SOLER, C.; BARCELÓ, D. Confirmation of fenthion metabolites in oranges by IT-MS and QqTOF-MS. *Analytical Chemistry*, v. 79, n. 24, p. 9350-9363, 2007.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 92-98, 2009.

POPE, C. N. Organophosphorus Pesticides: Do they all Have the Same Mechanism of Toxicity? *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, n. 2, p. 161–181, 1999.

POPPENGA, R. H. e OEHME, F. W. Pesticide Use and Associated Morbidity and Mortality in Veterinary Medicine. In: ROBERT KRIEGER (Ed). *Hayes’ Handbook of Pesticide Toxicology*. 3 ed. Londres: Academic Press – Elsevier, 2010. v. 1, Cap. 7, 285-301.

PRASSAD, K. S. N.; CHHABRA, A. Organochlorine pesticide residues in animal feeds and fodders. *Indian Journal of Animal Science*, v. 71, n. 12, p. 1178–1180, 2001.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A.; ANDRADE, J.; JARDIM, I. C. S. F. *Métodos para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas*. 71 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente- Documentos, 2008. 8p.

RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. *Pesticide*

---

*Biochemistry and Physiology*, v. 88, p. 115–121, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *Journal of Chromatography A*, v. 1156, p. 201–205, 2007.

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

RICE, P. J.; ARTHUR, E. L.; BAREFOOT, A. C. Advances in pesticide environmental fate and exposure assessments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 14, p. 5367-5373, 2007.

ROSATI, J. L. R.; DUTRA, A. A. M.; MORAES, A. C. L.; FERREIRA, M. C. E. L.; ROCHA, L. F. R. Intoxicação por carbamatos e organofosforados. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 3, p. 73-97, 1995.

ROTHWELL, J. T.; BURNETT, T. J.; HACKET, K.; CHEVIS, R.; LOWE, L. B. Residues of zeta-cypermethrin in bovine tissues and milk following pour-on and spray application. *Pest Management Science*, v.57, p.993-999, 2001.

SALSTE, L.; EDWARDSSON, M.; PAGARD, U.; FLYGH, E.; LIEDGREN, A.; REBEDY, J.; PIHLSTÖM, T. *Simplified analysis of pesticide residues in food Matrix: Fruit and vegetables*. 8<sup>th</sup> European Pesticide Residue Workshop. EPRW. 2010 Strasbourg, França, Junho de 2010. Final Programme Book of Abstracts. Página 181 de 330 p.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*: Associação de

Variáveis Quantitativas. 3 ed. Belo Horizonte: Fundação de ensino e Pesquisa em medicina Veterinária e Zootecnia, 2007, p. 122-139.

SANCO, Commission of the European Communities (2003). *Document n° SANCO/10684/2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Bruxelas, 01 Jan 2010. 40 p.

SANTOS, M. G. S. *Determinação de Resíduos de Carbofurano e do Metabólito 3-Hidroxi-Carbofurano em Águas de Lavouras de Arroz Irrigado em Santa Catarina*. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

SCHENCK, F. J.; BROWN, A. N.; PODHORNIAK, L. V. A rapid multiresidue method for determination of pesticides in fruits and vegetables by using acetonitrile extraction/partitioning and solid-phase extraction column cleanup. *Journal of AOAC International*, v. 91, n. 2, p. 422-438, 2008.

SECCIA, S.; FIDENTEB, P.; MONTESANO, D.; MORRICA, P. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, n. 1214, p. 115-120, 2008.

SEREDA, B.; BOUWMAN, H.; KYLIN, H. Comparing Water, Bovine Milk, and Indoor Residual Spraying as Possible Sources of DDT and Pyrethroid Residues in Breast Milk. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 72, p. 897–908, 2009.

SGARBIERI, V. C. Physiological-functional properties of milk whey proteins.

---

*Revista de Nutrição*, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SHARMA, H. R.; KAUSHIK, A.; KAUSHIK, C.P. Pesticide residues in bovine milk from a predominantly agricultural state of Haryana, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 129, p. 349-357, 2007.

SINITOX - Sistema Nacional de Informações Toxicológicas. 2010. Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=8](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=8)>. Acesso em: 12 set 2010.

SOBOLEVA, E.; AHAD, K.; AMBRUS, A. Applicability of some mass spectrometric criteria for the confirmation of pesticides residues. *Analyst*, v. 129, p. 1123-1129, 2004

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006. 897p.

STAJNBAHER, D.; ZUPANCIC-KRALJ, L. Optimisation of programmable temperature vaporizer-based large volume injection for determination of pesticide residues in fruits and vegetables using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1190, n. 2, p. 316-326, 2008.

STOLKER, A. A. M.; RUTGERS, P.; OOSTERINK, E.; LASAROMS, J. J. P.; PETERS, R. J. B.; VAN RHIJN, J. A.; NIELEN, M. W. F. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, n. 391, p. 2309-2322, 2008.

TATE, C. M.; HEINY, J. S. Organochlorine compounds in bed sediment and fish tissue in the South Platte River Basin, USA, 1992-1993. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 30, p. 62-78, 1996.

THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, v. 125, p. 385-386, 2000.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R., WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TIAN, H. Determination of chloramphenicol, enrofloxacin and 29 pesticides residues in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 2010 [no prelo].

TIMERMAN, A. *Beba Leite*, 2010. Disponível em: <<http://www.bebaleite.com.br/livros/especialistas/index.html>>. Acesso em: 02 jun 2010.

TRAPÉ, A. Z. *Doenças Relacionadas a Agrotóxicos: Um Problema de Saúde Pública*. 1995. 175f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp. Campinas.

UNITED KINGDOM. Pesticide poisoning of animals in 2007: Investigations of suspected incidents in the United Kingdom. York. CRD – Chemical Regulations Directorate Pesticides 2007. Disponível em: <[http://www.pesticides.gov.uk/uploadedfiles/Web\\_Assets/PSD/PPAreport2007.pdf](http://www.pesticides.gov.uk/uploadedfiles/Web_Assets/PSD/PPAreport2007.pdf)>. Acesso em: 19 jan 2011.

USDA, United States Drug Agency. 2009. *Dairy: World Markets and Trade*.

---

Disponível em:

<<http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2009/122909dairyfull.pdf>>. Acesso em: 02 jun 2010.

US-FDA - United States Food and Drug Administration, *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, May 2001. Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services, Rockville, 20 p.

WAXMAN, M. F. *Agrochemical and Pesticide Safety Handbook*. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1998. 382 p.

WHO - World Health Organization. Geneva, 2009a. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/pesticides/en/>>. Acesso em 17 jan 2011.

WHO - World Health Organization. *Safety of Pyrethroids for Public Health Use: (WHO/CDS/WHOPEP/GCDPP/2005.10/WHO/PCS/RA/2005.1)*. Geneva: World Health Organization, 2005. 77p.

WHO – World Health Organization. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard And Guidelines to Classification*. Geneva: World Health Organization. 2009b. Disponível em: <[http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard\\_2009.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf)>. Acesso em 17 jan 2011.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. S. Toxicologia do praguicida aldicarb (“chumbinho”): aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos. *Ciência Rural*, v. 37, n. 4, p. 1206-1211, 2007.