

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química**

CLÁUDIA MARIA DIAS PAES

**Desenvolvimento de método LC/MS/MS
para análise multirresíduo de
agrotóxicos em café**

**Belo Horizonte
2012**

UFMG/ICEx/DQ.897^a
T. 506^a

CLÁUDIA MARIA DIAS PAES

**Desenvolvimento de método LC/MS/MS
para análise multirresíduo de
agrotóxicos em café**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química - Química Analítica.

**Belo Horizonte
2012**

P126d Paes, Cláudia Maria Dias
2012 Desenvolvimento de método LC/MS/MS para análise
D multirresíduo de agrotóxicos em café / Cláudia Maria
Dias Paes. 2012.
ix, 98 f. : il.

Orientadora: Zenilda de Lourdes Cardeal.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.

Bibliografia: f. 72-77; Apêndice: f. 78-98.

1. Química Analítica - Teses 2. Produtos químicos
agrícolas - Teses 3. Extração (Química) - Teses 4.
Espectrometria de massa - Teses 5. Análise ambiental -
Teses 6. Café - Teses I. Cardeal, Zenilda de Lourdes,
Orientadora II. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



**"Desenvolvimento de Método LC/MS/MS para Análise Multirresíduo de
Agrotóxicos em Café"**

Claudia Maria Dias Paes

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Zenilda de Lourdes Cardenal - Orientadora
UFMG

Profa. Adriana Ferreira Faria
UFMG

Prof. Marcelo Martins de Sena
UFMG

Belo Horizonte, 01 de março de 2012.

“Se projetas alguma coisa, ela te saíra bem e a luz brilhará em teus caminhos”.
Jó Cap.22.Verc.28

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor, meu Deus meu criador, muito obrigado pela sabedoria alcançada.

Aos meus queridos e amados pais muito obrigado pelo amor e força que a cada dia me fortalecia mais e mais para continuar lutando por este sonho.

Ao meu amado Amarildo Soares obrigado pelo carinho, atenção e por cada palavra dita em todos os momentos.

À professora Dra Zenilda de Lourdes Cardeal, muito obrigado por acreditar em meu potencial, pela paciência e oportunidade deste trabalho.

Aos meus amigos Helena Capobiano, Helvécio Costa Menezes e Evan Visser obrigado por ter enriquecido meu trabalho com seus conhecimentos.

À Gilsara Silva, Responsável pelo laboratório de agrotóxicos do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG), Pedro Leopoldo, por ceder os materiais e o instrumental e por permitir minha presença nas instalações do Laboratório durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Mauro Lúcio Gonçalves de Oliveira e Fabiano Aurélio Oliveira pela disponibilidade em conceder-me material bibliográfico de grande riqueza para o meu trabalho.

Minha eterna gratidão a todos da equipe do Laboratório de Agrotóxicos do (LANAGRO-MG), pela paciência, pelas longas e valiosas discussões durante o desenvolvimento deste trabalho e principalmente pelo carinho e atenção oferecido por todos. Muito obrigado, impossível de esquecer.

Aos meninos da informática do LANAGRO-MG que sempre colaboraram em muito com todo o suporte técnico necessário para meus estudos.

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

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

RESUMO

O café é uma mercadoria agrícola tropical de grande importância econômica e representa fração significativa para a economia de muitos países. No entanto, espécies indesejáveis de plantas ou animais que causam danos ou interferem na produção, no armazenamento e no transporte do café podem prejudicar seu comércio. Uma solução para isso é o uso de agrotóxicos, que em alguns casos fazem mal à saúde humana e ao meio ambiente.

Considerando os riscos ambientais e a segurança alimentar, é necessário o desenvolvimento de metodologias eficientes e seguras para a determinação de resíduos de agrotóxicos em café. Um método analítico ideal deve ser capaz de analisar o grande número de agrotóxicos existentes, sem interferência da matriz, de detectar e quantificar de forma inequívoca os analitos envolvidos, em baixos níveis de concentração, de forma precisa e com um pequeno número de medidas que proporcione economia de tempo.

Este trabalho consistiu no desenvolvimento de um método multirresíduo para análise de agrotóxicos em café por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC/MS/MS). O procedimento de extração utilizado foi o denominado QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). Foram feitas otimizações para que a extração do café fosse eficiente e seletiva.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, faixa de trabalho, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (S) e grau de recuperação do método.

160 analitos foram estudados e 128 foram validados. Os resultados mostraram que o método é seletivo. A faixa de trabalho mais adequada estava compreendida entre 10,0 e 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O método apresentou boa linearidade com coeficientes de determinação R^2 entre 0,9922 e 0,9999. A sensibilidade, a recuperação e a precisão mostraram-se adequadas para a análise multirresíduos de agrotóxicos em café. Os LD variaram entre 0,05 a 18,48 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os LQ entre 0,11 a 40,12 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A recuperação variou entre 70 a 120% com valores de $S < 20\%$.

O método foi aplicado à análise de 15 diferentes amostras de café.

ABSTRACT

Coffee is a major tropical agricultural commodity and represents a significant fraction to the economy of many countries. However, unwanted species of plants or animals that cause damage or interfere with the production, transport and storage of coffee can harm their trade. A solution to this is the use of pesticides, which in some cases harm to human health and the environment.

Considering environmental risks and food security, it is necessary the development of performing methodologies to the determination of pesticides residues in coffee. An ideal analytical method must be able to analyze the large number of existing pesticides, without interference of the matrix, to detect and quantify unequivocally the analytes involved at low levels of concentration, accurately and with a small number of measurement that provide time-saving.

This work consisted in the development of a multiresidue method for analysis of pesticides in coffee by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS/MS). The extraction procedure used was the so-called QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). The optimizations were carried out in order that the extraction of coffee was efficient and selective.

The following parameters were evaluated: selectivity, analytical range, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision (RSD) and recovery of the method. 160 analytes were studied and 128 were validated. The results showed that the method is selective. The best working range was between 10.0 and 100.0 g kg⁻¹. The method presented good linearity with determination coefficients R² between 0.9922 and 0.9999. The sensitivity, recovery and precision were adequate for the multiresidue analysis of pesticides in coffee. The LOD varied from 0.05-18.48 µg kg⁻¹ and LOQ varied from 0.11-40.12 µg kg⁻¹. The recovery varied between 70 and 120% with values of RSD < 20% .

The method was applied to the analyses of 15 coffee samples.

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Região do cromatograma situada entre 0,0 e 6,5 min, apresentando: o cromatograma de massas de íon total (a) e o cromatograma de massas extraído para as transições m/z selecionadas para agrotóxico nuarimol (b). **45**
- Figura 2.** Cromatograma de massas total (a) e de íon selecionado (b) das transições m/z monitoradas para o agrotóxico carbendazim obtidos com a coluna Shim-Pack XR-ODS II no nível de concentração $0,1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. **46**
- Figura 3.** Cromatograma de massas total (a) e de íon selecionado (b) das transições m/z monitoradas para os agrotóxicos carbendazim (b) obtidos com a coluna Synergi Fusion-RP no nível de concentração $0,1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. **47**
- Figura 4.** Cromatogramas totais dos gradientes A, B e C com composição: acetato de amônio, ácido fórmico e metanol. **50**
- Figura 5.** Cromatogramas totais das amostras branco de matriz (a) e branco de reagente (b). **53**
- Figura 6.** Cromatograma das transições m/z para o agrotóxico acefato. **54**
- Figura 7.** Cromatograma das transições m/z para o agrotóxico cresoxim metil. **55**
- Figura 8.** Cromatograma das transições m/z para o agrotóxico clorpirifós. **56**

LISTA DE TABELAS**Página**

Tabela 1.	Maiores exportadores de café arábica e robusta no período Novembro de 2010 a outubro de 2011.	2
Tabela 2.	Agrotóxicos estudados contendo classe, grupo químico, classificação toxicológica e local.	5
Tabela 3.	Métodos analíticos para a realização de estudos de agrotóxicos em amostras de café e ambientais.	14
Tabela 4.	Agrotóxicos selecionados para o desenvolvimento do método.	22
Tabela 5.	Composição da fase móvel para o teste de desempenho de coluna.	29
Tabela 6.	Composição do gradiente de fase móvel A.	30
Tabela 7.	Composição do gradiente de fase móvel B.	31
Tabela 8.	Composição do gradiente de fase móvel C.	31
Tabela 9.	Agrotóxicos selecionados para a realização dos experimentos piloto.	31
Tabela 10.	Tabela contendo dados para o preparo da curva analítica matrizada.	34
Tabela 11.	Tabela contendo dados para preparo das amostras fortificadas.	36
Tabela 12.	Tempos de retenção, natureza do íon precursor, transições MRM (1ª transição/quantificadora e a 2ª transição/qualificadora) utilizadas e energia de colisão aplicada.	40
Tabela 13.	Valores de razão sinal/ruído para os agrotóxicos avaliados no experimento de otimização das condições cromatográficas com o gradiente C.	52
Tabela 14.	Valores dos parâmetros da regressão e coeficiente de determinação.	59
Tabela 15.	Dados de recuperação (% , n=6), estimativas dos limites de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) do método obtido para café e LMRs de acordo com a legislação brasileira.	62
Tabela 16-	Agrotóxicos encontrados, com seus valores de LQ, LMRs de acordo com a legislação brasileira e o valor encontrado na amostra.	66
Tabela 17.	Analitos validados no método quantitativo.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
APCI	Ionização química a pressão atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
DDVP	Diclorfós
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzeno-Carboxen- Polidimetilsiloxana (<i>Divinylbenzene-Carboxen-polydimethylsiloxane</i>)
ECD	Detector por Captura de Elétrons (<i>Electron Capture Detector</i>)
EPA	Agência de Proteção Ambiental (<i>Environmental Protection Agency</i>)
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
FIA	Análise por Injeção em Fluxo (<i>Flow Injection Analysis</i>)
GC	Cromatografia Gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
GC/MS	Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas (<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
GCB	Carbono Grafite Preto (<i>Graphite Carbon Black</i>)
GPC	Cromatografia de permeação em Gel (Gel Permeation Chromatography)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LANAGRO-MG	Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC/MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LMR	Limites Máximos de Resíduos
LOD	Limite de Detecção (<i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de Quantificação (<i>Limit of Quantification</i>)
MMQO	Metódo dos Mínimos Quadráticos Ordinários
MRM	Monitoramento de Reação Múltipla
MS	Espectrometria de Massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
NPD	Detector de Nitrogênio e Fósforo (<i>Nitrogen and Phosphor Detector</i>)
OCP	Pesticidas Organoclorados (<i>Organochlorine Pesticide</i>)
OPP	Pesticidas Organofosforados (<i>Organophosphate Pesticide</i>)
PDMS	Fibra de polimetilsiloxano
PFPA	Anidrido Pentafluoropropionico
PSA	Primary Secondary Amine
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
RSD	Relative Standard Deviation
SAMOS	System for the Automated Monitoring of Organic pollution in Surface water
SDME	Single-Drop Microextraction
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Micro Extraction
USA	United States of America
UV	Ultraviolet

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	ix
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	1
1.1-Agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao meio ambiente.....	3
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE EM AMOSTRAS DE CAFÉ E AMBIENTAIS.....	7
2.1-Métodos analíticos para avaliar a exposição dos agrotóxicos utilizados em culturas de café.....	8
2.1.1- Preparação de amostras.....	8
2.2- Determinações analíticas de agrotóxicos no café	9
CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS.....	16
3.1- Objetivo Geral.....	17
3.2- Objetivos Específicos.....	17
CAPÍTULO 4 – PARTE EXPERIMENTAL.....	18
4.1-Instrumentação.....	19
4.2 - Reagentes e materiais.....	20
4.3 - Padrões analíticos dos agrotóxicos estudados.....	20
4.4 - Preparação das soluções de trabalho.....	22
4.5- Otimização do sistema de detecção de massas.....	27
4.5.1- Otimização dos parâmetros da fonte de ionização.....	27
4.6 - Otimização das condições cromatográficas.....	28
4.6.1- Seleção da coluna cromatográfica.....	28
4.6.2- Otimização da separação cromatográfica.....	29
4.7- Validação do Método Quechers modificado para determinação / quantificação de resíduos de agrotóxicos em café.....	32
4.7.1- Seletividade.....	32
4.7.2-Estudos de linearidade.....	32
4.7.3 -Análise dos Solventes e Reagentes pelo Método de Extração Quechers modificado.....	34
4.7.4 - Ensaio de Fortificação e Extração com o Método Quechers para Avaliação da Recuperação.....	35
4.7.4.1-Ensaio de Fortificação.....	35
4.7.5- Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	36
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
5.1-Otimização do sistema de detecção de massas.....	39
5.2- Otimização das condições cromatográficas.....	44
5.2.1-Seleção da coluna cromatográfica.....	45

5.2.2- Escolha da fase móvel.....	48
5.2.3-Otimização das condições de temperatura e fluxo de fase móvel.....	51
5.3- Validação do método QuEChERS para determinação/quantificação de resíduos de agrotóxicos em café.....	52
5.3.1- Seletividade.....	52
5.3.2- Sensibilidade.....	57
5.3.3- Estudos de linearidade.....	57
5.3.4 - Verificação da homocedasticidade das respostas instrumentais.....	58
5.3.5-Estudos de precisão e recuperação do método.....	61
5.4- Aplicações do método LC/MS/MS para análise multirresíduo de agrotóxicos em café.....	66
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE.....	77
Apêndice 1- Fórmula estruturais dos agrotóxicos presentes na Tabela 4.....	78

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae e possui mais de 70 espécies. Dentre essas espécies, duas são de significativa importância econômica, arábica (*Coffea arabica*) e robusta (*Coffea canephora*). A partir dos grãos torrados do fruto do cafeeiro produz-se o café, uma das bebidas mais populares no mundo, sendo apreciada pelo seu sabor e aroma característicos. Esse produto é uma mercadoria agrícola tropical de importância econômica e representa fração significativa para a economia de exportação de muitos países. Ele é comercializado globalmente e, por vezes, ocupou o segundo lugar do mundo, perdendo apenas para o petróleo entre os produtos mais negociados [1]. A Tabela 1 mostra os principais exportadores mundiais de café arábica e robusta [2].

Tabela 1. Maiores exportadores de café arábica e robusta no período Novembro de 2010 a Outubro de 2011.

Países	Quantidade de sacos de 60 kg exportados
Brasil	33957546
Vietnam	16800000
Colômbia	8034734
Indonésia	6056851
Índia	5934080
Honduras	3866371
Guatemala	3685714
Peru	3478612
Uganda	3177393
Etiópia	2938802
México	2794102
El Salvador	1926498
Nicarágua	1522809
Equador	1452805
Costa Rica	1218810
Papua Nova Guiné	1100373

O café contém antioxidantes benéficos como o ácido clorogênico [3]. Estudos epidemiológicos têm associado o consumo deste ácido à prevenção de doenças como diabetes de *mellitus*, doenças cardiovasculares e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo [4].

A cultura do cafeeiro, devido à sua longa permanência no campo, passa por diferentes condições ambientais, tornando-se suscetível à ocorrência de grande número de pragas e

doenças causadas por fungos, insetos, nematóides e plantas daninhas. Estes são grupos de organismos prejudiciais que causam efeitos sobre o desenvolvimento, produção e qualidade do fruto [5, 6].

Para reduzir espécies indesejáveis de animais ou plantas da cultura do cafeeiro podem ser utilizados diferentes inseticidas, fungicidas e herbicidas [5]. No entanto, esses produtos são tóxicos ao homem e ao meio ambiente e seu uso, assim como a determinação de seus resíduos, devem ser controlados.

1.1-Agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao meio ambiente

Os agrotóxicos tornaram-se um problema em termos ambientais e de saúde humana, principalmente, se a aplicação for indiscriminada. Na saúde, eles podem atingir os aplicadores dos produtos, os membros da comunidade e os consumidores dos alimentos contaminados com resíduos. Ao mesmo tempo, o agricultor que não conhece os efeitos danosos dos agrotóxicos na saúde pode superestimar seus benefícios e usar doses maiores que as necessárias.

Agrotóxicos organofosforados são os mais utilizados na cultura do café [3, 6, 8-13]. Estes compostos são menos persistentes no ambiente e mais potentes em relação às pragas do que os agrotóxicos organoclorados, apesar de serem neurotóxicos. Os compostos organofosforados, assim como os carbamatos, inibem a ação da enzima acetilcolinesterase (ChE). Ela é importante na regulação dos níveis de acetilcolina, um neurotransmissor que age na transmissão de impulsos nervosos na fibra muscular [14]. A presença de ChE é utilizada como índice biológico de exposição à agrotóxicos organofosforados e carbamatos [8].

Em estudo realizado no norte da África do Sul, em 1992, foi avaliado o grau de exposição de cafeicultores aos agrotóxicos: parationa, monocrotofós, diclorvós, triclorfon, disulfoton, benomil, mancozeb, maneb, zineb, bupiridinas, paraquat, flusifope p-butílico, glifosato, oxicloreto de cobre, minam e clordane [8], através da determinação da enzima ChE em glóbulos vermelhos e em plasma sanguíneo. Os resultados obtidos através de análise de glóbulos vermelhos mostraram que 77% dos trabalhadores apresentaram níveis de ChE abaixo do que é considerado normal pela

legislação da República da África do Sul. Houve também diminuição dos níveis de ChE plasmática para 27% das amostras de sangue analisadas [8, 15].

Em outro estudo, também realizado na África, no ano de 2003, especificamente no país de Camarões, os autores relataram sobre as fontes de contaminações mais comuns associadas à aplicação de agrotóxicos em culturas de café. Estas estão ligadas ao manuseio e armazenamento inadequados e à falta de equipamentos de proteção individual (EPI). Os principais herbicidas, fungicidas e inseticidas utilizados na cultura do café, naquele país foram: paraquat, glifosato, bentazona, metalaxil, óxido cuproso, hidróxido de cobre, oxiclreto de cobre, maneb, captan, mancozeb, pirimifós de metila, cipermetrina, clorpirifós, endosulfan, HCH, parationa metílica, carbofurano, carbaril, dieldrin, etoprofós, diazinona, dimetoato, acefato e fenobucarb. Os cafeicultores de Camarões contaram que os pulverizadores de agrotóxicos, utilizados nessa cultura, eram obsoletos causando contaminação ao operador e ao ambiente. Além disso, não havia uso de EPI no momento da preparação e utilização do produto químico por desinformação, incômodo e/ou falta de recursos econômicos. Observou-se que quanto maior o grau de escolaridade, maior era a possibilidade do trabalhador usar o equipamento de proteção e menor o risco de exposição aos agrotóxicos. Observou-se também sobre o armazenamento domiciliar dos agrotóxicos usados nas lavouras de café. Os agricultores relataram que armazenavam os recipientes contendo agrotóxicos dentro de casa e especificamente dentro do quarto, temendo que estes produtos pudessem ser roubados uma vez, que apresentam preços elevados [6].

O uso abusivo de agrotóxicos pode contaminar o ar, o solo, a água, assim como, a fauna e a flora. É o que relata os autores *Ellis-Tabanore e Hyslop*. Em 2005, na Jamaica, nação da América Central, agricultores utilizavam inseticidas organoclorados no combate à praga Broca do Fruto do Cafeeiro (*Hypothenemus hampei*). A utilização destes agrotóxicos, provocou a redução do número de caracóis da espécie *Thiara granifera* (família da *Thiaridae*) que viviam nos rios próximos das regiões de cafeicultura. Esses locais estavam contaminados com endosulfan. Isso levou os autores a proporem que a espécie *Thiara* de caracóis pode servir como indicador do nível de poluição por agrotóxicos presentes em rios ou mesmo em córregos [16].

Já os autores Garcia e seus colaboradores apresentaram um estudo, em 2006, falando sobre aplicação de agrotóxicos em cafezais da Serra Madre de Chiapas, no México. Em cafezais que pulverizavam grandes quantidades do inseticida Thiodan (endosulfan) usado também no controle químico da Broca do Fruto do Cafeeiro percebeu-se uma redução do número de morcegos, já que insetos são componentes importantes de sua dieta. Houve essa redução, uma vez que, nesta região, existe diversidade de espécies de morcegos, devido a cobertura arbórea e o sombreado das plantações de café que são semelhantes a floresta original [17].

No ano de 2009, uma região de agricultura familiar, importante produtora de café do estado do Espírito Santo, Brasil, observou-se também a contaminação por agrotóxicos no ambiente de moradia, principalmente na poeira domiciliar, solo, ar e alimentos. Esta contaminação é oriunda a partir da proximidade das áreas de cultivo, onde o agrotóxico é aplicado, próximo das residências. Além do mais, na maioria dos casos, os agrotóxicos são armazenados no local de moradia e os agricultores circulam em suas casas com suas roupas contaminadas. Este estudo também mostrou uma relação entre o uso de agrotóxicos organofosforados e problemas neurológicos, em que os trabalhadores relataram problemas de depressão e perda de memória [7].

A Tabela 2 sintetiza os agrotóxicos apresentados por estes estudos.

Tabela 2. Agrotóxicos estudados contendo classe, grupo químico, classificação toxicológica e local.

Agrotóxicos	Classe**	Grupo químico	Classificação toxicológica*	Região utilizada	Referências
Acefato	I	Organofosforados	I	Camarões	[6, 18]
Benomil	Fg	Benzimidazol	IV	República da África do sul	[8, 18]
Bentazona	H	Benzotiadinazona	U	Camarões	[6, 18]
Captan	Fg	Ftalimida fung.	IV	Camarões	[6, 18]
Carbaril	I	Carbamato	III	Camarões	[6, 18]
Carbofurano	I	Carbamato	III	Camarões	[6, 18]
Clordano	I	Organoclorados	II	República da África do sul	[9, 19]
Clorpirifós	I/A/F	Organofosforados	II	Camarões	[6, 18]
Hidróxido de cobre	Fg	Inorgânico	IV	Camarões	[6, 18]
Oxicloreto de cobre	Fg	Inorgânico	IV	Camarões e República da África do sul	[6, 8, 8]

Agrotóxicos	Classe**	Grupo químico	Classificação toxicológica*	Região utilizada	Referências
Óxido cuproso	Fg	Inorgânico	IV	Camarões	[6, 18]
Cipermetrina	I	Piretroides	II/III	Camarões	[6, 18]
Diazinona	I	Organofosforados	II	Camarões	[6, 18]
Diclorfós	I/A	Organofosforados	II	República da África do sul	[8, 18]
Dieldrin	I	Organoclorados	II	Camarões	[6, 18]
Dimetoato	I	Organofosforados	III	Camarões	[6, 18]
Dissulfotona	I/A/Fg	Organofosforados	I	Camarões	[8, 18]
Endosulfan	I	Organoclorados	I	Camarões, Chiapas México e Jamica	[6, 16,18]
Etoprofós	I	Organofosforados	U	Camarões	[8, 18]
Fenobucarb	I	Carbamato	II	Camarões	[6, 18]
fluasifope p-butílico	H	Fenoxi herbicidas e ácido benzóico	IV	República da África do sul	[8, 18]
Glifosato	H	Glicina substituída	IV	Brazil, Camarões e República da África do sul	[6, 7, 18]
HCH	I	Organoclorados	II	Camarões	[6, 8, 18]
Mancozeb	Fg	Tio e ditiocarbamato	IV	Camarões e República da África do sul	[6, 8, 18]
Manebe	Fg	Tio e ditiocarbamato	IV	Camarões e República da África do sul	[6, 8, 18]
Metalaxil	Fg	Fenilamida	III	Camarões	[6, 18]
Parationa metílica	I	Organofosforados	I	Camarões	[6, 18]
Minam	Fg	n.d	n.d	República da África do sul	[8, 18]
Monocrotofós	I	Organofosforados	II		[8, 18]
Paraquat	H	Bipiridals	I	Camarões e República da África do sul	[6, 8, 18]
Parationa metílica	I/A	Organofosforados	I	República da África do sul	[8, 18]
Pirimifos metil	I	Organofosforados	III	Camarões	[6, 18]
Triclorfom	I	Organofosforados	II	República da África do sul	[8, 18]
Zineb	Fg	Tio and ditiocarbamato	IV	República da África do sul	[8, 18]

** Classes: A: acaricida, F: Formica, Fg.: Fungicida, H: herbicidas, I: Inseticida, N:nematicida.

* Classificação toxicológica: I-altamente tóxico, II-altamente tóxico, III-moderadamente tóxico, IV- levemente tóxico

n.d.: não encontrado

**CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE
EM AMOSTRAS DE CAFÉ E AMBIENTAIS**

2.1- Métodos analíticos para avaliar a exposição dos agrotóxicos utilizados em culturas de café

2.1.1- Preparação de amostras

Os métodos para extração de agrotóxicos e limpeza (*clean-up*) de amostras de alimentos e ambientais são extremamente importantes para a sua determinação quantitativa nas matrizes de interesse. As técnicas de extração utilizadas para concentrar os analitos incluem extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*- LLE), extração em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE), microextração com uma simples gota (*single-drop microextraction* - SDME), microextração em fase sólida (*solid phase microextraction* - SPME) e o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*).

A extração LLE é baseada na partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa) e é utilizada na análise de agrotóxicos em amostras de água e alimentos.

A extração SPE foi introduzida em 1978 como uma alternativa para LLE. Analitos contidos em uma matriz aquosa são extraídos para ficarem livres de compostos interferentes, após a passagem através de um cartucho absorvente. Um solvente orgânico é comumente usado para extrair os analitos de interesse. Este método SPE depende das propriedades físico químicas dos agrotóxicos e de suas concentrações, de modo a utilizar um volume ideal de solvente [19].

A microextração SDME é uma técnica de extração simples e barata que envolve pouco consumo de solvente. Esta técnica consiste na adição de uma pequena gota (8,0 µL) de solvente orgânico (n-octano) na amostra aquosa que contém o analito. A solução é agitada por um curto período de tempo (por exemplo, 5 min) com velocidade constante. Então, uma alíquota de 1,0 µL da fase orgânica é injetada no cromatógrafo para análise [20].

Já a microextração SPME é uma técnica de tratamento da amostra publicada em 1989 por Pawliszyn e Belardi [21], aplicada à extração de compostos orgânicos de diferentes matrizes, como o ar, solo, água e alimentos. A técnica de SPME é promissora e tem a vantagem de não usar solventes para extração. Ela consiste basicamente de particionamento de compostos entre a amostra e a fase estacionária (fibra de sílica fundida coberta com filme polimérico e adaptada a uma seringa), seguida de

dessorção térmica destes compostos em um instrumento analítico para determinação qualitativa e quantitativa [22].

Ultimamente, novos métodos de extração têm sido usados com o objetivo de efetuar o desenvolvimento de métodos multirresíduos para a determinação de agrotóxico em alimentos. Entre estes, destaca-se o método desenvolvido em 2003 por Anastassiades e colaboradores [23], denominado QuEChERS. Este método envolve uma extração inicial com solvente. Normalmente utiliza-se acetonitrila, seguida de uma partição líquido-líquido, após adição de alguns sais (responsáveis pela separação da fase aquosa da fase orgânica e remoção de quantidade significativa de compostos polares da matriz) e de agentes tamponantes (para a proteção de analitos susceptíveis à degradação em meio básico ou ácido). O extrato obtido é submetido a um processo de extração em fase sólida dispersiva para “clean up”. O sorvente utilizado varia em função da natureza da matriz. Este método requer pouca quantidade de amostra, baixo consumo de solvente, apresenta resultados satisfatórios de exatidão e repetibilidade, permite o preparo de um número considerável de amostras em pouco tempo e é adequado para análise de um amplo espectro de agrotóxicos, tanto por cromatografia gasosa (GC) quanto por cromatografia líquida (LC).

2.2- Determinações analíticas de agrotóxicos no café

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para identificação e quantificação de agrotóxico em alimentos e no meio ambiente. Entre as principais técnicas de análise utilizadas destacam-se a cromatografia gasosa (GC), equipada com detector de captura de elétrons (ECD) ou detector de nitrogênio e fósforo (NPD) ou espectrometria de massas (MS), e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando UV ou detecção de MS, uma vez que estas técnicas possuem boa sensibilidade e seletividade, necessárias para a identificação e quantificação de agrotóxicos.

Alguns estudos mostram que a pulverização de agrotóxicos no cultivo do café ocasiona a contaminação de águas superficiais, potáveis e solos agrícolas. A legislação europeia [24] exige que os níveis de concentração de agrotóxicos em águas superficiais seja de no máximo $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e em água potável de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Malationa, parationa, fenitrotona, diazinona e carbaril são agrotóxicos usados no controle de insetos em culturas de café. Em 1997, Oh-Shin *et al.* utilizaram um método GC/NPD e GC/ECD para determinar estes agrotóxicos derivatizados com ácido anidrido pentafluoropropionico (PFPA) em amostras de água potável. O método mostrou-se linear ($R^2=0,998$ a $1,000$), sensível (Limite de detecção - LD $<0,1$ ng mL $^{-1}$) e preciso (Desvio Padrão Relativo - RSD $<11\%$ para 10 ng mL $^{-1}$ e $<2\%$ para $1,0$ ng mL $^{-1}$). A recuperação do método para 10 ng mL $^{-1}$ variou de 76 a 87% para os compostos analisados. Este estudo foi realizado na província *Chungcheongnam-do* no oeste da Coreia do Sul [12].

Lacorte e colaboradores descreveram um programa, chamado SAMOS (*System for the Automated Monitoring of Organic pollutants in Surface water*), em 1998, para determinar resíduos de agrotóxico em rios. O sistema é programado de tal forma que oito amostras são analisadas em cada dia e pode ser operado durante pelo menos cinco dias. Eles analisaram uma mistura de triazines e outros organofosforados (OPP). As amostras foram extraídas por um método SPE com coluna C $_{18}$ e analisadas por HPLC/UV. O método apresentou boa linearidade ($R=0,99$) na faixa de $0,3$ a $1,5$ ng L $^{-1}$ e LD variando de 30 a 100 ng L $^{-1}$. Os autores descreveram que o terbutilazina, um herbicida usado em plantações de café, foi detectado no rio Llobregat e em seus efluentes, ao sul de Barcelona, Espanha, na concentração de 13 µg L $^{-1}$. Esta análise também foi realizada por cromatografia líquida com ionização química à pressão atmosférica acoplada a espectrometria de massas (LC APCI/MS) e o mesmo resultado foi obtido com esta técnica [11].

A praga broca do café (*Hypothenemus hampei*) era controlada (1991-92), na Jamaica, através de duas pulverizações por ano, de endosulfan misturado aos OPP diazinona, isazofós, dimetoato ou profenofós; ou aos piretróides permetrina ou cipermetrina. Ao solo era aplicado o carbamato furadan, de proteção contra nematóides. Já os agrotóxicos paraquat e o glifosato eram pulverizados 4 a 5 vezes por ano. Robinson e Mansingh utilizaram as técnicas GC/NPD e GC/ECD para determinar resíduos destes agrotóxicos nas águas costeiras dos rios (Rio Grande, Swift e Espanhol). Duas estações de amostragem foram estabelecidas em cada um dos três rios de estudo. Resíduos de organoclorados (OCP) foram encontrados nas águas dos rios Swift e Espanhol, mas

resíduos de OPP, carbamatos e piretróides não foram detectados em nenhuma amostra coletada [13].

Os mesmos autores descreveram também, um estudo de análise de solos. Foram coletadas amostras de solo a partir em dezembro de 1991 e abril de 1992 em cinco locais selecionados aleatoriamente, também na Jamaica. As amostras foram extraídas com hexano ou diclorometano seguida de *clean-up* com coluna de florisil. Os resultados mostraram que os resíduos de endosulfan persistem no solo por até três ou quatro meses após a última pulverização. Além disso, verificou-se que três dias após a primeira pulverização os níveis de α e β -endosulfan foram bastante elevados, enquanto seu sulfato apresentava concentrações baixas. Quatro semanas mais tarde, os níveis de α e β -endosulfan foram reduzidos em cerca de 63%, mas o sulfato de endosulfan aumentou em seis vezes, o que mostrava uma conversão na razão 70:30 dos isômeros em sulfatos. A conversão ocorreu em menor proporção no solo sob sombra de árvore, indicando uma reação de fotólise [13].

Em 2000, no município de Campinas, Brasil, os herbicidas triazina, ametryna e simazina que são geralmente utilizados para combater lagartas em folhas de cafezais e para o controle de ervas daninhas. Eles podem persistir por meses em solo e contaminar mananciais de água por lixiviação. Pinto *et al.* desenvolveram um método de HPLC/UV ($\lambda=230\text{nm}$) para determinar resíduos de ametrina e simazina em água. As amostras foram tratadas com SPE com cartuchos C_{18} . O método apresentou boa linearidade com $R^2=0,999$ para ambos herbicidas. No nível de fortificação igual a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ obteve-se recuperação de 97,4% para o ametrina e de 77,8% para simazina com precisão menor que 3%. Os LD e Limite de Quantificação (LQ) foram respectivamente para ametrina e simazina $0,034/0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,018/0,055 \mu\text{g L}^{-1}$ [25].

Já em Ourense, município da Espanha, López-Blanco *et al.* estudaram diferentes métodos analíticos para detecção de endosulfan em amostras de água coletadas próximas a plantações de café, nos anos de 2002 e 2003. Esse agrotóxico é persistente no solo e pode ser transportado para águas através do escoamento de partículas, sendo geralmente determinado como a mistura de isômeros α - e β -endosulfan. Os autores relataram diferentes técnicas de extração: SPE, SPME e SDME para a análise de α - e β -endosulfan em amostra de águas superficiais e potáveis por GC/ECD. Foram otimizadas as condições de análise de cada método de extração. Em seguida, alguns parâmetros de

mérito foram determinados comparativamente. O método SPE usou cartucho C₁₈ e o hexano como solvente; o método SPME foi selecionado com imersão direta da fibra de divinilbenzeno-carboxen-polydimethylsiloxana (DVB/CAR/PDMS); e o método SDME utilizou isoocatano como solvente orgânico. Os resultados mostraram que o método SPE necessita de tempo de análise um pouco maior (25 min) do que o necessário para SDME (20 min) e para SPME (15 min). Além do mais, SPE requer alto volume de solvente orgânico (5 mL). A precisão e reprodutibilidade (RSD%) foram bastante similares para ambos os isômeros, sendo menores que 14,4%, independentemente da técnica de extração utilizada. A linearidade para os três métodos foi boa ($R^2 > 0,995$). Os três métodos de pre-concentração apresentaram limites de detecção baixos, comparados com aqueles estabelecidos pela directiva 98/83/European [24]. Entretanto, a técnica SDME foi mais sensível. O efeito de matriz não prejudicou a correta quantificação dos métodos SDME, SPE e SPME. Os três métodos analíticos foram comparados sendo que em termos financeiros o método SDME apresentou-se mais favorável, pois o custo de solvente orgânico é insignificante comparado em relação ao custo do cartucho de SPE e da fibra de SPME [26,27].

Analisando OPP, Capobiango e Cardeal descreveram um método GC/NPD para determinação de co-ral, diclorfós (DDVP), di-siston, etion, forato, fosdrin, gution, malationa e parationa metílica em amostras de peixe, batata, goiaba e café. Foram analisadas também amostras de água de rios vizinhos às plantações dos alimentos analisados. As amostras foram coletadas entre outubro de 2002 e abril de 2003 na cidade de Patos de Minas, Brasil. Foi desenvolvido um método SPME com uma micro fibra de polimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm, com otimização do tempo e temperatura de extração, volume de amostra no frasco, e tempo de dessorção. Nas condições otimizadas o método mostrou-se linear com coeficientes de determinação (R^2) variando entre 0,997 e 0,999. A precisão foi adequada com RSD variando de 4,40 a 15,13%. O limite de detecção variou de 0,05 a 8,37 µg L⁻¹ e o limite de quantificação de 0,09 a 8,70 µg L⁻¹. As amostras de café continham resíduos de DDVP de 0,23 µg kg⁻¹ e resíduos de forato de 0,02 µg kg⁻¹. Os valores encontrados estavam abaixo dos limites permitidos pela legislação brasileira (0,05 µg kg⁻¹ para forato e de 2 µg kg⁻¹ DDVP) e dentro do limite prescrito pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, a (EPA) que é de 0,02 µg kg⁻¹ de forato [10].

Já no período de dezembro/2001 a agosto/2002, foi instalado um experimento no município de Garça, São Paulo referindo-se aos efeitos sobre as folhas do cafeeiro com uso dos inseticidas tiametoxam e aldicarbe para controle do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) do café. Foram feitas determinações de aldicarbe e seus metabólitos ativos, aldicarbe sulfóxido e sulfona por GC/NPD e de tiametoxam por GC/MS. Foram analisadas folhas verdes coletadas a diferentes alturas da planta. As amostras foram extraídas pelos métodos LLE e GPC. Determinaram-se os índices de recuperação e os LQ do método. As amostras de folhas foram fortificadas nos níveis: 10,0; 2,0 e 0,5 mg kg⁻¹, para aldicarbe e seus metabólitos, e de 1,00; 0,20 e 0,02 mg kg⁻¹, para tiametoxam. O LQ do aldicarbe, sulfóxido e sulfona foi de 0,5 mg kg⁻¹, com porcentagens de recuperação de 101-118%, 88-101% e 98-105%, respectivamente. Para tiametoxam, o LQ foi de 0,02 mg kg⁻¹ com porcentagens de recuperação entre 79-88%. Os resultados indicaram translocação uniforme de ambos inseticidas nos três terços de altura das plantas de café, quando aplicados no solo. Foi constatada também, a maior persistência do tiametoxam, cujos resíduos foram encontrados até oito meses após a aplicação, enquanto os metabólitos sulfóxido e sulfona foram encontrados entre quatro e seis meses após a aplicação [28].

Na Romênia, em 2008, também foi feito um estudo para investigar resíduos de nove agrotóxicos organoclorados (OCP) HCH, lindano, heptaclor, p,p'- DDT, p,p'- DDE, p,p'- DDD, aldrin, dieldrin e endrin em diferentes tipos de amostras de café: grão de café verde, café torrado, café instantâneo ou granulado, todas de um mesmo produtor. As amostras foram tratadas por LLE e os OCP foram determinados por GC/ECD. Elas continham níveis residuais de agrotóxicos entre 1,0 e 7,0 µg Kg⁻¹. Sendo que o menor LMR, entre os agrotóxicos analisados, foi de 10 µg Kg⁻¹ para o agrotóxico endrin [26]. De todos os agrotóxicos analisados, o lindano foi encontrado em todas as amostras. O HCH e o aldrin (7,0 µg Kg⁻¹) foram detectados em amostras de grãos de café torrados. O heptacloro estava presente em grãos de café verde. O DDT e seus metabólitos não foram detectados, provavelmente, pelo fato dos grãos de café verde serem ricos em nutrientes, que promovem o crescimento de microorganismos capazes de degradar o DDT e seus metabólitos [29].

Em 2010, Hong Kong, China, Stephen W.C. desenvolveu um método multirresíduo para a determinação de 98 analitos, pertencentes as classes de agrotóxicos

organofosforados (OPP) e carbamatos em diversos alimentos, incluindo café. Ele utilizou o método QuEChERS modificado, envolvendo uma simples extração dos agrotóxicos, seguida de *clean-up* com amina secundária (PSA) e carbono C₁₈ e/ou grafitado preto (GCB) como sorventes. A análise foi realizada por LC/MS/MS com ionização *electrospray* operando no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM). O método apresentou boa linearidade (valores de $R^2 > 0,995$) na faixa de 1,0 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos compostos estudados. As recuperações médias para os níveis de 10,0 e 200,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ficaram dentro da faixa 70 a 120% e o RSD foi inferior a 20%. O valor de 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi estabelecido como limite de quantificação (LOQ) para todos os analitos testados [9].

Enquanto em Beijing, China, no ano de 2011, Yang et al. desenvolveram um método multirresíduos para a determinação de 69 agrotóxicos (classes: 2,6-dinitroanilinas, amidas, azoles, carbamatos, cloroacetamidas, difenil etér, organoclorados, organofosforados, tio e ditiocarbamatos, triazinas e triazoles) em grãos de café por GC/MS. Eles utilizaram para o preparo das amostras as técnicas SPE com cartuchos Envi-Carbo, cromatografia de permeação em gel (GPC), com acetato de etila e n-hexano como fase móvel. O método apresentou boa linearidade com coeficientes de determinação (R^2) acima de 0,99. A recuperação, em níveis de fortificação de 0,05-1,00 mg kg^{-1} apresentou valores entre 60 e 120%. A precisão (RSD) ficou entre 1,3 e 22,3% para todos os agrotóxicos. Os limites de detecção para o método variaram de 10,0 a 150,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foram analisadas seis amostras comerciais e em todas foram detectados níveis baixos de agrotóxicos [3].

A Tabela 3 sintetiza os estudos de agrotóxicos em amostras de café e ambientais.

Tabela 3. Métodos analíticos para a realização de estudos de agrotóxicos em amostras de café e ambientais.

Agrotóxicos	Amostras	Método de extração	Técnica analítica	Referências
Malationa, parationa fenitrotiona, diazinona e carbaril	Água potável	SPE	GC-NPD GC-ECD	[12]
Desethylatrazine, simaze, atrazine, propazi, parationa metilica, fenotrotiona, diazinon, clorpirifós e terbutilazine	Água de rio	SAMOS	LC-DAD LC-APCI-MS	[11]
Endosulfan, diazinona, isazofós, dimetoato ou profenofós, permetrina ou cipermetrina, furadan, paraquat e o glifosato	Água de rio	LLE SPE	GC/NPD e GC/ECD	[13]
Ametrina e simazina	Água de superfície	SPE	HPLC-UV	[25]
Endosulfan	Água de superfície e potável	SDME SPE SPME-DVB-CAR-PDMS	GC-ECD	[26,27]
co-ral, diclorvós (DDVP), di-siston, etiona, forato, fosdrin, gution, malationa e parationa metilica	Grãos de café verde	SPME-PDMS	GC/NPD	[10]
Tiametoxan, aldicarbe sulfoxido e sulfona	Folhas de café	LLE-GPC-SPE	GC/NPD GC/MS	[28]
HCB, lindano, heptaclor, p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD, aldrin, dieldrin e endrin	Grãos de café verde, café torrado, café solúvel e granulado	LLE	HPLC GC/ECD	[29]
98 tipos diferentes de agrotóxicos	Grãos de café verde	QuEChERS modificado	LC/MS/MS	[9]
69 tipos diferentes de agrotóxicos	Grãos de café verde	LLE-GPC-SPE	GC/MS	[3]

CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Desenvolver um método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC/MS/MS) utilizando a técnica de extração Quechers modificado para a análise dos resíduos de 160 agrotóxicos em amostras de café.

3.2- Objetivos Específicos

1. Otimização dos parâmetros instrumentais para a detecção de todos os agrotóxicos, empregando o sistema LC/MS/MS, através da injeção individual de cada padrão analítico.
2. Otimização das condições de extração e “*clean up*” de resíduos de agrotóxicos em café para posterior validação do método.
3. Avaliar se o método proposto é preciso, seletivo e sensível para que ocorra a detecção e quantificação dos analitos de interesse.
4. Aplicar o método proposto a análise de amostras de café e verificar quais agrotóxicos presentes ficaram com suas concentrações acima do limite de quantificação estabelecido para eles.

CAPÍTULO 4 – PARTE EXPERIMENTAL

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

4.1- Instrumentação

1. Centrífuga refrigerada Jouan CR 4i, Thermo Electron Corporation (Ohio, USA);
2. Ultra-som *UltraClean* 1400, Unique (Inadaiatuba, SP);
3. Balança analítica de precisão modelo AUW200D, com resolução de 0,00001g, calibrada junto à RBC (Rede Brasileira de Calibração), Shimadzu (Kyoto, Japão);
4. Balança semi analítica, modelo MARK 500, com resolução de 0,001g, calibrada junto à RBC, *BELEngineering* (Piracicaba, SP);
5. Dispensador automático de solventes *Dispensette III*, com faixa de trabalho de 1 a 25 mL, calibrado junto à RBC (Wertheim, Alemanha);
6. Micropipeta eletrônica Linear, com faixa de trabalho de 100 a 1000 µL, calibrada junto à RBC (Curitiba, PR);
7. Micropipeta eletrônica PIPETMAN *Concept*, com faixa de trabalho de 5 a 100 µL, calibrada junto à RBC, Gilson (Middleton, EUA);
8. Micropipeta eletrônica *FISHERBrant* e5000, com faixa de trabalho de 100 a 5000 µL, calibrada junto à RBC, Fisher Scientific (Finlândia);
9. Agitador orbital tipo vortex, modelo MS 3 basic, IKA[®] Works INC., (Wilmington, EUA);
10. Freezer Biomédico Sanyo, modelo MDF-U537/U537D, com capacidade para atingir temperatura de -30° C (Osaka, Japão);
11. Evaporador centrífugo com *Trap* refrigerado, LABCONCO (Kansas City, EUA);
12. Sistema de purificação de água Direct-Q UV3 Millipore (Molsheim, França);
13. Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência, Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por: duas bombas binárias modelo LC20ADXR; injetor automático modelo SIL20ACXR; detector MS, *Triple Quad 5500* (Applied Biosystems, Canadá) com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray; coluna para UPLC, Shim-Pack XR-ODS II (2,0 x 100 mm, 2,2

µm), Shimadzu e Sistema de aquisição de dados através do *software* Analyst 1.5.1 (Applied Biosystems, Canadá).

14. Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics Instruments Ltda. (Escócia).

4.2 - Reagentes e materiais

1. Acetonitrila grau HPLC, pureza mínima 99,0%, Lichrosolv, Merck (Darmsdat, Alemanha);
2. Acetato de etila grau espectroscópico; pureza mínima 99,0%, Burdick e Jackson (Muskegon, EUA);
3. Metanol grau HPLC, pureza mínima 99,0%, J. T. Baker (Xalostoc, México);
4. Ácido fórmico 96%, Tedia (Ohio, EUA);
5. Ácido acético glacial, Merck (Darmsdat, Alemanha);
6. Sulfato de magnésio anidro, pureza mínima 97%, Sigma-Aldrich (Sant Louis, EUA);
7. Acetato de amônio p.a. ACS, pureza mínima 98%, Vetec (Rio de Janeiro, RJ);
8. Bondesil – C18, 40 µm, Varian (Palo Alto, EUA);
9. Acetato de sódio anidro PA (pureza mínima 99,0%);
10. Água destilada;
11. Água purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade 18,2 MW cm);
12. Tubo de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 mL (Sarstedt, Alemanha);
13. Tubos de centrífuga graduados de 2,0 mL de polipropileno, tipo Eppendorf (Sarstedt, Alemanha);
14. Balões volumétricos calibrados junto à RCB de 10, 25, 50, 100 e 1000 mL.
15. Espátulas metálicas;
16. Garrafas lavadeiras;
17. Proveta de 1000 mL;
18. Grades para tubo de 2,0 e 50 mL;
19. Frascos de vidro de 2 mL com tampa e septos de silicone ou teflon (PTFE).

4.3 - 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 - PESTANAL (Selze, Alemanha) ou Sigma-Aldrich (Sant Louis, EUA).

Os agrotóxicos selecionados para este estudo estão listados na Tabela 4, bem como sua classe, grupo químico, fórmula molecular, classificação toxicológica e limite máximo de resíduo (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 ng μL^{-1} , conforme recomendação do documento SANCO/10684/2009(2010) [30].

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

4.4 - Preparação das soluções de trabalho

Preparou-se 100,0 mL de uma solução de trabalho de concentração 4,0 ng μL^{-1} , contendo todos os agrotóxicos a serem estudados (Tabela 4). Para isso, transferiu-se o volume adequado de cada solução estoque anteriormente preparada de cada agrotóxico, para um balão volumétrico de 100,0 mL, já contendo um pequeno volume de acetonitrila, sendo, posteriormente, o volume completado com este mesmo solvente. A solução assim obtida foi armazenada em frascos âmbar (tampa contendo batoque de PTFE), com capacidade de 40 mL, rotulados de forma indelével, evitando-se com isso, problemas de contaminações e/ou evaporação.

Essa solução principal foi utilizada para os ensaios de fortificação e também para o estudo de linearidade e confecção das curvas analíticas, de cada composto, através de sua diluição, nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,50; 1,00 e 2,00 ng μL^{-1} (soluções analíticas). Todas as soluções analíticas foram preparadas em acetonitrila e armazenadas em freezer a - 20 °C. Antes da utilização das mesmas, estas foram retiradas do freezer, deixadas atingir a temperatura ambiente e, em seguida, agitadas para completa homogeneização.

Tabela 4. Agrotóxicos selecionados para o desenvolvimento do método.

Agrotóxico	Classe **	Grupo Químico	Fórmula Molecular	Classificação toxicológica*	LMR(mg.kg ⁻¹)					
					Instrução Normativa (IN) N° 26 Brasil[31]	Codex Alimentarius [32]	União Européia [33]	Japão [35]	Estados Unidos [36]	Córea do Sul [37]
2,4,5-T	H	Ácido ariloxialcanóico	C ₈ H ₅ Cl ₃ O ₃	III					0,00	
2,4-D	H	Ácido ariloxialcanóico	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	I		0,01	0,01			
2,4-DB	H	Ácido ariloxialcanóico	C ₁₀ H ₁₀ Cl ₂ O ₃	II			0,01			
3-hidroxicarbofurano	I	Carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	I			0,1			
Acefato	I	Organofosforado	C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS	III	0,02	0,02	0,02			
Acetamiprido	I	Neonicotícoide	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	II			0,05			
Aldicarbe	I	Carbamato	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	Ia		0,01	0,01	0,10	0,10	
Aldicarbe sulfona	I (metabólito)	Carbamato	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	Ia		0,01	0,01			
Aldicarbe sulfóxido	I (metabólito)	Carbamato	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	Ia		0,01	0,01			
Aletrina	I	Piretróide	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	II						
Amitraz	A / I	Amidina	C ₁₉ H ₂₃ N ₃	II		0,01				
Azinfós etil	A / I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	Ib	0,05		0,01			
Azinfós metil	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	Ib	0,05		0,01			
Azoxistrobina	Fg	Estrobirulina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	III			0,01	0,05		
Barban	H	Carbamato	C ₁₁ H ₉ Cl ₂ NO ₂	n. e.			0,05			
Benalaxil	H	Acilalanina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	III			0,05			
Benfuracarbe	I / N	Carbamato	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅ S	II			0,05			
Benomil	Fg	Benzimidazol	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	U						
Bentazona	H	Benzotiadiazinona	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	II		0,05	0,05			
BF 500-3 (metabólito da piraclostrobina)	Fg (metabólito)	N-demetoxilado	C ₁₈ H ₁₆ Cl N ₃ O ₃	II			0,01			
Bifentrina	A / I	Piretróide	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	II		0,05	0,01			
Boscalida	Fg	Carboxamida	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	III			0,05	0,05		
Carbaril	I	Carbamato	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	II	0,02	0,05	0,05			
Carbendazim	Fg	Benzimidazol	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	III		0,05	0,05	0,10		
Carbofurano	I	Carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	Ib	0,10	0,05	0,1	1,00	0,10	0,10
Carbossulfano	I	Carbamato	C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₃ S	II		0,03	0,05			
Ciazofamida	Fg	Imidazol	C ₁₃ H ₁₃ ClN ₄ O ₂ S	III						

Cimoxanil	Fg	Cianoacetamida óximo	$C_7H_{10}N_4O_3$	III			0,05	0,05		
Cinidon etílico	H	Fitalimida	$C_{19}H_{17}Cl_2NO_4$	n. e.						
Ciproconazol	Fg	Triazol	$C_{15}H_{18}ClN_3O$	III			0,05	0,10		
Ciprodinil	Fg	Anilinopiridina	$C_{14}H_{15}N_3$	III			0,05			
Ciromazina	I	Triazina	$C_6H_{10}N_6$	III		0,01	0,02			
Clorfenvinfos	A / I	Organofosforado	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	Ib			0,01			
Cloroxuron	H	Uréia	$C_{15}H_{15}ClN_2O_2$	n. e.			0,05			
Clorpirifós	A / I	Organofosforado	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	II	0,01	0,02	0,01	0,05		
Clorpirifós metil	A / I	Organofosforado	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	III	0,01	0,01	0,01			
Cresoxim metil	Fg	Estrobirulina	$C_{18}H_{19}NO_4$	III		0,01	0,05			
Deltametrina	I / F	Piretróide	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	III		0,05	0,05	2,00		
Di-alato	A / H	Tiocarbamato	$C_{10}H_{17}Cl_2NOS$	n. e.			0,2			
Diazinona	A / I / N	Organofosforado	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	II	0,01	0,02	0,01		0,20	0,20
Diclofluanida	Fg	Sulfamida	$C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$	U						
Diclorprope	R / N	Ácido ariloxialcanóico	$C_9H_8Cl_2O_3$	II			0,05			
Diclorvós	I	Organofosforado	$C_4H_7C_{12}O_4P$	Ib		0,02		0,20		2,00
Difenoconazol	Fg	Triazol	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	III		0,05	0,01			
Diflubenzuron	I	Benzoiluréia	$C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$	III		0,02	0,05			
Dimetoato	I	Organofosforado	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	II		0,05				
Dinocape	A / Fg	Dinitrofenol	$C_{18}H_{24}N_2O_6$	II			0,05			
Dinosebe	H	Dinitrofenol	$C_{18}H_{24}N_2O_6$	n. e.			0,01			
Dinoterbe	H	Dinitrofenol	$C_{10}H_{12}N_2O_5$	Ib			0,05			
Dissulfotona	A / I	Organofosforado	$C_8H_{19}O_2PS_3$	Ia		0,01	0,02	0,20	0,30	0,20
Dissulfotona sulfona	A / I (metabólito)	Organofosforado	$C_8H_{19}O_4PS_3$	Ia			0,02			
Dissulfotona sulfóxido	A / I (metabólito)	Organofosforado	$C_8H_{19}O_3PS_3$	Ia			0,02			
Espiroxamina	Fg	Morfolino	$C_{18}H_{35}NO_2$	II						
Etiona	A / I	Organofosforado	$C_9H_{22}O_4P_2S_4$							
Etofumesato	H	Benzofurano	$C_{13}H_{18}O_5S$	U						
Etoprofós	I / N	Organofosforado	$C_8H_{19}O_2PS_2$	Ia		0,01	0,01			
Etioxissulfurom	H	Sulfoniluréia	$C_{15}H_{18}N_4O_7S$	n. e.						
Etrinifós	A / I	Organofosforado	$C_{10}H_{17}N_2OPS$	n. e.						
Fenamidona	Fg	Imidazolinona	$C_{17}H_{17}N_3OS$	III			0,01			
Fenamifós	N	Organofosforado	$C_{13}H_{22}NO_3PS$	Ib		0,05	0,05			0,10

Fenamifós sulfona	N (metabólito)	Organofosforado	C ₁₃ H ₂₂ NO ₅ PS	Ib			0,05			
Fenamifós sulfóxido	N (metabólito)	Organofosforado	C ₁₃ H ₂₂ NO ₄ PS	Ib			0,05			
Fenarimol	Fg	Pirimidina	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	III			0,02			
Fenexamida	Fg	Hidroxianilida	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂	U		0,01	0,05			
Fenpropimorfe	Fg	Morfolínico	C ₂₀ H ₃₃ NO	III		0,01	0,01			
Fentiona	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	II			0,01			
Fentiona sulfóxido	I (metabólito)	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₅ O ₄ PS ₂	II			0,01			
Fentoato	A / I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ PS ₂	II						
Fipronil	I	Pirazol	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	II		0,02	0,05	0,002		
Fipronil sulfona	I	Pirazol	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ O ₂ S	II		0,02	0,05			
Fluasifope p-butílico	H	Ácido ariloxifenoxipropiônico	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄	III			0,10		0,10	
Fludioxonil	Fg	Fenilpirrol	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂	U		0,01	0,05			
Flumetrina	I	Piretróide	C ₂₈ H ₂₂ Cl ₂ FNO ₃	n. e.						
Fluquinconazol	Fg	Triazol	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	III			0,03			
Fluroxipir	H	Ácido piridincarboxílico	C ₇ H ₅ Cl ₂ FN ₂ O ₃	U			0,05			
Flutriafol	Fg	Traizol	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O	III			0,01			
Foransulfurom	H	Sulfoniluréia	C ₁₇ H ₂₀ N ₆ O ₇ S	n. e.						
Forato	A / I / N	Organofosforado	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃	Ia		0,01	0,02	0,02	0,02	
Forato sulfóxido	A / I / N (metabólito)	Organofosforado	C ₇ H ₁₇ O ₃ PS ₃	Ia			0,02			
Fosalona	A / I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	II			0,01			
Fosmete	A / I / TV	Organofosforado	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	II			0,05			
Furatiocarbe	I	Carbamato	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₅ S	II			0,05			
Hexaconazol	Fg	Triazol	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O	U				0,05	0,05	
Hexitiazoxi	A	Tiazolidinacarboxamida	C ₁₇ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ S	U			0,02			
Imazalil	Fg	Imidazol	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	II			0,05			
Imidacloprido	I	neonicotóide	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	II		0,02	0,1	0,70		
Indoxacarbe	I	Oxadiazina	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇	I		0,1	0,02			
Iprodiona	Fg	Dicarboximida	C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃	III			0,05	0,05		
Iprovalicarbe	Fg	Carbamato	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	U						
Isoproturon	H	Uréia	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	II						
Isoxaflutol	H	Isoxazol	C ₁₅ H ₁₂ F ₃ NO ₄ S	III						
Linuron	H	Uréia	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	III						

Malationa	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	III			0,02	0,50		
Metalaxil	Fg	Fenilamida	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	II			0,05			
Metamidofós	I	Organofosforado	C ₂ H ₈ NO ₂ PS	Ib	0,01	0,02				
Metazaclor	H	Cloroacetamida	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O	III			0,05			
Meticonazol	Fg	Triazol	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O	III			0,01			
Metidationa	I	Organofosforado	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	Ib	0,02	0,001	0,02	1,0		
Metiocarbe	I	Carbamate	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	Ib			0,10			
Metiocarbe sulfóxido	I (metabólito)	Carbamate	n.e	Ib			0,10			
Metissulfutom metil	H (metabólito)	Sulfoniluréia	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S	U						
Metomil	I	Carbamato	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	Ib	0,02	0,02	0,02			
Mevinfós	A / I	Organofosforado	C ₇ H ₁₃ O ₆ P	Ia	0,05					
Miclobutanil	Fg	Triazol	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	II		0,01	0,01			
Monocrotófos	I	Organofosforado	C ₇ H ₁₄ NO ₅ P	Ib					0,00	0,10
Monolinuron	H	Uréia	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	III			0,05			
Nuarimol	F	Pyrimidine	C ₁₇ H ₁₂ ClFN ₂ O	II						
Ometoato	I	Organofosforado	C ₅ H ₁₂ NO ₄ PS	Ib						
Oxadixil	H	Oxidiazole	C ₁₅ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O ₃	n.e						
Oxamil	I	Carbamato	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	Ib	0,05	0,02		0,10		
Oxassulfurom	H	Sulfoniluréia	C ₁₇ H ₁₈ N ₄ O ₆ S	n. e.						
Oxifluorfem	H	Difenil éter	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	U			0,05	0,05	0,05	0,05
Paclobutrazol	R	Triazole	C ₁₅ H ₂₀ ClN ₃ O	II						
Parationa etílica	A / I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS	Ia	0,02		0,05			
Pencicuron	Fg	Feniluréia	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O	U			0,05			
Penconazol	Fg	Traizol	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	III		0,01	0,01			
Pendimetalina	H	Dinitroanilina	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	II			0,05			
Picolinafen	H	Piridínico	C ₁₉ H ₁₂ F ₄ N ₂ O ₂	n. e.						
Pimetrozina	I	Triazina	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O	III			0,01			
Piraclostrobina	Fg	Metoxicarbamto	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	n. e.		0,03	0,01	0,30		
Pirazofós	Fg	Fosforotiolato	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	II			0,01			
Piridaben	I	Organoclorado	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS	II			0,02			
Piridato	H	Fenilpiridazina	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂ O ₂ S	III			0,05			
Pirifenox	F	Pyridine	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	III						
Pirimetanil	Fg	Anilino pirimidina	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	III		0,01				
Pirimicarbe	I	Carbamato	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	II		0,01	0,05			

Pirimifós etil	A / I	Organofosforado	C ₁₃ H ₂₄ N ₃ O ₃ PS	n. e.	0,02					
Pirimifós metil	A / I	Organofosforado	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	II	0,05	0,01	0,05			
Procloraz	Fg	Imidazol	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	II		0,05	0,02	0,20		0,20
Profam	H / R	Carbamato	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	U			0,05			
Profenofós	I	Organofosforado	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	II		0,01	0,05			
Propargito	H	Éster sulfito	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	III		0,1	0,1			
Propiconazol	Fg	Traizol	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	II		0,01	0,01	0,10		
Propizamida	H	Benzimidazol	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO	U			0,01			
Propoxur	I	Carbamato	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	II	0,05		0,05			
Prossulfuron	H	Sulfoniluréia	C ₁₅ H ₁₆ F ₃ N ₅ O ₄ S	n. e.						
Quinalfós	A / I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	II						
Tebuconazol	Fg	Triazol	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	II		0,01	0,05	0,20		
Tebufenozida	I	Diacilhidrazina	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	III			0,05			
TEPP (tetraetil pirofosfato)	A / I	Organofosforado	C ₈ H ₂₀ O ₇ P ₂	n. e.						
Tiabendazol	Fg	benzimidazol	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	III		0,20				
Tiacloprido	I	Neonicotóide	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	II		0,05	0,03			
Tiametoxam	I	Neonicotóide	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	III			0,02	0,05		
Tifensulfurom metil	H	Sulfoniluréia	C ₁₂ H ₁₃ N ₅ O ₆ S ₂	U						
Tiodicarbe	I	Carbamato oxima	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ S ₃	II				1,00		
Tiofanato metílico	Fg	Benzimidazol	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	U			0,05			
Tolilfluorida	Fg	Fenilsulfamida	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	Ib			0,02			
Triadimefon	Fg	Triazol	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	II		0,01	0,01	0,05		
Triadimenol	Fg	Traizol	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	II		0,01		0,10		
Triassulfurom	H	Sulfoniluréia	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₅ O ₅ S	U						
Triazofós	I / A / N	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	Ib			0,01			
Triclorfon	I	Organofosforado	C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P	II			0,1			
Tridemorfe	Fg	Morfolina	C ₁₉ H ₃₉ NO	II			0,05			
Trifloxistrobina	Fg	Oximinoacetato	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	III		0,02	0,01			
Triflumizol	Fg	Imidazole	C ₁₅ H ₁₅ ClF ₃ N ₃ O	II		0,1				
Triforin	Fg	Piperazina	C ₁₀ H ₁₄ Cl ₆ N ₄ O ₂	U			0,05			

**Classes: A: Acaricida; F: Formicida; Fg.: Fungicida; H: Herbicida; I: Inseticida; N: Nematicida; R: Regulador do crescimento.

*Classificação Toxicológica

n.e.: não encontrado

Fontes: FOOTPrint PDB [38].

4.5- 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 e a seleção da energia de colisão (CE), mais favoráveis para a análise dos agrotóxicos alvos, foram realizadas através da injeção das soluções individuais de cada agrotóxico no espectrômetro de massas, em ambos os modos de detecção, positivo e negativo. As soluções de injeção, de cada agrotóxico, foram obtidas por diluição das soluções estoque até a concentração de $1,0 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ em uma mistura de metanol/água/acetato de amônio $10,0 \text{ m molL}^{-1}$ 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 espectrômetro de massas *Triple Quad 5500* equipado com fonte de ionização *electrospray* (ESI) ortogonal foi empregado. Cortina de gás e o gás nebulizador foram ambos de nitrogênio obtido por um gerador da Peak Scientifics Instruments Ltda. Os experimentos foram conduzidos em uma faixa de massas de 50 a 1000 *m/z*.

4.5.1 - Otimização dos parâmetros da fonte de ionização

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

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

4.6 - 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 o pré-fracionamento cromatográfico não for 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.

4.6.1- 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 quanto ao desempenho na separação de agrotóxicos duas colunas de diferentes fabricantes disponíveis no Laboratório de Agrotóxicos do LANAGRO-MG. São elas:

1. Shim-Pack XR-ODS II (2,0 mm x 100 mm; 2,2 μm) da Shimadzu.
2. Synergi Fusion-RP (2,0 mm x 50 mm; 2,5 μm) da Phenomenex.

As colunas foram avaliadas quanto ao perfil do cromatograma total obtido a partir da injeção de uma solução de concentração 0,1 ng μL^{-1} contendo todos os analitos a serem estudados. As injeções foram realizadas no sistema LC-MS/MS sob as seguintes

condições: fluxo 0,5 mL min⁻¹; volume de injeção 2,0 µL; temperatura do forno de coluna 60 °C; temperatura do amostrador automático 20°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.* e é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Composição da fase móvel para o teste de desempenho de coluna [39].

Tempo (min)	% Acetato de amônio 10 mol L ⁻¹ / 0,1% ácido fórmico	% Metanol
0,0	65	35
2,5	65	35
7,5	20	80
9,5	20	80
12,0	90	10

4.6.2- 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, de acordo com as Tabelas 6, 7 e 8.

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 de acetato de amônio 10 mmol/L acidificada com 0,01% de ácido fórmico, denominada Solução A, preparada como segue:

1. Pesou-se 0,770 g de acetato de amônio em um béquer;
2. Transferiu-se, quantitativamente o conteúdo do béquer para um balão volumétrico de 1,0 L;

3. Acrescentou-se 100,0 μL de ácido fórmico;
4. Avolumou-se com água ultra pura até 1,0 L;
5. Armazenou-se em frasco âmbar de borosilicato de 1L

A Solução A foi misturada à fase orgânica, composta de metanol, durante a corrida cromatográfica conforme indicado nas Tabelas 6, 7 e 8, de modo a obter o melhor desempenho para o conjunto de parâmetros de avaliação previamente estabelecidos. As injeções foram da solução analítica, descrita no item Preparação de soluções de trabalho (4.4), de concentração 0,10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Elas foram realizadas sob fluxo de 0,5 mL min^{-1} e temperatura do forno de coluna de 60 $^{\circ}\text{C}$, com volume de injeção de 2,00 μL . O tempo total de corrida foi de 13 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 4).

Tabela 6. 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	40	60
9,00	10	90
11,00	10	90
11,50	60	40
13,00	60	40

Tabela 7. 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 8. 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 [40], foi realizado um estudo de conformidade do sistema considerando a razão sinal/ruído (S/R) mínima. Para a diferenciação inequívoca do sinal do analito dos sinais de interferentes é importante avaliar se a razão é de 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 representativos daqueles contidos na Tabela 4, que compõem o escopo de estudo deste trabalho (Tabela 9). Embora todos os compostos tenham sido injetados simultaneamente, em uma única solução, os agrotóxicos respondem de modo distinto à técnica sendo a grande variabilidade dos valores de S/R apresentados na Tabela 9 resultado das características individuais de cada agrotóxico quando analisados pelo espectrômetro de massas.

Tabela 9. Agrotóxicos selecionados para a realização dos experimentos piloto.

3-hidroxi carbofurano	carbaril	etiona	ometoato
acefato	carbofurano	famoxadona	piraclostrobina
aldicarbe	clorpirifós	flusifope p-butílico	propiconazol
azoxistrobina	diazinona	imidacloprido	tebuconazol
bifentrina	dissulfotona	iprodiona	triadimenol

4.7- Validação do Método QuEChERS modificado para determinação / quantificação de resíduos de agrotóxicos em café

4.7.1- Seletividade

Os estudos de seletividade foram realizados concomitantemente com os ensaios de linearidade. Empregando as mesmas condições experimentais (experimento único) utilizadas para a avaliação da seletividade. Os cromatogramas obtidos foram avaliados quanto à presença de sinais dos íons monitorados para cada um dos agrotóxicos estudados (Tabela 4).

4.7.2- Estudos de linearidade

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas a partir das soluções descritas no item 4.4, do extrato do café, nas concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Após vários testes, o método que apresentou melhor resultado fundamenta-se no método QuEChERS com modificações desenvolvidas internamente pelo Laboratório de Agrotóxicos do LANAGRO-MG para matrizes de origem vegetal. O método utilizado é descrito a seguir:

1. 2,50 g \pm 0,05 g da amostra de café verde processada foram pesados em tubo de centrífuga de 50 mL.
2. 7,5 mL de água ultrapura foram adicionados à matriz. A mistura foi homogeneizada manualmente por cerca de 15 segundos.

3. Utilizando um dispensador calibrado, foram adicionados 10,0 mL de solução acetonitrila: ácido acético (99:1). O tubo foi tampado e a amostra foi homogeneizada em agitador de tubos por 1 minuto a 3000 rpm.
4. Adicionou-se ao tubo uma mistura de $4,0 \pm 0,1$ g de sulfato de magnésio anidro e $1,0 \pm 0,1$ g de acetato de sódio anidro, mantidos em estufa a cerca de 100 °C. Agitou-se em agitador de tubos por 1 minuto a 3000 rpm para evitar a formação de grumos.
5. Centrifugou-se a mistura por 8,0 minutos a 4000 rpm.
6. Após a centrifugação, 10,00 mL da fase superior (acetonitrila) foi transferida para tubo de centrífuga de 50 mL, o qual continha $1,50 \pm 0,01$ g de sulfato de magnésio anidro e $1,25 \pm 0,01$ g de C₁₈. Agitou-se o conteúdo do tubo em agitador de tubos por 1 minuto a 3000 rpm.
7. Alíquotas de 1,0 mL do extrato branco foram transferidas para tubos de centrífuga graduados de 2,0 mL de polipropileno, tipo Eppendorf. Sendo que cada nível de concentração (total de 7 níveis) foi preparado em seis replicatas.
8. O volume dos extratos foram reduzidos até cerca de 0,5 mL em evaporador centrífugo.
9. Ao extrato evaporado foi adicionado o volume de soluções analíticas mostrado na Tabela 10, necessário para atingir o nível de concentração desejado em cada nível.
10. O volume foi completado para 1,0 mL com acetonitrila e as soluções obtidas foram homogeneizadas, conforme mostrado na Tabela 10.
11. As soluções obtidas foram transferidas para frascos de vidro de 2 mL com tampa e septos de silicone ou teflon (PTFE) para injeção no LC/MS/MS.

As amostras apresentadas ao sistema LC/MS/MS consistiam de: um branco de matriz, um branco de reagentes, metanol, seis replicatas de cada nível de concentração preparadas em extrato de matriz branca. 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 sequencial, minimizando o risco de se introduzir erros sistemáticos.

Tabela 10. Tabela contendo dados para o preparo da curva analítica matrizada.

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Conc. da solução analítica ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) *	Vol. sol. de trabalho adicionada (μL)
5,0	0,05	25,00
7,5	0,05	37,50
10,0	0,10	25,00
25,0	0,10	62,50
50,0	0,10	125,00
75,0	0,50	37,50
100,0	0,50	50,00

* Ver item -**Preparação de soluções de trabalho (4.4)**

4.7.3 -Análise dos Solventes e Reagentes pelo Método de Extração Quechers modificado

Este procedimento teve a finalidade de verificar a pureza dos solventes e reagentes utilizados, com relação às contaminações por resíduos dos agrotóxicos estudados. Ele consistiu em realizar todo o procedimento normal de extração das amostras, porém sem a presença de café. O extrato assim obtido foi denominado branco de reagente.

Adicionou-se, através de dispensador, 10,0 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético, em 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 $4,0 \pm 0,1$ g e $1,0 \pm 0,1$ 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 líquido e os reagentes sólidos. Logo após, os tubos tampados foram levados para centrifugação a 4000 rpm, por 8 minutos, e posteriormente transferiu-se o extrato líquido para outro tubo idêntico, já contendo $1,50 \pm 0,01$ g de sulfato de magnésio anidro e $1,25 \pm 0,01$ g

de C₁₈, sendo novamente agitados a 3000 rpm por 1 min, e também centrifugados como citado anteriormente. Depois o sobrenadante foi injetado no sistema LC/MS/MS.

4.7.4 - 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 coeficientes de variação (CV%) calculados, obtêm-se informações a cerca da repetitividade (precisão) dos dados obtidos.

A exatidão foi investigada por meio da média de recuperação aparente obtida para as seis replicatas (preparadas independentemente) de amostras adicionadas em cada nível de concentração (10,0; 25,0; 50,0; 100,0 µg kg⁻¹). Os critérios adotados para considerar os resultados como satisfatórios foram recuperações de 70 % a 120 % [31].

Este procedimento de fortificação foi realizado seis vezes (n = 6), para cada nível de fortificação (4 níveis), e também para café “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.

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

4.7.4.1 Ensaios de Fortificação

Quando a porção era destinada a ensaios de recuperação, as amostras brancas após terem sido hidratadas, receberam a adição de volumes apropriados de solução analítica, utilizando micropipeta calibrada (Tabela 11). Logo após, elas foram deixadas em banho de ultrassom por 10 minutos para garantir a perfeita distribuição dos agrotóxicos pela

matriz, simulando da melhor maneira possível uma condição real de contaminação. As amostras foram submetidas a todo o processo de extração descrito no estudo de linearidade até o item 5. Depois, prosseguiu-se da seguinte maneira:

1. Após a centrifugação, 1,0 mL da fase superior (acetonitrila) foi transferida para tubos de centrífuga graduados de 2,0 mL de polipropileno, tipo Eppendorf, os quais continham $0,150 \pm 0,001$ g de sulfato de magnésio anidro e $0,125 \pm 0,001$ g de C18. Agitou-se o conteúdo dos tubos em agitador de tubos por 1 minuto a 3000 rpm;
2. Centrifugou-se os tubos por 8 min a 9000 rpm;
3. Utilizando uma micropipeta, transferiu-se cerca de 0,800 mL do sobrenadante para frascos de vidro de 2 mL com tampa e septos de silicone ou teflon (PTFE) para injeção no LC/MS/MS.

Tabela 11. Tabela contendo dados para preparo das amostras fortificadas.

Nível de fortificação ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Conc. da solução analítica ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)*	Vol. sol. de trabalho adicionada (μL)
10,0	1,00	25,00
25,0	1,00	62,50
50,0	2,00	62,50
100,0	2,00	125,00

* Ver item -**Preparação de soluções de trabalho (4.4)**

4.7.5- Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas constitui o limite de detecção [40].

Uma maneira de determinar esta figura de mérito consiste em analisar 10 amostras brancas independentes, calcular a média e o desvio padrão dos resultados obtidos, e expressar o LD do sinal acordo de com a equação 1. A concentração correspondente ao LD é calculada a partir da equação de regressão da curva de calibração [40].

$$LD = X + 3S$$

Equação 1

Onde: X = média e S = desvio padrão de 10 amostras do branco

O LQ é a menor concentração que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão (recuperação média entre 70 e 120% e desvio padrão relativo (%S) ou coeficiente de variação (CV%) < 20%, sob as condições experimentais adotadas [47]. O delineamento experimental para a determinação do limite de quantificação é semelhante ao do LD. O LQ pode ser expresso como a concentração do analito correspondente à média do branco mais 5,6 ou 10 vezes o desvio padrão [40]. A equação 2 foi utilizada para o cálculo do limite de quantificação.

$$LQ = X + 10S$$

Equação 2

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1-Otimização do sistema de detecção de massas

A etapa inicial da detecção consistiu na determinação do íon precursor (íon pai) para cada padrão (total de 160 agrotóxicos estudados). Este íon é obtido através da formação de um aduto entre a molécula neutra do agrotóxico e um dos cátions: NH_4^+ ou Na^+ , gerando os adutos carregados de massa igual à massa molecular do agrotóxico somada à massa do íon $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ou $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$. Ou ainda através da desprotonação da molécula neutra do agrotóxico, gerando a espécie desprotonada $[\text{M} + \text{H}]^+$. Pode também obter uma outra espécie através da molécula neutra do agrotóxico subtraindo um próton H^+ , no modo ESI (-), gerando o aduto $[\text{M} + \text{H}]^-$. A seleção do íon precursor foi baseada na intensidade do mesmo em um espectro de massas em “full scan” obtido no primeiro quadrupolo (Q1).

A fonte foi empregada em modo de ionização ESI+ ou ESI-, conforme resposta individual de cada agrotóxico. Aplicou-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 ionizavam bem em modo positivo.

Os íons produzidos pela fragmentação do íon precursor no segundo quadrupolo (Q2), íons produto, foram otimizados em modo semi automático através da seleção dos cinco íons mais intensos. Cada um dos íons foi otimizado em relação à energia de colisão (CE), que é responsável pela ótima fragmentação do íon pai no Q2 e sua posterior passagem pelo terceiro quadrupolo (Q3). Os resultados obtidos neste experimento são apresentados na Tabela12.

Os parâmetros para as condições de operação da fonte ESI foram estabelecidos de acordo com informações já otimizadas anteriormente para matrizes de origem vegetais. As seguintes condições de experimento foram consideradas: voltagem do capilar de *electrospray* (IS) 5500 V; pressão do gás nebulizador (GS 1) 30 psi e do gás auxiliar (GS 2) 30 psi ambos de nitrogênio, temperatura da *probe* de 550 °C e potencial de entrada (EP) 10 V. A pressão do gás de colisão, também de nitrogênio (CAD), foi

otimizada a 8 psi. Estes parâmetros foram aplicados 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. Seguindo Diretiva 2002/657 [41], foram selecionados, no mínimo, um íon pai e dois íons filhos para cada um dos compostos estudados, sendo que a transição mais intensa foi empregada como íon quantificador, e a segunda, como íon qualificador.

Tabela 12. Tempos de retenção, natureza do íon precursor, transições MRM (1ª transição/quantificadora e a 2ª transição/qualificadora) utilizadas e energia de colisão aplicada.

	Composto	Janela de TR (min)	Natureza do íon precursor	Razão m/z do íon Precursor	Razão m/z dos íons produtos	CE (V)
1	2,4,5-T	1,97-2,08	[M - H] ⁻	252,7	195,0 / 158,9	(-18, -40)
2	2,4-D	1,17-1,24	[M - H] ⁻	218,9	160,9 / 125,0	(-20, -40)
3	2,4-DB	2,97-3,13	[M - H] ⁻	246,8	161,0 / 125,0	(-22, -36)
4	3-hidroxycarbofurano	0,76-0,80	[M + H] ⁺	238,1	163,1 / 181,2	(21, 15)
5	Acefato	0,46-0,48	[M + H] ⁺	184,0	143/125/95	(13,25,31)
6	Acetamiprido	0,74-0,78	[M + H] ⁺	223,1	126,0 / 73,0	(29, 71)
7	Aldicarbe	1,18-1,25	[M + NH ₄] ⁺	208,1	116,0 / 88,9	(11, 20)
8	Aldicarbesulfona	0,50-0,53	[M + H] ⁺	223,1	86,1 / 76,1	(21, 11)
9	Aldicarbe sulfóxido	0,47-0,50	[M + H] ⁺	207,1	132,0 / 89,0	(9, 21)
10	Aletrina	7,92-8,32	[M + H] ⁺	303,1	135,1/91,1	17,55
11	Amitraz	9,36-9,90	[M + H] ⁺	294,2	163,1 / 122,2	(21, 43)
12	AvermectinaB1A	10,08-10,6	[M + NH ₄] ⁺	890,5	305,2/145,1	(33,35)
13	Azinfósetil	5,07-5,33	[M + H] ⁺	346,0	132,2 / 160,2	(23, 15)
14	Azinfós metil	3,34-3,52	[M + H] ⁺	318,1	132,1 / 261,1 / 160,0	(23, 9, 11)
15	Azoxistrobina	3,99-4,20	[M + H] ⁺	404,1	371,9 / 343,9	(21, 29)
16	Barban	4,41-4,64	[M + H] ⁺	258,1	178,0 / 143,1	(13, 27)
17	Benalaxil	6,21-6,52	[M + H] ⁺	326,0	148,0 / 294,0	(31, 15)
18	Benfuracarbe	7,57-7,96	[M + H] ⁺	411,1	190,1 / 102,1	(17, 43)
19	Benomil	0,58-0,62	[M + NH ₄] ⁺	382,1	167,0 / 198,9	(18, 38)
20	Bentazona	0,59-0,63	[M - H] ⁻	238,9	132,0 / 197,0	(-38, -28)
21	BF 500-3	6,42-6,75	[M + NH ₄] ⁺	358,0	132,1 / 164,7	(41, 19)
22	Bifentrina	10,94-11,51	[M + NH ₄] ⁺	440,1	181,2 / 166,2	(19, 55)
23	Bitertanol	6,53-6,87	[M + H] ⁺	338,1	269,1/99	(13,21)
24	Boscalida	4,36-4,92	[M + H] ⁺	343,0	307,0 / 139,9	(27, 27)

	Composto	Janela de TR (min)	Natureza do íon precursor	Razão m/z do íon Precursor	Razão m/z dos íons produtos	CE (V)
25	Carbaril	1,95-2,05	[M + H] ⁺	202,2	145,1 / 127,1	(15, 39)
26	Carbendazim	0,95-1,00	[M + H] ⁺	192,0	160,1 / 132,1	(25, 41)
27	Carbofurano	1,75-1,84	[M + H] ⁺	222,1	165,2 / 123,0	(17, 29)
28	Carbossulfano	10,21-10,74	[M + H] ⁺	381,2	118,0 / 160,2	(27, 20)
29	Ciazofamida	5,25-5,52	[M + H] ⁺	324,9	108,0 / 261,0	(19, 13)
30	Cimoxanil	0,91-0,96	[M + H] ⁺	199,1	128,0 / 110,9	(13, 25)
31	Cinidon etílico	7,68-8,10	[M + NH ₄] ⁺	410,9	347,9 / 365,9	(31, 25)
32	Ciproconazol	4,74-5,00	[M + H] ⁺	292,1	70,1 / 125,0	(23, 37)
33	Ciprodinil	5,98-6,28	[M + H] ⁺	226,1	92,9 / 76,9	(45, 63)
34	Ciromazina	0,45-0,48	[M + H] ⁺	167,1	68,1 / 85,0	(45, 25)
35	Clorfenvinfós	6,53-6,86	[M + H] ⁺	359,9	155,0 / 99,2	(17, 43)
36	Cloroxuron	4,68-4,92	[M + H] ⁺	291,2	72,0 / 218,0	(53, 33)
37	Clorpirifós	8,13-8,54	[M + H] ⁺	350,1	97,0 / 197,9	(45, 25)
38	Clorpirifós metil	6,77-7,12	[M + H] ⁺	321,9	125,0 / 289,8	(27, 23)
39	Cresoxim metil	5,95-6,26	[M + H] ⁺	314,1	222,1 / 116,0	(21, 19)
40	Deltametrina	9,33-9,80	[M + NH ₄] ⁺	522,9	280,7 / 181,3	(23, 51)
41	Diazinona	6,32-6,65	[M + H] ⁺	305,1	97,0 / 169,1	(49, 31)
42	Diclofluanida	5,11-5,37	[M + NH ₄] ⁺	349,9	223,9 / 123,1	(21, 39)
43	Diclorprope	1,67-1,76	[M - H] ⁻	233,0	161,0 / 125,0	(-22, -38)
44	Diclorvós	1,60-1,69	[M + NH ₄] ⁺	223,0	109,0 / 79,0	(23, 37)
45	Difenoconazol	6,63-6,97	[M + H] ⁺	406,1	250,9 / 337,2	(35, 23)
46	Diflubenzuron	5,34-5,62	[M - H] ⁻	309,0	156,0 / 289,0	(-14, -14)
47	Dimetoato	0,78-0,82	[M + H] ⁺	230,0	125,0 / 198,8	(31, 13)
48	Dinocape	6,02-6,58	[M - H] ⁻	295,0	134,1 / 193,0	(-68, -40)
49	Dinosebe	2,28-2,39	[M - H] ⁻	238,8	133,9 / 193,0	(-58, -36)
50	Dinoterbe	2,51-2,64	[M - H] ⁻	239,0	206,9 / 175,9	(-36, -54)
51	Dissulfotona	6,64-6,99	[M + H] ⁺	275,1	89,1 / 61,1	(19, 45)
52	Dissulfotonasulfona	2,57-2,71	[M + H] ⁺	307,0	153,0 / 171,0	(17, 17)
53	Dissulfotona sulfóxido	2,45-2,58	[M + NH ₄] ⁺	291,0	185,0 / 157,0	(21, 31)
54	Espiroxamina	7,30-7,67	[M + H] ⁺	298,2	144,2 / 100,1	(27, 41)
55	Etiona	7,93-8,34	[M + H] ⁺	385,0	199,1 / 171,0	(15, 23)
56	Etofumesato	3,93-4,14	[M + NH ₄] ⁺	304,1	121,1 / 161,2	(29, 31)
57	Etoprofós	5,29-5,57	[M + H] ⁺	243,1	131,0 / 96,6	(27, 41)
58	Etoxissulfurom	1,60-1,69	[M + H] ⁺	399,0	261,0 / 218,0	(23, 35)
59	Etrinifós	5,98-6,29	[M + H] ⁺	293,1	125,0 / 265,1	(33, 21)
60	Fenamidona	4,26-4,48	[M + H] ⁺	312,1	92,1 / 236,1	(35, 19)
61	Fenamifós	5,58-5,87	[M + H] ⁺	304,1	217,1 / 202,0	(29, 45)
62	Fenamifóssulfona	1,82-1,92	[M + H] ⁺	336,0	188,0 / 266,0	(39, 27)

	Composto	Janela de TR (min)	Natureza do íon precursor	Razão m/z do íon Precursor	Razão m/z dos íons produtos	CE (V)
63	Fenamifós sulfóxido	1,66-1,75	[M + H] ⁺	320,1	232,9 / 171,1	(33,31)
64	Fenarimol	5,07-5,34	[M + H] ⁺	330,9	268,0 / 139,0	(31, 47)
65	Fenexamida	5,13-5,40	[M + H] ⁺	302,1	97,2 / 55,1	(31, 55)
66	Fenpropimorfe	10,47-11,00	[M + H] ⁺	304,3	147,1 / 117,1	(37, 73)
67	Fentiona	5,97-6,28	[M + H] ⁺	279,0	247,0 / 169,0	(19, 25)
68	Fentiona sulfóxido	1,76-1,85	[M + H] ⁺	294,9	279,9 / 109,0	(25, 41)
69	Fentoato	5,80-6,10	[M + H] ⁺	321,0	79,1 / 163,1	(51, 17)
70	Fipronil	5,66-5,96	[M + NH ₄] ⁺	453,9	368,1 / 255,1	(31,51)
71	Fipronilsulfona	6,15-6,47	[M - H] ⁻	450,7	282,0 / 414,2	(-38, -24)
72	Fluasifope p-butílico	7,75-8,15	[M + H] ⁺	384,1	282,0 / 328,0	(29, 23)
73	Fludioxonil	3,92-4,13	[M - H] ⁻	246,9	126,0 / 169,0	(-42, -42)
74	Flumetrina	10,68-11,2	[M + NH ₄] ⁺	527,0	267,0 / 239,0	(21, 31)
75	Fluquinconazol	4,92-5,17	[M + H] ⁺	376,0	307,0-349,0	(33, 33)
76	Fluroxipir	1,96-2,07	[M - H] ⁻	252,9	194,9 / 158,9	(-22, -32)
77	Flutriafol	2,70-2,83	[M + H] ⁺	302,1	122,9 / 109,0	(35, 43)
78	Foransulfurom	0,74-0,78	[M + NH ₄] ⁺	453,1	182,1 / 272,1	(27, 19)
79	Forato	2,47-2,60	[M + NH ₄] ⁺	278,1	97,0 / 171,0	(43, 25)
80	Forato sulfóxido	2,46-2,60	[M + H] ⁺	276,9	199,0 / 142,9	(13, 27)
81	Fosalona	6,54-6,88	[M + H] ⁺	367,9	182,0 / 111,0	(21, 57)
82	Fosmete	3,42-3,59	[M + H] ⁺	318,0	133,0 / 130,1 / 160,0	(51, 51, 19)
83	Furatiocarbe	7,64-8,04	[M + H] ⁺	383,2	195,2 / 252,2	(17, 24)
84	Hexaconazol	6,29-6,61	[M + H] ⁺	314,2	70,0 / 159,2	(53, 37)
85	Hexitiazoxi	8,18-8,60	[M + H] ⁺	353,0	228,0 / 168,1	(21, 35)
86	Imazalil	5,92-6,23	[M + H] ⁺	297,0	159,0 / 200,9	(29, 23)
87	Imidacloprido	0,62-0,66	[M + H] ⁺	256,2	175,1 / 209,1	(27, 21)
88	Indoxacarbe	7,15-7,52	[M + H] ⁺	528,0	203,1 / 150,1	(59, 31)
89	Iprodiona	5,55-5,84	[M + H] ⁺	329,9 / 331,9	245,0 / 246,9	(21, 21)
90	Iprovalicarbe	5,14-5,41	[M + H] ⁺	321,2	203,2 / 119,0	(23, 12)
91	Isoproturon	2,86-3,01	[M + H] ⁺	207,3	72,1 / 165,1	(23, 19)
92	Isoxaflutol	2,95-3,11	[M - H] ⁻	357,8	79,0 / 63,9	(-20, -80)
93	Linuron	3,71-3,90	[M + H] ⁺	249,1	159,2 / 182,0	(25, 21)
94	Malationa	4,48-4,72	[M + H] ⁺	330,9	127,1 / 285,1	(17, 11)
95	Metalaxil	3,05-3,21	[M + H] ⁺	280,2	220,1 / 192,2	(19, 25)
96	Metamidofós	0,44-0,47	[M + H] ⁺	142,0	93,9 / 124,9	(19, 19)
97	Metazaclor	2,89-3,04	[M + H] ⁺	278,1	134,1 / 210,1	(29, 15)
98	Meticonazol	6,39-6,72	[M + H] ⁺	320,1	70,1 / 125,1	(59, 57)
99	Metidationa	3,15-3,32	[M + H] ⁺	303,0	145,0 / 85,1	(13, 29)

	Composto	Janela de TR (min)	Natureza do íon precursor	Razão m/z do íon Precursor	Razão m/z dos íons produtos	CE (V)
100	Metiocarbe	3,90-4,10	[M + H] ⁺	226,1	169,1/121,1	(13,25)
101	Metiocarbe sulfóxido	0,68-0,72	[M + H] ⁺	242,1	185,1/122,1	(19,39)
102	Metissulfotom metil	0,57-0,60	[M + H] ⁺	383,0	167,1 / 168,1	(23, 21)
103	Metomil	0,55-0,58	[M + H] ⁺	163,1	88,1 /106,1	(13, 13)
104	Mevinfós	0,83-0,89	[M + H] ⁺	225,1	127,1 / 193,0	(21, 11)
105	Miclobutanil	4,64-4,88	[M + H] ⁺	289,1	70,1 / 125,1	(33, 39)
106	Monocrotofós	0,54-0,57	[M + H] ⁺	224,1	127,0 / 98,0	(23, 17)
107	Monolinuron	2,16-2,28	[M + H] ⁺	215,1	125,9 / 148,0	(27, 19)
108	Nuarimol	4,00-4,20	[M + H] ⁺	315,0	252/81,1	(31,51)
109	Ometoato	0,44-0,47	[M + H] ⁺	214,1	183,0 / 125,0	(15, 29)
110	Oxadixil	1,17-1,23	[M + H] ⁺	279,1	219/132,1	(15,41)
111	Oxamil	0,50-0,53	[M + NH ₄] ⁺	237,1	72,1 / 90,0	(25, 11)
112	Oxassulfurom	0,70-0,74	[M + H] ⁺	407,1	150,1 / 107,1	(25, 63)
113	Oxifluorfem	7,64-8,04	[M + NH ₄] ⁺	378,9	315,9 /237,1	(25, 39)
114	Paclobutrazol	4,49-4,72	[M + H] ⁺	294,1	70,1/125/70	(55,57)
115	Parationa etflica	5,66-5,95	[M + H] ⁺	292,0	235,9 / 97,0	(21, 37)
116	Pencicuron	6,72-7,07	[M + H] ⁺	329,0	125,0 / 218,0	(31, 23)
117	Penconazol	5,90-6,21	[M + H] ⁺	284,2	70,1 / 159,0	(21, 41)
118	Pendimetalina	8,15-8,57	[M + H] ⁺	282,2	212,1 / 91,0	(15, 33)
119	Picolinafen	7,71-8,10	[M + H] ⁺	377,2	238,3 / 145,0	(35, 69)
120	Pimetozina	0,44-0,47	[M + H] ⁺	218,0	105,0 / 79,0	(25, 47)
121	Piraclostrobina	6,46-6,80	[M + H] ⁺	388,0	194,1 / 163,1	(17, 33)
122	Pirazofós	6,51-6,85	[M + H] ⁺	374,1	222,1 / 194,1	(29, 43)
123	Piridaben	9,43-9,95	[M + H] ⁺	365,1	309,1 / 147,2	(17, 31)
124	Piridato	10,08-10,60	[M + H] ⁺	379,1	207,1 / 104,1	(23, 55)
125	Pirifenox	5,46-5,74	[M + H] ⁺	295,0	93,1/92,1/93,1	(27/83)
126	Pirimetanil	4,00-4,21	[M + H] ⁺	200,2	107,1 / 80,0	(33, 39)
127	Pirimicarbe	2,71-2,84	[M + H] ⁺	239,2	72,1 / 182,2	(34, 21)
128	Pirimifósetil	7,85-8,26	[M + H] ⁺	334,2	198,0 / 182,1	(32, 31)
129	Pirimifós metil	6,63-6,97	[M + H] ⁺	306,1	164,1 / 108,1	(29, 39)
130	Piriproxifen	8,00-8,41	[M + H] ⁺	322,1	96/78,1	(21/75)
131	Procloraz	6,51-6,85	[M + H] ⁺	376,0	308,0 / 265,9	(17, 25)
132	Profam	2,61-2,74	[M + H] ⁺	180,1	138,1 / 120,1	(13, 25)
133	Profenofós	7,42-7,81	[M + H] ⁺	372,9	302,9 / 97,0	(25, 35)
134	Propargito	8,56-9,00	[M + NH ₄] ⁺	368,1	231,1 / 175,1	(15, 23)
135	Propiconazol	6,24-6,57	[M + H] ⁺	342,1	159,1 / 89,1	(37, 99)
136	Propizamida	4,36-4,59	[M + H] ⁺	256,1	190,0 / 173,0	(19, 31)
137	Propoxur	1,68-1,77	[M + H] ⁺	210,1	111,0 / 168,1	(19, 11)

	Composto	Janela de TR (min)	Natureza do íon precursor	Razão m/z do íon Precursor	Razão m/z dos íons produtos	CE (V)
138	Prossulfuron	1,77-1,87	[M + H] ⁺	419,9	167,1 / 109,1	(25, 69)
139	Quinalfós	5,73-6,03	[M + H] ⁺	299,1	163,1 / 147,1	(33, 31)
140	Tebuconazol	5,98-6,29	[M + H] ⁺	308,1	70,1 / 125,1	(57, 53)
141	Tebuempirade	7,80-8,20	[M + H] ⁺	334,1	145,1/117,1	(39,67)
142	Tebufozida	5,73-6,03	[M + H] ⁺	353,1	133,1 / 297,1	(25, 11)
143	TEPP	1,26-1,33	[M + H] ⁺	291,1	179,0 / 99,0	(29, 45)
144	Terbufós	7,61-8,00	[M + H] ⁺	289,0	57,1/103,1	(31,13)
145	Tiabendazol	1,20-1,27	[M + H] ⁺	202,16	175,1 / 131,1	(35, 45)
146	Tiacloprido	0,80-0,85	[M + H] ⁺	253,3	126,0 / 186, 0	(29, 21)
147	Tiametoxam	0,54-0,57	[M + H] ⁺	292,1	211,1 / 181,1	(17,31)
148	Tifensulfurom metil	0,54-0,57	[M + H] ⁺	388,0	167,1 / 205,0	(21, 37)
149	Tiodicarbe	2,05-2,16	[M + H] ⁺	355,1	88,1 / 108,0	(27, 21)
150	Tiofanatometílico	1,47-1,55	[M + H] ⁺	342,98	151,1/93,1	(29,69)
151	Tolilfluorida	6,02-6,33	[M + NH ₄] ⁺	363,9	238,0 / 137,1	(19, 39)
152	Triadimefon	4,67-4,91	[M + H] ⁺	294,0	197,0 / 225,0	(21, 17)
153	Triadimenol	4,84-5,09	[M + H] ⁺	296,1 / 298,0	70,1 / 70,0	(31, 33)
154	Triassulfurom	0,80-0,85	[M + H] ⁺	402,0	167,1 / 141,1	(23, 27)
155	Triazofós	4,80-5,05	[M + H] ⁺	314,1	97,0 / 65,1	(45, 85)
156	Triclorfon	0,79-0,84	[M + H] ⁺	257,0	109,0 / 221,0	(23, 15)
157	Tridemorfe	11,3-12,0	[M + H] ⁺	298,3	130,1 / 98,1	(35, 37)
158	Trifloxistrobina	7,20-7,57	[M + H] ⁺	409,1	186,1 / 145,1	(23, 63)
159	Triflumizol	7,12-7,48	[M + H] ⁺	346,0	278/73,1	(15,21)
160	Triforin	3,51-3,69	[M + H] ⁺	434,9	389,8 / 215,1	(17, 37)

5.2- Otimização das condições cromatográficas

O emprego da técnica LC/MS/MS permite a análise de multirresíduos em uma única corrida sem comprometer a qualidade da resposta de cada agrotóxico apesar da complexidade do cromatograma, como mostra a Figura 1. Isto é possível através da obtenção do cromatograma de massas de íons selecionados que monitora individualmente cada transição *m/z*.

O cromatograma total, Figura 1a representa a resposta de todos os padrões de agrotóxicos contidos na janela de tempo selecionada. A Figura 1b mostra o cromatograma das transições selecionadas para o agrotóxico nuarimol. A transição mais intensa representa o íon quantificador. Nota-se claramente que o analito foi

completamente separado dos demais e que praticamente não há ruídos na janela de tempo visualizada. Estes cromatogramas evidenciam a seletividade do método e foram obtidos para cada agrotóxico estudado.

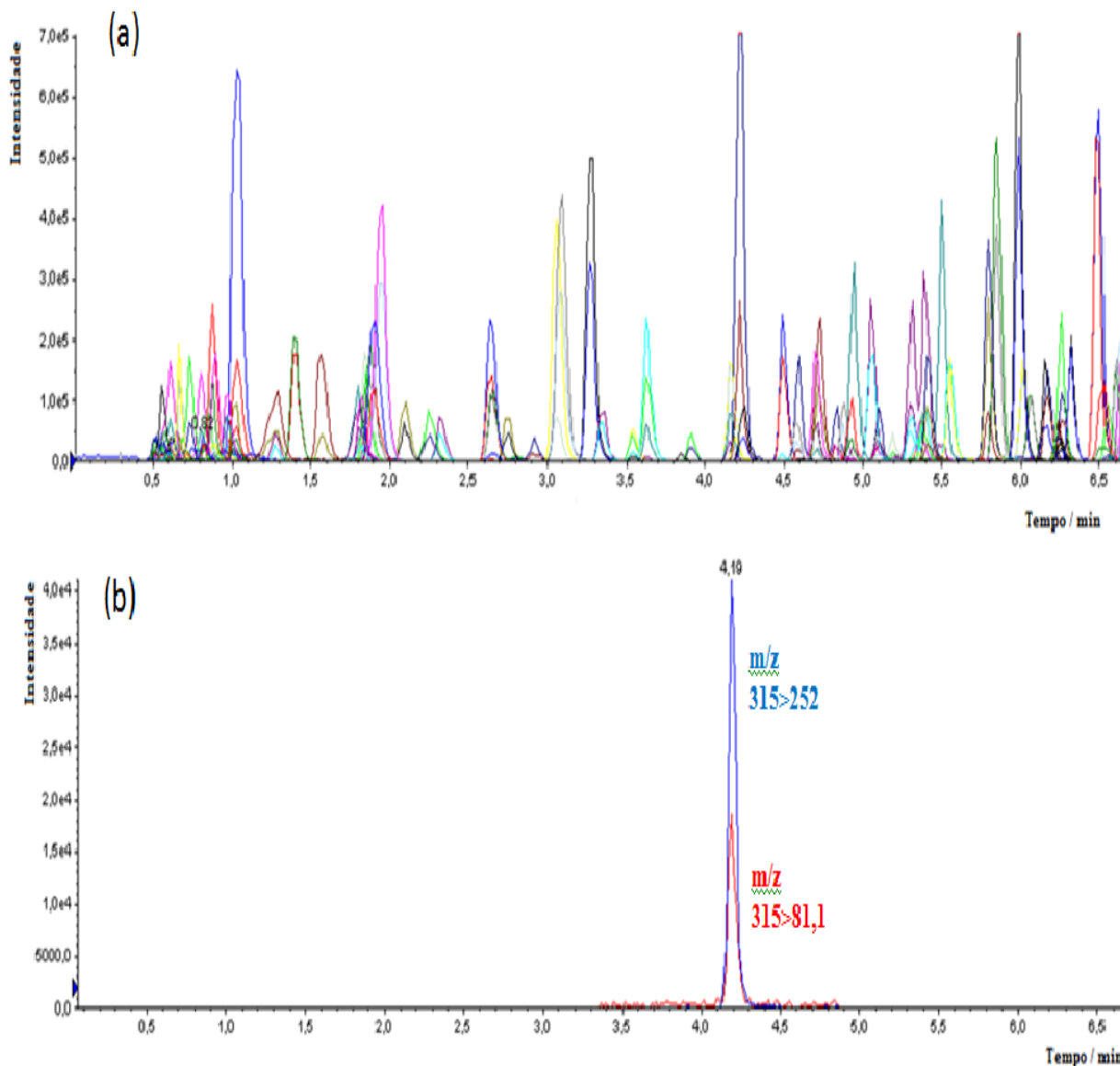


Figura 1. Região do cromatogram situada entre 0,0 e 6,5 min, apresentando: o cromatograma de massas de íon total (a) e o cromatograma de massas extraído para as transições m/z selecionadas para agrotóxico nuarimol (b).

5.2.1-Seleção da coluna cromatográfica

A maioria dos métodos que utilizam a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas emprega coluna de fase reversa (fase estacionária apolar). A fase estacionária

mais popular é aquela que emprega grupos octadecil ligados à superfície da sílica (C_{18}). Outra fase estacionária bastante utilizada é C_8 , com grupos octil ligados à superfície da sílica [42]. Neste trabalho foram avaliadas colunas de fase estacionária C_{18} .

As Figuras 2 e 3 apresentam os cromatogramas totais e extraídos das transições selecionadas para o agrotóxico carbendazim, obtidos pelas colunas avaliadas nas condições empregadas no teste.

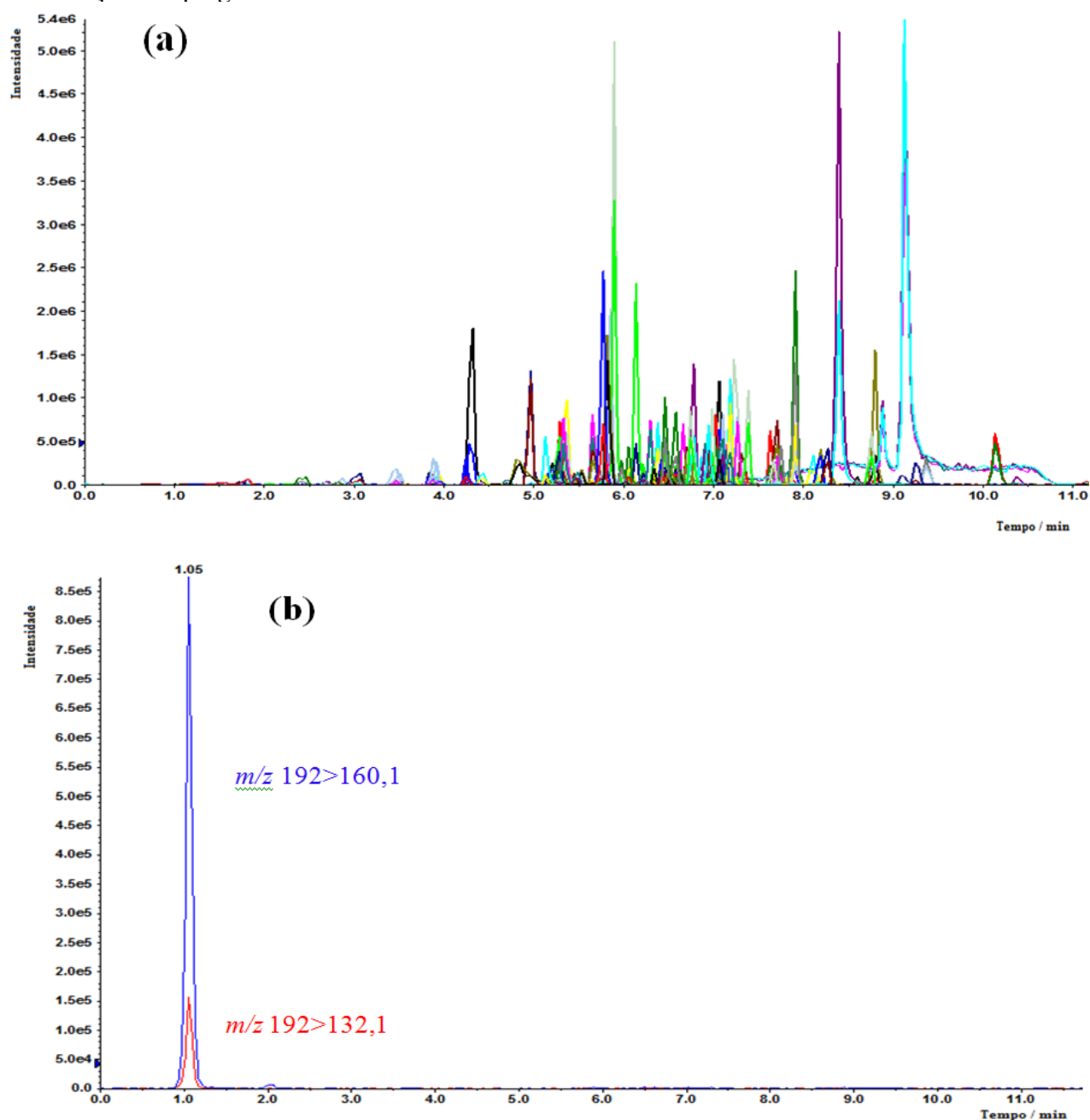


Figura 2. Cromatograma de massas total (a) e de íon selecionado (b) das transições m/z monitoradas para o agrotóxico carbendazim obtidos com a coluna Shim-Pack XR-ODS II no nível de concentração $0,1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

A análise do cromatograma de massas de íons totais apresentados na Figura 2a 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 mais bem definido, com a maioria dos picos apresentando-se estreitos e sem caudas, evidenciando boa separação cromatográfica. Além do mais, a Figura 2b evidencia a eficiência dos sinais cromatográficos para transições m/z de agrotóxico (carbendazim).

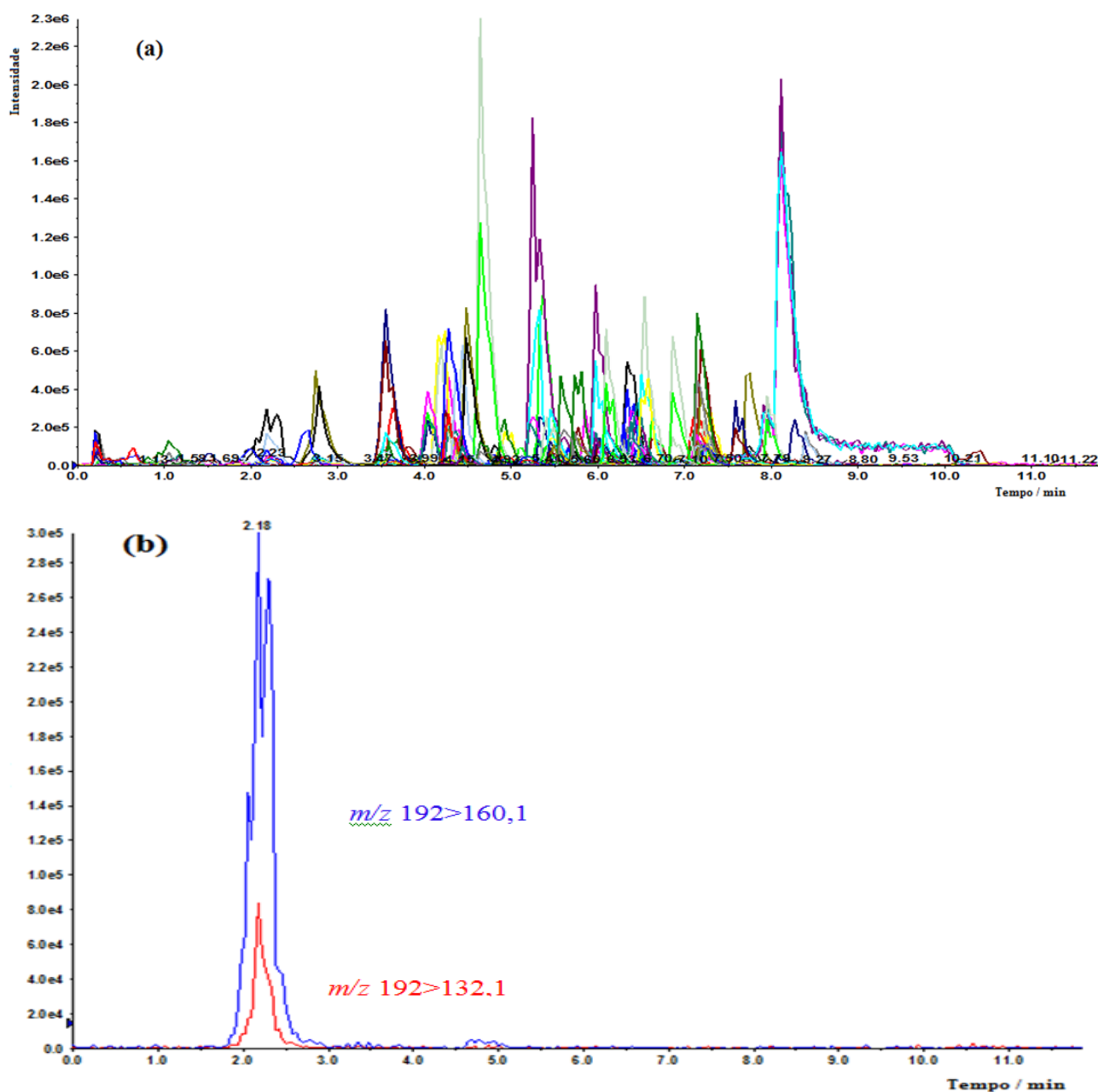


Figura 3. Cromatograma de massas total (a) e de íon selecionado (b) das transições m/z monitoradas para os agrotóxicos carbendazim (b) obtidos com a coluna Synergi Fusion-RP no nível de concentração $0,1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Já para a coluna SynergiFusion-RP, ao analisar o cromatograma gerado por ela na Figura 3a, percebe-se imediatamente que embora os picos estejam mais distribuídos ao longo da janela cromatográfica, o formato geral dos mesmos mostra picos largos e com cauda à direita, o que sugere fortes interações impedindo a obtenção de boa resolução. A Figura 3b revela a presença de um pico cromatográfico de ponta dupla e que apresenta um “ombro” à direita, para o composto carbendazim.

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

5.2.2- Escolha da fase móvel

A separação cromatográfica ocorre através da interação dos componentes de uma mistura com as fases móvel (FM) e estacionária (FE), em diferentes graus. Há, em relação a estas interações, dois extremos:

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

(II) todos os analitos têm afinidade com a FE e não interagem com a FM - 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 através da seleção e otimização da FM e FE.

Poucas alterações podem ser feitas nas FE comerciais, pois estas são adquiridas em colunas previamente empacotadas impossibilitando o acesso do pesquisador a seu conteúdo. Resta então, a FM 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. Uma alternativa muito

eficiente é o uso de fases móveis em gradiente, nas quais a composição da FM é variada de uma forma controlada, durante a análise. Este tipo de FM leva, em geral, a melhores resultados.

Foram feitos experimentos de otimização de fase móvel buscando obter uma composição do gradiente que permitisse uma perfeita separação dos analitos estudados pela coluna cromatográfica selecionada para os experimentos de validação. 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, de acordo com as Tabelas 6, 7 e 8 (páginas 32 e 33). A Figura 4 mostra os resultados obtidos nos testes para as diferentes composições de FM.

A fase móvel representada pelo gradiente A, Figura 4a revela a presença de picos largos e diversos picos com pontas duplas. Nota-se ainda um acúmulo de picos na região situada entre 9,0 e 11,0 minutos, demonstrando que a FM não promove boa separação dos agrotóxicos.

O gradiente B (Figura 4b) foi proposto como uma correção do gradiente A na tentativa de obter-se melhor distribuição dos picos. 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, evidenciando a necessidade da elaboração de um novo gradiente.

O cromatograma de massas total de íons obtido com o gradiente C (Figura 4c), 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 corrida 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 (Figura 4c).

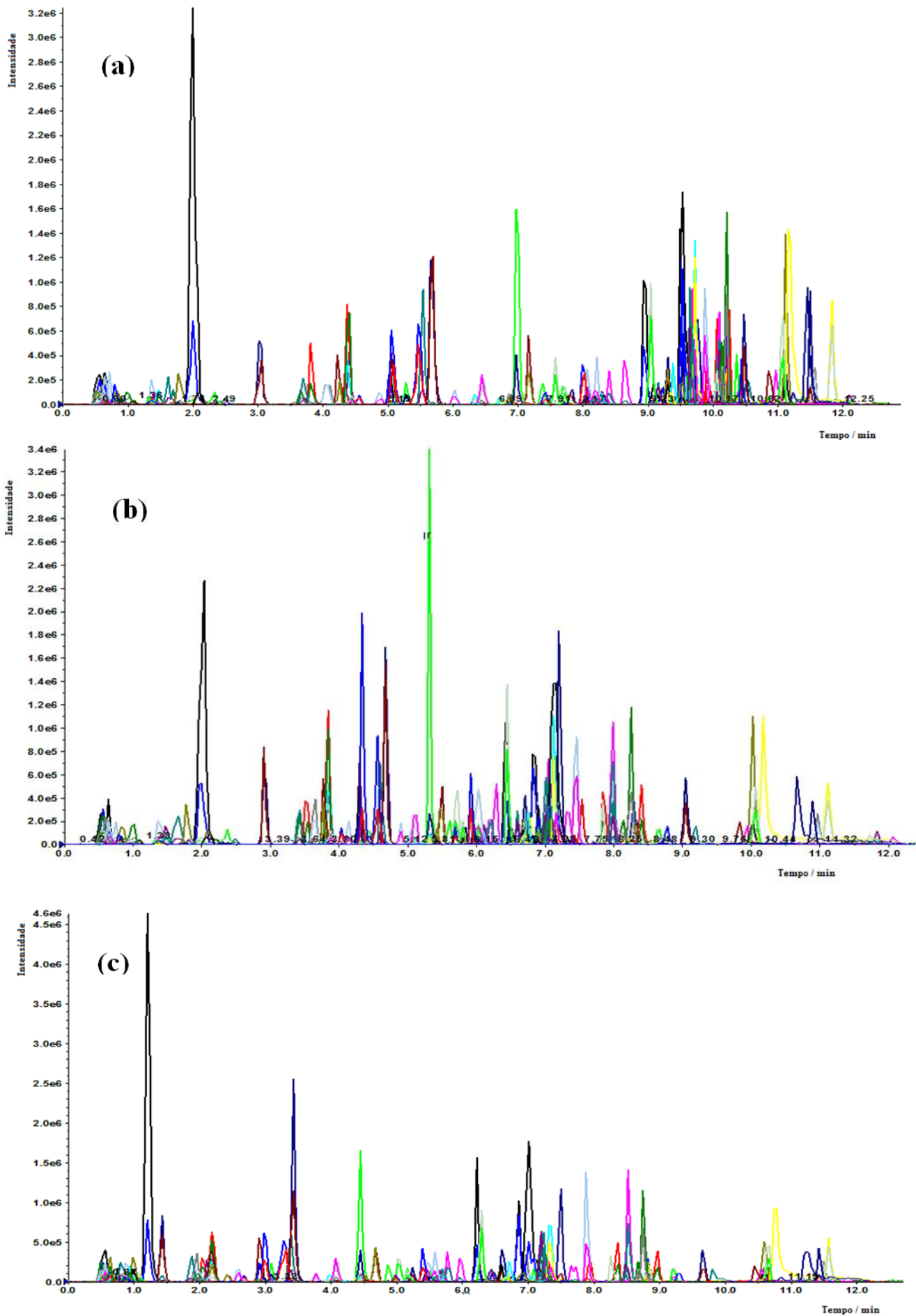


Figura 4. Cromatogramas totais dos gradientes A, B e C com composição: acetato de amônio, ácido fórmico e metanol.

5.2.3-Otimização das condições de temperatura e fluxo de fase móvel

O fluxo de FM 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 FM interfere nas interações entre a FE 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 FM, podendo auxiliar na mistura de seus componentes e alterando a viscosidade desta. Estes efeitos podem ser benéficos para o desenvolvimento da separação cromatográfica ótima.

O fluxo e a temperatura de forno de coluna escolhidos para o início dos trabalhos de otimização do método foram pré estabelecidos pelo laboratório em trabalhos desenvolvidos com matrizes vegetais.

A combinação da FM composta pelo gradiente C com um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de forno de coluna de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ mostrou-se ideal para a aplicação na matriz café. 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 9, 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 13, não havendo necessidade de alterações nos dois últimos parâmetros.

Tabela 13. Valores de razão sinal/ruído para os agrotóxicos avaliados no experimento de otimização das condições cromatográficas com o gradiente C.

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	Fluasifope 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

5.3- Validação do método QuEChERS para determinação/quantificação de resíduos de agrotóxicos em café

5.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos para extratos de amostras brancas com cromatogramas de íons selecionados que continham o analito em estudo. A ausência de sinais provenientes de compostos interferentes da matriz no mesmo tempo de retenção dos analitos, considerando as respectivas transições m/z , confirmou a seletividade do método.

Se há interferência do ruído para as duas transições monitoradas, tem-se um indício de que o branco não está livre do analito em questão. Contudo, tal resultado não inviabiliza os trabalhos de validação, desde que a relação sinal/ruído no menor nível de concentração selecionado para a curva analítica seja menor ou igual a 3. Um valor dentro deste limite para a relação entre as intensidades indica que, apesar de o branco encontrar-se contaminado pelo analito, sua presença não irá interferir significativamente na seletividade do método [31].

A Figura 5 mostra os cromatogramas de massas obtidos para análises de amostras brancas, respectivamente, branco de matriz (Figura 5a) e branco de reagente (Figura 5b).

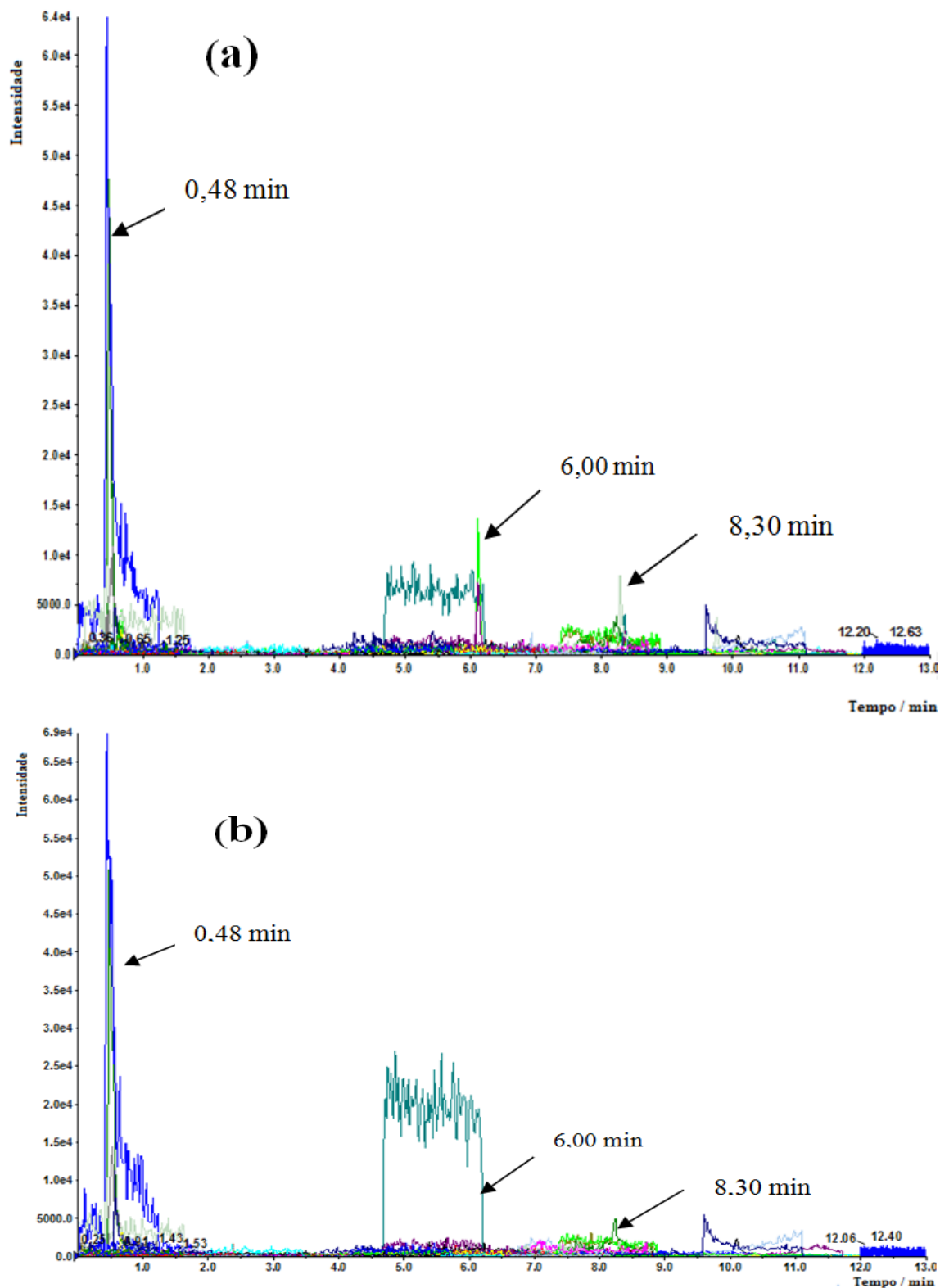


Figura 5. Cromatogramas totais das amostras branco de matriz (a) e branco de reagente (b).

A Figura 5a 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. Contudo, não foi verificada a presença das três transições empregadas para quantificação e qualificação deste composto, conforme pode-se observar na Figura 6, onde apenas duas transições são visíveis. Desta forma, pode-se afirmar com segurança que o acefato não está presente no branco de matriz. Todavia, o estudo da razão entre as intensidades do sinal da transição correspondente ao íon quantificador para o menor nível de concentração da curva analítica e do 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 café 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 essa fonte de interferentes.

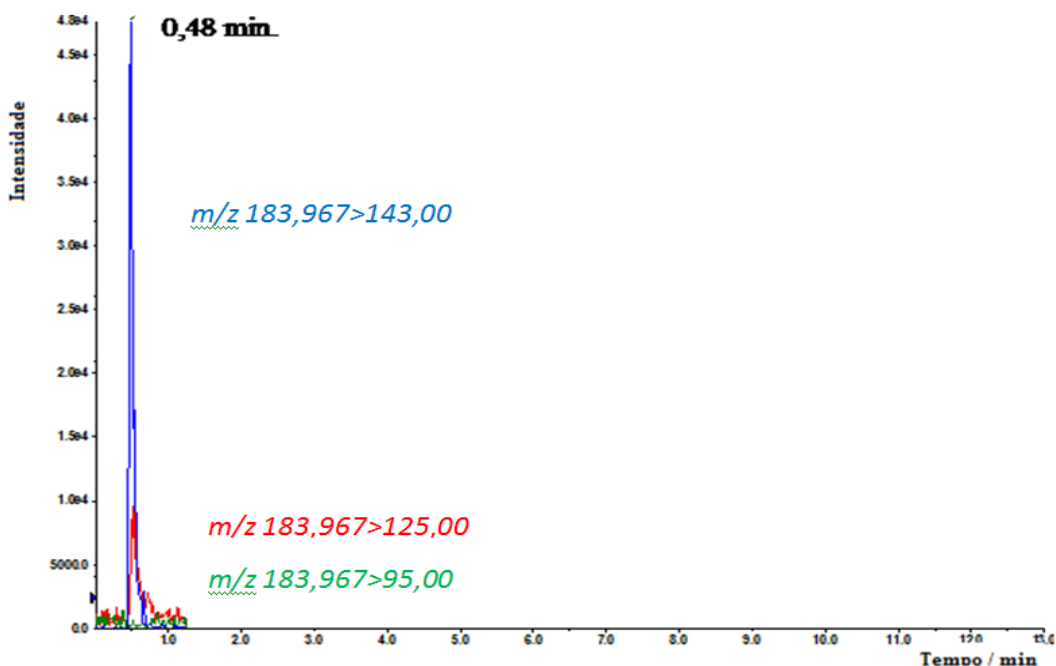


Figura 6. Cromatograma das transições m/z para o agrotóxico acefato.

No tempo de retenção aproximado de 6,0 min, observa-se outro pico, com boa simetria, sobreposto aos sinais de ruído. A deconvolução para a extração das transições m/z correspondentes a este pico é dada na Figura 7. 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. 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 estendeu-se a todos os agrotóxicos estudados neste trabalho.

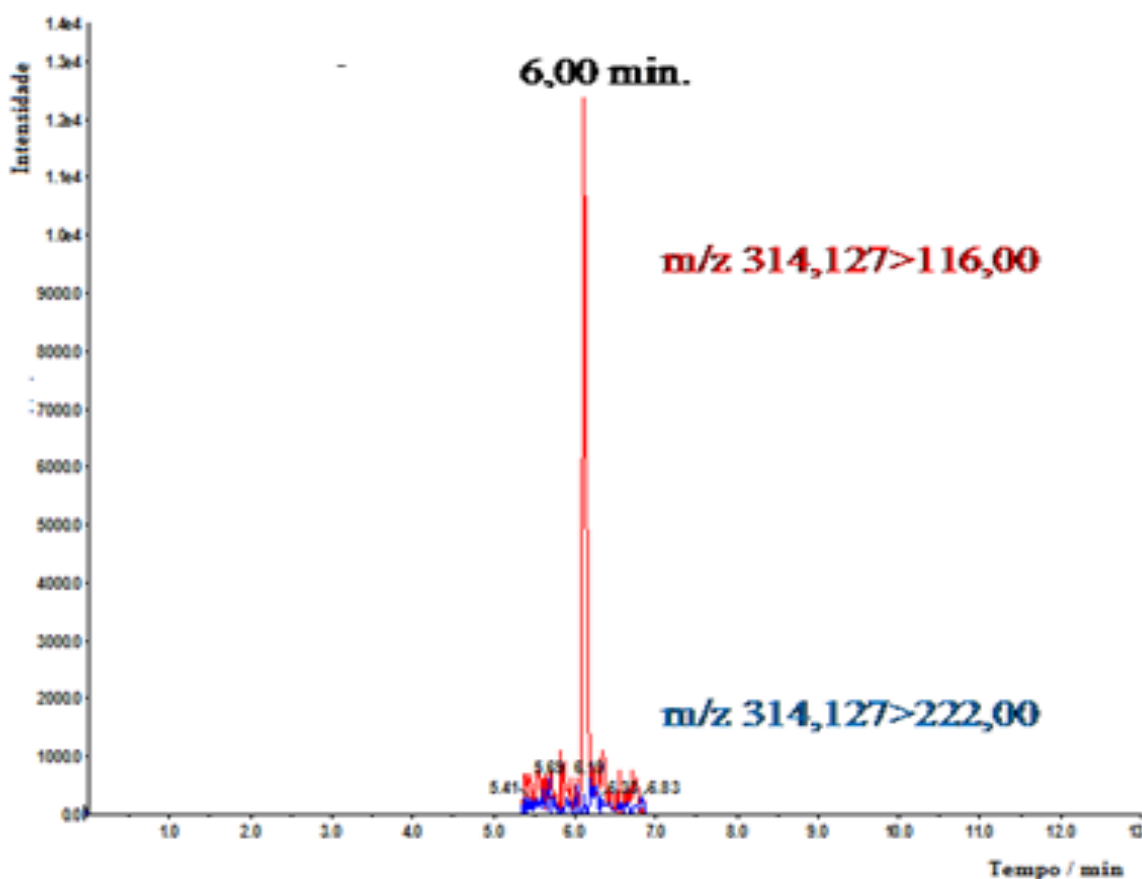


Figura 7. Cromatograma das transições m/z para o agrotóxico cresoxim metil.

Outro pico é ainda observado no tempo aproximado de 8,3 min. Este pico corresponde às transições do agrotóxico clorpirifós. Ao extrair os picos referentes a estas transições m/z , Figura 8, 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.

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

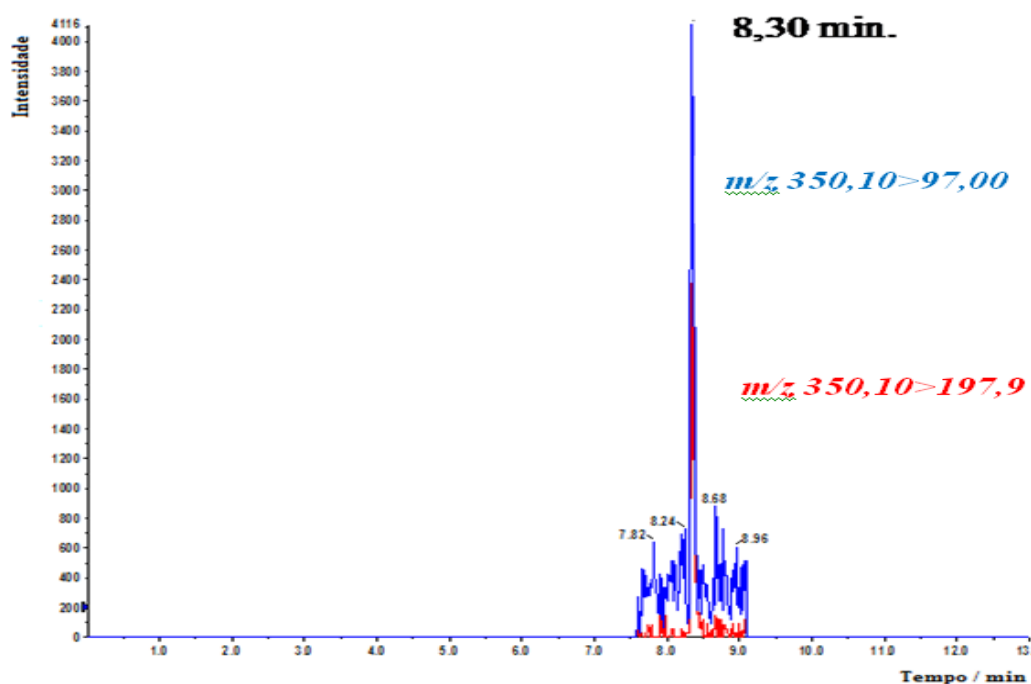


Figura 8. Cromatograma das transições m/z para o agrotóxico clorpirifós.

5. 3.2- Sensibilidade

A sensibilidade (S) constitui o coeficiente angular do gráfico analítico expresso pela equação 3[43].

$$S = \frac{dy}{dc} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: dy = variação da resposta;
 dc = variação da concentração.

Os coeficientes angulares para cada agrotóxicos estão apresentados na Tabela 14.

5. 3.3- Estudos de linearidade

Foram empregados para a construção da curva analítica os seguintes níveis de concentração: 5,0; 7,5; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

As curvas analíticas foram ajustadas pelo Método dos Mínimos Quadrados (MMQ), sob a premissa de que o desvio padrão dos resíduos da regressão é constante (homocedasticidade).

Além da inspeção das curvas analíticas, foi feita a análise gráfica dos resíduos da regressão, para a identificação visual de desvios das premissas de linearidade e desvio padrão constante garantia de aleatoriedade dos resíduos.

Para os agrotóxicos acetamiprido, benalaxil e deltametrina os gráficos de resíduos revelaram que, a partir da concentração de 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, os resíduos não ficaram ajustados de forma aleatória, ou seja, possuíam certa tendência. E que, portanto, a faixa de trabalho mais adequada estava compreendida entre 10,0 e 100,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As curvas analíticas foram construídas nesta faixa de trabalho e avaliadas por meio de ANOVA.

A presença de resíduos sistemáticos não prejudicou a avaliação da faixa de trabalho. Isso porque valores anômalos foram detectados para cada nível de concentração pelo teste de Grubbs [44]. Após a eliminação dos valores extremos, se necessário, o teste de

Grubbs foi aplicado sucessivamente até que novos valores não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados [45,46].

5.3.4 - Verificação da homocedasticidade das respostas instrumentais.

A verificação da homocedasticidade das variâncias das respostas instrumentais ao longo de toda a faixa de trabalho foi feita pelo teste F de Fisher, através de 6 replicatas. O valor de $F_{\text{calculado}}$ foi comparado com o valor de F_{tabelado} para o nível de significância de 5% e graus de liberdade (n-1, n-1).

Se $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, os desvios padrões não eram significativamente diferente e os dados foram considerados homocedásticos. Se $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, o desvio padrão era muito diferente e os dados foram considerados heterocedásticos.

Constatada a homocedasticidade das variâncias, o modelo escolhido para a curva analítica de cada agrotóxico foi o ajuste linear simples (MMQ). Se as variâncias eram heterocedásticas ao longo da faixa de trabalho, o ajuste aplicado à curva analítica foi o ponderado, com pesos iguais a $1/s^2$ (inverso das variâncias de cada nível de concentração) ou com peso igual a $1/x$ (inverso da medida).

Os testes foram feitos usando tabelas ANOVA e foram aplicados à curva analítica de cada agrotóxico, para verificação da qualidade do ajuste e da adequação da faixa de trabalho ao propósito do método. A Tabela 14 apresenta as equações das curvas analíticas e valores de coeficientes de determinação R^2 .

Dos 159 agrotóxicos estudados (exceto o acefato), 128 apresentaram ajustes significativos de acordo com a ANOVA. Os valores de R^2 foram também bastantes significativos, apresentando valores de $R^2 > 0,9922$.

Dos modelos de ajuste disponíveis, para aplicação na construção da curva analítica, ajuste linear simples pelo MMQO, ajuste linear ponderado, com pesos iguais a $1/s^2$ e $1/x$ e ajuste quadrático, o mais aplicado foi o ajuste ponderado ($1/s^2$). 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.

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

Tabela 14. Valores dos parâmetros da regressão e coeficiente de determinação.

Agrotóxicos	Equação da curva analítica ajustada	Valor de R ²
2,4,5-T	$y = 1,011 \cdot 10^3 x - 2,469 \cdot 10^3$	0,9994
2,4- DB	$y = 5,112 \cdot 10^2 x + 1,491 \cdot 10^2$	0,9959
3-hidroxycarbofurano	$y = 1,403 \cdot 10^3 x + 1,119 \cdot 10^3$	0,9992
Acetamiprido	$y = 5,683 \cdot 10^3 x - 9,178 \cdot 10^3$	0,9976
Aldicarbe	$y = 1,817 \cdot 10^3 x + 1,901 \cdot 10^2$	0,9971
Aldicarbesulfona	$y = 5,726 \cdot 10^2 x - 5,966 \cdot 10^2$	0,9988
Aldicarbe sulfóxido	$y = 1,165 \cdot 10^3 x - 7,624 \cdot 10^2$	0,9988
Aletrina	$y = 2,486 \cdot 10^3 x + 2,165 \cdot 10^3$	0,9988
Azinfósetil	$y = 3,795 \cdot 10^3 x + 3,493 \cdot 10^2$	0,9978
Azinfós metil	$y = 2,613 \cdot 10^3 x - 2,387 \cdot 10^3$	0,9980
Azoxistrobina	$y = 3,253 \cdot 10^4 x + 9,467 \cdot 10^3$	0,9977
Benalaxil	$y = 2,648 \cdot 10^4 x - 1,406 \cdot 10^4$	0,9979
Benfuracarbe	$y = 1,232 \cdot 10^4 x - 2,980 \cdot 10^3$	0,9993
Bentazona	$y = 4,111 \cdot 10^4 x - 5,694 \cdot 10^4$	0,9993
BF 500-3	$y = 3,086 \cdot 10^4 x - 3,028 \cdot 10^4$	0,9981
Betertanol	$y = 1,627 \cdot 10^3 x - 1,569 \cdot 10^2$	0,9986
Bifentrina	$y = 2,605 \cdot 10^3 x - 3,862 \cdot 10^2$	0,9987
Boscalida	$y = 6,429 \cdot 10^3 x - 1,372 \cdot 10^3$	0,9995
Carbaril	$y = 4,565 \cdot 10^3 x - 5,136 \cdot 10^3$	0,9995
Carbendazim	$y = 3,088 \cdot 10^7 x - 4,164 \cdot 10^4$	0,9976
Carbofurano	$y = 8,812 \cdot 10^3 x - 7,785 \cdot 10^3$	0,9974
Ciazofamida	$y = 1,456 \cdot 10^4 x - 1,723 \cdot 10^4$	0,9986
Cinidon etílico	$y = 2,546 \cdot 10^3 x - 6,657 \cdot 10^2$	0,9981
Ciproconazol	$y = 6,072 \cdot 10^3 x - 4,925 \cdot 10^2$	0,9997
Ciprodinil	$y = 1,932 \cdot 10^3 x - 1,203 \cdot 10^3$	0,9989
Clorfenvinfós	$y = 7,650 \cdot 10^3 x - 9,491 \cdot 10^2$	0,9992
Cloroxuron	$y = 1,294 \cdot 10^4 x - 8,454 \cdot 10^3$	0,9998
Clorpirifós	$y = 1,342 \cdot 10^3 x + 7,048 \cdot 10^1$	0,9991
Cresoxim metil	$y = 1,649 \cdot 10^3 x - 5,979 \cdot 10^2$	0,9956
Deltametrina	$y = 1,338 \cdot 10^3 x + 4,024 \cdot 10^2$	0,9958
Diazinona	$y = 6,795 \cdot 10^3 x - 6,254 \cdot 10^3$	0,9986
Dicloflanida	$y = 4,201 \cdot 10^3 x + 4,270 \cdot 10^3$	0,9956
Diclorprope	$y = 2,244 \cdot 10^3 x - 4,671 \cdot 10^3$	0,9997
Difenoconazol	$y = 1,081 \cdot 10^4 x - 3,655 \cdot 10^3$	0,9976
Diflubenzuron	$y = 2,297 \cdot 10^3 x - 1,651 \cdot 10^3$	0,9989
Dimetoato	$y = 4,306 \cdot 10^3 x - 3,370 \cdot 10^3$	0,9981
Dinocape	$y = 9,938 \cdot 10^3 x - 1,026 \cdot 10^4$	0,9998
Dinosebe	$y = 2,844 \cdot 10^4 x - 1,629 \cdot 10^4$	0,9999
Dinoterbe	$y = 3,574 \cdot 10^4 x - 4,193 \cdot 10^4$	0,9999
Dissulfotonasulfona	$y = 3,980 \cdot 10^3 x - 1,184 \cdot 10^3$	0,9970
Dissulfotona sulfóxido	$y = 1,070 \cdot 10^4 x - 1,913 \cdot 10^1$	0,9990
Etiona	$y = 1,367 \cdot 10^4 x - 6,057 \cdot 10^3$	0,9995
Etofumesato	$y = 2,803 \cdot 10^3 x + 8,110 \cdot 10^2$	0,9991
Etoprofós	$y = 7,930 \cdot 10^3 x - 5,211 \cdot 10^3$	0,9995

Agrotóxicos	Equação da curva analítica ajustada	Valor de R ²
Etoxisulfurom	$y = 7,015 \cdot 10^3 x - 1,176 \cdot 10^3$	0,9949
Etrinfós	$y = 4,876 \cdot 10^3 x - 2,819 \cdot 10^3$	0,9992
Fenamidona	$y = 9,052 \cdot 10^3 x - 3,786 \cdot 10^3$	0,9976
Fenamifós	$y = 2,559 \cdot 10^4 x - 5,586 \cdot 10^3$	0,9994
Fenamifóssulfona	$y = 1,502 \cdot 10^4 x - 9,047 \cdot 10^3$	0,9996
Fenamifós sulfóxido	$y = 6,759 \cdot 10^3 x - 2,113 \cdot 10^3$	0,9985
Fenarimol	$y = 1,466 \cdot 10^3 x - 1,910 \cdot 10^2$	0,9997
Fenexamida	$y = 3,128 \cdot 10^3 x + 7,558 \cdot 10^2$	0,9983
Fenpropimorfe	$y = 2,417 \cdot 10^4 x - 1,231 \cdot 10^4$	0,9983
Fentiona sulfóxido	$y = 1,119 \cdot 10^4 x + 4,186 \cdot 10^2$	0,9992
Fentoato	$y = 4,504 \cdot 10^3 x - 6,342 \cdot 10^3$	0,9940
Fipronilsulfona	$y = 8,846 \cdot 10^4 x - 4,188 \cdot 10^4$	0,9999
Fluasifope p-butílico	$y = 3,875 \cdot 10^4 x - 3,826 \cdot 10^4$	0,9992
Fludioxonil	$y = 1,354 \cdot 10^4 x - 4,648 \cdot 10^3$	0,9999
Fluquinconazol	$y = 1,504 \cdot 10^3 x - 7,937 \cdot 10^2$	0,9928
Fluroxipir	$y = 1,4040 \cdot 10^3 x - 3,256 \cdot 10^3$	0,9999
Flutriafol	$y = 1,494 \cdot 10^3 x - 1,507 \cdot 10^3$	0,9980
Foransulfurom	$y = 3,213 \cdot 10^3 x - 2,813 \cdot 10^3$	0,9978
Forato	$y = 7,770 \cdot 10^2 x + 6,30 \cdot 10^2$	0,9978
Forato sulfóxido	$y = 5,532 \cdot 10^3 x + 8,722 \cdot 10^3$	0,9992
Fosalona	$y = 7,589 \cdot 10^3 x + 1,071 \cdot 10^4$	0,9966
Furatiocarbe	$y = 6,764 \cdot 10^3 x + 1,077 \cdot 10^4$	0,9998
Hexaconazol	$y = 3,332 \cdot 10^3 x + 1,072 \cdot 10^4$	0,9993
Hexitiazoxi	$y = 7,074 \cdot 10^3 x + 1,043 \cdot 10^4$	0,9973
Indoxacarbe	$y = 1,416 \cdot 10^3 x + 3,263 \cdot 10^3$	0,9988
Iprovalicarbe	$y = 1,926 \cdot 10^4 x + 2,897 \cdot 10^4$	0,9979
Isoproturon	$y = 1,675 \cdot 10^4 x + 2,286 \cdot 10^4$	0,9997
Linuron	$y = 1,932 \cdot 10^3 x + 3,512 \cdot 10^3$	0,9971
Malationa	$y = 9,141 \cdot 10^3 x + 1,314 \cdot 10^4$	0,9980
Metalaxil	$y = 2,2374 \cdot 10^4 x + 2,894 \cdot 10^4$	0,9985
Metazaclor	$y = 2,045 \cdot 10^4 x + 2,382 \cdot 10^4$	0,9978
Meticonazol	$y = 7,701 \cdot 10^3 x + 1,260 \cdot 10^4$	0,9997
Metidationa	$y = 4,299 \cdot 10^3 x + 7,2578 \cdot 10^3$	0,9988
Metiocarbe	$y = 7,061 \cdot 10^3 x + 6,4823 \cdot 10^3$	0,9993
Metiocarbe sulfóxido	$y = 6,6511 \cdot 10^3 x + 2,7354 \cdot 10^4$	0,9970
Metomil	$y = 1,318 \cdot 10^3 x + 2,7148 \cdot 10^3$	0,9975
Miclobutanil	$y = 3,8335 \cdot 10^3 x + 4,571 \cdot 10^3$	0,9994
Monocrotófos	$y = 6,369 \cdot 10^3 x + 1,393 \cdot 10^4$	0,9998
Monolinuron	$y = 2,800 \cdot 10^3 x + 3,701 \cdot 10^3$	0,9993
Nuarimol	$y = 1,7821 \cdot 10^3 x + 3,099 \cdot 10^3$	0,9979
Ometoato	$y = 1,869 \cdot 10^3 x + 4,3076 \cdot 10^3$	0,9981
Oxadixil	$y = 7,792 \cdot 10^3 x + 1,508 \cdot 10^4$	0,9976
Oxamil	$y = 4,028 \cdot 10^3 x + 9,5339 \cdot 10^3$	0,9997
Oxassulfurom	$y = 1,703 \cdot 10^4 x + 3,728 \cdot 10^4$	0,9990
Paclobutrazol	$y = 8,392 \cdot 10^2 x + 1,132 \cdot 10^3$	0,9922
Pencicuron	$y = 4,548 \cdot 10^4 x + 8,722 \cdot 10^4$	0,9996
Penconazol	$y = 5,9705 \cdot 10^3 x + 1,2331 \cdot 10^4$	0,9988
Pendimetalina	$y = 2,9234 \cdot 10^3 x + 4,897 \cdot 10^3$	0,9986
Picolinafen	$y = 5,784 \cdot 10^3 x + 8,976 \cdot 10^3$	0,9951
Piraclostrobin	$y = 2,275 \cdot 10^4 x + 2,601 \cdot 10^4$	0,9980
Piradabem	$y = 2,385 \cdot 10^4 x + 4,091 \cdot 10^4$	0,9991
Pirazofós	$y = 1,813 \cdot 10^4 x + 2,009 \cdot 10^4$	0,9979
Pirimetanil	$y = 4,055 \cdot 10^3 x + 9,170 \cdot 10^3$	0,9973
Pirimifósetil	$y = 4,077 \cdot 10^4 x + 6,08867 \cdot 10^4$	0,9990
Pirimifós metil	$y = 7,947 \cdot 10^3 x + 5,184 \cdot 10^3$	0,9961
Piriproxifen	$y = 4,425 \cdot 10^4 x + 6,5279 \cdot 10^4$	0,9995
Procloraz	$y = 1,0858 \cdot 10^4 x + 1,5375 \cdot 10^4$	0,9998
Profam	$y = 4,2766 \cdot 10^2 x + 1,1188 \cdot 10^3$	0,9983
Profenofós	$y = 7,80881 \cdot 10^3 x + 1,344 \cdot 10^4$	0,9981
Propargito	$y = 2,267 \cdot 10^4 x + 3,313 \cdot 10^4$	0,9986
Propiconazol	$y = 5,9866 \cdot 10^3 x + 1,043 \cdot 10^4$	0,9997
Propizamida	$y = 2,5794 \cdot 10^3 x + 4,0663 \cdot 10^3$	0,9983
Propoxur	$y = 4,1554 \cdot 10^3 x + 5,3981 \cdot 10^3$	0,9993

Agrotóxicos	Equação da curva analítica ajustada	Valor de R ²
Prossulfuron	$y = 2,2072 \cdot 10^3 x + 3,4394 \cdot 10^3$	0,9992
Quinalfós	$y = 5,4886 \cdot 10^3 x + 6,4023 \cdot 10^3$	0,9993
Tebuconazol	$y = 8,6915 \cdot 10^3 x + 1,5182 \cdot 10^4$	0,9993
Tebuempirade	$y = 6,6384 \cdot 10^3 x + 1,1349 \cdot 10^4$	0,9997
Tebufenozida	$y = 2,7248 \cdot 10^4 x + 5,7195 \cdot 10^4$	0,9983
TEEP	$y = 1,983 \cdot 10^4 x + 4,091 \cdot 10^4$	0,9991
Tiabendazol	$y = 1,7653 \cdot 10^4 x + 3,636 \cdot 10^4$	0,9978
Tiacloprido	$y = 5,8651 \cdot 10^3 x + 2,1974 \cdot 10^4$	0,9946
Tiametoxam	$y = 1,1229 \cdot 10^3 x + 5,6792 \cdot 10^3$	0,9992
Tifensulfurom metil	$y = 2,0845 \cdot 10^4 x + 5,0095 \cdot 10^4$	0,9998
Tiodicarbe	$y = 4,2644 \cdot 10^3 x + 7,7051 \cdot 10^3$	0,9994
Tolilfluánida	$y = 6,2199 \cdot 10^3 x + 6,4805 \cdot 10^3$	0,9981
Triadimefon	$y = 3,7304 \cdot 10^3 x + 7,4698 \cdot 10^3$	0,9979
Triadimenol	$y = 2,1243 \cdot 10^3 x + 3,4117 \cdot 10^3$	0,9999
Triassulfurom	$y = 4,3496 \cdot 10^4 x + 7,928 \cdot 10^4$	0,9992
Triazofós	$y = 1,132 \cdot 10^4 x + 1,496 \cdot 10^4$	0,9987
Triclorfon	$y = 1,1889 \cdot 10^3 x + 3,971 \cdot 10^4$	0,9991
Tridemorfe	$y = 5,123 \cdot 10^3 x + 7,123 \cdot 10^3$	0,9989
Trifloxistrobina	$y = 4,3407 \cdot 10^4 x + 7,9287 \cdot 10^4$	0,9992
Triflumizol	$y = 2,1037 \cdot 10^4 x + 5,5004 \cdot 10^4$	0,9969
Triforin	$y = 5,04655 \cdot 10^3 x + 3,5530 \cdot 10^3$	0,9997

5.3.5-Estudos de precisão e recuperação do método

A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade e precisão intermediária.

Em geral, são aceites intervalos de recuperação entre 70 e 120%, com precisão de até 20% para a maioria dos métodos analíticos [33,43,46].

A Tabela 16 apresenta os resultados das recuperações médias (n=6) percentuais e o CV%, para os 128 agrotóxicos que foram fortificados em café, aos níveis de 10,00; 25,00; 50,00; 100,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$, extraídos pelo método Quechers e analisados por LC/MS/MS em modos de ionização ESI(+) e ESI(-), conforme as condições de detecção otimizadas.

Valores de resíduos sistemáticos foram investigados nos resultados de recuperação obtidos para cada nível de concentração pelo teste de Grubbs [44]. Após a eliminação dos valores extremos, se necessário, o teste de Grubbs foi aplicado sucessivamente até que novos valores não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados [48].

Dos 160 compostos estudados, o agrotóxico acefato, não foi tratado devido à presença de interferentes nos brancos de matriz e de reagentes. Dos 159 analitos restantes, 31 não atenderam aos critérios de desempenho requeridos. São eles:

1. avermectina B1A, cimoxanil, diclorvós, forato, imidacloprido e pirimicarbe, cujos picos cromatográficos não apresentaram eficiência cromatográfica bem definida nem nas amostras fortificadas, nem nas amostras analíticas matrizadas;
2. barban, dissulfotona, fipronil, mevinfós, oxifluorfem, parationa etílica e terbufós apresentaram CV% acima de 20;
3. 2,4D, amitraz, espiroxamina, imazalil e piridato apresentaram recuperações abaixo de 70%;
4. benomil apresentou recuperação acima de 120%;
5. carbossulfano, ciromazina, cloripirifós metil, flumetrina, iprodiona, isoxaflutol, metamidofós, pimetozina, pirifenox e tiofanato metílico apresentaram recuperações abaixo de 70% e CV% acima de 20;
6. fosmete e metilssulfurom metil apresentaram recuperação acima de 120% e CV% acima de 20.

Tabela 15. Dados de recuperação (% , n=6), coeficiente de variação (CV%) ,limites de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) do método obtido para café e LMR de acordo com a legislação brasileira.

Agrotóxicos/nível de concentração	10,00 µg kg ⁻¹		25,00 µg kg ⁻¹		50,00 µg kg ⁻¹		100,00 µg kg ⁻¹		LD µg kg ⁻¹	LQ µg kg ⁻¹	LMR µg kg ⁻¹
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	Média	CV (%)	Média	CV (%)			
2,4,5-T	80,5	15,8	82,4	12,6	83,2	10,4	84,8	9,7	4,08	6,25	10,0
2,4-DB	87,0	16,6	88,9	10,8	100,5	7,0	98,7	5,9	7,01	16,63	100,0
3-hidroxycarbofurano	98,8	11,0	101,3	9,1	102,7	7,3	100,0	7,4	3,74	10,56	10,0
Acetamiprido	98,1	8,6	99,0	6,3	100,8	5,0	100,3	7,7	2,16	2,63	100,0
Aldicarbe	95,2	14,5	95,0	6,5	102,2	9,9	100,2	8,1	5,06	12,25	100,0
Aldicarbesulfona	101,3	15,1	96,1	9,1	97,1	7,8	97,1	7,4	5,20	10,89	Proibido
Aldicarbe sulfóxido	83,3	11,3	88,4	11,3	88,5	7,2	92,1	7,8	0,75	1,94	100,0
Aletrina	83,9	16,3	84,2	7,9	92,1	7,3	92,4	5,4	5,05	9,23	Proibido
Azinfósetil	92,9	4,8	96,7	5,1	97,9	4,2	98,7	7,3	0,20	0,54	Proibido

Azinfós metil	93,0	6,1	93,3	6,7	96,2	5,6	96,6	8,0	1,34	1,85	Proibido
Azoxistrobina	96,6	8,7	95,6	7,9	101,6	7,2	99,8	9,6	0,50	0,71	50,0
Benalaxil	90,0	9,3	94,2	6,7	93,7	6,3	96,5	9,0	0,73	1,04	100,0
Benfuracarbe	83,6	14,9	82,6	12,0	93,4	8,8	92,1	4,7	0,28	0,31	50,0
Bentazona	93,6	9,1	90,4	6,0	97,1	5,9	96,5	5,9	1,45	1,54	NPC
BF 500-3	90,4	5,4	94,8	7,0	100,4	4,1	96,5	5,9	1,17	1,36	10,0
Bifentrina	56,7	18,4	56,4	12,4	59,9	18,6	60,7	9,9	0,89	1,83	10,0
Bitertanol	86,7	10,4	92,2	13,5	97,0	7,6	97,0	10,9	3,61	5,66	NPC
Boscalida	93,9	7,5	93,9	6,1	98,5	7,3	99,0	6,3	1,26	2,68	50,0
Carbaril	94,8	7,0	95,4	7,8	98,2	4,2	97,1	4,4	1,50	2,00	NPC
Carbendazim	98,3	10,8	93,3	9,5	98,1	7,1	98,8	8,2	1,90	2,61	NPC
Carbofurano	100,8	8,6	100,7	5,2	103,7	4,7	101,7	7,2	0,98	1,09	100,0
Ciazofamida	93,4	7,3	94,7	6,1	101,7	7,3	99,2	7,0	1,07	1,15	NPC
Cinidon etílico	89,4	11,6	91,6	6,3	95,9	6,7	98,1	5,9	0,77	1,56	Proibido
Ciproconazol	90,1	19,3	86,1	14,9	92,1	6,4	92,8	7,1	0,54	1,17	10,0
Ciprodinil	78,2	8,4	83,7	9,3	87,6	8,1	85,9	10,3	3,04	5,97	NPC
Clorfenvinfós	92,8	9,8	99,1	8,4	108,6	7,0	108,8	9,4	0,33	0,64	Proibido
Cloroxuron	93,3	7,1	93,1	6,2	97,3	7,0	95,2	7,2	0,81	1,01	Proibido
Clorpirifós	83,3	11,7	83,2	8,6	86,5	7,5	87,6	9,5	2,74	6,13	50,0
Cresoxim metil	96,2	14,7	101,0	8,0	101,2	8,4	102,1	11,1	4,34	9,81	50,0
Deltametrina	73,8	10,3	74,4	8,0	81,7	6,1	83,8	11,0	3,02	8,89	1000
Diazinona	89,6	7,9	93,1	8,7	94,7	8,4	94,7	10,8	1,59	2,51	NPC
Diclofluanida	95,4	7,1	97,5	8,8	99,0	6,6	99,5	8,7	5,69	5,88	Proibido
Diclorprope	90,9	17,1	83,6	10,2	88,9	9,2	94,0	10,3	17,30	29,7	Proibido
Difenoconazol	86,0	8,6	88,0	9,4	95,7	7,6	96,1	9,1	2,97	4,16	50,0
Diflubenzuron	98,0	11,2	96,3	5,7	100,7	5,3	102,6	5,0	1,28	2,10	NPC
Dimetoato	94,8	13,4	97,0	8,0	100,1	4,0	101,2	6,9	3,32	7,52	NPC
Dinocape	84,2	7,9	87,0	6,1	93,5	6,1	94,4	5,7	0,27	0,52	NPC
Dinosebe	94,2	5,5	96,0	6,0	101,0	5,2	102,1	5,5	0,68	0,82	Proibido
Dinoterbe	99,0	5,2	98,8	6,8	101,8	5,9	101,8	6,7	1,47	1,71	Proibido
Dissulfotonasulfona	91,4	7,1	92,8	6,5	95,4	5,8	95,9	8,6	2,28	4,79	50,0
Dissulfotona sulfóxido	92,5	8,0	95,4	5,8	99,1	5,8	99,6	7,7	0,45	1,03	50,0
Etiona	85,3	6,2	87,8	7,2	94,2	6,5	93,9	5,8	0,75	1,18	NPC
Etofumesato	94,5	8,8	95,5	6,6	97,6	6,0	96,9	7,0	3,01	7,39	Proibido
Etoprofós	85,1	8,0	85,9	9,4	87,8	7,0	88,6	9,4	1,85	3,14	NPC
Etoxissulfurom	89,4	9,5	91,7	8,9	106,5	9,7	103,5	10,2	1,43	2,98	NPC
Etrinós	87,5	6,0	93,2	7,9	92,3	7,5	95,5	7,6	6,75	16,90	Proibido
Fenamidona	92,8	8,3	95,4	6,0	98,2	7,4	98,8	7,5	0,86	1,44	NPC
Fenamifós	89,5	10,0	93,5	6,6	95,8	6,6	98,0	10,2	0,28	0,33	50,0
Fenamifóssulfona	98,5	4,5	100,5	5,4	103,8	4,9	103,2	6,5	1,04	1,59	50,0

Fenamifós sulfóxido	92,2	7,0	95,6	7,2	101,4	6,8	101,7	9,1	0,48	0,65	50,0
Fenarimol	90,8	7,6	91,5	12,0	97,0	7,3	97,0	7,1	0,59	1,27	NPC
Fenexamida	90,4	8,6	93,1	6,7	96,7	7,7	100,5	7,4	1,18	2,92	Proibido
Fenpropimorfe	52,4	11,8	52,7	8,7	54,2	7,3	52,9	6,6	0,69	0,89	100,0
Fentiona sulfóxido	92,9	7,3	95,5	5,8	98,8	7,1	98,9	6,5	0,07	0,15	100,0
Fentoato	97,8	12,5	99,0	8,1	102,2	6,3	103,0	7,2	2,93	4,77	NPC
Fipronilsulfona	100,9	6,4	102,7	4,9	107,9	3,6	107,9	6,3	1,28	1,59	NPC
Fluasifope p-butílico	89,2	5,8	90,6	6,8	97,4	6,3	96,3	7,1	1,10	1,23	30,0
Fludioxonil	95,8	6,6	99,2	7,2	104,0	4,9	103,2	6,4	0,49	0,74	NPC
Fluquinconazol	93,0	13,5	93,4	9,9	97,6	7,9	97,5	7,6	1,00	1,61	NPC
Fluroxipir	85,3	18,1	82,0	5,2	83,1	9,2	83,3	8,3	3,53	5,09	NPC
Flutriafol	95,5	8,5	96,5	8,2	100,6	8,8	102,8	10,8	3,38	6,67	50,0
Foransulfurom	98,2	11,5	96,1	8,8	98,7	11,5	96,1	10,0	1,28	1,76	NPC
Forato	86,2	15,7	93,6	6,7	96,2	4,9	98,2	7,8	2,18	6,51	50,0
Forato sulfóxido	90,5	9,9	92,0	5,9	96,9	4,6	97,8	6,3	0,16	2,58	50,0
Fosalona	87,6	6,3	94,0	8,4	97,2	7,0	97,2	7,6	1,37	1,53	Proibido
Furatiocarbe	84,2	7,2	86,2	9,7	93,9	9,2	93,7	8,3	0,46	1,34	NPC
Hexaconazol	79,1	15,4	85,3	9,8	88,5	8,3	90,6	8,1	4,17	5,70	50,0
Hexitiazoxi	70,7	9,3	74,8	7,7	80,5	6,1	81,5	6,0	1,45	1,59	100,0
Indoxacarbe	99,0	13,4	100,1	10,4	104,1	9,8	100,7	6,2	7,34	8,17	NPC
Iprovalicarbe	90,8	9,4	96,1	11,4	98,4	5,3	98,3	6,6	0,70	0,94	NPC
Isoproturon	90,3	6,6	90,8	7,4	97,3	5,7	96,6	6,2	0,64	0,72	100,0
Linuron	88,5	9,8	88,7	7,0	92,8	7,3	92,3	6,1	0,05	2,48	NPC
Malationa	95,2	11,0	95,4	8,2	99,1	8,1	100,2	7,9	3,63	9,58	10,0
Metalaxil	89,9	5,0	92,9	7,2	97,2	4,6	97,5	5,2	0,59	0,80	NPC
Metazaclor	89,5	5,9	92,3	5,3	94,4	5,7	94,3	5,3	0,62	0,82	0,01
Meticonazol	84,6	12,1	86,3	4,4	91,0	6,8	92,3	7,0	1,78	2,47	200,0
Metidationa	89,7	6,9	89,4	5,6	92,9	4,9	92,9	5,7	2,70	3,2	NPC
Metiocarpe	90,5	9,7	88,7	7,4	95,2	6,6	93,8	5,6	1,45	1,57	NPC
Metiocarpe sulfóxido	89,7	17,6	94,1	11,3	97,8	7,4	97,0	5,3	0,19	0,26	100,0
Metomil	91,6	12,7	95,9	9,7	101,9	11,1	101,4	6,6	7,70	8,33	NPC
Miclobutanil	88,5	10,4	95,1	8,1	95,1	6,6	97,4	7,9	3,34	4,38	50,0
Monocrotofós	92,4	9,9	96,2	5,5	99,5	6,2	97,8	5,3	1,79	2,20	Proibido
Monolinuron	87,4	10,1	91,4	6,1	95,1	6,4	94,6	5,4	3,59	3,83	100,0
Nuarimol	86,6	7,8	91,0	9,7	94,1	7,4	96,7	8,7	5,98	6,82	Proibido
Ometoato	82,6	16,0	84,6	7,8	85,9	9,3	90,0	7,5	6,09	7,47	Proibido
Oxadixil	92,5	8,5	96,1	7,3	100,4	7,3	99,0	5,8	0,51	2,27	Proibido
Oxamil	92,0	12,0	95,2	9,1	96,9	7,6	97,3	8,3	3,35	4,45	Proibido
Oxassulfurom	93,4	14,0	95,5	9,6	101,5	9,9	96,0	9,7	2,77	6,47	100,0
Paclobutrazol	85,9	14,7	90,3	6,5	91,8	5,9	95,7	10,8	1,57	4,45	NPC

Pencicuron	86,4	8,0	93,0	6,1	97,3	6,6	96,3	5,7	0,43	0,66	NPC
Penconazol	79,1	6,5	81,3	8,0	87,4	9,1	86,3	8,0	1,00	1,26	Proibido
Pendimetalina	71,0	8,9	76,7	9,8	81,7	6,9	82,4	6,0	3,89	4,49	100,0
Picolinafen	83,5	11,1	85,9	6,5	92,6	6,4	93,2	8,4	1,80	2,00	100,0
Piraclostrobina	93,9	8,9	93,5	7,2	99,5	6,3	99,5	7,7	0,51	0,62	50,0
Pirazofós	91,0	8,4	95,5	6,7	101,4	7,7	96,4	5,8	0,52	0,67	NPC
Piridabem	62,5	6,0	65,3	7,5	71,6	6,8	72,4	7,5	0,58	0,66	NPC
Pirimetanil	78,7	14,0	82,8	9,0	87,2	6,5	87,1	6,2	4,47	7,51	NPC
Pirimifósetil	74,5	8,1	78,9	7,4	83,9	4,5	84,4	6,3	0,31	0,40	10,0
Pirimifós metil	85,8	11,1	90,1	7,5	92,3	6,1	92,0	7,1	1,78	2,43	50,0
Piriproxifen	74,7	5,6	78,2	6,8	83,1	5,5	84,0	6,7	0,32	0,45	100,0
Procloraz	76,4	7,6	79,3	9,9	86,0	8,4	85,5	7,4	1,16	1,52	NPC
Profam	90,1	19,4	92,3	13,5	91,9	10,4	95,0	7,2	18,48	40,12	Proibido
Profenofós	83,1	7,3	83,0	7,0	89,5	7,1	88,1	7,8	1,32	1,42	30,0
Propargito	78,9	5,2	81,1	6,6	87,0	5,9	86,8	6,2	0,46	0,51	NPC
Propiconazol	79,8	8,2	84,3	6,0	90,8	5,9	89,6	4,0	2,06	2,59	50,0
Propizamida	90,7	7,3	90,5	8,8	93,6	6,0	94,2	6,2	3,89	4,25	Proibido
Propoxur	93,0	9,7	99,0	7,8	101,3	5,3	101,0	5,3	3,76	6,15	Proibido
Prossulfuron	92,2	8,9	99,0	9,2	105,1	9,8	103,6	7,5	7,56	12,56	Proibido
Quinalfós	89,0	11,5	90,5	9,4	94,0	6,2	92,2	6,2	2,86	4,03	100,0
Tebuconazol	86,6	10,1	86,8	9,0	89,3	10,8	90,8	9,0	1,77	2,72	200,0
Tebufempirade	77,2	10,6	83,9	8,3	87,5	6,5	88,5	8,1	5,46	15,06	Proibido
Tebufenozida	92,9	10,6	98,4	11,4	102,1	7,3	102,2	9,0	0,66	1,06	NPC
TEEP	66,6	7,7	64,5	9,5	63,9	7,2	69,8	11,7	1,31	2,19	20,0
Tiabendazol	71,9	15,7	79,9	14,2	89,4	16,4	91,5	11,8	0,08	0,11	NPC
Tiacloprido	91,7	10,9	95,9	10,3	99,6	8,7	96,2	7,3	1,92	2,29	NPC
Tiametoxam	97,3	13,4	102,1	13,9	102,2	10,9	104,0	10,8	4,89	17,79	0,02
Tifensulfurom metil	98,1	14,4	96,6	17,2	101,1	15,7	103,2	12,5	1,78	3,29	NPC
Tiodicarbe	92,5	7,5	93,4	7,0	94,9	5,2	97,1	7,0	2,43	2,69	NPC
Tolilfluorida	96,0	10,0	94,7	7,6	100,2	9,7	98,5	6,6	1,76	2,12	NPC
Triadimefon	90,9	7,8	93,0	8,8	95,0	4,3	95,1	7,1	3,00	3,56	100,0
Triadimenol	84,0	16,5	91,1	9,8	93,1	7,7	91,9	6,6	0,86	1,46	500,0
Triassulfurom	101,6	16,8	97,6	12,7	102,0	6,4	103,2	6,5	1,57	3,10	Proibido
Triazofós	94,1	10,3	96,0	10,3	96,4	6,5	98,5	7,8	1,48	2,29	10,0
Triclorfon	95,4	17,4	94,4	10,9	98,8	9,0	95,6	8,2	2,02	3,85	50,0
Tridemorfe	37,1	19,9	42,7	7,8	51,2	8,6	51,2	6,3	4,24	7,19	NPC
Trifloxistrobina	92,4	7,8	96,5	8,9	104,6	6,2	101,8	7,2	0,28	0,36	0,05
Triflumizol	75,0	9,7	79,8	5,8	89,2	8,5	89,8	7,9	0,74	1,11	NPC
Triforin	92,6	13,3	95,0	10,2	97,5	5,8	96,5	7,4	1,96	2,05	NPC

NPC – não permitido para a cultura.

Proibido – produto com uso proibido na agricultura brasileira.

Como pode-se perceber, cinco compostos apresentaram recuperação menor do que 70%. Eles foram considerados com desempenho satisfatório. Trata-se de um comportamento sistemático para suas recuperações, ao considerar os três dias de validação. É importante avaliar se os coeficientes de variação são menores que 20%. São eles: bifentrina, fenpropimorfe, piridaben, TEPP e tridemorfe que incluem-se nesta categoria, pois apresentaram recuperação menor do que 70% com boa precisão intermediária (CV < 20%).

5.4- Aplicações do método LC/MS/MS para análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras reais de café

Foram analisadas 15 amostras reais de café sendo duas do Estado região de Minas Gerais (Diamantina e Monte Santo de Minas) e 13 amostras de diferentes regiões do Brasil, sendo que não foi possível identificar suas origens, por se tratarem de amostras de fiscalização.

Das 15 amostras, 7 amostras estavam contaminadas com agrotóxicos. Uma amostra contaminada com o agrotóxico carbendazim, duas com o tiametoxan e quatro com o triadimenol, conforme pode-se visualizar na Tabela 16.

Tabela 16. Agrotóxicos encontrados, com seus valores de LQ, LMRs de acordo com a legislação brasileira e os valores encontrados nas amostras.

Agrotóxicos	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Valor encontrado nas amostras ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Carbendazim	2,61	NPC	162,0
Tiametoxan	17,79	20,0	329,0
	17,79	20,0	194,0
Triadimenol	1,46	500,0	237,0
	1,46	500,0	717,0
	1,46	500,0	177,0
	1,46	500,0	167,0

NPC – não permitido para a cultura

O carbendazim foi encontrado em apenas uma amostra, mas isso pode ser considerado grave, pois ele não é permitido para a cultura de café, de acordo com a legislação brasileira.

Já os agrotóxicos tiametoxan e o triadimenol foram encontrados respectivamente em duas e quatro amostras, conforme mostra a tabela 16. As duas amostras contaminadas por tiametoxan apresentaram valores superiores ao LMR permitido para este agrotóxico. Para o triadimenol apenas uma amostra contaminada apresentou LMR superior ao permitido pela legislação brasileira.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO

Neste trabalho foi estudada a determinação de 159 resíduos de agrotóxicos em café, com o desenvolvimento de um novo método de análise usando extração Querches modificado e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. Dentre os agrotóxicos estudados, os compostos: 2,4D, amitraz, avermectina B1A, barban, benfuracarbe, carbossulfano, cimoxanil, ciromazina, clorpirifós metil, diclorprope, diclorvós, dissulfotona, espiroxamina, famoxadona, fipronil, flumetrina, forato, fosmete, imazalil, imidacloprido, iprodiona, isoxaflutol, metamidofós, metilssulfurom metil, mevinfós, oxifluorfem, parationa etílica, pimetrozina, piridato, pirifenox, pirimicarbe, terbufós, tiodicarbe etiofanato metílico, foram retirados do método por apresentar algum tipo de deficiência, como picos cromatográficos mal definido, CV% maior que 20 ou recuperações fora da faixa ideal de 70 a 120%.

O método desenvolvido para a determinação de 128 resíduos de agrotóxicos, demonstrou ser eficiente em todos os parâmetros de validação estudados. Os dados de recuperação e de precisão intermediária atenderam às recomendações da Comunidade Européia para resíduos de agrotóxicos explicitadas no Documento N° SANCO/10.684/2009 [31]. As recuperações ficaram na faixa de 70,7 a 108,8% e foram obtidos coeficientes de variação, em condições de precisão intermediária, menores do que 19,4%.

A sensibilidade variou bastante, os limites de quantificação variaram de 0,11 a 40,12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os limites de detecção variaram de 0,05 a 18,48 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os estudos de linearidade mostraram que a faixa ideal deve apresentar coeficientes de determinação maiores que $R^2 > 0,9922$.

Na comparação com os poucos trabalhos específicos para matriz café descritos na literatura, cabe destacar o estudo desenvolvido por Yang e colaboradores [3] para a determinação de 69 resíduos de agrotóxicos no café com um método utilizando GPC, combinado com extração SPE e análise por GC/MS. Já o método desenvolvido por este trabalho possibilitou a determinação de 128 agrotóxicos, listados na tabela 17.

Portanto, considerando-se os bons resultados obtidos com o método proposto neste trabalho, ele será usado na rotina de análises de quantificação multirresíduo de agrotóxicos em café do laboratório de pesticidas do LANAGRO-MG, nos programas oficiais de monitoramento desenvolvidos pelo MAPA.

Tabela 17. Analitos validados no método quantitativo.

01- 2,4,5-T	28- Clorpirifós	55- Fentoato	82- Monocrotofós	109- Quinalfós
02- 2,4-DB	29- Cresoxim metil	56- Fipronil sulfona	83- Monolinuron	110- Tebuconazol
03- 3-hidroxicarbofurano	30- Deltametrina	57- Fluasifope p-butílico	84- Nuarimol	111- Tebufempirade
04- Acetamiprido	31- Diazinona	58- Fludioxonil	85- Ometoato	112- Tebufenozida
05- Aldicarbe	32- Diclofluanida	59- Fluquinconazol	86- Oxadixil	113- TEPP
06- Aldicarbe sulfona	33- Diclorprope	60- Fluroxipir	87- Oxamil	114- Tiabendazol
07- Aldicarbe sulfóxido	34- Difenconazol	61- Flutriafol	88- Oxassulfurom	115- Tiacloprido
08- Aletrina	35- Diflubenzuron	62- Foransulfurom	89- Paclobutrazol	116- Tiametoxam
09- Azinfós etil	36- Dimetoato	63- Forato sulfóxido	90- Pencicuron	117-Tifensulfurom metil
10- Azinfós metil	37- Dinocape	64- Fosadona	91- Penconazol	118- Tiodicarbe
11- Azoxistrobina	38- Dinosebe	65- Furatiocarbe	92- Pendimetalina	119- Tolifluanida
12- Benalaxil	39- Dinoterbe	66- Hexaconazol	93- Picolinafen	120- Triadimefon
13- Benfuracarbe	40- Dissulfotona sulfona	67- Hexitiazoxi	94- Piraclostrobina	121- Triadimenol
14- Bentazona	41- Dissulfotona sulfóxido	68- Indoxacarbe	95- Pirazofós	122- Triassulfurom
15- BF 500-3	42- Etiona	69- Iprovalicarbe	96- Piridaben	123- Triazofós
16- Bifentrina	43- Etofumesato	70- Isoproturon	97- Pirimetanil	124- Triclorfon
17- Bitertanol	44- Etoprofós	71- Linuron	98- Pirimifós etil	125- Tridemorfe
18- Boscalida	45- Etoxissulfurom	72- Malationa	99- Pirimifós metil	126- Trifloxistrobina
19- Carbaril	46- Etrinifós	73- Metalaxil	100- Piriproxifen	127- Triflumizol
20- Carbendazim	47- Fenamidona	74- Metazaclor	101- Procloraz	128- Triforin
21- Carbofurano	48- Fenamifós	75- Meticonazol	102- Profam	
22- Ciazofamida	49- Fenamifós sulfona	76- Metidationa	103- Profenofós	
23- Cinidon etílico	50- Fenamifós sulfóxido	77- Metiocarbe	104- Propargito	
24- Ciproconazol	51- Fenarimol	78- Metiocarbe sulfóxido	105- Propiconazol	
25- Ciprodinil	52- Fenexamida	79- Metissulfurom metil	106- Propizamida	
26- Clorfenvinfós	53- Fenpropimorfe	80- Metomil	107- Propoxur	
27- Cloroxuron	54- Fentiona sulfóxido	81- Miclobutanil	108- Prossulfurom	

REFERÊNCIAS

1. Chanakya, H.N. e de Alwis, A.A.P. (2004). "Environmental issues and management in primary coffee processing." *Process Safety e Environmental Protection* Trans I Chem E, Vol 82, N° B4, pp 291-300.
2. "Provisional exports by exporting countries to all destinations (may to october 2011)." Disponível em: <www.ico.org/prices/m1.htm>. Acesso em dezembro de 2011.
3. Yang, X.; Wang J.; Xu, D.C.; Qiu, J.W.; Ma, Y.; Cui, J. (2011). "Simultaneous Determination of 69 Pesticide Residues in Coffee by Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *Food Analytical Methods* , Vol 4, N°2, pp 186-195.
4. Garambone, E. e Rosa, G. (2007). Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. *Alimentos Nutrição*, Vol 18, N°2, pp 229-235.
5. Andaló, V.; Moino Jr, A.; Santa-Cecília, L.V.C. e Souza, G.C. (2004). "Compatibility of Beauveria bassiana with chemical pesticides for the control of the coffee root mealybug *Dysmicoccus texensis* tinsley (Hemiptera : Pseudococcidae)." *Neotropical Entomology* ,Vol 33, N°4, pp 463-467.
6. Matthews, G.; Wiles, T.; Baleguel, P. (2003). "A survey of pesticide application in Cameroon." *Crop Protection*. Vol 22, N°5, pp 707-714.
7. Jacobson, L.S.V.; Hacon, S.S.; Alvarenga, L.; Goldstein, R.A.; Gums, C.; Buss, D.F.; Leda, L. R. (2009). "Pomeranian community and the use of pesticides: an unknown reality." *Ciência & Saúde Coletiva*. Vol 14, N°6, pp 2239-2249.
8. Rama, D. B. K. e Jaga, K. (1992). " Pesticide exposure and cholinesterase levels among farm-workers in the republic-of-South-Africa." *Science of the Total Environment*, Vol 122, N°3, pp 315-319.
9. Chung, S.W.C. e Chan, B.T.P. (2010). "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*, Vol 1217, N° 29, pp 4815-4824.
10. Capobianco, H. L.V. e Cardeal, Z. L. (2005). "A Solid-Phase Microextraction method for the chromatographic determination of organophosphorus pesticides in fish, water, potatoes, guava and coffee." *Journal of Brazilian Chemical Society*, Vol 16, N°5, pp 907-914.
11. Lacorte, S.; Vreuls J. J.; Salau, J. S.; Ventura, F.; Barceló, D. (1998). "Monitoring of pesticides in river water using fully automated on-line solid-pase extraction and liquid chromatography with diode array detection with a novel filtration device". *Journal of Chromatography A*, Vol 795, No1, pp 71-82.

12. Oh-Shin, Y.S.; Koa, M.; Shinb, H. S. (1997). "Simultaneous quantification of insecticides including carbaryl in drinking water by gas chromatography using dual electron-capture and nitrogen-phosphorus detection." *Journal of Chromatography A*, Vol 769, No2, pp 285-291.
13. Robinson, D. E. e Mansingh, A. (1999). "Insecticide contamination of Jamaican environment. IV. Transport of residues from coffee plantations in the blue mountains to coastal waters in eastern Jamaica." *Environmental Monitoring and Assessment*, Vol 54, No2, pp 125-141.
14. Casarett e Doull's (2001). Toxicology: The Basic Science of Poisons. *McGraw-Hill*, New York, pp 763-784.
15. Fuller, B.H. e Berger, G.M.B. (1990). "Automation of serum cholinesterase assay-paediatric and adult reference ranges." *Air Medical Journal*, Vol 78, pp 577-580.
16. Ellis-Tabanor, M. e Hyslop, E. (2005). "Effect of sublethal concentrations of endosulfan on growth and fecundity of two species of snails." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 74, N^o6, pp 1173-1178.
17. Garcia Estrada, C.; Damon, A.; Hernández, C.S.; Pinto, L.S.; Núñez, G.I. (2006). "Bat diversity in montane rainforest and shaded coffee under different management regimes in southeastern Chiapas, Mexico." *Biological Conservation*. Vol 132, N^o3, pp 351-361.
18. Kamrim, M.A. (1997). PESTICIDES PROFILES: Toxicity, Environmental Impacts, and Fate. *Lewis Publishers*. Boca Raton, New York, 676p.
19. Souza, A. G.; Amorin, L.C.A.; Cardeal, Z.L. (2010). "Studies of the Analysis of Pesticide Degradation in Environmental Samples." *Current Analytical Chemistry*, Vol 6, N^o3, pp 237-248.
20. Jeannot, M. A. e Cantwell, F. F. (1996). "Solvent Microextraction into a Single Drop." *Analytical Chemistry*, Vol 68, pp 2236-2240.
21. Zhang, Z.; Yang, M. ; Pawliszyn, J. (1994). "Solid Phase Microextraction integrates sampling, extraction, concentration and sample introduction into a single step." *Analytical Chemistry*, Vol 66, pp 844-853.
22. Cardeal, Z. L.; Rabelo C.; Silva, F. C. (1999). "Determination of organophosphorus pesticides in water using SPME-GC-MS." *Química Nova*, Vol 22, N^o2, pp 197-200.
23. Lehotay, S. J.; Michelangelo, A.; Ronald, M. (2010). "The QuEChERS Revolution." *LC GC Europe*, Vol 23, N^o8, pp 418.

24. "The Drinking Water Directive (DWD), Council Directive 98/83/EC". Disponível em: <ec.europa.eu/environment/water>. Acesso em dezembro de 2011.
25. Pinto, G M F e Jardim, I C S F (2000). "Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method." *Journal Chromatography A*, Vol 869, No1-2, pp 463-469.
26. López-Blanco, M.C.; Blanco-Cid, S.; Cancho-Grande, J.; Simal-Gándara, J. (2003). "Application of single-drop microextraction and comparison with solid-phase microextraction and solid-phase extraction for the determination of α - and β -endosulfan in water samples by gas chromatography–electron-capture detection." *Journal Chromatography A*, Vol 984, N^o2, pp 245-252.
27. López-Blanco, M.C; Reboreda-Rodríguez, B.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. (2002). "Optimization of solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the determination of α - and β -endosulfan in water by gas chromatography–electron-capture detection." *Journal Chromatography A*, Vol 976, No1-2, pp 293-299.
28. Diez-Rodríguez, G.I. ; De Baptista, G.C.; Trevizani, L.R.P.; Haddad, M.L.; Nava, D.E. (2006). "Residues of thiamethoxam, aldicarb and its metabolites in coffee leaves and effect on the control of *Leucoptera coffeella* (Guerin-Meneville) (Lepidoptera : Lyonetiidae)." *Neotropical Entomology Crop Protection*, Vol 35, N^o3, pp 257-263.
29. Stanciu, G.; Dobrinas, S.; Birghila, S.; Popescu, M. (2008). "Determination of organic compounds from different types of coffee by HPLC and GC-ECD analysis." *Environmental Engineering and Management Jobs*, Vol 7, N^o6, pp 661-666.
30. EU MRLs pesticides. Disponível em <ec.europa.eu/sanco_pesticides>. Acesso em dezembro de 2012.
31. European Commission, Document n^o SANCO/10684/2009 (2010). "Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed": Bruxelas, 01 Jan 2010. 40p.
32. MAPA, (2010). Instrução Normativa n^o 26 de 08 de Outubro de 2010. Diário Oficial da União.
33. Codex Alimentarius ; Pesticide Residuos in Food. Maximum Residue Limits. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp>. Acesso em : 25/08/2011.
34. União Europeia. Food Safety – From de farm to the Fork. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/database_pesticide_en.htm>. Acesso em: 25/08/2010.

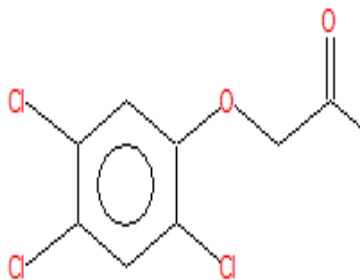
35. The Japan Food Chemical Research Foundation. The Japanese Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Foods. Disponível em: <<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/MRLs-p>>. Acesso em 25/08/2010.
36. United States Environmental Protection Agency (EPA). Index to Pesticide Chemical Names, Part 180 Tolerance Information, and Food and Feed Commodities. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/regulating/tolerances-commodity.pdf>>. Acesso em 25/08/2010.
37. Korea & drug administration. Disponível em: <<http://eng.kfda.go.kr/file/PesticideMRLs.pdf>>. Acesso em 25/08/2010.
38. 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.
39. Kovalczuk, T.L.O.; Jech, M.; Poustka, J.; Hajsilova, J. (2008). "Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)". *Food Additives and Contaminants*, Vol 25, No4, pp 444-457.
40. EURACHEM(1998).The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 61p.
41. Commission, E. (2002). 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 O.J.o.t.E. Communities, Editor. Bruxelas.
42. Ardrey, R.E. (2003). Liquid Chromatography -Mass Spectrometry: An Introduction. West Sussex: *John Wiley & Sons, Ltd*, pp. 269p .
43. INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial(2010). Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008. 3 rev. Rio de Janeiro. pp 20 p.
44. Standardizations, I IOf, ISO 5725-2 (1994). 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. pp. 42p.
45. Oliveira, E. (2008) . Anais - Comparação das Diferentes Técnicas para a Exclusão de “Outliers”. In: ENQUALAB - Congresso da Qualidade em Metrologia. Rede Metrológica do Estado de São Paulo - REMESP, Brasil.

46. 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>. Acesso em: 05 fev 2011.
47. Brito, N. M.; Amarante Junior, O. P.; Polese, L.; Ribeiro, M. L. (2003). Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Vol 13, pp 129-146.
48. Horwitz, W. (1982). Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Analy. Chem.*, Vol 54, pp 67A-76A,.

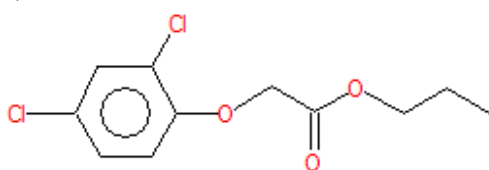
APÊNDICE

Apêndice 1. Fórmula estruturais dos agrotóxicos presentes na Tabela 4.

2,4,5-T



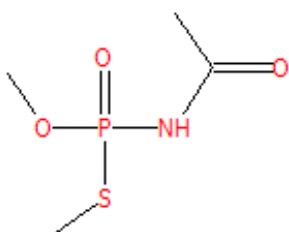
2,4-DB



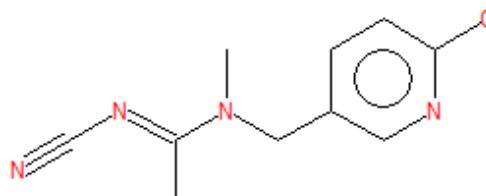
3-hidroxicarbofurano



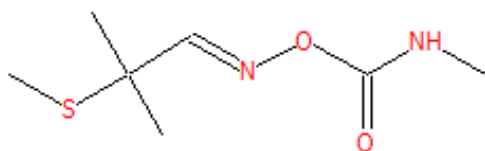
Acefato



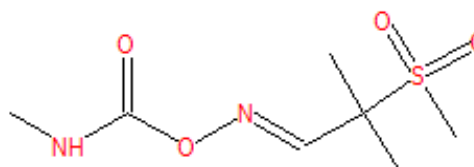
Acetamiprido



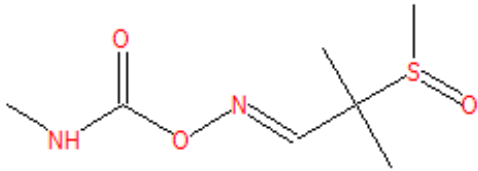
Aldicarbe



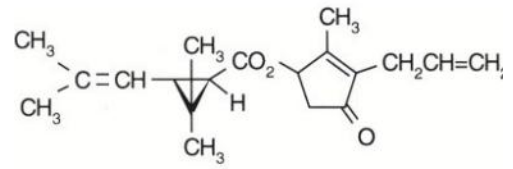
Aldicarbe sulfona



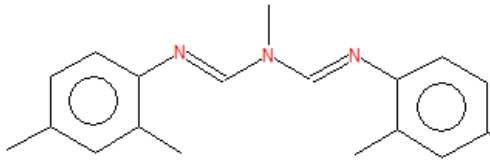
Aldicarbe sulfóxido



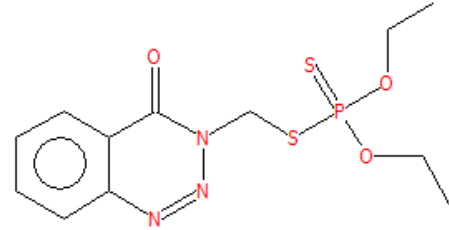
Aletrina



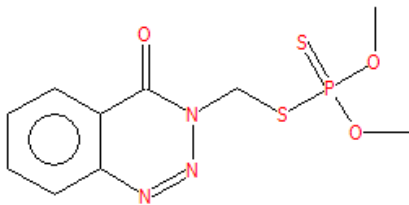
Amitraz



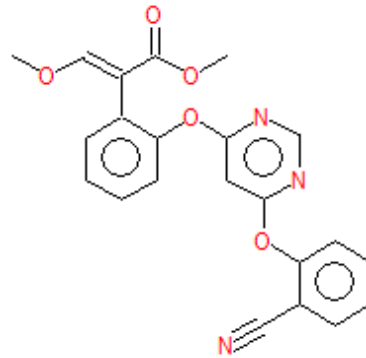
Azinfós etil



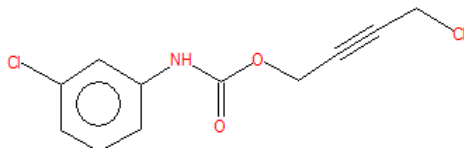
Azinfós metil



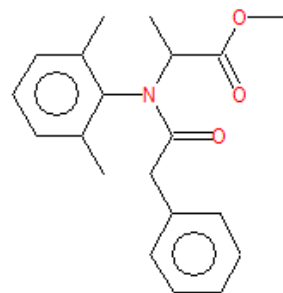
Azoxistrobina



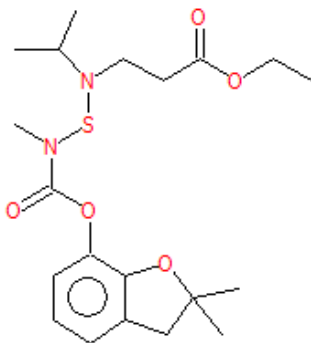
Barban



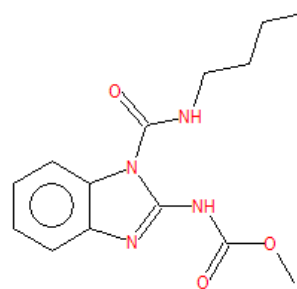
Benalaxil



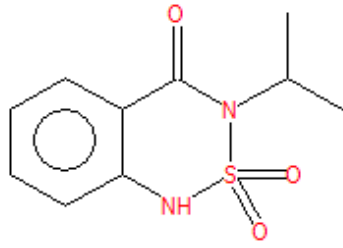
Benfuracarbe



Benomil

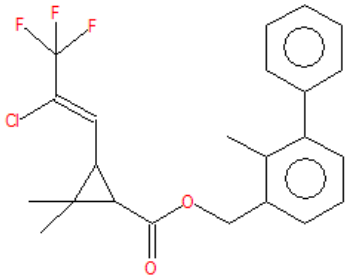


Bentazona

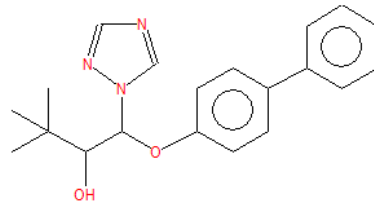


BF 500-3

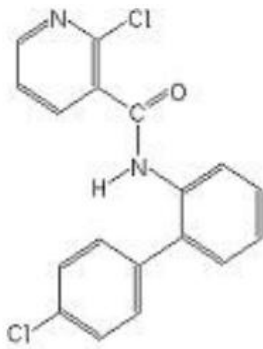
Bifentrina



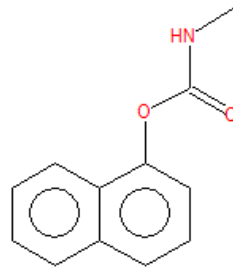
Bitertanol



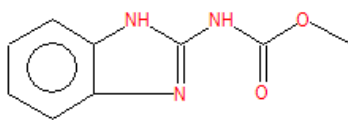
Boscalida



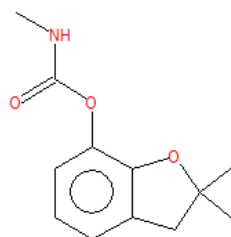
Carbaril



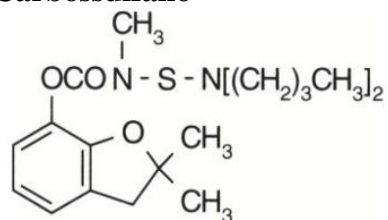
Carbendazim



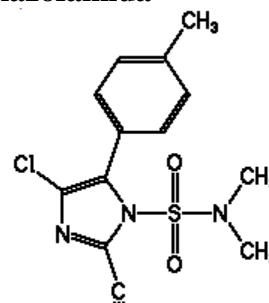
Carbofurano



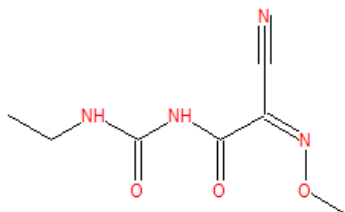
Carbossulfano



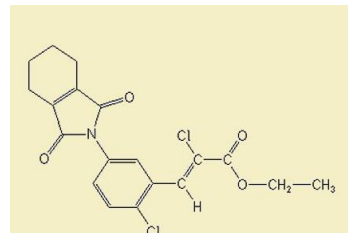
Ciazofamida



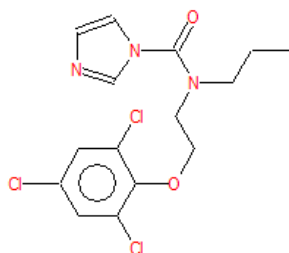
Cimoxanil



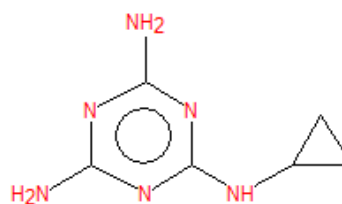
Cinidon etílico



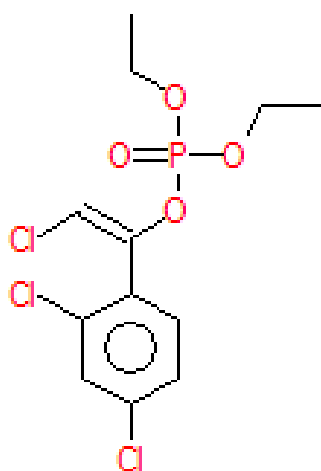
Ciproconazol



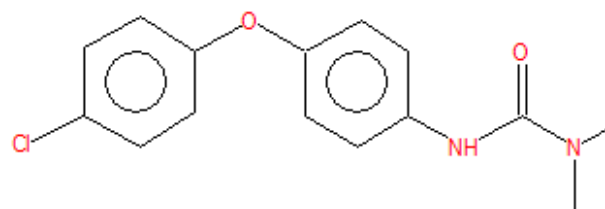
Ciromazina



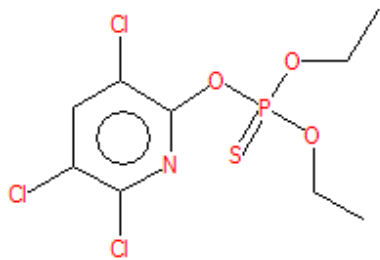
Clorfenvinfós



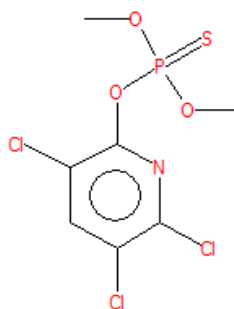
Cloroxuron



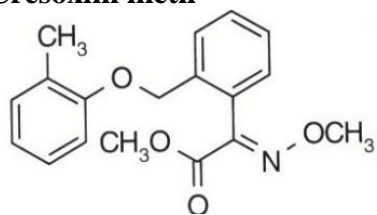
Clorpirifós



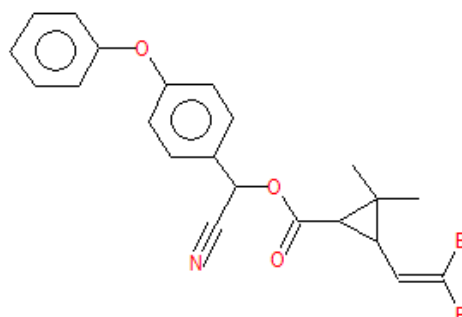
Clorpirifós metil



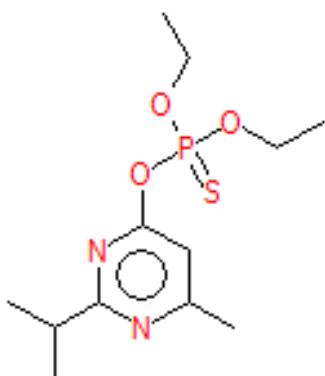
Cresoxim metil



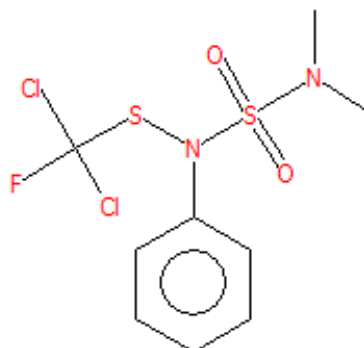
Deltametrina



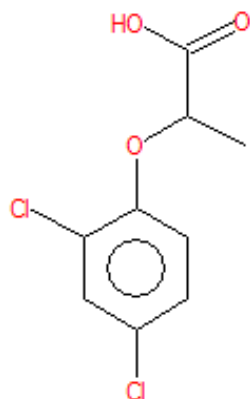
Diazinona



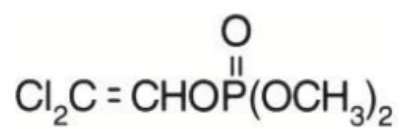
Diclofluanida



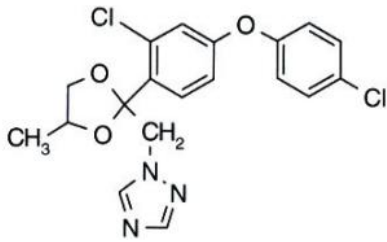
Diclorprope



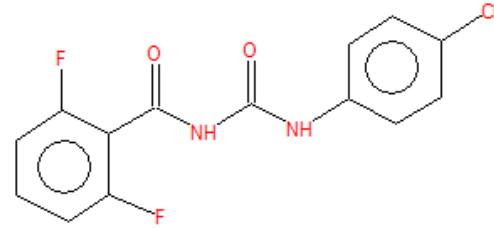
Diclorvós



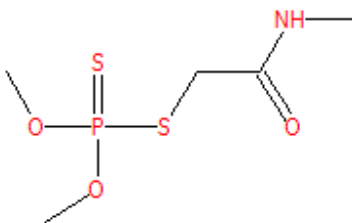
Difenoconazol



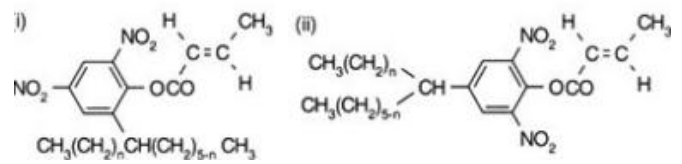
Diflubenzuron



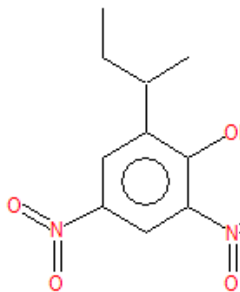
Dimetoato



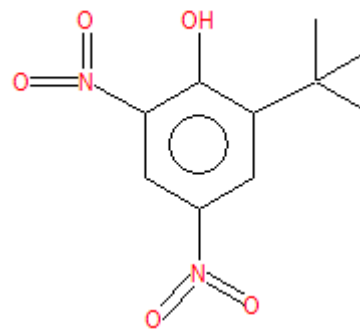
Dinocape



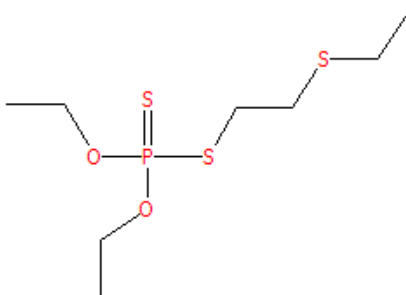
Dinosebe



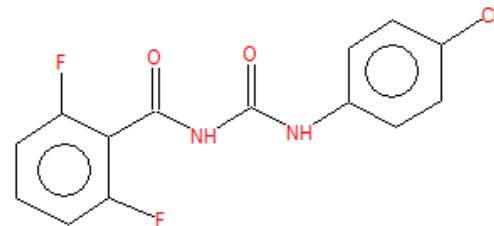
Dinoterbe



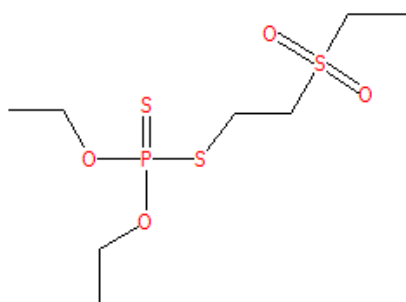
Dissulfotona



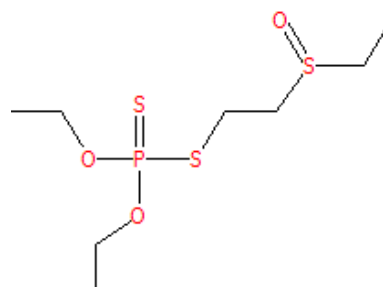
Diflubenzuron



Dissulfotona sulfona

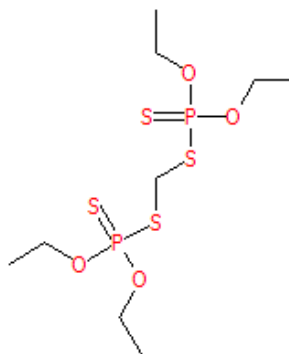


Dissulfotona sulfóxido

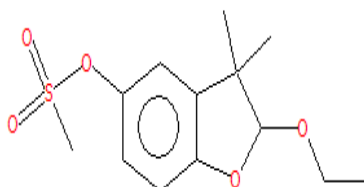


Espiroxamina

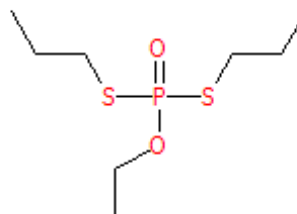
Etiona



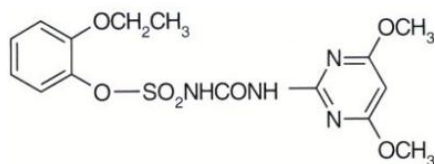
Etofumesato



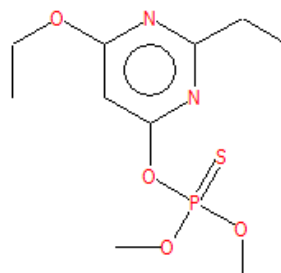
Etroprofós



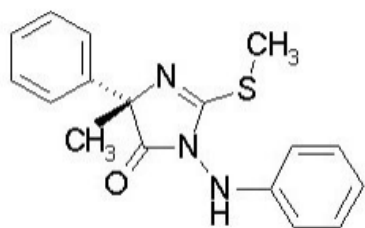
Etoxissulfurom



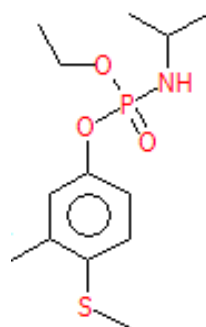
Etrinfós



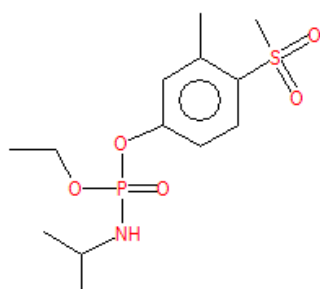
Fenamidona



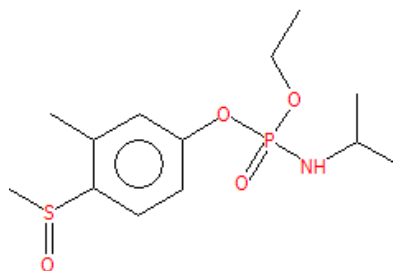
Fenamifós



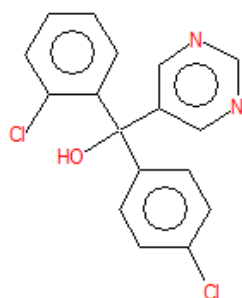
Fenamifós sulfona



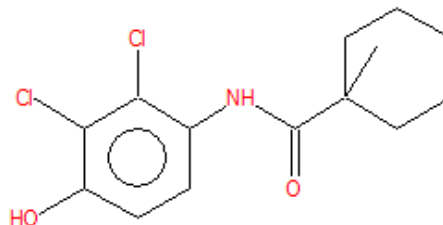
Fenamifós sulfóxido



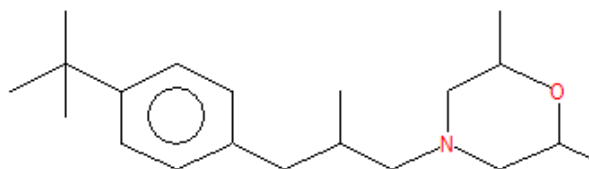
Fenarimol



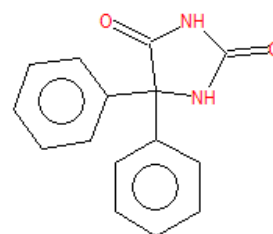
Fenexamida



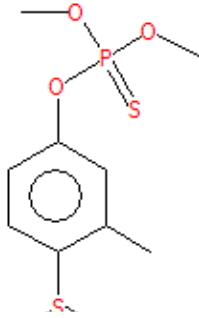
Fenpropimorfe



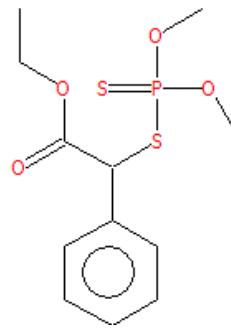
Fentiona



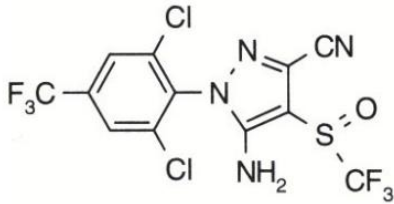
Fentiona Sulfóxido



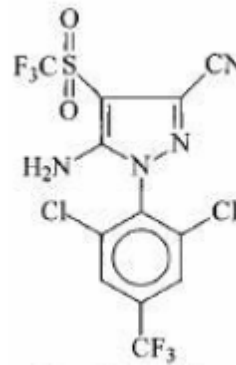
Fentoato



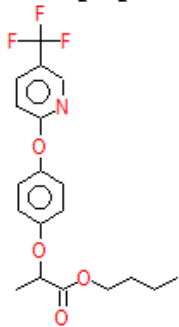
Fipronil



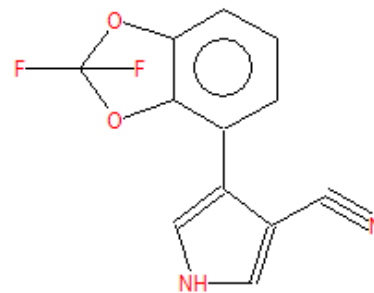
Fipronil sulfona



Fluasifope p-butílico



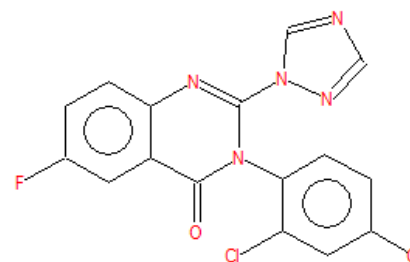
Fludioxonil



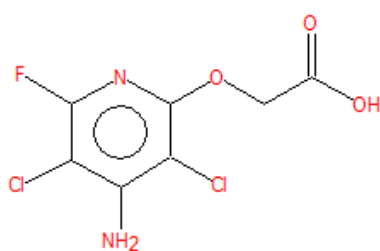
Flumetrina



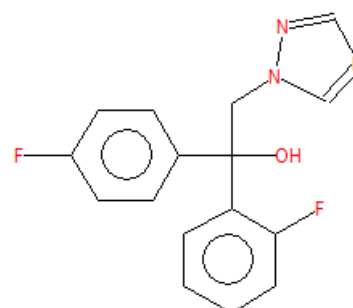
Fluquinconazol



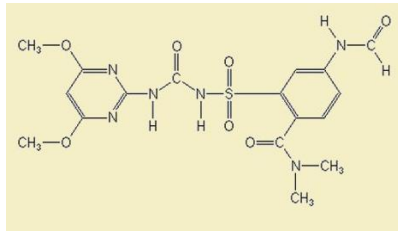
Fluroxipir



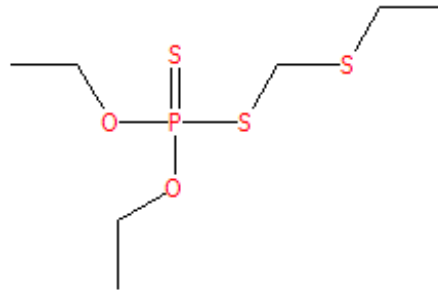
Flutriafol



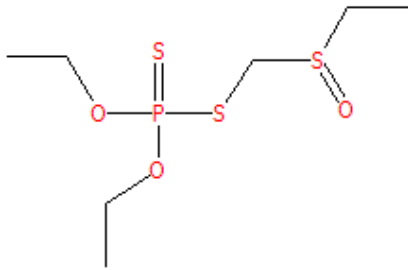
Foransulfuron



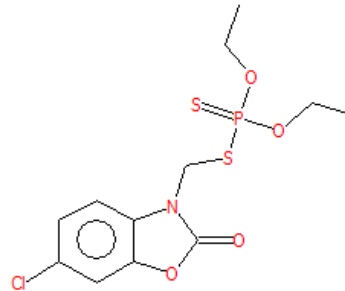
Forato



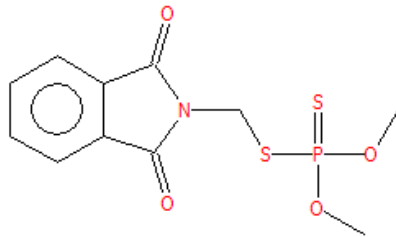
Forato sulfóxido



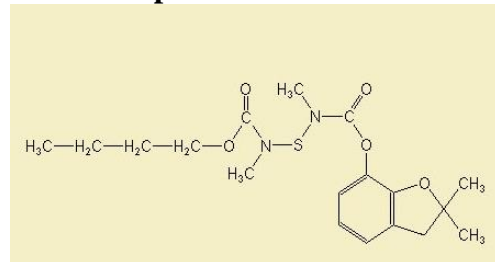
Fosalona



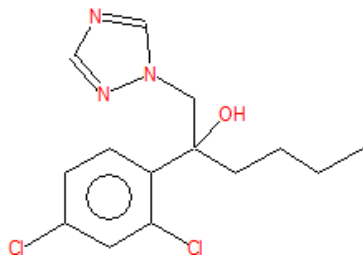
Fosmete



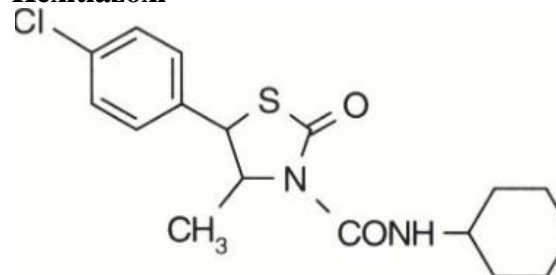
Furatiocarpe



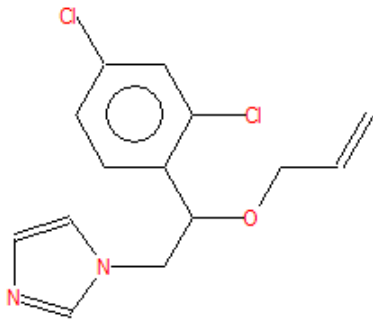
Hexaconazol



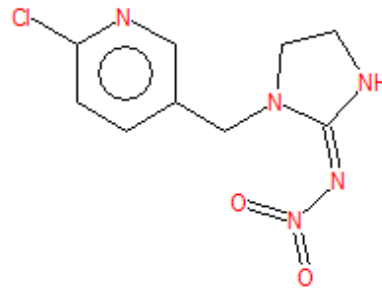
Hexitiazoxi



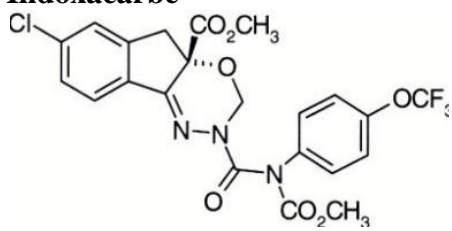
Imazalil



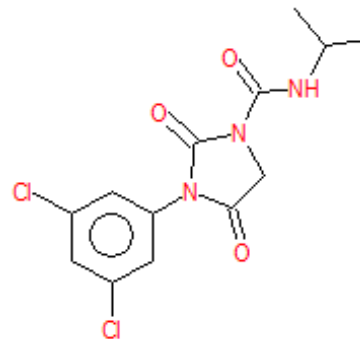
Imidacloprido



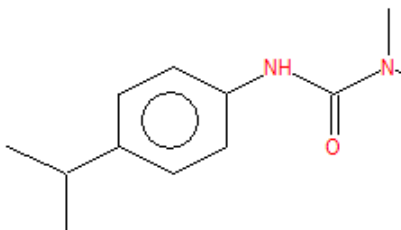
Indoxacarbe



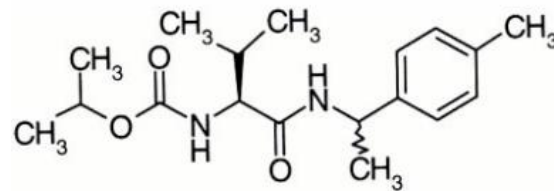
Iprodiona



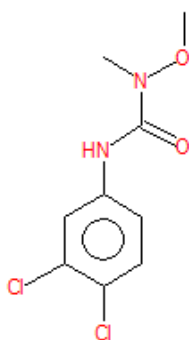
Isoproturon



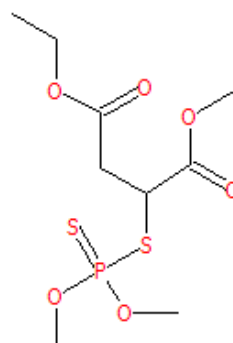
Isoxaflutol



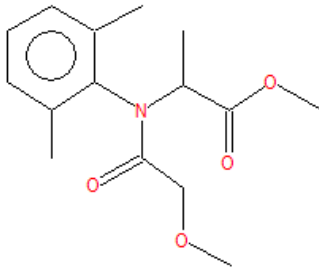
Linuron



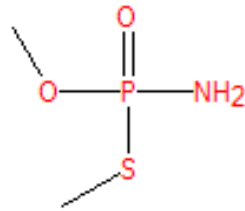
Malationa



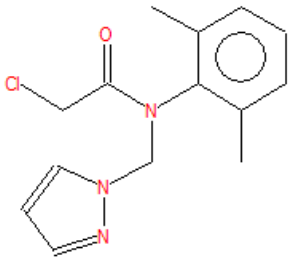
Metalaxil



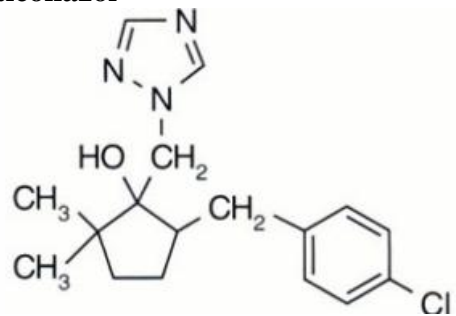
Metamidofós



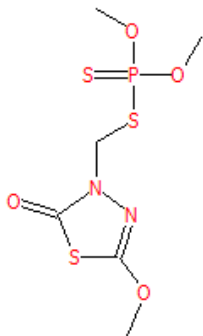
Metazaclor



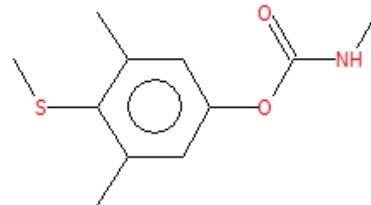
Meticonazol



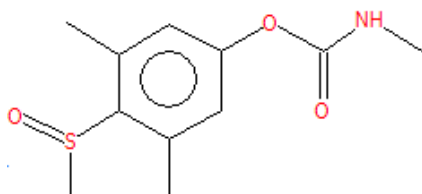
Metidationa



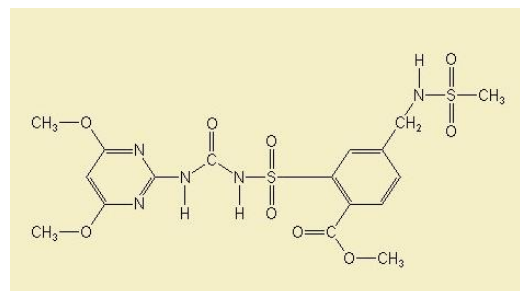
Metiocarpe



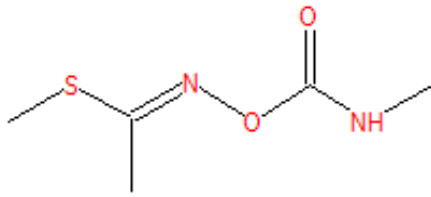
Metiocarpe sulfóxido



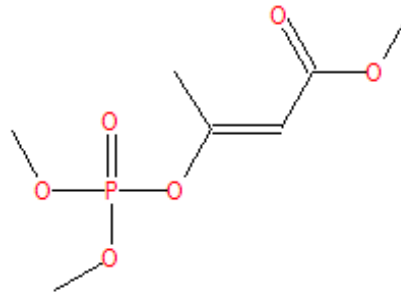
Metissulfuron metil



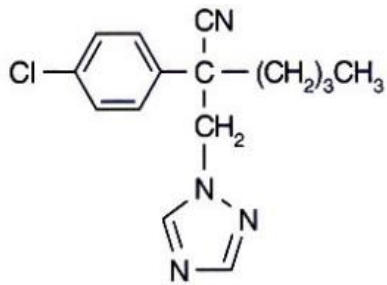
Metomil



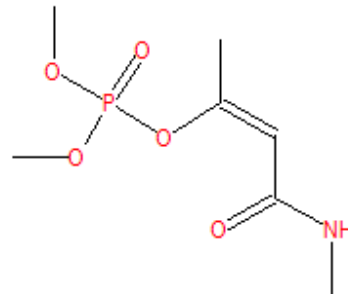
Mevinfós



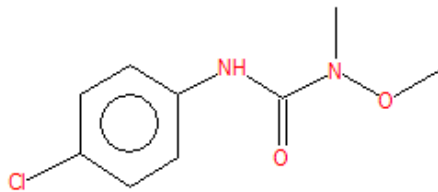
Miclobutanil



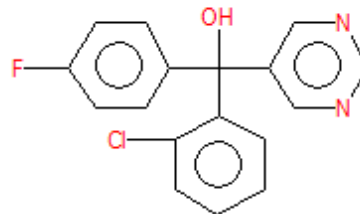
Monocrotofós



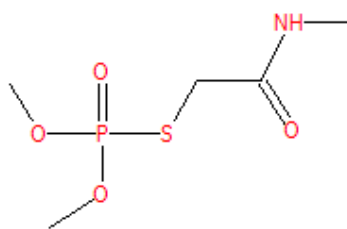
Monolinuron



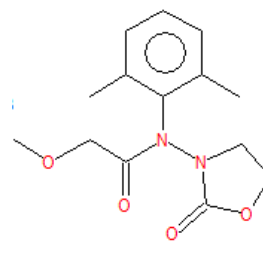
Nuarimol



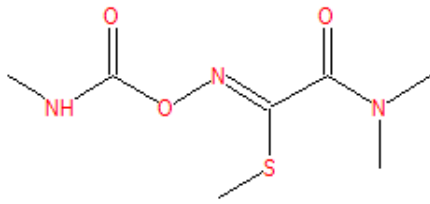
Ometoato



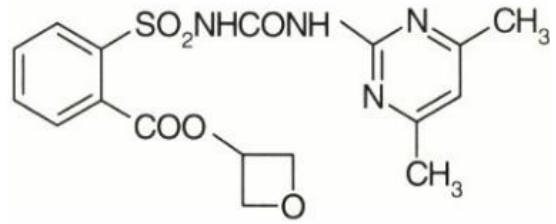
Oxadixil



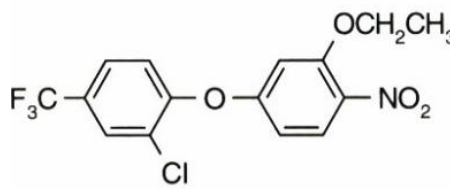
Oxamil



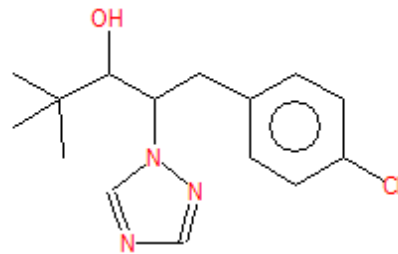
Oxassulfurom



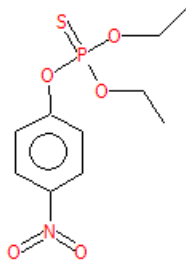
Oxifluorfem



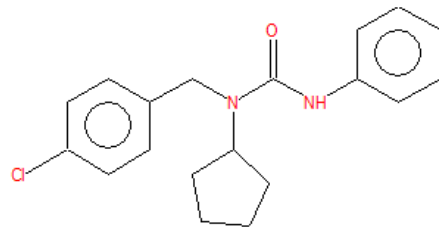
Paclobutrazol



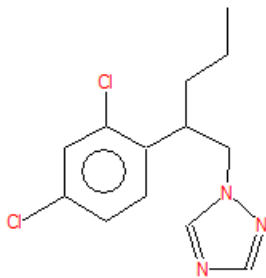
Parationa etlica



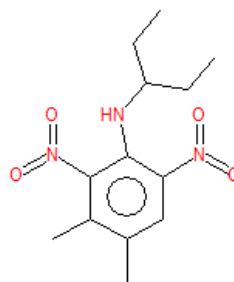
Pencicuron



Penconazol

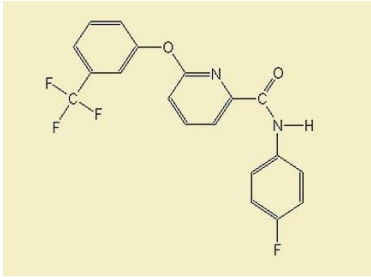


Pendimetalina

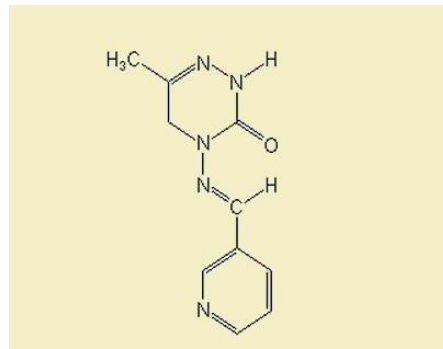


1

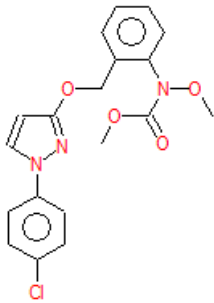
Picolinafen



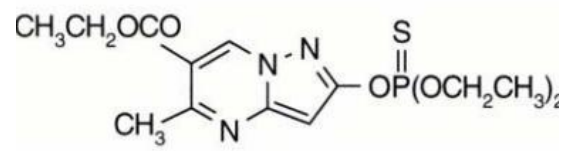
Pimetrozina



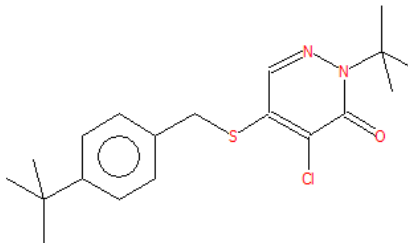
Piraclostrobina



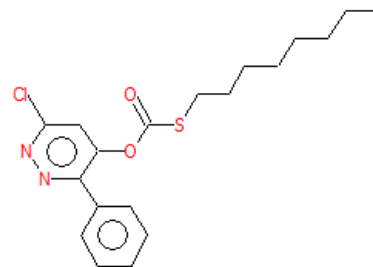
Pirazofós



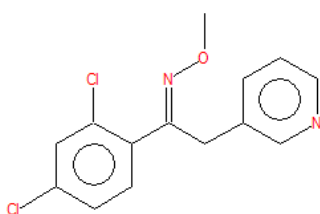
Piradabem



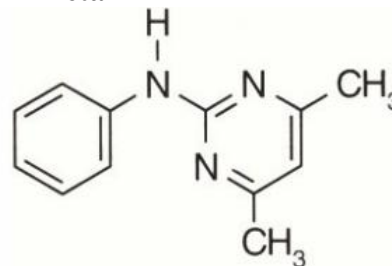
Piridato



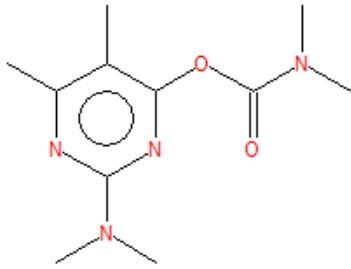
Pirifenox



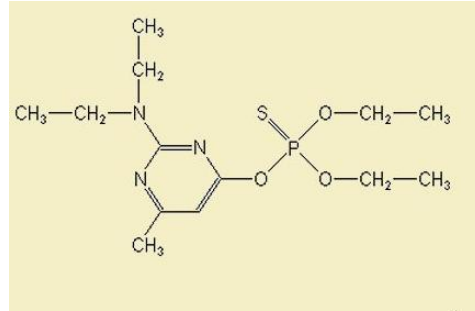
Pirimetanil



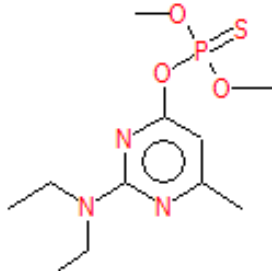
Pirimicarbe



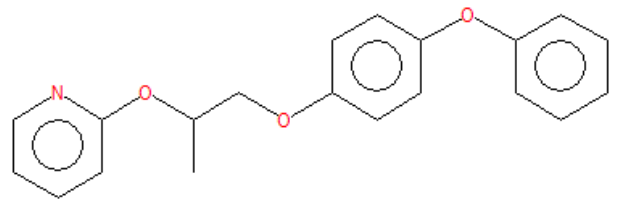
Pirimifós etil



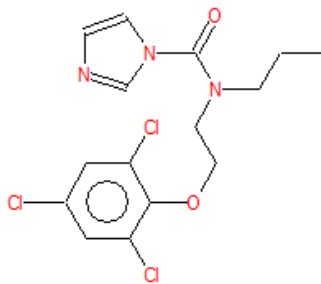
Pirimifós metil



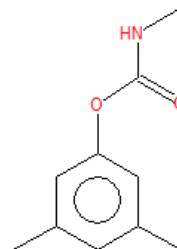
Piriproxifen



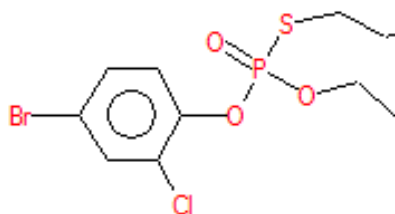
Procloraz



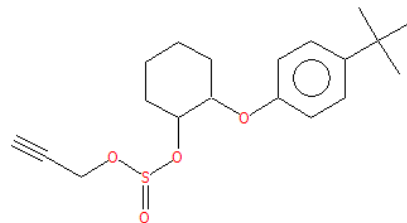
Profam



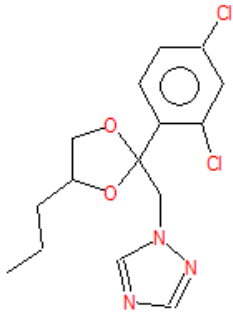
Profenofós



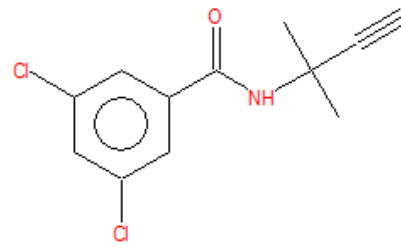
Propargito



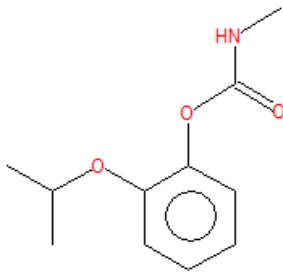
Propiconazol



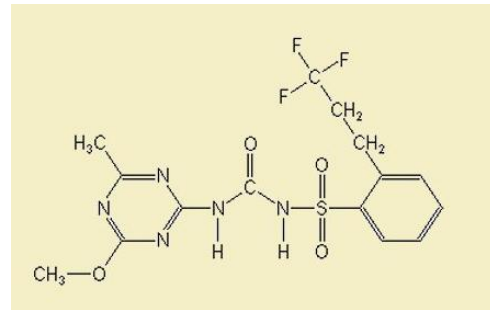
Propizamida



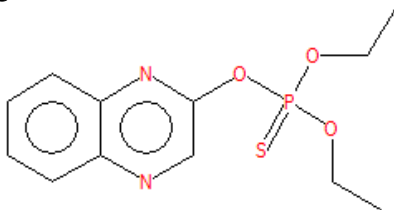
Propoxur



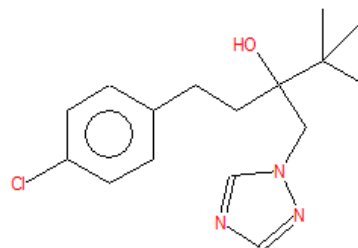
Prossulfuron



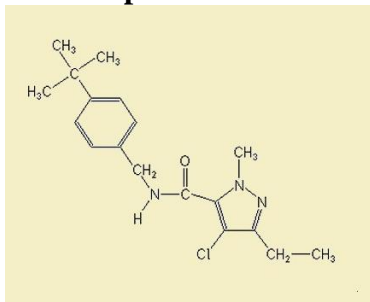
Quinalfós



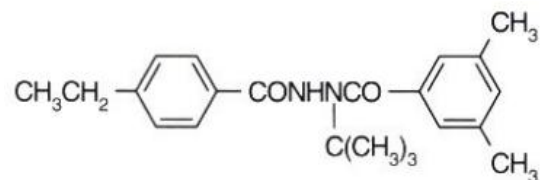
Tebuconazol



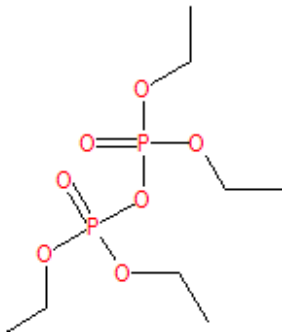
Tebufempirade



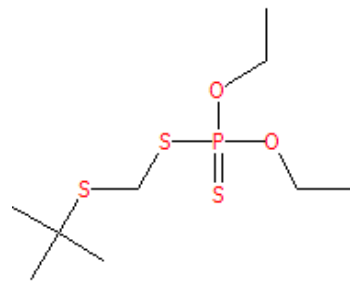
Tebufenozida



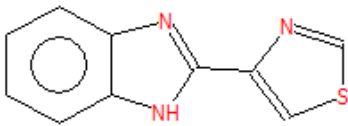
TEPP



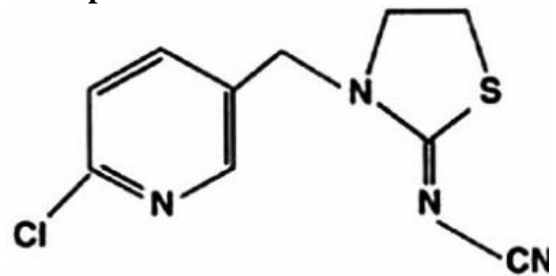
Terbufós



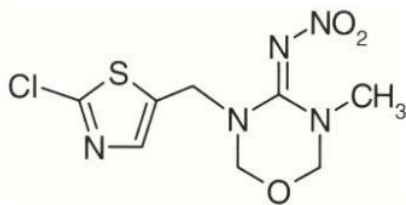
Tiabendazol



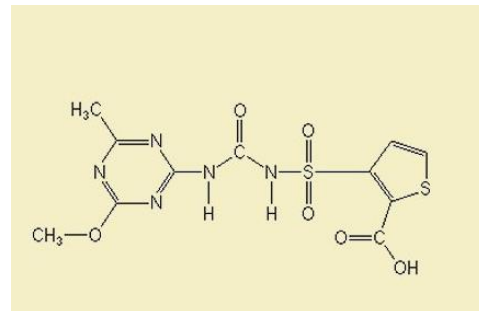
Tiacloprido



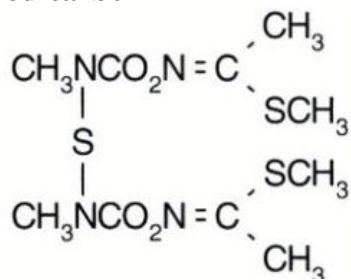
Tiametoxan



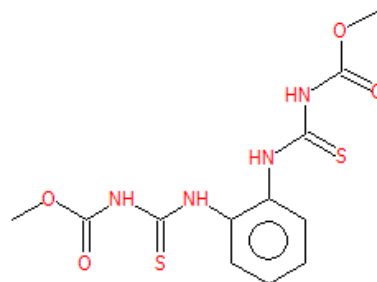
Tifensulfuron metil



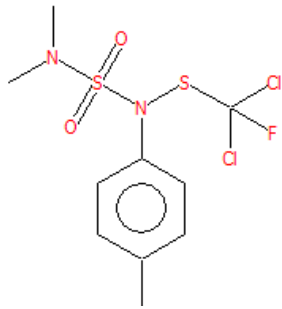
Tiodicarbe



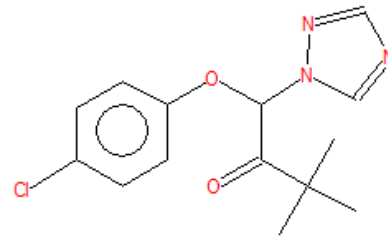
Tiofanato metílico



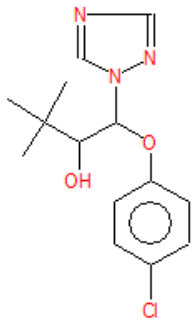
Tolifluanida



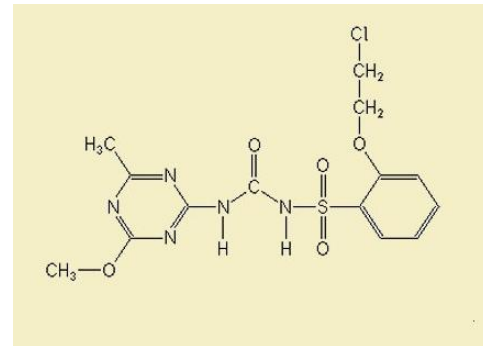
Triadimefon



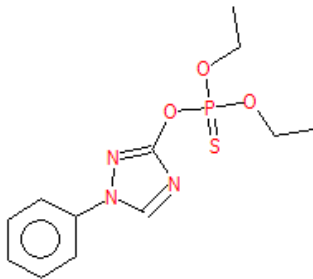
Triadimenol



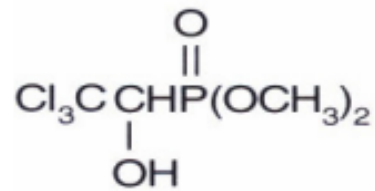
Triassulfurom



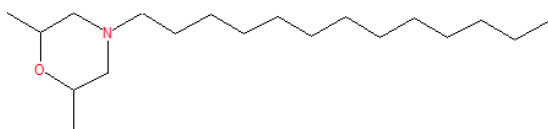
Triazofós



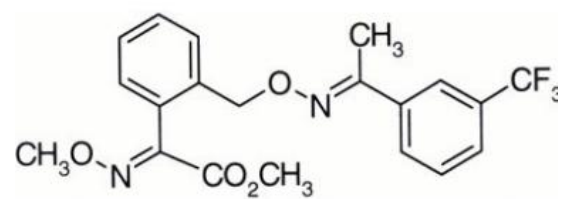
Triclorfon



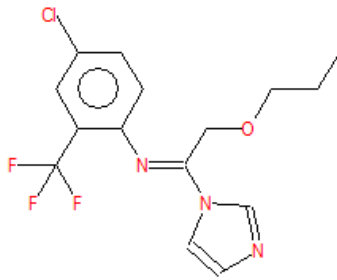
Tridemorfe



Trifloxistrobina



Triflumizol



Triforin

