UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Herliana Damelys Flores Abreu

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM TABACO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

Santa Maria - RS, Brasil
2022

Herliana Damelys Flores Abreu

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM TABACO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de pós-graduação em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella
Co-Orientadora: Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime

Santa Maria, RS, Brasil
2022

Herliana Damelys Flores Abreu

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM TABACO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de pós-graduação em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

Aprovada em 27 de maio de 2022

Renato Zanella, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Gabrieli Bernardi, Dra. (UFSC)

Guilherme Post Sabin, Dr. (Unicamp)

Jean Lucas de Oliveira Arias, Dr. (FURG)

Filipe Fagan Donato, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS, Brasil
2022

Dedico esta tese doutoral a todas as pessoas que fizeram parte da minha caminhada, especialmente à minha família pelo carinho e palavras de apoio e a meu melhor amigo J.G. Perez pelos abraços que me mantiveram em pé.

"O poder reside onde o homem acredita que reside"
Game of Thrones, Lord Varys.

AGRADECIMENTOS

Quero começar por agradecer ao CNPq pelo auxílio financeiro, à UFSM e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM que contribuíram com a minha formação, em especial aos professores do LARP, Dr. Renato Zanella, Dra. Martha Bohrer Adaime e Dr. Osmar D. Prestes pela oportunidade de fazer parte do grupo, pelas orientações e ensinamentos.

A minha Alma Mater, a Universidad Central de Venezuela e todos os professores e colegas que contribuíram com os sólidos conhecimentos em química que tem me formado, em especial o Dr. José Daniel Martinez que me encorajou a vir ao Brasil. A UFRR e professores, pelos ensinamentos profissionais e de vida, obrigada Dr. Pedro R.E Ribeiro e Dr. Habdel Nasser pelo calor e qualidade humana.

A todos os colegas do LARP obrigada pela parceria; pela amizade, preocupação e paciência obrigada Larissa, Állisson, Luana, Karolaine. Obrigada pelos ensinamentos Julia, Lucila, Dani, Roberta, Henrique e tantos outros...

Agradeço à minha família, aos meus pais Ana Rosa e Hermes pelo amor incondicional e o apoio. A minhas tias, em especial Carmen sempre exemplo de trabalho, empenho e calor humano. Meus primos e em especial a Maridyl por ser sempre minha confidente e Claudimar por escutar infinitas horas de áudios. A meu padrinho Fuad pelos conselhos. A meu namorado Guille por sempre me apoiar, entender, escutar, encorajar e por secar minhas lágrimas. A Migraidh pelo acompanhamento psicológico.

Agradeço também aos funcionários do PPGQ-UFSM, Ademir e Miguel, sempre prestativos e atenciosos com os alunos.

Obrigada Brasil por me acolher, e aos brasileiros, amigos gentis, bondosos e sempre dispostos a dar uma mão amiga, que me demonstraram que um mundo melhor é possível. Obrigada a todas as pessoas que fizeram parte da minha caminhada.

RESUMO

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM TABACO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

Autora: Herliana Damelys Flores Abreu

Orientador: Renato Zanella

O tabaco é o cultivo não alimentar mais difundido no mundo, onde uma ampla variedade de substâncias é usada durante e após seu cultivo para proteção de pragas, doenças e regular o crescimento. Sendo assim se faz necessário o monitoramento dos resíduos destes agrotóxicos no tabaco a fim de garantir a segurança dos produtos de consumo fabricados com ele. No entanto a matriz da amostra contém abundante quantidade e variedade de coextrativos como açúcares, ceras, resinas, ácidos etc., exigindo uma etapa de preparo de amostra capaz de reduzir a presença destas substâncias que podem interferir na análise dos compostos de interesse. Neste trabalho foram avaliadas diferentes modificações do método QuEChERS, uma etapa de precipitação por baixa temperatura e diferentes sorventes para limpeza de extrato de tabaco, incluindo sorventes para d-SPE como quitosana, fase fluorada, Florisil®, Z-Sep+, EMR-lipid, C_{18}, PSA, GCB, MWCNTs-OH, MWCNTs-COOH e cartuchos para SPE PSA/GCB, LC-NH_2 e Captiva EMR-lipid. O método estabelecido e validado neste trabalho, consistiu em uma extração empregando QuEChERS citrato, seguida de 1 h de freezer (-25 a -18 °C), e posterior limpeza do extrato por extração em fase sólida dispersiva com 150 mg $MgSO_4$ + 10 mg MWCNTs-OH, diluição de 5 vezes do extrato final com água ultrapura, filtração e análise por UHPLC-MS/MS. Os resultados da validação foram satisfatórios conseguindo recuperações entre 70 e 120% e RSDs ≤ 20% para 74 compostos presentes no guia CORESTA de 2021. As curvas foram preparadas no extrato da matriz devido à presença de efeito matriz significativo para a maioria dos analitos. Os valores de LOD e LOQ, apesar da complexidade da matriz, variaram entre 0,007-0,045 e 0,025-0,15 mg kg^{-1}, respetivamente. O método proposto mostrou-se adequado para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em tabaco, detectando 9 dos 74 compostos validados nas amostras reais analisadas.

Palavras-chave: preparo de amostra, MWCNTs, tabaco, cromatografia, agrotóxicos

ABSTRACT

MULTIRESIDE DETERMINATION OF PESTICIDES IN TOBACCO USING MODIFIED QuEChERS METHOD AND UHPLC-MS/MS

Author: Herliana Damelys Flores Abreu

Advisor: Renato Zanella

Tobacco is the most widely grown non-food crop in the world, a wide variety of substances are used in it during and after its cultivation to protect it from pests, diseases and regulate its growth. Therefore, it is necessary to monitor the residues of these pesticides in tobacco in order to guarantee the safety of consumer products manufactured with it. However, the sample matrix contains an abundant amount and variety of sugars, waxes, resins, acids, etc., requiring a sample preparation step capable of reducing the presence of these substances that can interfere with the analysis of the compounds of interest. In this work, different modifications of the QuEChERS method, a low temperature precipitation step and different sorbents for cleaning tobacco extract were evaluated, including d-SPE sorbents like chitosan, fluorinated phase, Florisil®, Z-Sep+, EMR-lipid, C_{18}, PSA, GCB, MWCNTs-OH, MWCNTs-COOH and SPE cartridge like PSA/GCB, LC-NH_2 and Captiva EMR-lipid. The method established and validated in this work consisted of an extraction of QuEChERS citrate, followed by 1 h of freezer (-25 to -18 °C), cleaning of the extract by d-SPE with 150 mg $MgSO_4$ + 10 mg MWCNTs-OH and finally a 5 times dilution with water and filtration of the final extract for analysis by UHPLC-MS/MS. The validation results were satisfactory, achieving recoveries between 70 and 120% and RSDs ≤ 20% for 74 compounds present in the CORESTA of 2021. The curves were prepared in the matrix extract due to the presence of a significant matrix effect for most analytes. LOD and LOQ values, despite the matrix complexity, were between 0.007-0.045 and 0.025-0.15 mg kg^{-1} respectively. The proposed method proved to be adequate for the multiresidue determination of pesticides in tobacco, achieving the detection of 9 of the 74 pesticides validated during the analyses of the real samples, this is two herbicides, five fungicides and two insecticides.

Keywords: sample preparation, MWCNTs, tobacco, chromatography, pesticides

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 - Esquema geral do método QuEChERS..... 27
Figura 2 - Diagrama esquemático de nanotubo de carbono de parede múltipla modificado com grupos hidroxila (MWCNT-OH)..... 32
Figura 3 - Cromatograma de íon total obtido por UHPLC-MS/MS a partir de soluções preparadas no extrato da matriz de tabaco na concentração de 25 µg L^{-1}..... 77
Figura 4 - A: Aparência dos extratos obtidos após realização das etapas de extração empregando os métodos QuEChERS original modificado com 5% ácido fórmico, citrato e acetato. B: Aparência dos mesmos após evaporação do solvente..... 78
Figura 5 - Fluxograma do procedimento de extração e limpeza de extrato para testes preliminares QuEChERS original modificado com ACN 5% ácido fórmico, citrato e acetato..... 80
Figura 6 - Efeito matriz resultante para cada versão do método QuEChERS testado (T4: original modif. ACN 5% ácido fórmico, T5: acetato e T6: citrato)..... 82
Figura 7 - A: Aparência do extrato de tabaco sem limpeza (T3), e após LTP 1 h, 2 h e 3 h (T9, T8 e T7 respetivamente), B: Aparência dos mesmos após teste gravimétrico..... 84
Figura 8 - Fluxograma do procedimento de extração e limpeza de extrato para testes preliminares da 2da limpeza do extrato de tabaco..... 89
Figura 9 - Aparência dos extratos obtidos após testes de limpeza T16 a T41..... 90
Figura 10 - Percentual de coextrativos retirados pela segunda limpeza do extrato (T16 a T41)..... 92
Figura 11 - Efeito matriz resultante para diferentes procedimentos com EMR (T17, T24 e T31) 94
Figura 12 - Efeito matriz resultante para diferentes quantidades de MWCNTs-OH (T29, T37 e T38)..... 96
Figura 13 - Cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS, para os compostos carbendazim e imidacloprido preparados em branco de tabaco e no solvente (25 µg L^{-1}). A) CTS 25 µg L^{-1}, B) 1:5 em água ultrapura, C) 1:5 em FM 90:10, D) 1:5 em FM 50:50, E) 1:1 em água ultrapura..... 97
Figura 14 - Fator de supressão dos agrotóxicos segundo a diluição do extrato em água ultrapura (Área analito no T37-a/ Área analito no T37-d; 5 vezes diluído/2 vezes diluído)..... 98
Figura 15 - Fluxograma do procedimento de extração e limpeza de extrato validado neste trabalho..... 99

LISTA DE QUADROS

Pág.

Quadro 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos..... 25
Quadro 2 - Parâmetros analíticos avaliados no processo de validação do método otimizado..... 51
Quadro 3 - Conjuntos de testes onde foi aplicado análise estatística ANOVA e teste de Tukey..... 71
Quadro 4 - Parâmetros de métodos analíticos avaliados na validação do método, com respectivas formas de aplicação, equações (quando aplicável) e critérios de aceitação..... 72

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 - Composição química do tabaco moído em base seca..... 18

Tabela 2 - Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco..... 34

Tabela 3 - Relação dos agrotóxicos analisados pela técnica de UHPLC-MS/MS com informações sobre pKa, Log Kow, fórmula molecular, classe química e ação agronômica..... 58

Tabela 4 - Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em água no sistema UHPLC-MS/MS..... 63

Tabela 5 - Testes realizados para análise dos compostos selecionados para análise de resíduos de agrotóxico em tabaco..... 65

Tabela 6 - Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando eletronebulização ESI+/-, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores e produtos utilizados..... 74

Tabela 7 - Comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis remanescentes em cada versão do método QuEChERS (original modif. ACN 5% ác. fórmico, citrato e acetato) sem etapa de limpeza 79

Tabela 8 - Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação em cada versão do método QuEChERS (T4: original modif. ACN 5% ác fórmico, T5: acetato e T6: citrato)..... 81

Tabela 9 - Comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis remanescentes após diferentes tempos de LTP..... 84

Tabela 10 - Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação para cada variação do tempo de freezer (T6, T10 a T12) usando Q. citrato..... 85

Tabela 11 - Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação para os testes T11, T13 a T15 e detalhe de alguns dos compostos de interesse..... 87

Tabela 12 - Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação para os testes T16 a T41 e comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis retirados por cada tipo de sorvente em relação à primeira limpeza de extrato realizada..... 91

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 13 - Faixa linear, coeficiente de determinação das curvas analíticas, percentuais de recuperação e precisão para ensaios de repetitividade (RSDr) e precisão intermediaria (RSDpi) do método validado..... 100

Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação, efeito matriz e Nível de Resíduo Guia (GRL) CORESTA para os agrotóxicos estudados 106

Tabela 15 - Resultados das análises das amostras de tabaco empregando o método desenvolvido neste trabalho..... 110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcEt	Acetato de etila;
ACN	Acetonitrila;
BPA	Boas Práticas Agrícolas;
CORESTA	Centro de Cooperação para Pesquisa Científica Relativa ao Tabaco, do inglês *Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco;*
CPAs	Agentes de proteção de culturas, do inglês *crop protection agents;*
DCM	Diclorometano;
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction;*
d-SPE	Extração Dispersiva em Fase Sólida, do inglês *dispersive solid phase extraction;*
EAU	Extração assistida por ultrassom;
ECD	Detecção por captura de elétrons, do inglês *electron capture detection;*
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization;*
FL	Detecção por fluorescência, do inglês *fluorescence detection;*
GPC	Cromatografia de permeação em gel, do inglês *gel permeation chromatography;*
*GRL*s	Níveis de Resíduos de Orientação, do inglês *guidance residue levels;*
HEX	Hexano;
HF-SLSDE	Extração dispersiva sólido-líquido-sólido assistida em campo híbrido, do inglês *hybrid field-assisted solid-liquid-solid dispersive extraction;*
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução, do inglês *high-resolution mass spectrometry;*
K_{ow}	Coeficiente de partição octanol/água;
LARP	Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas;
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction;*
MDGC-MS	Cromatografia gasosa multidimensional, do inglês *multidimensional gas chromatography;*
MeOH	Metanol;
MSPD	Dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *matrix solid phase dispersion;*

MSPE	Extração em fase sólida em magnética, do inglês *magnetic solid-phase extraction;*
PDA	Detecção por fotodiodos, do inglês *photodiode-array detection;*
pH	Potencial hidrogeniônico;
PLE	Extração de líquido pressurizado, do inglês *pressurized liquid extraction;*
PTFE	Politetrafluoretileno;
Q-TOF-MS	Espectrometria de massas de tempo de voo, do inglês *quadrupole time-of-flight mass spectrometry;*
QuEChERS	Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe;*
SBSE	Extração por sorção em barra, do inglês *stir bar sorptive extraction*
SCDS	Citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado, do inglês *sodium citrate dibasic sesquihydrate;*
SCTD	Citrato de sódio di-hidratado tribásico, do inglês *sodium citrate tribasic dihydrate;*
SEC	Cromatografia de exclusão de tamanho, do inglês *size exclusion chromatography;*
SFC	Cromatografia de fluido supercrítico, do inglês *supercritical fluid chromatography;*
SLE	Extração sólido-líquido, do inglês *solid liquid extraction;*
SPE	Extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction;*
SRM	Monitoramento de reações selecionadas, do inglês *selective reaction monitoring;*
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-alta performance com espectrometria de massa em tandem, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry;*
UPC^2	Cromatografia de convergência de ultra desempenho, do inglês *ultraperformance convergence chromatography;*
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1 OBJETIVO geral 16
1.1.1 Objetivos específicos 16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 17
2.1 TABACO 17
2.1.1 Constituintes do tabaco 17
2.2 AGROTÓXICOS 21
2.3 MÉTODOS MULTIRRESÍDUOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TABACO 26
2.3.1 Método QuEChERS 27
2.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS 47
2.4.1 Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS) 48
2.5 ANÁLISE ESTATISTICA ANOVA E O TESTE DE TUKEY 49
2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO 51
3. MATERIAIS E MÉTODOS 53
3.1 INSTRUMENTAÇÃO 53
3.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES 54
3.2.1 Compostos selecionados e preparo das soluções analíticas 55
3.2.2 Preparo e utilização do Padrão Interno (PI) e Padrão de Controle (PC) 56
3.2.3 Agrotóxicos selecionados 56
3.3 AMOSTRAS DE TABACO 62
3.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS 62
3.5 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICO EM TABACO 63
3.5.1 Avaliação gravimétrica de coextrativos 68
3.5.2 Ensaios de recuperação, avaliação da eficiência de extração 68
3.5.3 Aplicação de testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) e teste Tukey 69
3.6 VALIDAÇÃO 72
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 74
4.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS 74

4.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TABACO 77

4.2.1 Avaliação do método de extração. 77

4.2.2 Avaliação de métodos de limpeza do extrato 83

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO 99

4.3.1 Seletividade 100

4.3.2 Linearidade 100

4.3.3 Limites de detecção e Limites de Quantificação do método 108

4.3.4 Exatidão e Precisão 108

4.3.5 Efeito Matriz 108

4.3.6 Aplicação do método validado 109

5. CONCLUSÕES 111

6. TRABALHOS FUTUROS 112

7. DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO LABORATORIO 113

8. REFERÊNCIAS 114

9. APÊNDICE 123

9.1 APÊNDICE A - Níveis de Resíduos de Orientação CPA (GRLs) guia CORESTA N° 1, Out., 2021 123

9.2 APÊNDICE B – ESTRUTURAS DOS AGROTÓXICOS AVALIADOS..... 129

9.3 APÊNDICE C – RESULTADOS DE ENSAIOS DE FORTIFICAÇÃO, EFEITO MATRIZ E ANÁLISE ESTATISTICA ANOVA E TESTE DE TUKEY 135

1. INTRODUÇÃO

O tabaco é uma planta da família *Solanaceae,* do gênero *Nicotiana,* com pelo menos 60 espécies diferentes, sendo a *Nicotiana rustica* e a *Nicotiana tabacum* as mais comumente usadas pelos humanos. A parte mais valiosa desta planta são suas folhas, sendo então a cultura não alimentar mais amplamente cultivada no mundo (TAYOUB *et al*., 2015). A produção mundial atual de *Nicotiana tabacum* é de cerca de 6,5 milhões de toneladas de folhas, sendo o Brasil o segundo maior produtor com a cifra de 0,88 milhões de toneladas de folhas produzidas em 2017, conforme estimado pela FAO (Organização para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization)*. Tendo grande importância econômica, o tabaco é cultivado no nordeste e no sul do Brasil. No Sul, cerca de meio milhão de pessoas trabalham em atividades relacionadas ao tabaco, representando uma importante fonte de renda para muitos produtores (FAO, 2017).

Ao mesmo tempo, a agricultura atual baseia-se no uso intensivo de agrotóxicos usados na cultura do tabaco para proteção de pragas, doenças, controlar plantas indesejadas (ervas daninhas) e regular o crescimento. O Centro de Cooperação para Pesquisa Científica Relativo ao Tabaco, (CORESTA, do inglês *Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco*) criou um Guia de Níveis de Resíduos de Agrotóxicos (GRLs, do inglês *Guidance Residue Levels*), a fim de fornecer orientações na aplicação de agentes de proteção de culturas (CPAs, do inglês *crop protection agents*). Mesmo quando essa GRL não substitui nenhum regulamento, pretende ajudar na implementação de Boas Práticas Agrícolas (BPA) na produção de tabaco (CORESTA, 2021).

Os CPAs (herbicidas, inseticidas, fungicidas, entre outros), incluem compostos de distintas classes como, por exemplo, organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides. Vários deles têm efeitos adversos nos microrganismos do solo, afetando a fertilidade do mesmo (CHOWDHURY *et al*., 2008), bem como causando problemas à saúde humana como câncer entre muitas outras doenças (TEODORO *et al*., 2019; DAMALAS *et al*., 2011; ZHANG *et al*., 2016; GARCÍA-GARCÍA *et al*., 2016). Portanto, torna-se indispensável monitorar os resíduos desses compostos no meio ambiente e nos produtos para consumo humano.

A necessidade de desenvolver métodos de análise para o monitoramento da ampla variedade de agrotóxicos disponíveis comercialmente e seus derivados deu

lugar aos métodos multirresíduo ou multiclasse. Estes métodos permitem a determinação e quantificação de múltiplas substâncias de diferentes classes na mesma análise, reduzindo custos, volumes de reagente, e a necessidade de manipular várias vezes a amostra.

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver e validar um método simples para a extração e determinação multirresíduo de agrotóxicos em tabaco, empregando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS) com sistema triplo quadrupolo.

1.1.1 Objetivos específicos

(i) Otimizar o processo de extração multiclasse de agrotóxicos em tabaco moído;
(ii) Otimizar o processo de limpeza do extrato para análise multiclasse de agrotóxicos em tabaco moído;
(iii) Verificar se as condições cromatográficas para análise multiclasse de agrotóxicos UHPLC-MS/MS usualmente empregadas no LARP-UFSM são efetivas para análise em tabaco moído;
(iv) Validar o método para os 74 compostos contidos na Guia CORESTA, avaliando: curva analítica, linearidade, efeito matriz, limites de quantificação e detecção, precisão e exatidão.
(v) Aplicar o método validado em amostras de tabaco moído.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TABACO

O tabaco é uma planta herbácea, com folhas largas e macias, de 50 a 70 cm de comprimento e 30 a 40 cm de largura. As folhas estão dispostas em espiral em uma haste ereta que cresce entre 1,5 e 2,5 m de altura. Suas flores apresentam cores que vão do branco ao vermelho escuro, sendo os tons de rosa os mais comuns, e geralmente têm forma tubular (WENDIE; MICKEL,1973).

As plantas de tabaco pertencem ao gênero *Nicotiana,* da família *Solanaceae.* As mais cultivadas comercialmente são a *Nicotiana rustica,* principalmente para coleta de nicotina e solanesol, e a *Nicotiana tabacum* para uso em cigarro, cachimbos, charutos, rapé e tabaco de mascar (RODGMAN; PERFETTI, 2013).

2.1.1 Constituintes do tabaco

As espécies de *Nicotiana* têm uma composição química extremamente complexa, apresentando diferentes constituintes. A presença de ao menos 5595 substâncias têm sido identificadas no tabaco moído, outras 6010 substâncias foram identificadas na fumaça de tabaco e pelo menos 2215 constituintes foram reportados em ambos, ou seja, no tabaco moído e sua fumaça. Contabilizando os isômeros das substâncias que podem estar presentes, têm sido reportadas aproximadamente 9390 substâncias identificadas no tabaco e sua fumaça (RODGMAN; PERFETTI, 2013).

É interessante considerar que a presença ou não de alguns constituintes na folha do tabaco assim como sua concentração, podem mudar dependo da espécie, origem, tempo de maturação, secagem, fermentação, processamento e armazenamento (BANOŽIĆ *et al.,* 2020). As informações sobre composição química consideradas nesta revisão correspondem a espécie *Nicotiana Tabacum.*

Na Tabela 1 podemos observar a composição química das diferentes classes de substâncias que majoritariamente estão presentes no tabaco, sendo aproximadamente 14% de açúcares, 11% de substâncias peptídicas, 9% de ceras e resinas, 6% de fenóis, entre outros.

Tabela 1 - Composição química do tabaco moído em base seca

Componente	%(m/m) em tabaco moído (base seca)
Carboidratos	
Açúcares	14,1
Celulose	13,3
Substâncias peptídicas	11,4
Amido, pentosanos	1,4
Água	0
Proteínas e aminoácidos	
Proteínas	6,4
Amino ácidos livre	2
Bases	
Bases voláteis	4,5
Nicotina	2
Ceras e resinas	9
Metais, não metais	5
Fenóis	6,05
Ácidos	9,8
Lignina	2,25
Íons inorgânicos	2,2
Compostos contendo halogênios	1,5
Compostos contendo enxofre	0,7
Hidrocarbonetos	0,71
Álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres	6,2
Outros	1,49
Total	100

Fonte: RODGMAN; PERFETTI, 2013

Como podemos ver na Tabela 1, aproximadamente 40,2% dos constituintes do tabaco são considerados carboidratos, incluindo substâncias poliméricas como, amido, amilopectina, amilose, celulose, hemicelulose, ligninas e pectina. Ao mesmo tempo uma porcentagem importante destes carboidratos é composta por açúcares que representam aproximadamente 14% da composição do tabaco moído, entre eles podemos destacar: frutose, glucose, heptose, lactose, lixose, manose, melibiose, xilose, ribose e xilitol (RODGMAN; PERFETTI, 2013). A presença destas e várias outras substâncias como coextrativos no extrato final de uma extração de agrotóxicos, dependendo da metodologia de extração, pode significar um desafio interessante para

ser vencido dada a necessidade de limpar o extrato para possibilitar a determinação dos compostos de interesse.

Dentre a grande variedade de constituintes na folha do tabaco estão incluídos diferentes hidrocarbonetos como alcaloides, terpenos, hidrocarbonetos aromáticos, álcoois, fenóis e polifenóis, ésteres, esteróis, aldeídos, cetonas, ácidos e aminoácidos (JOHNSTONE; PLIMMER, 1959), açúcares, nitrato-nitrogênio, amino nitrogênio, compostos organometálicos, metais, aza-arenos, entre outros. Os esteróis, de natureza lipídica-anfipática constituem aproximadamente 0,2% em massa do tabaco, entre estes podemos nomear estigmasterol, β-sitosterol, campesterol e colesterol (RODGMAN; PERFETTI, 2013).

Os alcalóides são uma classe de compostos orgânicos de ocorrência natural, geralmente heterocíclicos, que contêm átomos de nitrogênio básicos (IUPAC, 2019). No tabaco têm sido reportados diferentes alcaloides, entre os quais destaca a nicotina, representando aproximadamente 95% de todos os alcalóides presentes (BANOŽIĆ *et al*., 2020). Dentre os alcalóides minoritários podem ser destacados a nornicotina, anatabina, anabasina (JI *et al.,* 2019), miosmina, nicotirina, 2,3-dipiridil, muscarina, atropina, quinina, morfina, estricnina, nicoteína e nicotimina (BANOŽIĆ *et al.,* 2020). Os alcalóides no tabaco estão relacionados com sua qualidade, usabilidade e tem um papel nas sensações prazerosas que ele produz assim como em seu uso continuado (XIA *et al*., 2014). Embora a nicotina seja formada e esteja presente em grandes quantidades no tabaco, é importante entender que a maioria de toda a nicotina do tabaco está presente na forma de sais orgânicos. Muito pouco existe na forma de base livre devido à natureza ácida do tabaco (RODGMAN; PERFETTI, 2013). Da mesma forma, estas propriedades físico-químicas da nicotina (de natureza básica e altamente miscível em água, etanol e solventes orgânicos), fazem desta mais um potencial coextrativo de entre tantos presentes na matriz tabaco.

Os principais constituintes contendo nitrogênio orgânico na folha do tabaco são, nicotina e demais alcalóides, proteínas e aminoácidos relacionados. No caso dos aminoácidos podem estar presentes tanto como ácidos livres quanto como ligados a moléculas de proteína. Alguns exemplos de aminoácidos que ocorrem livremente e/ou ligados a proteínas em tabaco incluem α- e β-alanina, arginina, asparagina, cisteína, cistina, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina. Ao mesmo tempo existe uma importante presença de ácidos carboxílicos nesta matriz, por

exemplo, tem sido reportada a presença de ácidos: acético, dicloro, metóxi, hidroxi e acetiloxi acéticos, arabinóico, aspártico, benzenopropanóico, benzóico, succínico, butanóico, malêico, ciclopentanóico, fórmico, glutâmico, heptanóico, palmítico, octanóico, malônico, mirístico, entre outros (RODGMAN; PERFETTI, 2013). Todos estes são exemplos dos múltiplos constituintes orgânicos que podem ser coextraídos da matriz dificultando a análise de agrotóxicos em tabaco e dificultando a etapa de limpeza dos procedimentos de extração. No caso das proteínas presentes no tabaco, além daquelas proteínas insolúveis consideras estruturais, estão presentes também proteínas altamente solúveis em água. O alto conteúdo de proteínas hidrossolúveis que o tabaco apresenta em relação a outras culturas pode ter diversos usos nutricionais e terapêuticos quando as mesmas são extraídas com esses propósitos (TREMBLAY *et al*., 2010). Na determinação de resíduos de agrotóxicos em tabaco, as proteínas hidrossolúveis resultam em coextrativos que dificultam a obtenção de extratos límpidos.

Os terpenos são hidrocarbonetos de origem biológica com esqueletos de carbono derivados formalmente do isopreno [$CH_2=C(CH_3)CH=CH_2$] (IUPAC, 2019). Alguns dos terpenos reportados na folha da *Nicotiana Tabacum* são a betulina, ácido oleanólico, ácido ursólico (POPOVA *et al.,* 2019).

A categoria fenólica no tabaco corresponde aproximadamente a 8,3% da massa seca do tabaco, sendo aproximadamente 2,25% do peso em lignina. O restante do peso de constituintes contendo oxigênio na sua estrutura é composto por álcoois, fitoesteróis e seus derivados, aldeídos, cetonas, aminoácidos e ésteres (RODGMAN; PERFETTI, 2013). Os polifenóis do tabaco afetam o odor e sabor do fumo pelo qual o monitoramento destes precisa ser levado em consideração no controle de qualidade no processamento do tabaco. Entre os compostos fenólicos mais estudados nas folhas de tabaco tem-se a rutina e a quercetina (XIA *et al.*, 2014). O solanesol por exemplo é um álcool frequentemente extraído das folhas de tabaco e que é usado como fonte de isopreno em diversas sínteses (BANOŽIĆ *et al*., 2020; RODGMAN; PERFETTI, 2013).

Para entender melhor o comportamento desta ampla e numerosa variedade de constituintes, pode ser feita uma classificação em frações extraíveis de compostos por diferentes solventes. Entre os componentes solúveis em solvente orgânico presentes no tabaco pode-se nomear, os hidrocarbonetos alifáticos saturados e insaturados de cadeia longa; álcoois terpenóides, como os duvanedióis, fitoesteróis, fitol e solanesol;

álcoois alifáticos cadeia de longa; ésteres alifáticos de cadeia longa, ésteres de alto peso molecular, ácidos alifáticos de cadeia longa (palmítico, esteárico, oleico etc.). Entre os constituintes mais apolares, tem-se que, aproximadamente 9% da composição química do tabaco moído em base seca é constituido por ceras e resinas. Estes são considerados a fração extraível por éter, sendo aproximadamente 60% do peso lipídios e 40% resinas. Já os constituintes do tabaco extraíveis com hexano (aproximadamente 6% do peso original do tabaco) incluem parafinas alifáticas e cíclicas, ácidos graxos, fitoesteróis, ésteres esterílicos e terpenos. Como os componentes maioritários extraídos de tabaco usando éter de petróleo (aproximadamente 8% do peso do tabaco) tem-se, os hidrocarbonetos saturados de cadeia longa, neofitadieno, ésteres de esteróis, álcoois terpenóides, solanesol, esteróis, ácidos graxos de cadeia longa e ésteres polares de ácidos graxos. Os extraíveis com álcool incluem, pigmento polifenólico de tabaco e açúcares de baixo peso molecular, enquanto o resíduo final do tabaco contém componentes estruturais do tabaco, os biopolímeros como a lignina e os polissacarídeos celulose, amido e pectinas (RODGMAN; PERFETTI, 2013). Estas observações experimentais nos permitem prever como, dependendo da estratégia do procedimento de extração escolhida para melhor recuperação dos analitos, serão enfrentados diferentes desafios a respeito da estratégia de limpeza dos diferentes coextrativos para a obtenção do extrato final.

Ademais, no tabaco podem estar presentes enzimas, aromatizantes ou outros aditivos adicionados ao produto comercial, produtos micotóxicos de microrganismos encontrados na planta, agrotóxicos ou agentes de controle de crescimento, ou seus resíduos (RODGMAN; PERFETTI, 2013).

Portanto, a quantidade de constituintes no tabaco é tão grande, diversa e complexa, que faz do mesmo uma matriz extremamente difícil de trabalhar, uma vez que, estes compostos podem ser coextraídos junto com os analitos de interesse, dificultando a determinação de resíduos de agrotóxicos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

2.2 AGROTÓXICOS

Segundo o Código Internacional de Conduta no Manejo de Agrotóxicos (*The International Code of Conduct on Pesticide Management*) publicado pela FAO

juntamente com a OMS em 2014, um agrotóxico é qualquer substância ou mistura de substâncias de ingredientes químicos ou biológicos destinados a repelir, destruir ou controlar qualquer praga ou regular o crescimento de plantas. Os agrotóxicos podem ser classificados de diversas formas, as principais classificações dependem de sua natureza química (organoclorados, organofosforados etc.); requisito de aplicação (agricultura, saúde pública, doméstico) e organismo alvo ou uso direcionado (inseticida, herbicida, fungicida etc.). Assim, um grande número de substâncias pode ser usado nas culturas para protegê-las de pragas, doenças, controlar plantas indesejadas (ervas daninhas) e regular o crescimento.

No caso da produção de tabaco, é de importância primordial o controle de pragas, insetos, fungos e ervas daninhas que podem influenciar a sua produção e na qualidade. Para isto são frequentemente usados inseticidas, herbicidas, fungicidas e reguladores de crescimento. Devido a este fato, o Centro de Cooperação para Pesquisa Científica Relativo ao Tabaco (CORESTA, do inglês *Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco*) criou um Guia de Níveis de Resíduos Agroquímicos (GRLs, do inglês *Guidance Residue Levels*) para orientar na aplicação de agentes de proteção de culturas (CPAs, do inglês *Crop Protection Agents*). Embora este GRL não substitua nenhum regulamento, pretende ajudar na implementação de Boas Práticas Agrícolas (BPA) na produção de tabaco. No apêndice A, foi incluída a Tabela I contendo os compostos e GRLs orientados no Guia N°1, 2021 da CORESTA (CORESTA, 2021).

Os CPAs nomeados no Guia N°1, 2021 da CORESTA podem ser classificados com base na sua natureza química em uma ampla variedade de classes, entre elas, auxinas, benzimidazóis, benzoiluréias e uréias substituídas, benzotiadiazóis, carbamatos, dicarboxamidas, dinitroanilinas, ftalimidas, neonicotinóides, organofosforados, organoclorados, piretróides, rianoides, triazinas ou triazóis. Vários deles mostraram efeitos adversos nos microrganismos do solo, afetando a fertilidade do solo (CHOWDHURY *et al*., 2008) assim como problemas na saúde humana incluindo câncer, perturbação hormonal, hipersensibilidade entre outras doenças (TEODORO *et al*., 2019; DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011; ZHANG *et al*., 2016; GARCÍA-GARCÍA *et al*., 2016; VAN MAELE-FABRY *et al.*, 2011). Portanto, torna-se indispensável monitorar os resíduos desses compostos no ambiente e nos produtos para consumo humano.

As auxinas, por exemplo, são uma classe de hormônios vegetais, capazes de afetar o crescimento, desenvolvimento e tropismo celular, sendo usados como reguladores de crescimento de plantas ou frequentemente nos cultivos de tabaco como herbicidas. As auxinas podem ser sintetizadas endogenamente pelas plantas, como o ácido indol-3-acético, ou sintetizados projetados justamente com o fim de reproduzir os potentes efeitos daqueles sintetizados endogenamente pelas plantas (TODD *et al*., 2020). Entre as auxinas, mencionadas no GRLs do CORESTA, 2021 pode-se nomear o 2,4-D e a 2,4,5-T, são compostos com anel aromático e um grupo ácido carboxílico.

Outros herbicidas usados em cultivos de tabaco são as dinitroanilinas, com a fórmula química $C_6H_5N_3O_4$ são derivados da anilina e dinitrobenzenos. Podem persistir como contaminantes do solo e geralmente são consideradas altamente tóxicas para os humanos sendo bem absorvidas por todas as vias de exposição. A toxicidade associada à exposição de dinitroanilinas está relacionada à formação de metemoglobina, na qual o ferro da molécula de hemoglobina é oxidado a Fe^{3+}, a metemoglobina não pode ligar o oxigênio, o que se traduz em uma deficiência na capacidade de transporte de oxigênio do sangue (YOUNG, 2014).

Em relação às uréias substituídas, em particular as feniluréias e as sulfoniluréias também são usadas como herbicidas, enquanto que as benzoiluréias tem efeito inseticida (BERRADA *et al*., 2003). Como herbicidas são frequentemente aplicados em pré-emergência, geralmente como emulsões aquosas na superfície do solo (STOYTCHEVA *et al*., 2014). Estes produzem a atividade herbicida inibindo a fotossíntese, ao impedir a função da clorofila ao inibir a acetolactato sintase. As benzoiluréias por sua parte atuam como reguladores de crescimento de insetos inibindo a síntese de cutícula de quitina (BERRADA *et al*., 2003). Especificamente no GRLs do CORESTA está incluído o diflubenzurom.

Já os chamados triazóis, são compostos de anéis de cinco membros contendo três nitrogênios, podendo ser 1,2,3-triazóis ou 1,2,4-triazóis. Os triazóis não são produzidos nas plantas naturalmente, mas são encontrados como componentes estruturais de fungicidas, inseticidas e herbicidas. Desta família ao menos cinco 1,2,4-triazois foram identificados como resíduos em tabaco, incluindo, três fungicidas: triadimefon, penconazol e triadimenol; um herbicida: sulfentrazona; e um inseticida: triazofós. Da mesma forma pelo menos dois 1,2,3-triazóis foram identificados no tabaco e na fumaça do tabaco até o momento, a saber, os inseticidas azinfós-metil-

oxon e azinfós-metílico (RODGMAN; PERFETTI, 2013). Entre os triazóis inclusos no GRLs do CORESTA (2021), podemos nomear o azinfós-metílico, pebulato, penconazol, tebuconazol e difenoconazol.

Boa parte dos inseticidas aplicados nas culturas de tabaco, mencionados no GRLs do CORESTA (2021) são compostos organoclorados, organofosforados, piretróides ou carbamatos.

Os compostos organofosforados, incluem ésteres de ácido fosfórico e fosfônico, assim como organotiofosforados (SANNINO, 2008). São amplamente eficazes como inseticidas, nematicidas e acaricidas. Infelizmente muitos deles representam um risco para a saúde humana (JAGA; DHARMANI, 2003). Entre os organofosforados economicamente mais importantes também mencionados no GRLs do CORESTA tem-se: paration (amplo espectro e alta toxicidade), malationa, azinfós, dimetoato, fention, cloropirifós, diclorvós e diazinon.

Já os carbamatos são sais ou ésteres do ácido carbâmico, $H_2NC(=O)OH$, ou então de ácidos carbâmicos N-substituídos, $R_2NC(=O)OR'$, onde R'= hidrocarbila, ex. metil ou fenil) (IUPAC, 2019). São um importante grupo de inseticidas, alguns com atividades fungicidas, herbicidas e moluscicidas (SANNINO, 2008). Entre os carbamatos nomeados no GRLs do CORESTA destacam: aldicarbe, carbaril, carbofurano, propoxur, pirimicarbe, propamocarbe, metomil e oxamil.

Adicionalmente três inseticidas rianóides são nomeados no GRLs do CORESTA (2021), a saber clorantraniliprole, ciantraniliprole e flubendiamida. Os rianoides são uma classe de inseticidas que apresentam o mesmo mecanismo de ação que o alcalóide rianodina. A rianodina é o componente principal dos extratos da madeira do caule da planta *Ryania speciosa*, com ação inseticida e alta toxicidade para os mamíferos (USHERWOOD; VAIS, 1995).

Outro exemplo de inseticidas no GRLs do CORESTA (2021), são o imidacloprido e o tiametoxam, dois inseticidas neonicotinóides, de estruturas quimicamente semelhantes à nicotina, porém, mais potentes e eficazes contra insetos e de menor toxicidade para mamíferos (TOMIZAWA; CASIDA, 2005).

Além dos triazóis, as classes de fungicidas que mais se repetem no GRLs do CORESTA são os benzimidazóis, carboxamidas e ftalimidas. Os benzimidazóis são compostos heterocíclicos aromáticos, cuja estrutura base é constituída pela fusão de um anel benzeno e um imidazol, são exemplos disto o benomil e o carbendazim, nomeados no GRLs do CORESTA (2021). Em geral os fungicidas de benzimidazol

são amplamente utilizados na prevenção de fungos doenças em frutas e vegetais para pré-colheita e pós-colheita (ZHAO *et al*., 2020). A toxicidade entre benzimidazóis pode variar entre baixa e moderada, no caso tanto do benomil quanto do carbendazim produzem efeitos tóxicos na reprodução e no desenvolvimento em animais de laboratório em altas doses orais, efeitos de toxicidade no desenvolvimento incluem redução do peso fetal e anomalias dos olhos, crânio e cabeça, sendo o carbendazim considerado tóxico para o desenvolvimento e teratogênico (GUPTA *et al*., 2018).

As carboxamidas, também conhecidas como amidas, ou amidas orgânicas, são amidas de ácidos carboxílicos, tendo a estrutura $RC(=O)NR_2$ (IUPAC, 2019). Entre os fungicidas nomeados no GRLs do CORESTA (2021), que podem ser considerados da classe das carboxamidas temos metalaxil, benalaxil e iprodiona. É interessante comentar que em geral algumas destas substâncias podem ser classificadas em vários grupos, a iprodiona por exemplo é uma imidazolidino carboxamida e já têm antecedentes sendo detectada como resíduo em tabaco (RODGMAN; PERFETTI, 2013). O metalaxil é uma mistura 1:1 dos enantiômeros R e S usado como fungicida e é um irritante grave para coelhos e causa danos no fígado de cães. O benalaxil por sua vez, se a exposição for de longo prazo, causa anormalidades reprodutivas em ratos, assim como ganho de peso corporal, aumento do peso do fígado dos filhotes e retardo da ossificação craniana (GUPTA *et al*., 2018).

Os agrotóxicos também podem ser classificados quanto a sua toxicidade, considerando a dose letal oral, cutânea e inalatória estabelecida. A RDC n° 294, de 29 de julho de 2019 (ANVISA, 2019), apresenta no artigo 39 a classificação por categorias como mostra o Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos

Categoria	Classificação	Faixa do rótulo
1	Produto Extremamente tóxico	vermelha
2	Produto Altamente Tóxico	vermelha
3	Produto Moderadamente Tóxico	amarela
4	Produto Pouco Tóxico	azul
5	Produto Improvável de Causar Dano Agudo	azul
Não classificado	Produto Não Classificado	verde

Fonte: ANVISA, 2019

2.3 MÉTODOS MULTIRRESÍDUOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM TABACO

O uso de agrotóxicos a grande escala começou após a Segunda Guerra Mundial, quando a produção agrícola de alimentos se acelerou (SANNINO, 2008). De fato, o aumento na produtividade por área plantada se deve grandemente ao uso intensivo de agrotóxicos como, acaricidas, inseticidas, fungicidas, herbicidas e fertilizantes (PAREJA *et al*., 2011).

A necessidade de desenvolver métodos analíticos para o monitoramento destes compostos e de seus derivados permitiu o surgimento de métodos eficientes para a identificação e quantificação de múltiplas substâncias em nível de resíduo, em uma única análise, possibilitando a redução de custos, volumes de reagente, e de manuseio da amostra.

O primeiro método multirresíduo para a extração de agrotóxicos foi desenvolvido por Mills e colaboradores 1963, e estava orientado à determinação de compostos organoclorados apolares. Neste método realiza-se uma extração dos analitos com acetonitrila (ACN), seguida da adição de água e de um solvente orgânico apolar, propiciando uma extração líquido-líquido, onde ao mesmo tempo são extraídos os analitos e são removidos açúcares e sais da amostra (MILLS *et al.,* 1963; PRESTES *et al.,* 2009). Ao longo do tempo variações deste tipo de extração têm permitido a análise de agrotóxicos mais polares, com diferentes grupos funcionais, em amostras de variada natureza. Outras adaptações têm possibilitado o aumento na porcentagem de recuperação dos analitos, diminuindo os volumes de solventes usados, ou adicionando etapas para uma melhor limpeza dos extratos da amostra (PRESTES *et al*., 2009).

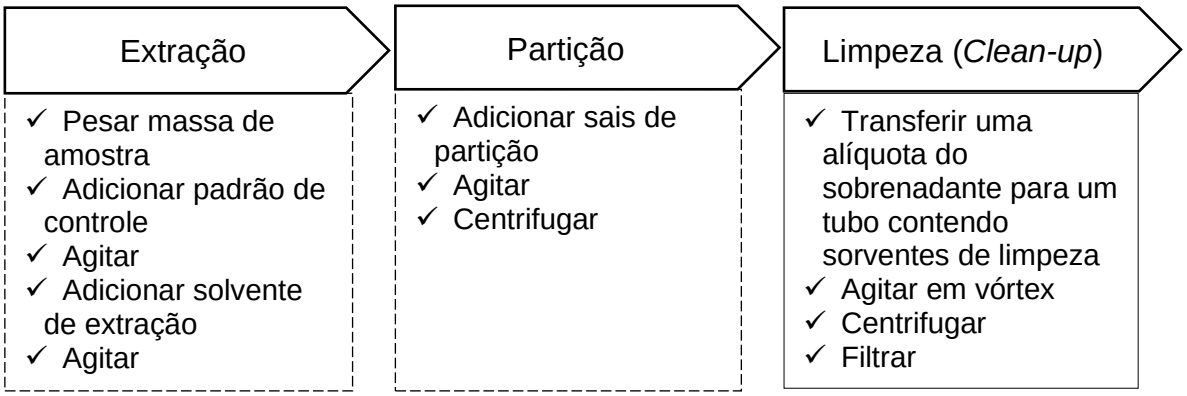
O método QuEChERS, do acrônimo em inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro), é um procedimento de preparo de amostras amplamente utilizado na extração de agrotóxicos, fármacos, poluentes ambientais, entre outros analitos em diferentes tipos de matrizes complexas (PERESTRELO *et al*., 2019) que tem se destacado ao longo do tempo para análise multirresíduo.

2.3.1 Método QuEChERS

Desenvolvido por Anastassiades e Lehotay em 2003, o método QuEChERS tem várias vantagens no preparo de amostras para análises de agrotóxicos, incluindo: elevadas recuperações para uma ampla gama de agrotóxicos e resultados muito precisos (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003). O método é barato, usa material de laboratório simples e consome menores volumes de solvente em relação a outros métodos. A instrumentação necessária para executar o método se resume a balanças, centrífugas, vórtex e pipetas automáticas. Um grande número de amostras pode ser preparado em curtos períodos de tempo. Além disso, não há necessidade de uma equipe com habilidades técnicas especiais e, finalmente, o método inclui uma etapa de limpeza da amostra (LEHOTAY *et al*., 2005), o que ajuda a prolongar a vida útil da coluna e do sistema cromatográfico.

Este método de preparo de amostra consiste em uma extração com solvente orgânico, originalmente ACN, seguida da adição de uma mistura de sais que promovem uma partição graças ao efeito *salting-out* e finaliza com a limpeza do extrato obtido. Esta limpeza comumente é feita com uma extração em fase sólida dispersiva d-SPE (PRESTES *et al*., 2011a). Na Figura 1 podemos observar um esquema básico geral do método QuEChERS.

Figura 1. Esquema geral do método QuEChERS



Há duas combinações específicas e bem estabelecidas deste método que são reconhecidas e aceitas como métodos oficiais: o QuEChERS acetato, implementado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AOAC, 2007) e o QuEChERS citrato, que foi

adotado pelo *European Committee for Standardization* (CEN), como método de referência na União Europeia (CEN, 2008). No QuEChERS acetato, a amostra é extraída usando 10 mL de ACN, 1,5 g de NaOAc (tampão acetato), 6 g $MgSO_4$ e logo depois é feita uma limpeza no extrato por d-SPE empregando 150 mg $MgSO_4$ e 50 mg PSA para cada 1mL de extrato (AOAC, 2007). Já o QuEChERS citrato usa 10 mL de ACN, 1 g de SCTD, 0,5 g de SCDS (tampão citrato), 4 g de $MgSO_4$ e 1 g de NaCl, seguida de limpeza do extrato por d-SPE usando 150 mg $MgSO_4$ e 25 mg PSA para cada 1 mL de extrato (CEN, 2008).

A d-SPE é uma extração na qual uma mistura de sorventes em fase sólida é dispersa no extrato de uma amostra com o objetivo de favorecer a cinética da sorção de determinados coextrativos enquanto os analitos são mantidos na fase líquida. Cabe salientar que são utilizadas pequenas quantidades de sorventes sólidos (~ 50 mg) permitindo a melhor limpeza do extrato onde o analito é mantido, o que melhora a seletividade da determinação (CHISVERT *et al*., 2019).

Devido à complexidade da matriz do tabaco, principalmente pela presença de diferentes compostos orgânicos que podem ser coextraídos com os analitos, faz-se necessário um preparo de amostra com adequada etapa de limpeza da amostra (TROJE *et al*., 1997). Uma das vantagens do método QuEChERS é a sua flexibilidade já que a natureza do método permite diversas modificações para diversos fins. Dependendo da natureza química dos analitos, podem ser otimizadas as quantidades e combinações de solventes e sais.

Por exemplo, o pH do solvente de extração pode ser ajustado para aumentar as recuperações de analitos sensíveis ao pH, isto é feito adicionando à ACN um tampão de pH (citrato, acetato ou fosfato) ou um ácido orgânico (ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico). Da mesma forma a ACN pode ser adicionada em conjunto com outros solventes orgânicos como acetato de etila (AcEt), metanol (MeOH), diclorometano (DCM) ou hexano (HEX) em diferentes proporções para melhorar a eficiência de extração dos analitos (PERESTRELO *et al*., 2019). Entre os sais de extração usados frequentemente na etapa de partição para promover o efeito *salting-out* podemos citar: sulfato de magnésio ($MgSO_4$), sulfato de sódio (Na_2SO_4), acetato de amônio ($NH_4CH_3CO_2$), cloreto de sódio (NaCl), acetato de sódio (NaOAc), citrato de sódio di-hidratado tribásico (SCTD), citrato de sódio dibásico sesqui-hidratado (SCDS), e combinações destes (PERESTRELO *et al*., 2019).

A versatilidade do procedimento QuEChERS é notável, porém possui algumas desvantagens. A maior delas é a relação entre a quantidade de amostra:solvente (1 g mL^{-1}) obtida no método, a qual é baixa se comparada com os valores típicos de 2 a 5 g mL^{-1} de outros métodos de extração de agrotóxicos que utilizam solventes apolares (PRESTES *et al*., 2009). Uma relação amostra:solvente baixa pode levar a valores de LQ (limite de quantificação) mais elevados para o mesmo volume de injeção. Adicionar etapas de concentração dos extratos pode ajudar a elevar esta relação, no entanto, a alta sensibilidade das técnicas cromatográficas disponíveis atualmente, muitas vezes permite a análise.

Outra desvantagem é o fato da acetonitrila ser um excelente solvente para os métodos de determinação que utilizam LC-MS/MS, mas ser inconveniente para análises empregando GC-MS/MS devido ao seu grande volume de expansão durante a vaporização. No entanto devido a avanços nos sistemas de injeção em GC-MS/MS, como a injeção de grandes volumes (LVI, do inglês *large volume injection*) e a programação da temperatura de vaporização (PTV, do inglês *programmed temperature vaporized*) é possível o uso de ACN em ambas técnicas (PRESTES *et al*., 2011b, PRESTES *et al*., 2009).

A temperatura durante o procedimento QuEChERS pode afetar a eficiência de recuperação de analitos termolábeis. Alguns deles podem se degradar devido à reação exotérmica de hidratação ao adicionar $MgSO_4$ anidro (PERESTRELO *et al*., 2019). Isto pode ser amenizado resfriando a amostra imediatamente após a adição do $MgSO_4$ ou então usando o solvente de extração resfriado.

Além disso, no procedimento QuEChERS é necessária uma etapa inicial de adição de água para amostras com baixo conteúdo de água (<80%) como cereais, frutas secas, solo ou tabaco moído com o objetivo de enfraquecer as interações entre o analito e a matriz, e assim, garantir a adequada separação das fases (SANTANA-MAYOR *et al*., 2019).

2.3.1.1 Extração em fase sólida dispersiva d-SPE

A técnica de extração em fase sólida é baseada num mecanismo de partição onde os analitos são distribuídos seletivamente entre o material sorvente sólido e uma fase líquida. O sorvente sólido pode ser utilizado para remover impurezas indesejadas

na amostra ou para reter os compostos de interesse, concentrando-os para uma eluição tardia com um eluente adequado (BUSZEWSKI; SZULTKA, 2012). Em d-SPE o extrato da amostra é adicionado ao sorvente, tendo após etapas de agitação e centrifugação (SENES *et al*., 2020). É uma técnica bastante usada como etapa de limpeza do extrato do método QuEChERS.

Várias combinações de sorventes podem ser usadas quando se trata de d-SPE. Alguns dos sorventes mais usados são: amina primária secundária (PSA, do inglês *primary secondary amine*), sulfato de magnésio ($MgSO_4$), octadecilsilano (C_{18}) e carvão ativado grafitizado (GCB, do inglês *graphitized carbon black*). Nesta etapa deve se levar em consideração as quantidades dos sorventes para que ocorra a limpeza do extrato, mas não a retenção dos analitos.

Neste sentido, sorventes amino e alumina são usados para limpar o extrato de ácidos (incluindo aminoácidos e ácidos graxos), açúcares, pigmentos (antocianinas e clorofila), porém, considerando a possibilidade de ter perdas de agrotóxicos com características ácidas (CHEN *et al*., 2013). Os sorventes com base de carbono como o GCB são usados para remover carotenoides, clorofila e esteróis, podendo ter perdas de agrotóxicos com estrutura planar. Já os sorventes de fase reversa, principalmente C_{18}, são usados para diminuir a presença de lipídeos, ceras e interferentes apolares (ANASTASSIADES, 2006; CHEN *et al*., 2013). Ao mesmo tempo, nas misturas de sorventes para d-SPE geralmente é adicionada uma quantidade de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) com o objetivo de realizar simultaneamente a limpeza da água residual (PRESTES *et al*., 2011b). Dentre outros tipos de limpeza de extrato pode-se incluir uma etapa de o congelamento do extrato que auxilia na precipitação de lipídios, ceras e açucares (ANASTASSIADES, 2006).

Outros sorventes usados para limpeza de coextrativos após extração com o método QuEChERS são, quitosana, fase fluorada, Florisil®, EMR-Lipid, Supel™ QuE Z-Sep+ e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs, do inglês *multiwalled carbon nanotubes*).

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina (copolímero de β-(1→4)-D-glucosamina e β-(1→4)-N-acetil-D-glucosamina), cujas propriedades dependem grandemente de seu grau de desacetilação (CANELLA; GARCIA, 2001). A quitosana tem sido usada eficazmente na limpeza de extratos de noz Pecan (BARCI *et al*., 2020), cevada e trigo (FRANCESQUETT, 2018) para determinação de agrotóxicos.

A fase fluorada é um sorvente tipicamente usado como fase estacionária em separações cromatográficas, contendo átomos de flúor na estrutura, agindo por mecanismo semelhante a uma fase reversa regular apenas com uma seletividade diferente. É um sorvente que interage com compostos polares e tem sido usado para a limpeza de extratos vegetais para análise de agrotóxicos, tendo inclusive melhor desempenho que os sorventes PSA e C_{18} usados de forma conjunta (MARTINS *et al*., 2017).

O metassilicato de magnésio, mais conhecido como Florisil® é um pó branco, inodoro e finamente dividido amplamente utilizado como adsorvente de pigmentos, ácidos graxos, entre outros, em diversas matrizes incluindo extratos de tabaco (QUADRONI; BETTINETTI, 2019; LOZOWICKA; RUTKOWSKA; HRYNKO, 2015; MUREYA; MUSUNA-GARWE, 2014; GHOSH *et al*., 2014; WEIYUN *et al*., 2014; QI *et al*., 2014; ZHOU; XIAO; LI, 2012).

O EMR (do inglês *Enhanced Matrix Removal*) é um material projetado para a remoção de lipídios, envolvendo mecanismos de exclusão por tamanho e interações hidrofóbicas. Hidrocarbonetos de cadeia longa se encaixam na estrutura EMR-Lipídica, onde são aprisionados, podendo bem precipitar ou bem ser separados por centrifugação na fase aquosa após uma de etapa de *salting-out* (HAN *et al*., 2016). O EMR está disponível comercialmente em duas apresentações, em pó para d-SPE que pode ou não ser previamente ativado com água para melhores resultados (AGILENT, 2015), e compactado em forma de cartucho para SPE, o Captiva-EMR-Lipid, para o qual o fabricante recomenda o uso de um extrato aquoso 80:20 (fase orgânica/água ultrapura) na hora de passar através do cartucho (AGILENT, 2017).

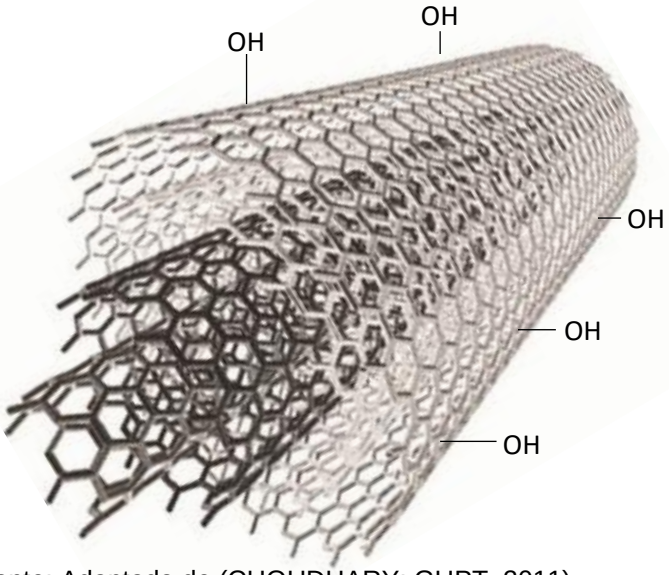
O sorvente Supel™ QuE Z-Sep+ é uma mistura de dois sorventes octadecilsilano (C_{18}) e sílica revestida com dióxido de zircônio com uma razão ZrO_2:C_{18} de 2:5 (LOZANO *et al.*, 2014). É considerado mais eficiente na remoção de gorduras e pigmentos que os sorventes tradicionais PSA/C_{18} (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015).

Os nanotubos de carbono (CNTs, do inglês *Carbon Nanotubes*) são folhas de grafeno enroladas cuja estrutura exata depende dos diferentes ângulos e curvaturas em que uma folha de grafeno pode ser enrolada. Quando dois ou mais nanotubos de carbono estão aninhados um dentro do outro, passam a ser considerados nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs, do inglês *multiwalled carbon nanotubes*) (KAROUSIS; TAGMATARCHIS; TASIS, 2010).

Devido à sua grande área superficial, estrutura única com cavidade interna, e estabilidade química e física, os MWCNTs podem ter excelente capacidade de adsorção (LIAO *et al*., 2014). Sua superfície dramaticamente hidrofóbica (WANG *et al*., 2007) possui capacidade de estabelecer interações π-π com coextrativos, removendo componentes da matriz, como açúcares, ácidos graxos (LI *et al*., 2013) e pigmentos (ABDULLAH; TAJUDDIN; YUSOF, 2018). As multicamadas de folhas de grafeno permitem também prender moléculas pequenas, o que faz dos MWCNTs sorventes bastante versáteis (LI *et al*., 2013). Além disso, suas capacidades de adsorção e dispersibilidade podem ser aumentadas pela introdução de diferentes grupos funcionais em sua superfície, como hidroxila, grupo carboxila, polímeros e assim por diante (ABDULLAH; TAJUDDIN; YUSOF, 2018). Na Figura 2, pode-se observar o diagrama esquemático de um nanotubo de carbono de parede múltipla modificado com grupos hidroxila.

Os MWCNTs têm sido usados eficientemente como sorventes em d-SPE para análise de agrotóxicos em amostras de água (ASENSIO-RAMOS *et al*., 2011), óleo de amendoim (SU *et al*., 2011), tomate, maçã, berinjela, soja, chá verde, peixe e fígado de porco (LI *et al*., 2013), tabaco (LIAO *et al*., 2014), pepino (WANG *et al*., 2021), entre outros.

Figura 2 - Diagrama esquemático de nanotubo de carbono de parede múltipla modificado com grupos hidroxila (MWCNT-OH)



Fonte: Adaptado de (CHOUDHARY; GUPT, 2011)

No caso da análise multirresíduo de agrotóxicos em tabaco, na Tabela 2 pode-se encontrar resumidamente alguns dos métodos de preparo de amostra reportados na literatura junto às várias técnicas instrumentais de análise utilizadas. É importante salientar que os métodos de extração vão depender muito do tipo de agrotóxico alvo em cada pesquisa e que sempre é necessário considerar a matriz altamente complexa do tabaco.

Como podemos observar na Tabela 2, o método QuEChERS se destaca entre os mais usados para a matriz tabaco além de possibilitar a extração de maior número de agrotóxicos de forma adequada. Outros métodos de preparo de amostra usados em tabaco para análise de agrotóxicos relatados na literatura são: extração sólido-líquido (SLE, do inglês *solid liquid extraction*), extração assistida por ultrassom (EAU), extração em fase sólida magnética (MSPE, do inglês *magnetic solid-phase extraction*), extração líquida pressurizada (PLE, do inglês *pressurized liquid extraction*), extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid liquid extraction*), dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*), extração por sorção com barra (SBSE, do inglês *stir bar sorptive extraction)* microextração em fase sólida (MSPE, do inglês *microscale solid phase extraction*) e microextração líquido-líquido dispersivo (DLLME, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*).

Os métodos para limpeza de extrato (*clean-up*) mais comuns reportados na literatura são extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*), extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) e cromatografia de exclusão por tamanho (GPC, do inglês *gel permeation chromatography*).

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continua)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Tabaco	40	UPLC/QTOF -MS	QuEChERS: 2 g amostra, 10 mL de H2O, 10 min repouso. 10 mL de ACN, agitar 2min. 4 g $MgSO_4$; 1 g NaCl; 1 g SCTD; 0,5 g SCDS; Vórtex 2 min; Centrif. 3 min a 10.000 rpm.	r-DSPE: 1 mL de sobrenadante. 10 mg de Fe_3O_4@C e 150 mg $MgSO_4$; Recolher com a ajuda de um ímã externo. Filtrar extrato, filtro de seringa 0,22 µm	0,0005 - 0,009	Chen *et al.*, 2022
Tabaco Virgínia	181	HPLC-HRMS	SLE: 20 g de homogeneizado (2 g de tabaco + 18 mL de H_2O 0,5% ácido acético), 10 mL de acetato de etilo + 10 g de Na_2SO_4. Vórtex 1 min, Centrifugação 3350 × g, 5 min.	d-SPE 2 mL de sobrenadante. 50 mg PSA + 50 mg C 18 + 25 mg GCB + 100 mg $MgSO_4$. Evaporar 1mL até a secura sob N_2. Reconstituir em ACN:H_2O 0,1% ácido acético (3:7). Filtrar, PTFE 0,2 µm	0,010-0,1	Paul *et al.*, 2021
Folhas de tabaco torradas	5	SFC-MS/MS	SLE: 2 g de amostra, 10 mL H_2O + 10 mL ACN. Vórtex 2 min, 1 g NaCl + 4 g $MgSO_4$, Vórtex por 2 min. Centrifugação, 800 rpm, 3 min.	SPE: 3 mL de sobrenadante. Passar através de coluna de extração em fase sólida PRIME sob gravidade. Coletar 5 mL. Filtrar, nylon, 0,22 µm. Diluir 200 µL de filtrado + 800 µL de ACN	0,00079-0,01036	Yang *et al.*, 2021
Folhas de tabaco em pó	47	GC-MS	SLE: Extrair 20 g de amostra homogeneizada (25 g de amostra em 225 mL de H_2O 0,5% de ácido acético). 10 mL AcEt + 10 g Na_2SO_4). Agitar 15.000 rpm, 2 min. Centrifugar 5000 rpm, 5 min. Alíquota de 3 mL de extrato. Misturar com 1 mL tolueno. Agitar em vórtex	d-SPE: 2mL de extrato anterior 150 mg PSA + 150 mg C_{18} + 75 mg GCB + 300 mg $MgSO_4$. Agitar em vórtex Filtrar, filtro PTFE, 0.22 µm.	0,007 - 0,015	Ghosh *et al.*, 2021
Fumo do tabaco	GC: 7 LC: 7	GC-ECD LC-MS/MS	QuEChERS: 2g amostra 8 mL de H2O, agitar. 15 mL de ACN, agitar vigorosamente. 1,5 g NaCl; 1,5 g SCTD; 0,750 g SCDS; 6,0 g MgSO4. Agitar 5 min a 300 rpm. Centrifugar 5 min a 10.000 rpm.	Para LC-MS/MS: 1 mL de sobrenadante Adicionar 9 mL de água Milli-Q. Agitar até homogeneizar. Pipetar 1,5 mL para análise por LC-MS/MS. Para GC-ECD: 5 ml de sobrenadante Evaporar a secura. Redissolver em 5 ml de n-hexano. Pipetar 1,5 ml para análise	---	López-Dávila *et al.*, 2020

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Tabaco em pó	1	2D-LC-MS/MS	QuEChERS: 2 g de tabaco, 10 mL de H_2O, agitar 1 min, 10 mL de ACN, agitar 2 min. Kit sal de extração Bond Elut QuEChERS, Agitação 2 min; Centrif. 5000 rpm, 10 min. Filtrar a camada ACN, análise 2D-LC-MS / MS.	d-SPE: Para análise LC-MS/MS: Limpar 1 mL kit d-SPE QuEChERS Agitar 2 min e centrif. a 5000 rpm, 10 min. Filtrar. Análise LC-MS/MS: Coluna XB-Fenil (primeira dimensão) Coluna ADME (segunda dimensão)	0,0023	Shen *et al.*, 2020
Folha de tabaco fresca Folha de Tabaco curada	3	LC-MS/MS	SLE: 5 g de folhas tabaco frescas ou 2 g de tabaco curado. 20 mL de acetonitrila Agitação em vórtex 3 min. 2 g de NaCl Agitação em vórtex 1 min. Centrifugar a 6000 rpm, 3 min.	d-SPE: 1 mL do sobrenadante; 40 mg de C_{18}. Vórtex 1 min. Centrifugação a 6000 rpm, 3 min. Filtrar, filtro de nylon de 0,22 µm	0,02–1,00	Yu *et al.*, 2019
Tabaco em pó	4	GC- ECD	Coluna recheada com a amostra: 1 g de amostra foi colocado em uma coluna de vidro (17 cm de comprimento x 1,5 cm de diâmetro interno). Extrair durante a noite usando 15 mL de n-hexano. Lavar 2 vezes com 10 mL de n-hexano. Evaporar até 1 mL em rotaevaporador.	SPE: Adicionar extrato em coluna Florisil® (40 mm de comprimento x 7 mm de diâmetro interno). Eluir com 25 mL de uma mistura de n-hexano-diclorometano (85:15). Concentrar até 0,5 mL	0,00005-0,0001	Quadroni; Bettinetti, 2019
Solo Folhas de tabaco verde e curadas	2	LC–MS/MS	SLE: 5 g de amostra, 20 mL de acetonitrila 0,5 g de $MgSO_4$ anidro. Agitar em vórtex por 3 min. Centrifugar 5 min a 6000 rpm. Filtrar. Evaporar a 40 ° C.	d-SPE: Ao resíduo foi adicionado 1 mL de metanol, 30 mg de PSA e 30 mg de C_{18} Agitação por vórtex 1 min. Filtrar, filtro nylon, 0,22 µm	0,005–0,02	Qin *et al.*, 2019
Solo Folhas de tabaco verde e curadas	1	LC–MS/MS	QuEChERS modificado: 2 g de amostra; 5 mL H2O e 20 mL de metanol. Vórtex 1 min. Sonicação 20 min. 5 g de NaCl e 5 g de MgSO4. Vórtex 1 min Centrifugação RCF 4025 × g, 5 min	d-SPE: 1 mL de sobrenadante; 50 mg de PSA, 50 mg de C_{18}. Vórtex 30 s. Centrifugação RCF 3220 × g, 5 min. Filtração, filtro nylon, 0,22 µm	0,010–0,050	Gong *et al.*, 2018

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Tabaco em pó	9	GC-MS	MSPE: Síntese de grafeno magnético. Modificação do grafeno magnético para preparar: magG@PDA@Zr-MOF. 0,5 g de amostra; 11 mL de solução acetonitrila/água (1/10, v/v). Extração assistida por micro-ondas (300 W) por 1 min. Centrif. 3 min, 5000 rpm. 40 mg de magG@PDA@Zr-MOF dispersos em 3,50 mL de sobrenadante. Vórtex 1 min. Coletar os nanocompósitos magnéticos, com ajuda de um campo magnético externo, descartar sobrenadante. Eluir agrotóxicos com 1 mL de ACN, ultrassom por 5 min. Coletar eluente usando um ímã forte de Nd-Fe-B. Adicionar sulfato de sódio anidro para remover a água. Concentrar do sobrenadante por evaporação até 100 µL com N_2 a 323 K		0,03434-0,1447	Jin *et al.*, 2018
Folha de tabaco seca	115	GC–Q-TOF-MS	QuEChERS: 2 g de amostra; 10 mL de água deionizada. Agitar. Repouso 10 min. 9,85 mL de ACN. Vórtex 2 min. Repouso 10 min a -20°C. 5 mL de tolueno, 4 g de $MgSO_4$, 1 g de NaCl, 1 g SCTD e 0,5 g SCDS, Vórtex 2 min. Centrifugação 4000 rpm, 5 min.	d-SPE: 0,75 mL do sobrenadante; 150 mg de MgSO4 e 25 mg de PSA; Agitação 2 min Centrifugação 4000 rpm, 5 min. Evaporar 0,3 mL de sobrenadante até secura sob N_2. Reconstituir em 0,3 mL de n-hexano/acetona (9:1, v/v).	0,001–0,020	Chen *et al.*, 2018
Solo Folhas de tabaco verde e curadas	3	LC–MS/MS	SLE: 1 g de amostra; 20mL de ACN 0,1% de ácido acético. Agitação 2500 rpm, 5 min. Centrifugação a 4025 g, 3 min	d-SPE: 1 mL de sobrenadante; 50mg C_{18}. Vórtex 1 min, Centrifugação 6708 g, 3 min. Filtração, filtro de seringa 0,22 µm	0,006-1	Wu *et al.*, 2018
Solo Folhas de tabaco verde Folhas de tabaco curadas	1	LC-MS/MS	UAE: 5 g de tabaco; 40 mL de diclorometano. Sonicação 15 min. Filtrar (1 cm de Celite® 545 em funil de areia de vidro). Secagem do extrato com $MgSO_4$. Evaporação dos até à secura a 40 ° C. Redissolver em 1 mL de MeOH	d-SPE: 1 mL de extrato; 50 mg de PSA e 50 mg de C_{18}. Vórtex, 30 s; Centrifugação a 3354 × g por 3 min. Filtração, filtro de nylon 0,22 µm	0,02-0,1	Chen *et al.*, 2017

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Folhas de tabaco e outras plantas	72	UHPLC–MS/MS	QuEChERS: 3 g de amostra; 10 mL de ACN 5% ácido fórmico (v/v). Vórtex, 1 min. 1,5 g de NaCl e 4,0 g de $MgSO_4$. Agitação vigorosa 1 min Centrifugação 8 min, 2600g	d-SPE: 2 mL do sobrenadante; 300 mg de MgSO4, 50 mg C_{18} e 10 mg GCB. Vórtex, 1 min. Centrifugação a 2600g, 8 min. Filtração, filtro nylon de 0,2 µm Diluição 5 vezes com água ultrapura	0,016-0,160	Viera *et al.*, 2017
Tabaco curado	114 compostos	GC–MS/MS	SLE: 2 g de amostra; 5 g de $MgSO_4$; 20 mL de ACN. Vórtex, 10 min, 2500 rpm; Centrifugação 4000 rpm, 10 min. Coletar 5 mL de sobrenadante.	SPE: Coluna Cleanert TPT SPE (com 2 cm $MgSO_4$). Pré-ativação da coluna 5mL de acetonitrila/tolueno (3: 1) Transferir 5 mL do sobrenadante para a coluna. Eluição com 15 mL de acetonitrila/tolueno (3:1) a 2,0 mL/min. Coletar frações de eluição Evaporar até secagem. Reconstituir em 2mL de n-hexano. Filtração, filtro orgânico de seringa, 0,45 µm.	0,00006–0,0176	Cao *et al.*, 2016
Folhas secas de tabaco em pó	41	SEC–GC–MS/MS	QuEChERS: 2 g de amostra; 10 mL de H_2O; Vórtex, 30 s; 10 min em repouso; 10 mL de ciclohexano/acetona (7:3, v/v). Vórtex, 2 min. Resfriamento a –20°C, 10 min. 4 g MgSO4, 1 g NaCl, 1 g SCTD e 0,5 g SCDS. Vórtex, 2 min. Centrifugação 4000 rpm, 5 min. Filtração, filtro de fase orgânica, 0,22 µm	SEC: 10 µL de amostra foram injetados no sistema SEC (FM: ciclohexano: acetona 7: 3, v/v; 0,1 mL/min). Eluente SEC dividido em três partes: 1) Micromoléculas interferentes 2) Maioria dos analitos e alguns interferentes 3) Macromoléculas interferentes Drenar a primeira e a terceiras partes. Coletar segunda no loop de 200 µL por 2 min e, injetar no GC–MS/MS	0,001 – 0,050	Guo *et al.*, 2016

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Tabaco em pó	UHPLC: 43 GC: 16	UHPLC-MS/MS GC-MS/MS	QuEChERS: 2 g de tabaco; 10 mL de H_2O; Agitação à mão 1 min; 10 min de repouso; 10 mL de acetonitrila resfriada a -18 °C. Vórtex, 1 min. 4 g de $MgSO_4$, 1 g de NaCl, 1 g de SCTD e 1 g de SCDS. Agitação manual, 1 min. Centrifugação, 3500 rpm, 8 min.	d-SPE: 4mL em repouso a no freezer por 3 h (-18 ° C) para *LTP* (do inglês *Low Temperature precipitation*) 2 mL do sobrenadante, 300 mg de $MgSO_4$, 100 mg de PSA, 100 mg de GCB e 100 mg de C_{18}. Vórtex, 1 min. Centrifugação, 3500 rpm, 8 min. Filtração. UHPLC-MS/MS: 300 µL extrato,150 µL de H_2O, 550 µL de ACN. GC-MS/MS: 150 µL do extrato limpo	25 - 75	Bernardi *et al*., 2016
Tabaco curado, burley e oriental	37	LC–MS/MS	QuEChERS: 2 g de amostra, 5 mL de água ultrapura, Repouso por 10 min. 10 mL de ACN. Agitação em vórtex, 2 min. 4 g $MgSO_4$ anidro, 1 g de NaCl, 1 g SCTD e 0,5 g de SCDS. Vórtex, 2 min. Centrifugação 3 min.	d-SPE: 1 mL de sobrenadante. 10 mg de *MWCNT*s (diâmetro externo = 20-30 nm, área superficial > 110 m2/g) e 150 mg de $MgSO_4$ anidro. Vórtex, 3 min. Filtração, filtro de seringa, 0,22 µm	0,00046–0,02857	Yu *et al*., 2015
Tabaco moído	10	GPC-GC-MS/MS	QuEChERS: 2g de amostra; 10 mL de H_2O. Vórtex 30 s, Repouso por 10 min. 10 mL de ACN. Refrigerar –20°C, 10 min. 4g $MgSO_4$ + 1 g NaCl + 1g SCTD + 0,5 g SCDS. Agitação à mão, 30 s. 5 mL de tolueno; Vórtex, 2 min, centrif. 4000 rpm, 5 min. Coletar sobrenadante	Adsorvente magnético: 0,5 mL de extrato; 80 mg de adsorvente magnético (GCB/PSA/Fe_3O_4). Vórtex 1 min. Coletar sobrenadante com auxílio de um ímã externo	$3,1x10^{-6}$ – $340x10^{-6}$	Luo *et al*., 2015
Tabaco em pó	259	LPGC–MS/MS	SLE: Pré-imersão das amostras em 225 mL, H_2O 0,5% de ácido acético, 30 min. 20 g de homogeneizado (2 g de tabaco + 18 mL de H_2O 0,5% de ácido acético). 10 mL de AcEt (+10 g Na_2SO_4). 3 mL de sobrenadante + 1 mL de tolueno	d-SPE: 150 mg PSA + 150 mg C_{18} + 75 mg GCB + 300 mg $MgSO_4$ Vórtex 2 min. Centrifugar 7000 rpm, 7 min. Filtrar, PTFE, 0.2 um	0,0002–0,00195	Khan *et al*., 2015a

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Folhas de tabaco secas ao ar	223	GC-µECD/NPD nitrogênio-fósforo GC/MS/MS	1) LSE 5 g de tabaco moído; 50 mL de ACN. Agitação rotativa, 2500 rpm, 30 min. 5 g de Celite, 5 g de $MgSO_4$ Re-extrair com 20 mL de ACN, agitar 30 min. Combinar extratos Evaporação a 40 °C. Redissolver em 2 mL ACN	1) SPE Passar 10 mL de ACN 1 mL de extrato de tabaco Eluir com 5 mL de ACN Evaporar a 40 °C até secura. Redissolver em 2 mL n-hexano/acetona 9:1.	0,001 - 0,0012	Lozowicka; Rutkowska ; Hrynko, 2015
			2) MSPD 2 g de tabaco; 4 g de Florisil®, homogeneizar, 2 min. Transferir para uma coluna de vidro contendo 5 g $MgSO_4$. Eluição por gravidade com 25 mL ACN. Evaporar a 40 °C até secura. Redissolver em 2 mL de ACN	2) Mesmo de acima	0,001 - 0,0012	
			3) QuEChERS 2g de tabaco moído; 10 mL de água; Agitação manual 1 min. Repouso 10 min. 50 mL de acetonitrila. Vórtex 7 min 4g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 1g Na3C6H5O7 • 2H2O, e 0,5 g Na2 HC6 H5O7 * 1,5H2O Vórtex 5 min, 4500 rpm. Coletar sobrenadante	3) d-SPE: 6 mL do extrato: 150 mg de $MgSO_4$, 25 mg de PSA e 2,5 mg de GCB. Agitação em vórtex 0,5 min. Centrif. 10 min, 4500 rpm. Evaporação de 2 mL do extrato a 40 °C até quase a secura. Redissolver em 2 mL de n-hexano/ acetona 9:1	0,001 - 0,0012	
Tabaco em pó	47	GC-MS/SIM	SLE: 2 g tabaco + 18 mL água; 10 mL EtOAc + 10 g Na_2SO_4. Vórtex, 15000 rpm, 2 min Centrifugar, 5000 rpm, 5 min, 3 mL de extrato de EtOAc. Adicionar 1000 µL de toluene. Vórtex, 30 s.	d-SPE: 150 mg PSA + 150 mg C_{18} + 75 mg GCB + 300 mg $MgSO_4$ Agitar em vortex Filtrar, PTFE, 0.22 µm	0,0075-0,015	Khan *et al.*, 2014

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Tabaco e solo	3	UPLC–MS/MS	QuEChERS: 2 g de amostra; 10,0 mL de água; 10,0 mL de ACN. 200 µL de ácido fórmico. Vórtex, 1 min. Resfriamento -18 °C ,10 min. 4 g de $MgSO_4$ anidro, 1 g de NaCl 1 g de SCTD e 0,5 g de SCDS. Vórtex 1 min. Centrifugar, 3.800 rpm, 1 min.	d-SPE: 1,00 mL do sobrenadante 0,25 g de PSA e 1,50 g de $MgSO_4$ anidro. Vórtex 2 min. Centrifugar 3.800 rpm, 2 min. Alíquota de 200 µL + 100 µL de ACN e 700 µL de H_2O. Filtrar, filtro de membrana de poliéter sulfona, 0,22 µm	$40x10^{6}$ – $420x10^{-6}$	Xiong *et al.*, 2014
Tabaco em pó	118	LC–MS-MS.	QuEChERS: 2,0 g de amostra; 10 mL de água ultrapura Vórtex 1 min. Repouso 10 min, 10 mL de ACN. Vórtex 1 min. Resfriamento -18 ° C durante 10 min. 4 g de MgSO4, 1 g de NaCl, 1 g de SCDS e 0,5 g de SCTD Vórtex 1 min. Centrifugar 5000 rpm, 1 min	d-SPE: 1,00 mL do sobrenadante. 0,025 g de PSA e 0,15 g de $MgSO_4$ anidro. Vórtex 1 min. Filtrar, filtro PVDF, 0,22 µm. 200 µL do filtrado + 800 µL ACN.	0,007-0,03	Yang *et al.*, 2014
Tabaco curado	2	UPLC–MS-MS.	UAE: 5 g de amostra; 20 mL de acetona. Extração sob ultrassom, 10 min. Centrifugação 8.000 rpm, 5 min. Resíduo re-extraído com 20 mL de acetona Sobrenadantes coletados. Evaporação até secura 35°C. Redissolvido em 10 mL de acetato de etila-ciclohexano (50:50, v/v). Filtração (tamanho do poro 0,45 µm)	CPG: Eluição: AcEt:ciclohexano (50:50, v/v) a 4,7 ml/min. Coletar fração entre 10-20 min. Evaporar à secura, 35 °C. Redissolver resíduo em 2 ml de acetona. Purificar por SPE-LC-NH_2. Acondicionar MeOH e acetona, carregar 2 mL de extrato. Coletar eluente. Lavar com MeOH, 1 mL de ácido acético, descarte o eluente. Eluição: 5 mL de MeOH, coletar eluente. Evaporar à secura, 40°C; Redissolver: 1 mL de MeOH:água (1:1, v/v). Filtrar, filtro 0,45 µm	0,01	Chen *et al.*, 2014

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Tabaco moído	7	GC-ECD	SLE: 5 g de tabaco; 25 mL de água destilada, repouso 3 horas. 200 mL de acetato de etilo 35 g de Na_2SO_4. Agitar 3 min, filtrar sobre 20 g de Na_2SO_4. Evaporar 100 mL do extrato até 1 ml a 37°C. Lavar com 2,5 mL AcEt, coletar e juntar ao extrato anterior Adicionar 2,5 ml de ciclohexano. Vórtex. Centrifugar, 3 min, 2300 rpm. Coletar 3 mL de sobrenadante	SPE: Coluna de limpeza: tampada com lã de vidro, 5 g de Florisil® ativado usando 1:1 AcEt:ciclohexano e completada com ~ 1 g de Na_2SO_4 anidro. Carregar 3 ml de extrato. Eluir com 100 ml de acetato de etilo: ciclohexano (1:1). Evaporar eluente até à secura. Re-constituir com 1 mL de ACN	0,1	Mureya, Musuna-Garwe, 2014
Folha de tabaco seca no forno	10	GC-MS/MS	SLE-LLE: 1 g de amostra; 20 mL de mistura de acetonitrila/água (1: 1). Agitar 45 min em agitador orbita 150 rpm. Filtrar Extração liquido-liquido com 40 mL de hexano	SPE: Coluna de 2 g de Florisil® (60/100 mesh) entre duas camadas de $MgSO_4$. Condicionar com hexano. Carregar o extrato, Coletar eluato. Evaporar à secura. Redissolver em hexano	0,006-0,012	Ghosh, *et al.*, 2014
Folhas de tabaco curadas	12	GC-MS/MS	SLSDE-DLLME: 1g de tabaco + 10 mL de ACN +200 mg *MWCNT*s. Vórtex, 20 s; Sonicar 10 min. Centrifugar, 3 min, 4.500 rpm. DLLME: 1 mL de extrato de ACN. Adicionar 100 µL de clorofórmio. Injetar a mistura em um tubo de centrífuga com tampa contendo 4 mL de água. Vórtex, 1 min; Centrif. 3 min, 4.500 rpm; Remover sobrenadante. Transferir a fase de clorofórmio para análise.		0,005 - 0,015	Liao *et al.*, 2014
Tabaco em pó	6	UPC^2-PDA	QuEChERS: 2 g de amostra; 10 mL de água ultrapura Repouso por 10 min. 10 mL ACN Vórtex 2 min; Resfriar –18 °C, 10 min. 4 g of $MgSO_4$, 1 g of NaCl, 1g SCTD + 0,5 g SCDS. Vórtex 2 min, 2.000 rpm. Centrifugar, 5 min, 6.000 rpm. Coletar sobrenadante	SPE: Condicionar coluna de Florisil® com 6 mL de n-hexano. Passar 5 mL de extrato na coluna. Coletar extrato filtrado. Passar 5 mL de n-hexano:acetona (9: 1) (1mL/min) pela coluna. Secar. Coletar eluato e evaporar até secura. Redissolver em 1,0 mL de ACN. Agitar em vórtex. Filtrar.	0,0127 - 0,0245	Weiyun *et al.*, 2014

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Folhas de tabaco e cigarros	18	LC-GC-ECD	UAE: 1 g de amostra; 10 mL de n-hexano:AcEt (1:1 v:/v). 30 min de extração ultrassônica Centrifugar, 4500 rpm, 5 min.	SPE: Ativar coluna de Florisil® com n-hexano. Passar 2 mL de extrato. Eluir com 4 mL de n-hexano. Coletar as frações, misturar.	0,0045-0,010	Qi *et al.*, 2014
Tabaco pulverizado	159	GC-MS/MS	QuEChERS: 2 g de tabaco + 10 mL de água ultrapura. Vórtex por 30 s, Repouso 10 min. 10 mL de ACN, Vórtex por 2 min; Resfriamento -20 °C, 10 min. 4 g of $MgSO_4$ + 1 g of NaCl + 1g SCTD + 0,5 g SCDS. Agitar à mão por 30 s. 5 mL de tolueno. Vórtex, 2 min. Sem centrif.	d-SPE: 1 mL do extrato. 150 mg de $MgSO_4$, 50 mg de PSA e 50 mg de C_{18}. Vórtex, 2 min. Centrifugar 5 min. Coletar sobrenadante.	0,050-0,250	Chen *et al.*, 2013
Tabaco	13	GC-ECD	HF-SLSDE: Florisil® previamente acondicionado. 0,5 g de amostra + 2 ml de hexano, agitar até homogeneizar. Repouso durante a noite a 4°C (Evaporação do Solvente) 0,5 g de amostra. Sorvente de dispersão de mistura 3:1 (Florisil®:amostra). 15 mL de hexano. Irradiação ultrassônica 60 °C, 100 W. Filtrar, filtro de vidro, G4, 4-7 µm. Concentrar o extrato, sob N_2, até 1,0 Ml. Análise GC-ECD		0,001-0,0045	Zhou, Xiao, Li, 2012
Folhas secas de tabaco	7	HPLC-PDA	SLE: 5 g de tabaco; 100 mL de acetona Agitação 12 h, 150 rpm. Evaporar até 5 mL em rotaevaporador a vácuo.	SPE: Florisil® com camada $MgSO_4$ anhidro. Carregar o extrato de acetona. Eluir com hexano bidestilado (65%) e DCM (35%) a 5 mL/min. Evaporar a vácuo até secura. Re-solubilizar em 1 mL de ACN	$30x10^{-6}$ - $100x10^{-6}$	Rahman *et al.*, 2012
Tabaco moído	52	HPLC–MS/MS	UAE-SPE: 2g de amostra; 6,25mL de H_2O 1% ácido acético 1%; 12,5 mL de MeOH. Ultrassom 5min. Agitar 5min. Centrifugar. Diluir 4 mL do sobrenadante com 1,33 mL de solução de NaCl a 20%. Misturar. Carregar em cartucho Chem Elut; Eluição: Fração apolar: 8mL de pentano. Fração polar e polar média: 8mL de DCM	Cada fração: d-SPE, 500mg $MgSO_4$ + 200mg PSA. Agitar, Centrifugar. Fração pentano: SPE Florisil®, eluição com éter dietílico. Evaporar até secura. Redissolver MeOH 5 mM de acetato de amônio 0,1% de ácido acético; Filtrar Fração DCM: SPE Florisil®, Eluição com acetona. Diluir acetato de amônio 10 mM e ácido acético a 0,2%. Filtrar.	0,010	Mayer-Helm, 2009

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Tabacos Burley, Orient, Virginia, Snuff e Cigarro	11	LC–ESI-MS/MS	UAE: 1g de tabaco moído; 12,5 ml de água, 5 min de repouso. 25 ml de metanol, ultrassom e agitação por 5 min. Centrifugar. 4 mL do sobrenadante diluído com 1,33 mL de cloreto de sódio aquoso a 20% (p/p).	SPE: 5 mL da solução anterior aplicada em cartucho Chem Elut contendo terra de diatomáceas. 5 min de equilíbrio. Eluir dois vezes 8 ml de ciclohexano/tolueno (85/15, v/v). Evaporar a 30 °C sob N_2 Reconstituir com 400 µL de metanol e 400 µL de acetato de amônio aquoso 10 mM. Filtrar em PTFE, 0,45 µm	0,01-0,5	Mayer-Helm, Hofbauer, Müller, 2008
Folhas secas de tabaco moídas	49	GC-MS/MS	1) LLE: 5 g de amostra; 25mL de H_2O; 50mL de ACN. Homogeneizar por Ultra Turrax, 1 min. Adicionar NaCl. Agitar, filtrar. Concentrar 5mL até a secura com N_2. Redissolver com 1,5 mL de acetona:n-hexano (20:80)	SPE: Carregar 1mL de extrato no cartucho Florisil® (1 g, 6 mL) previamente condicionado. Eluição: 5 mL de acetona/n-hexano (20:80). Concentrar eluato até a secura com N_2. Redissolver em 1mL de acetona.	0,012-0,102	Lee *et al*., 2008
			2) PLE: 2,5 g de amostra + 3 g de hidromatriz. Extrair com ASE 200. 50mL de acetona; 100◦C; pressão: 1500 psi; aquecimento: 5 min; tempo de extração: 3 min. Concentrar 10mL até a secura N_2. Redissolver com 1 mL de acetona/n-hexano (20:80).	SPE: Carregar 1 mL de extrato em cartucho Florisil® previamente condicionado Eluir com 5 mL de acetona/n-hexano (20:80). Concentrar eluato até a secura com N_2. Redissolver com 1mL de acetona.	0,007-0,068	
			3) QuEChERS: 2 g de amostra; 10mL de água e 10mL ACN Agitar vigorosamente 1 min. 4 g of $MgSO_4$, 1 g of NaCl, 1g SCTD + 0,5 g SCDS Agitar vigorosamente 1 min. Centrifugar, 5 min, 6000 rpm.	d-SPE: Para 1mL do extrato: (1) 25mg PSA + 150mg $MgSO_4$ (2) 25mg PSA + 25mg of C_{18} + 150 $MgSO_4$ (3) 25mg PSA + 2.5 mg + GCB + 150mg $MgSO_4$ Agitar vigorosamente, 30 s, centrifugar.	0,015-0,157	

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Tabaco curado, burley e oriental	49	GC-MS/MS	QuEChERS: 2 g tabaco; 10 mL ACN; 100 µL ISTD mirex Agitar 1 min. 4g $MgSO_4$+ 1g NaCl + 1g SCTD + 0,5 g SCDS. Agitar 1min Centrifugar 6000 rpm 5min	d-SPE: Para 1mL de extrato 1) 25 mg PSA + 150 mg $MgSO_4$ 2) 25 mg PSA + 25 g C_{18}+ 150 mg $MgSO_4$ 3) 25 mg PSA + 2.5 mg GCB+ 150 mg $MgSO_4$ Vórtex 30 s; Centrifugar	0,015-157	Lee, Jang, Hwang, 2007
Tabaco e chá	5	GC-MS	SBSE: 15 g da amostra; 30 mL de metanol. Ultrassom por 30 min. 2 mL da fase de metanol sobrenadante + 18 mL de água bidestilada. Extrair com barra sorptiva de agitação (comprimento: 10 mm; espessura: 0,5 mm; 1100 rpm por 1 h) Remover barra de agitação, enxaguar com água bidestilada, secar com papel de filtro Dessorção: 20-300 °C, 4 min, fluxo de hélio. Analitos dessorvidos coletados a 0 °C injetor CIS-4. Injetor CIS-4 a 300 °C. Análise GC-MS		0,033-0,114	Hou *et al*., 2007
Tabaco curado	4	GC/MS	SPME: 0,2 g de tabaco moído; 25 mL de água deionizada, Sonicação, Banho de ultrassom, 10 min. Filtrar sobrenadante. Fibra comercial e suporte (100 µm PDMS), antes do uso, deixar sob hélio, entrada do GC aquecida a 280˚C, 30 min. Agulha de SPME penetra no septo do frasco de amostra e a fibra foi baixa até a solução. Sonicar 180 s. Dessorção: 280˚C na porta de injeção do GC por 2 min. Análise		0,0092-0,036	Shen *et al*., 2006
Tabaco curado	18	HPLC-MS/MS	UAE: 1 g de tabaco; 40 mL de metanol; Agitar vigorosamente. Sonicar em ultrassom, 10 min. Agitar, 2.000 rpm, 10 min. Centrifugar 1 mL do extrato, 16.000 g, 10 min.	Diluir, 500uL do sobrenadante 1:1 (v/v) com acetato de amônio aquoso 10 mM. Filtrar, 0,45 µm	$10x10^{-6}$-$40x10^{-6}$	Mayer-Helm; Hofbauer; Müller, 2006
Tabaco moído curado	18	GC–ECD	MSPD-SSEC: Condicionar Florisil®; Misturar e triturar 5 g de folhas de tabaco moídas e 5 g de Florisil® pré-tratado e desativado; Introduzir em Soxhlet contendo uma frita grossa de 40 µm, preenchida com 5,0 g de Florisil® desativado. Formadas duas camadas separadas, Adicionar 60 mL de n-hexano. Extrair com Soxhlet em refluxo 6 h. Concentrar o extrato até 1,0 mL sob N_2. Análise GC-ECD		0,01-0,02	Cai *et a*l., 2005

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Tabaco seco ao ar, tabaco seco ao ar quente, tabaco oriental e Mistura de tabacos	12	LC-MS/MS	Com base na metodologia DFG S19: 15 g de amostra; 100 mL de água 200 mL de uma mistura de ciclohexano : acetato de etilo (1:1) + 20 g de NaCl. Filtrar. Extrair 200 mL de sobrenadante com 100 mL de ciclohexano : acetato de etila (1:1) + 20 g NaCl Remover e descartar fase aquosa Agregar 25 g de $MgSO_4$ anidro sobre camada orgânica. Agitar, Filtrar MgSO4 anidro. Evaporar até 2 mL. Agregar 15 mL de mistura de ciclohexano : acetato de etila (1:1) + 2 g de $MgSO_4$ anidro Reservar 10 mL de sobrenadante para limpeza por GPC.	GPC: Separar eluato de GPC em três porções. 1ra) Evaporar até secura. Redissolver em 3 mL de solução de formiato de amônio 10 mM em MeOH:água (20:80). Filtrar Análise LC 2da) 300 µL de extrato, agregar 2700 µL de formiato de amônio 10 mM em MeOH:água (20:80). Filtrar. Análise LC 3era) 60 µL de extrato, agregar 2940 µL de formiato de amônio 10 mM em MeOH:água (20:80). Filtrar. Análise LC	0,1	Otte; Intorp, 2005
Tabaco curado	3	HPLC-UV-ESI/MS	UAE: 200 g de tabaco; 100 ml de AcEt. Extração ultrassônica (UE), 30 min. Filtrar. Evaporar 50 mL do filtrado até 10 ml sob vácuo. Filtrar, filtro de membrana, 0,45 µm.	GPC: Coluna Bio-Bead S-X3, FM: ciclo-hexano-acetato de etilo (1:1, v/v), 5 ml/min). Injetar 5 ml de sobrenadante. Coletar fração entre 27-45 min. Evaporar até 1 ml sob vácuo. Redissolver com 1 ml de MeOH-água (1:1, v/v) sob ultrassom. Filtrar, filtro de seringa 0,45 µm	0,05	Liu *et al*., 2005
Tabaco curado	3	HPLC-UV-ESI/MS	UAE: 200 g de tabaco; 100 mL de acetato de etila Extração ultrassônica (UE), 30 min. Filtrar sobrenadante. Evaporar 50 mL de sobrenadante até 10 mL, sob vácuo. Filtrar, filtro nylon 0,45 µm.	GPC: Coluna Bio-Bead S-X3 400 x 25 mm, FM: ciclohexano-acetato de etila (1:1, v/v), 5 mL/min. Injetar 5mL de filtrado. Coletar fração entre 25-40 min. Evaporar até quase a secura sob vácuo. Redissolver 1 mL de MeOH-água (1:1, v/v). Filtrar	0,05-0,08	Liu *et al*., 2004

Tabela 2 – Métodos de preparo de amostra para análise de agrotóxicos em tabaco

(continuação)

Matriz	N° de agrotóxicos	Técnica Instrumental	Preparo de amostra		LOQ (mg kg^{-1})	Referência
			Extração	Limpeza do extrato (*clean-up*)		
Tabaco Burley, curado e oriental	24	GC–MS–MS HPLC-FL	PLE: Instrumento ASE 200 (100°C; 100 atm; 5 min de aquecimento; 3 min extração; purga: N_2, 60 s; 3 ciclos). 7,5 g de amostra; 3 g terra de diatomáceas. Acetona como solvente de extração. Volume de extrato: 60mL. Adicionar 1 mL de tolueno. Evaporar até 1mL, 55°C; 0,7 atm; Lavar resíduo com 0,5 mL de tolueno	SPE: 1) Organoclorados e 2,6-dinitroanilinas: Cartucho de Florisil®, seguido de sílica gel. Análise GC–MS–MS. 2) Acilalaninas e organofosforados: Cartucho de sílica gel seguido de GCB. Análise GC-MS-MS. 3) N-metilcarbamato: Cartucho aminopropil seguido de GCB. Análise HPLC-FL	$0,010x10^{-3}$-$0,500x10^{-3}$	Haib; Hofer; Renaud, 2003
Tabaco moído Fumaça de cigarro	5	GC–ECD	UAE-LLE: 10,0 g de tabaco ou discos de filtro Cambridge (após a coleta de fumaça) 100mL de acetona. Extrair em ultrassom 30 min, Filtrar; Re-extrair com 50mL de acetona, ultrassom 10 min. Coletar extratos. Agregar 25 ml de éter de petróleo, 10 mL de solução saturada de NaCl, 100 mL de sulfato de sódio 2%. Extrair 4 vezes com 25 ml de éter de petróleo, coletar extratos. Adicionar $MgSO_4$ anidro Para fumaça de cigarro: Máquina de fumar para coletar fumaça: Borgwaldt RM 20 / CS. Coletar fumaça de 60 cigarros coletados em um filtro Cambridge. Extrair conforme descrito acima	SPE: Evaporar o extrato de éter de petróleo até 2mL, pressão baixa, 40°C. Carregar em cartucho Florisil® com 3% de umidade Eluição: dez frações de 10 mL de éter de petróleo:acetato de etila (20:80, v/v) Descartar as três primeiras frações e as duas últimas. As frações coletadas foram combinadas Evaporar até 1 mL Análise GC-ECD	0,014-0,082	Cai *et al.*, 2002

Alguns trabalhos na literatura contrastam diferentes metodologias de extração. Lee e colaboradores (2008), por exemplo, compararam a eficiência e o número de compostos recuperados por diferentes técnicas de extração, especificamente LLE e PLE limpando o extrato com sorvente Florisil® com a extração por QuEChERS citrato usando diferentes limpezas d-SPE. Os autores obtiveram as melhores recuperações (70–120%) e RSD ≤ 0,7–18,9% com o uso de QuEChERS citrato e limpeza por d-SPE empregando 25 mg de PSA e 150 mg de $MgSO_4$ por mL de extrato.

Outro trabalho interessante mencionado na Tabela 2 é a extração empregando QuEChERS citrato e limpeza por d-SPE com 150 mg de $MgSO_4$, 50 mg de PSA, e 50 mg of C_{18} (por mL de extrato) realizada por Chen e colaboradores em 2013. No procedimento, os autores resfriaram o tubo antes da adição de sais de partição para diminuir a perda de analitos termolábeis e diminuíram a polaridade do meio adicionando tolueno após a extração com acetonitrila, conseguindo a determinação de 159 agrotóxicos com taxas de recuperação entre 70–120% e RSD ≤ 20%.

Também com o objetivo de evitar a perda de analitos termolábeis, Bernardi e colaboradores (2016) usaram ACN resfriado a -18 °C na extração empregando QuEChERS citrato, evitando assim o aumento de temperatura gerado na adição de sais pela reação de hidratação exotérmica do $MgSO_4$. Além disso, adicionaram uma primeira etapa de limpeza por precipitação por baixa temperatura, com o objetivo de precipitar parte dos coextrativos para logo depois fazer uma limpeza por d-SPE usando 150 mg de $MgSO_4$, 50 mg de PSA, 50 mg de C_{18} e 50 mg de GCB por mL de extrato, conseguindo a determinação adequada de 55 agrotóxicos com taxas de recuperação entre 70-120 % e RSD ≤ 20%.

Pode-se destacar também o uso de sorvente Florisil® nos trabalhos de Qi e colaboradores (2014); Ghosh e colaboradores (2014) e Quadroni e Bettinetti (2019) como alternativa na etapa de limpeza do extrato. O Florisil® é comumente empregado para remover interferências polares de resíduos de agrotóxicos.

2.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

Existe uma variedade de técnicas instrumentais que podem ser usadas para determinação de resíduos de agrotóxicos. Atualmente a cromatografia gasosa (GC,

do inglês *gas chromatography*) e a cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) são as técnicas mais difundidas para a separação dos agrotóxicos. Já a identificação e a quantificação dos agrotóxicos são facilitadas ao acoplar a GC ou LC com diferentes detectores, entre os que podemos citar: detectores eletroquímicos (de detecção direta ou de reação enzimática), detectores óticos (fluorescência, quimiluminescência, fosforescência) entre outros (LLORENT-MARTINEZ *et al*., 2011).

A técnica de GC pode ser combinada com diferentes tipos de detectores segundo a classe de agrotóxicos a serem determinados. Alguns sistemas de detecção usados são: detecção por captura de elétrons (ECD), detecção de condutividade eletrolítica (ELCD), detecção fotométrica de chama (FPD) e a detecção por nitrogênio-fósforo (NPD). Da mesma forma, LC também já foi combinada para análise de agrotóxicos com a detecção por fluorescência, UV, e arranjo de díodos (DAD) (LEDOUX, 2011). Adicionalmente, tanto GC quanto LC têm sido acopladas a detectores de espectrometria de massas com a grande vantagem de poder determinar, de forma simultânea, agrotóxicos de diferentes classes e identificar seus metabólitos e produtos de degradação na mesma aquisição (LEDOUX, 2011). Ainda, a espectrometria de massas é preferida pois fornece evidências confirmatórias da identidade dos compostos (FANG *et al*., 2012). O acoplamento de GC e LC com analisadores de massas inclui quadrupolo único, armadilha de íons e triplo quadrupolo. Neste trabalho, iremos priorizar os espectrômetros do tipo triplo quadrupolo.

2.4.1 Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS)

A cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS) é uma técnica que usa tamanho de partícula < 2 µm, altas pressões acima de 100 MPa, colunas mais curtas e de diâmetro interno menor (MALDANER; JARDIM, 2009). Essas características conferem análises mais rápidas e boas resoluções com picos mais estreitos usando menor volume de amostra e consumo de fase móvel, ao mesmo tempo que aumenta a resolução dos picos cromatográficos e a razão sinal/ruído, resultando em detecção de níveis muito baixos de concentração (ng L^{-1}) (OSHITA; JARDIM, 2015).

O acoplamento de uma excelente técnica de separação como a UHPLC com uma potente técnica de identificação de moléculas como a espectrometria de massas resulta em uma ferramenta muito útil. Para conseguir a identificação, no detector de espectrometria de massas, moléculas neutras de interesse são convertidas em íons, para logo depois medir como a trajetória destes íons resultantes respondem, sob pressão reduzida, a várias combinações de campos elétricos e magnéticos. Desta forma é possível identificar e quantificar os analitos de interesse (LANÇAS, 2009).

Para conseguir a ionização das moléculas que são separadas na coluna várias técnicas podem ser usadas. Em particular, na ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization)*, os analitos que eluem da coluna são liberados a pressão atmosférica na fonte de ionização através de um capilar de aço inox aonde é aplicada uma voltagem de 3000-5000 V, resultando na saída da amostra em direção ao detector na forma de aerossol. Após a dessolvatação das gotículas os íons formados pela atração eletrostática e pela pressão reduzida entram no espectrômetro de massas (LANÇAS, 2009).

A UHPLC-MS/MS tem sido amplamente usado na determinação de resíduos de agrotóxicos de diferentes classes, como: 310 agrotóxicos em espinafre (LEE *et al*., 2018), 55 agrotóxicos em tabaco (BERNARDI *et al*., 2016), 72 agrotóxicos em partes de plantas de cenoura, milho, melão, arroz, soja, silagem, tabaco, mandioca, alface e trigo (VIERA *et al*., 2017), entre outros.

2.5 ANÁLISE ESTATISTICA ANOVA E O TESTE DE TUKEY

A análise de variância (ANOVA), é um teste estatístico usado para determinar se mais de duas médias populacionais são iguais. O teste usa a função de distribuição F (distribuição de probabilidade) e informações sobre as variações de cada população para ajudar a decidir se a variabilidade dentro de cada população é significativamente diferente. É baseado na comparação do valor médio de um elemento comum.

O método da ANOVA testa as hipóteses de que:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = ... = \mu_k$$

$$H_1 = \text{Nem todas as médias são iguais}$$

O objetivo do teste ANOVA é primeiramente verificar se mais de duas médias populacionais são iguais e depois saber a diferença entre a estimativa dentro da amostra da variância e entre a estimativa amostral da variância e como calculá-los (MOLUGARAM; RAO, 2017). O teste de Tukey é um teste estatístico de comparação múltipla e é comumente empregado em conjunto com o teste ANOVA. Permite encontrar médias de um fator que são significativamente diferentes entre si, comparando todos os pares de médias possíveis (TUKEY, 1949).

ANOVA permite determinar se entre os resultados avaliados ao menos um é estatisticamente diferente. De forma prática, para um nível de confiança de 95 %, é possível concluir que, quando p-valor > 0,05 todas as médias comparadas são estatisticamente iguais, e quando p-valor ≤ 0,05, pelo menos uma destas médias é estatisticamente diferente.

Para aqueles grupos de medidas onde detecta-se uma diferença estatística, pode ser aplicado então, em um segundo momento, o teste de Tukey de comparação múltipla, com o objetivo de discriminar quais as medidas diferentes em comparação par a par. Num nível de confiança de 95%, podemos concluir que quando p-valor > 0,05 não existe diferença estatística entre dois grupos de medidas, e quando p-valor ≤ 0,05 conclui-se que os dois grupos de medidas são estatisticamente diferentes.

Desta forma, é possível concluir para mudanças no procedimento, se as mesmas alteravam ou não o resultado de recuperação de cada analito em particular. Na área da química, este tipo de testes estatísticos possui o uso bastante disseminado. Na área de análise de agrotóxicos, por exemplo, este tipo de ferramentas permitiu a otimização de metodologias de extração de carbamatos em solo (SUN; LEE, 2003), e a otimização de um método analítico para análise de resíduos de agrotóxicos em larvas *Tenebrio molitor* também chamadas de *larva-da-farinha* (KIM *et al*., 2020).

Da mesma forma, este tipo de ferramenta tem ajudado a determinar o efeito de agrotóxicos sobre parasitoides da espécie *Trichogramma* (KHAN *et al*., 2015b), o efeito de agrotóxicos sobre bagre prateado *Rhamdia quelen* (BECKER *et al*., 2009) ou suscetibilidade de nematóides entomopatogênicos à ivermectina e tiabendazol (BARRÓN-BRAVO *et al*., 2020).

2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Para assegurar que um método analítico forneça resultados significativos, o mesmo deve passar por um processo de validação a fim de comprovar que os resultados obtidos sejam confiáveis, reprodutíveis e interpretáveis sobre determinada amostra.

No Brasil, a ANVISA (BRASIL, 2017) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2020) estabelecem guias para a validação de métodos analíticos.

Alguns dos parâmetros de desempenho que a ANVISA (BRASIL, 2017) recomenda para avaliação do método são: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez. O Quadro 2 apresenta a definição e aplicação destes parâmetros.

Quadro 2 – Parâmetros analíticos avaliados no processo de validação do método otimizado.

(continua)

Parâmetro	Definição	Referência
Seletividade	Capacidade do método de medir exatamente um analito em uma amostra sem a interferência de outros componentes presentes na matriz	SANTE, 2019
Faixa linear de trabalho	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente.	INMETRO, 2020
Limite de quantificação (LOQ)	Menor concentração a partir da qual o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitáveis.	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017
Limite de detecção (LOD)	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	INMETRO, 2020
Precisão	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017

Quadro 2 – Parâmetros analíticos avaliados no processo de validação do método, com respectivas formas de aplicação, e critérios de aceitação.

(conclusão)

Parâmetro	Definição	Referência
Exatidão	Proximidade de resultado em relação a uma referência	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017
Robustez	Capacidade do método em resistir a pequenas variações	INMETRO, 2020
Efeito matriz	Aumento ou diminuição na resposta do detector na presença do analito no extrato da matriz em relação ao solvente	SANTE, 2019

Matriz branco: matriz isenta dos analitos em estudo

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa em Cromatografia e Espectrometria de Massas (CPCEM), no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos que foram utilizados durante a elaboração deste trabalho estão listados abaixo:

- ✓ Agitador vórtex - Biomixer QL-901 (Microtécnica, Brasil) e Phoenix, modelo AP56 (Brasil);
- ✓ Balança analítica, modelo APX-200 (Denver Instruments, EUA), modelo AUW 220D (Shimadzu, Japão) e modelo UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Centrífuga (Centribio, Brasil) e centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand – Alemanha e Eppendorf - Canadá);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct 3UV® (Millipore, França);
- ✓ Ultrassom Unique, modelo USC-1400 (Brasil);
- ✓ Estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal, Brasil)
- ✓ Sistema UHPLC-MS/MS Waters (EUA) equipado com:
    - Cromatógrafo líquido ACQUITY com sistema binário de bomba para operação de gradientes de alta pressão;
    - Coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C_{18} (50 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm) Waters (EUA);
    - Detector MS do tipo triplo quadrupolo, modelo Xevo TQ;
    - Interface/fonte de ionização por eletronebulização (ESI);
    - Compressor de ar Atlas Copco (Bélgica);
    - Gerador de nitrogênio PEAK NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia);
    - Sistema de aquisição de dados através do *software MassLynx* 4.2 (Waters, EUA).

3.2 MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

- ✓ Acetato de sódio anidro (J.T. Baker, EUA)
- ✓ Acetona grau HPLC (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Ácido acético glacial (J.T. Baker, EUA).
- ✓ Ácido fórmico ≥ 98% (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV® (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Cartuchos de SPE BeCarbon/PSA (250 mg/ 250 mg/ 3 mL) (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Cartuchos de SPE Bond Elut NH_2 (100 mg/1 mL) (Supelco, EUA)
- ✓ Cartuchos de SPE EMR-Captiva® (300 mg/3 mL) (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Extran® neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- ✓ Fase fluorada, dp 35-70 µm, diâmetro de poro 60 nm, 9% de carbono (Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brasil)
- ✓ Filtros de nylon (PTFE) de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Florisil® 60-120 mesh (J.T. Baker, EUA)
- ✓ Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*) de 2 e 4 mL;
- ✓ Hexano (95% n-hexano) (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquiidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Nanotubos de carbono de paredes múltiplas modificados com grupos hidroxila (MWCNTs-OH) grau industrial. Diâmetro: 50-80 nm, Comprimento: 10-20 um, Pureza > 88% (Nanostructured & Amorphous Materials, Inc, EUA)
- ✓ Nanotubos de carbono de paredes múltiplas modificados com grupos carboxila (MWCNTs-COOH) grau industrial. Diâmetro: 50-80 nm, Cumprimento: 10-20 um, Pureza > 88% (Nanostructured & Amorphous Materials, Inc, EUA)

- ✓ Padrões sólidos dos compostos em estudo com pureza 95,0 a 99,9% das empresas LGC Standards (Alemanha), Sigma-Aldrich (EUA) e ChemService (EUA) (Tabela 3)
- ✓ Quitosana (obtida e caracterizada no Laboratório de Operações Unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, a partir de resíduos de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*) com dp 62-76 (Rio Grande, Brasil)
- ✓ Quitosana (chitosan) baixo peso molecular, 5-85% desacetilado (Sigma Aldrich, EUA)
- ✓ Sorvente Bondesil C_{18} com diâmetro de partícula de 40 µm (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil PSA com diâmetro de partícula de 40 µm (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Sorvente carvão grafitizado (GCB) com dp de <200 nm (Supelco, EUA);
- ✓ Sorvente carvão grafitizado 100, 200, 325 e 400 mesh de fabricação local (Rio Grande do Sul, Brasil)
- ✓ Sorvente EMR-Lipid® (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Sorvente Supel™ QuE Z-Sep+ com dp de 40 µm (Supelco, EUA)
- ✓ Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão)
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca, com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha).
- ✓ Tubos tipo Eppendorf de 2 mL;
- ✓ Vidrarias comuns de laboratório.

3.2.1 Compostos selecionados e preparo das soluções analíticas

As soluções estoques individuais de cada analito foram preparadas na concentração de 1000 mg L^{-1} a partir dos padrões sólidos, considerando a pureza de cada um fazendo sua dissolução no solvente adequado.

A partir da solução de 1000 mg L^{-1} de cada composto, preparou-se a mistura dos agrotóxicos em solvente ACN na concentração de 5 mg L^{-1} e a solução foi armazenada em frasco âmbar a -10 °C.

Esta mistura de compostos foi utilizada para os ensaios de fortificação nas amostras “branco” e também para o preparo das curvas analíticas preparadas no extrato da matriz e no solvente.

3.2.2 Preparo e utilização do Padrão Interno (PI) e Padrão de Controle (PC)

De acordo com a SANTE (2019), um padrão interno (PI) é um composto químico adicionado à amostra ou a uma porção da mesma em quantidade conhecida em um momento específico da análise para verificar a correta execução do procedimento analítico ou uma etapa do mesmo. Um padrão interno deve ser quimicamente estável e manter um comportamento similar a composto alvo.

Dependendo da etapa quando é adicionado o padrão interno pode ter diferentes nomes e servir para diferentes fins. No caso do presente trabalho, foi usado o composto trifenilfosfato (TPP) como Padrão Interno Instrumental (PI) na concentração de 20 µg L^{-1}. Este foi adicionado nos vials de injeção, antes da análise cromatográfica, para verificar a execução correta da análise cromatográfica, sendo aceito valores de variação de área de até 20% (SANTE, 2019). Ao mesmo tempo, empregou-se uma solução de atrazina-d5 como Padrão de Controle (PC). Esta solução foi adicionada às amostras anteriormente à extração dos analitos, para a avaliação do procedimento de extração na forma de resultados de recuperação (70-120% e RSD≤ 20%). A solução de PC foi adicionada numa quantidade conhecida sobre o tabaco previamente umedecido para uma concentração final no vial de injeção de 20 µg L^{-1}.

As soluções de atrazina-d5 deuterada e de trifenilfosfato foram preparadas cada uma em frascos âmbar individuais, diluindo as soluções de 1000 mg L^{-1} de cada composto em ACN até a concentração de 10 mg L^{-1} e armazenadas para posterior uso em frascos âmbar a -10 °C.

3.2.3 Agrotóxicos selecionados

Para este estudo, foram selecionados agrotóxicos de diferentes classes: organofosforados, carbamatos, ureias substituídas, neonicotinóides, triazinas, entre outros. Os compostos foram escolhidos de acordo com o Guia CORESTA N° 1 (CORESTA GUIDE N° 1), publicada em outubro de 2021 pelo Comitê Consultivo Agroquímico (ACAC) do CORESTA e com base na relação de padrões dos compostos

disponíveis no laboratório. Na Tabela 3, estão listados os compostos que foram utilizados neste estudo, juntamente com algumas informações relevantes, tais como: logaritmo da constante de dissociação ácida (pKa), coeficiente de partição octanol/água (log K_{ow}), fórmula molecular, classe química e ação agronômica (PUBCHEM, 2020).

Todos os padrões utilizados possuem pureza maior que 90% e foram adquiridos das empresas LGC Standards (Alemanha), Sigma-Aldrich (EUA) e ChemService (EUA).

Tabela 3 - Relação dos agrotóxicos analisados pela técnica de UHPLC-MS/MS com informações sobre pKa, log K_{ow}, fórmula molecular, classe química e ação agronômica

(continua)

	Composto	pKa [1]	log K_{ow} [2]	Fórmula química	Classe química	Ação agronômica
1	2,4,5-T	2,9	3,3	$C_8H_5Cl_3O_3$	Auxína	Herbicida
2	2,4-D	2,7	3,2	$C_8H_6Cl_2O_3$	Auxína	Herbicida
3	Acetamiprido	0,7	0,8	$C_{10}H_{11}ClN_4$	Nicotenoide	Insecticida
4	Acibenzolar-S-metil	-	3,1	$C_8H_6N_2OS_2$	Benzotiadiazol	Fungicida
5	Alacloro	16,6	3,5	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	Cloroacetanilida	Herbicida
6	Aldicarb	-	1,1	$C_7H_{14}N_2O_2S$	Carbamato	Insecticida
7	Aldicarb-sulfona	-	-0,6	$C_7H_{14}N_2O_4S$	Sulfona	Metabolito do aldicarbe
8	Aldicarb-sulfoxido	-	-0,2	$C_7H_{14}N_2O_3S$	Sulfoxido	Metabolito do aldicarbe
9	Azinfós-etílico	-	3,4	$C_{12}H_{16}N_3O_3PS_2$	Organofosforado	Insecticida
10	Azoxistrobina	-	2,5	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	Ariloxipirimidina	Fungicida
11	Benalaxil	-	3,4	$C_{20}H_{23}NO_3$	Fenil-amida	Fungicida
12	Butóxido de piperonila	-	4,8	$C_{19}H_{30}O_5$	Benzodioxoles	Sinergista de agrotóxicos
13	Butralina	-	4,9	$C_{14}H_{21}N_3O_4$	Nitro-composto	Herbicida
14	Carbaril	-	2,4	$C_{12}H_{11}NO_2$	Carbamato	Insecticida
15	Carbendazim	4,2	1,6	$C_9H_9N_3O_2$	Benzimidazol	Fungicida
16	Carbofurano	-	2,3	$C_{12}H_{15}NO_3$	Carbamato	Insecticida
17	Carbofurano-3-hidróxido	-	1,2	$C_{12}H_{15}NO_4$	Carbamato	Metabolito do carbofurano
18	Ciantraliniprole	-	3,9	$C_{19}H_{14}BrClN_6O_2$	Carboxamida	Insecticida
19	Cimoxanil	9,7	0,6	$C_7H_{10}N_4O_3$	Etil-úrea	Fungicida
20	Clomazona	-	2,5	$C_{12}H_{14}ClNO_2$	Monoclorobenceno	Herbicida

[1] pKa: -log da constante de dissociação ácida do composto (Ka); [2] log K_{ow}: coeficiente de partição octanol/água

Tabela 3 - Relação dos agrotóxicos analisados pela técnica de UHPLC-MS/MS com informações sobre pKa, log K_{ow}, fórmula molecular, classe química e ação agronômica

(continuação)

	Composto	pKa [1]	log K_{ow} [2]	Fórmula química	Classe química	Ação agronômica
21	Clorantraniliprole	10,9	2,8	$C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$	Rianóide	Insecticida
22	Clorfenvinfós	-	3,8	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	Organofosforado	Insecticida
23	Clorpirifós-etílico	4,6	5,0	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	Organofosforado	Acaricida
24	Clorpirifós-metílico	-	4,3	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	Organofosforado	Insecticida, acaricida e formicida
25	Demeton-S-metil-sulfona	-	-0,3	$C_6H_{15}O_5PS_2$	Sulfona	Insecticida e acaricida
26	Diazinon	2,6	3,3	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	Organofosforado	Insecticida
27	Diclorvós	-	1,4	$C_4H_7Cl_2O_4P$	Organofosforado	Insecticida
28	Difenoconazol	1,1	4	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	Dioxolana	Fungicida
29	Diflubenzuron	-	3,9	$C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$	Benzil-úrea	Insecticida
30	Dimetoato	-	0,8	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	Organofosforado	Insecticida, acaricida
31	Dimetomorfe	-	2,7	$C_{21}H_{22}ClNO_4$	Morfolina	Fungicida
32	Etoprofós	-	2,9	$C_8H_{19}O_2PS_2$	Organofosforado	Insecticida, nematicida
33	Famoxadona	10	4,7	$C_{22}H_{18}N_2O_4$	Oxazolidinonas	Fungicida
34	Fenamidona	-	2,8	$C_{17}H_{17}N_3OS$	Imidazol	Fungicida
35	Fenamifós	10,5	3,2	$C_{13}H_{22}NO_3PS$	Organofosforado	Insecticida
36	Fentiona	-	4,1	$C_{10}H_{15}O_3PS_2$	Organotiofosforado	Insecticida
37	Fluazifope-P-butílico	-	4,5	$C_{19}H_{20}F_3NO_4$	Ác. arilofenoxipropiônico	Herbicida
38	Flubendiamida	-	4,2	$C_{23}H_{22}F_7IN_2O_4S$	Organofluorado	Insecticida

[1] pKa: -log da constante de dissociação ácida do composto (Ka); [2] log K_{ow}: coeficiente de partição octanol/água

Tabela 3 - Relação dos agrotóxicos analisados pela técnica de UHPLC-MS/MS com informações sobre pKa, log K_{ow}, fórmula molecular, classe química e ação agronômica

(continuação)

	Composto	pKa [1]	log K_{ow} [2]	Fórmula química	Classe química	Ação agronômica
39	Fluopiram	-	4,5	$C_{16}H_{11}ClF_6N_2O$	Benzamida	Fungicida
40	Forato	-	3,6	$C_7H_{17}O_2PS_3$	Organotiofosforado	Insecticida e acaricida
41	Fosalona	-	4,4	$C_{12}H_{15}ClNO_4PS_2$	Organotiofosforado	Insecticida
42	Fosfamidona	-	0,8	$C_{10}H_{19}ClNO_5P$	Organofosforado	Insecticida
43	Foxim	-	4,4	$C_{12}H_{15}N_2O_3PS$	Organofosforado	Insecticida
44	Imidacloprido	-	0,8	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	Neonicotenoide	Insecticida
45	Indoxacarbe	-	4,6	$C_{22}H_{17}ClF_3N_3O_7$	Oxadiazina	Insecticida e formicida
46	Iprodiona	-	3	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	Imidazol	Fungicida
47	Malationa	-	2,7	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	Organofosforado	Insecticida, acaricida
48	Metalaxil	-	1,7	$C_{15}H_{21}NO_4$	Carboxamida	Fungicida
49	Metamidofós	-	-0,8	$C_2H_8NO_2PS$	Organofosforado	Insecticida
50	Metidationa	-	2,5	$C_6H_{11}N_2O_4PS_3$	Organofosforado	Insecticida, acaricida
51	Metiocarbe	-	3,1	$C_{11}H_{15}NO_2S$	Carbamato	Insecticida, moluscicida e repelente de passaros
52	Metiocarbe-sulfona	-	1,6	$C_{11}H_{15}NO_4S$	Carbamato	Insecticida
53	Metiocarbe-sulfoxido	-	1,5	$C_{11}H_{15}NO_3S$	Carbamato	Metabolito do metiocarbe
54	Metomil	-	0,6	$C_5H_{10}N_2O_2S$	Carbamato	Insecticida
55	Mevinfós	-	0,1	$C_7H_{13}O_6P$	Organofosforado	Insecticida e acaricida
56	Monocrotofós	-	-0,2	$C_7H_{14}NO_5P$	Organofosforado	Insecticida

[1] pKa: -log da constante de dissociação ácida do composto (Ka); [2] log K_{ow}: coeficiente de partição octanol/água

Tabela 3 - Relação dos agrotóxicos analisados pela técnica de UHPLC-MS/MS com informações sobre pKa, log K_{ow}, fórmula molecular, classe química e ação agronômica

(conclusão)

	Composto	pKa [1]	log K_{ow} [2]	Fórmula química	Classe química	Ação agronômica
57	Naled	-	1,4	$C_4H_7Br_2Cl_2O_4P$	Organofosforado	Insecticida
58	Ometoato	-	-0,7	$C_5H_{12}NO_4PS$	Organofosforado	Insecticida
59	Oxadixil	-	0,6	$C_{14}H_8N_2O_4$	Fenilamida	Fungicida
60	Oxamil	-	-0,5	$C_7H_{13}N_3O_3S$	Carbamato	Insecticida
61	Parationa-metílica	7,15	2,9	$C_8H_{10}NO_5PS$	Organofosforado	Inseticida
62	Pebulato	-	3,8	$C_{10}H_{21}NOS$	Amina terciaria	Herbicida
63	Penconazol	1,5	3,7	$C_{13}H_{15}Cl_2N_3$	Triazol	Fungicida
64	Pirimicarbe	4,4	1,7	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	Dimetilcarbamato	Inseticida
65	Pirimifós-metílico	4,3	3,9	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	Organofosforado	Insecticida e acaricida
66	Profenofós	-	4,4	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	Organofosforado	Insecticida e acaricida
67	Propamocarbe	9,5	1,1	$C_9H_{20}N_2O_2$	Carbamato	Fungicida
68	Propoxur	-	1,5	$C_{11}H_{15}NO_3$	Carbamato	Insecticida
69	Tebuconazol	5	3,7	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	Triazol	Fungicida
70	Terbufós	-	4,5	$C_9H_{21}O_2PS_3$	Organotiofosforado	Insecticida
71	Tiametoxam	-	-0,1	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	Neonicotenoide	Insecticida
72	Tiodicarbe	-	1,7	$C_{10}H_{18}N_4O_4S_3$	Tiocarbamato	Insecticida
73	Tiofanato-metílico	7,3	1,4	$C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$	Benzimidazol	Fungicida
74	Triflumurom	-	4,9	$C_{15}H_{10}ClF_3N_2O_3$	Benzoilúrea	Insecticida

[1] pKa: -log da constante de dissociação ácida do composto (Ka); [2] log K_{ow}: coeficiente de partição octanol/água

3.3 AMOSTRAS DE TABACO

As amostras “branco” de tabaco (*Nicotiana tabacum*), já curadas e moídas, foram obtidas de cultivos controlados, sem a aplicação de agrotóxicos. As amostras branco assim como as amostras reais para aplicação do método foram mantidas em plástico sob refrigeração (< -10 °C) até iniciar a análise.

O tipo de tabaco utilizado para “branco” foi o chamado *Bright* ou *Virginia*, no qual o processo de cura é por secagem com temperatura e umidade controladas que produz folhas laranja, com alto teor de açúcar. O curado é obtido com calor artificial começando em cerca de 35 °C e terminando em cerca de 75°C durante um período de 5 a 7 dias. Num primeiro momento a clorofila é degradada e a maioria dos carboidratos é convertida em açúcares simples. Logo depois é passado ar seco e quente, para conseguir a morte das células da folha, já que ao interromper seus processos respiratórios são evitadas perdas de açúcares. O tabaco curado por este processo (*Flue-cured*) tem um aroma doce característico devido ao seu alto teor de açúcar e um sabor ligeiramente ácido (DAVIS; NIELSON, 1999).

3.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Acquity UPLC™ BEH C_{18} (2,1 x 50 mm; 1,7 µm) empregando água:metanol (98:2, v/v) como fase móvel A e metanol:água (98:2, v/v) como fase móvel B, ambas contendo 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio e 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Tanto a coluna como a fase móvel A:B já foram utilizadas previamente no laboratório LARP-UFSM para a análise de agrotóxicos. Na Tabela 4 é apresentado o gradiente de fase móvel utilizado a uma vazão constante de 0,225 mL min^{-1}.

Tabela 4 - Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em água no sistema UHPLC-MS/MS.

Tempo (min)	%A	%B
Inicial	95	5
0,25	95	5
7,75	0	100
8,50	0	100
8,51	95	5
10,00	95	5

Fonte: A autora, 2022

As demais condições foram baseadas em estudos prévios: temperatura da coluna: 40 ºC; voltagem do capilar: 0,5 kV (ESI+) 2,5 kV (ESI-); temperatura de dessolvatação: 500 ºC; vazão do gás de dessolvatação (N_2): 600 L h^{-1}; vazão do spray: 80 L h^{-1}; vazão do gás de colisão: 0,15 mL min^{-1}; temperatura da fonte: 150 ºC; volume de injeção: 10 µL; modo de aquisição: dinâmico e tempo de aquisição (*dwell time*): 0,01 s.

3.5 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICO EM TABACO

Vários métodos disponíveis na literatura foram revisados (LEE *et al*., 2008; CHEN *et al.,* 2013; KHAN *et al.,* 2014; BERNARDI *et al.,* 2016; CHEN *et al*., 2018) a fim de avaliar o melhor método de preparo de amostra priorizando critérios como presença de coextativos, limpeza do extrato e o maior número de compostos recuperados com taxas de recuperação entre 70 e 120%, com RSD≤ 20%. Para avaliação foram realizados testes gravimétricos e ensaios de fortificação no nível de 25 µg L^{-1} equivalentes a 0,625 mg kg^{-1} na amostra, em triplicata.

Na Tabela 5, é apresentado um resumo dos testes realizados. Testes T1 a T6: Para escolha do melhor método de extração, foram realizados testes utilizando três versões do método QuEChERS: original acidificado (VIERA *et al*., 2017); acetato (LEHOTAY; MASTOVSKA; LIGHTFIELD; 2005) e citrato (ANASTASSIADES *et al*., 2007). Estes testes preliminares com extração em pH ácido foram escolhidos a fim de aumentar a possibilidade de extrair satisfatoriamente analitos de natureza ácida como

os herbicidas 2,4-D e 2,4,5-T (REBELO *et al*., 2016). A fim de obter um extrato que pudesse ser analisado por UHPLC-MS/MS foi empregada uma etapa de limpeza proposta por Bernardi e colaboradores (2016) para extratos de tabaco que está detalhada na Tabela 5 e inclui uma etapa de 3 h de LTP seguida de uma limpeza por d-SPE com uma mistura de sorventes.

Uma vez definido o método de extração com melhores resultados avaliou-se a etapa de limpeza do extrato e diluição final, para posterior validação e aplicação em amostras reais. O preparo de amostra em uma matriz complexa como a do tabaco é extremamente importante a fim de garantir a obtenção de resultados confiáveis. Levando isto em consideração, vários tipos de limpeza de extrato foram avaliados. T7 a T11: Avaliaram a etapa de limpeza com o uso de LTP, observando sua influência sobre a recuperação dos agrotóxicos em estudo, assim como a quantidade de coextrativos retirados. Nos testes T11, T13 a T15 foram realizadas variações na quantidade de GCB no procedimento de limpeza d-SPE proposto por Bernardi *et al*., (2016). A mistura de GCB, PSA e C_{18} aparece repetidamente na literatura em diferentes proporções mostrando alta efetividade para limpeza do extrato de tabaco (PAUL *et al*., 2021; GHOSH *et al*., 2021; KHAN *et al.,* 2015a; KHAN *et al.*, 2014).

Nos testes T16 a T41, os sorventes GCB, PSA e C_{18} foram testados de forma individual, também por d-SPE. Adicionalmente foram testados outros sorventes como quitosana, fase fluorada, Florisil®, EMR, Supel™ QuE Z-Sep+, MWCNTs-OH e MWCNTs-COOH. Por SPE foram avaliados cartuchos LC-NH_2, PSA/GCB e Captiva-EMR-Lipid (Tabela 5).

Tabela 5 - Testes realizados para análise dos compostos selecionados para análise de resíduos de agrotóxico em tabaco

(continua)

Teste	Método	Limpeza de extrato 1 Tempo de freezer (h) (-25 a -18 °C) (4 mL de extrato)	Limpeza de extrato 2 (1 mL de extrato)	Diluição	Filtração	Análise
T1	Q. Original Modif 5% ác. fórmico: 2g de amostra, 10 mL de água ultrapura, 10 mL de ACN 5% ác. fórmico. Sais de Extração: 4g $MgSO_4$ + 1 g NaCl	-	-	-		
T2	Q. Acetato: 2g de amostra, 10 mL de água ultrapura, 10 mL de ACN 1% ác. acético. Sais de Extração: 4g $MgSO_4$ + 1,7 g CH_3COONa	-	-	-	Filtro de nylon 0,22µm	Avaliação gravimétrica
T3	Q. Citrato: 2g de amostra, 10 mL de água ultrapura, 10 mL de ACN. Sais de Extração: 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl + 1 g SCTD + 0,5 g SCDS	-	-	-		
T4	Q. Original Modif 5% ác. fórmico: 2g de amostra, 10 mL de água ultrapura, 10 mL de ACN 5% ác. fórmico. Sais de Extração: 4g $MgSO_4$ + 1 g aNaCl					
T5	Q. Acetato: 2g de amostra, 10 mL de água ultrapura, 10 mL de ACN 1% ác. acético. Sais de Extração: 4g $MgSO_4$ + 1,7 g CH_3COONa	3	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 50 mg GCB	5:1 água ultrapura	Filtro de nylon 0,22µm	UHPLC-MS/MS
T6	Q. Citrato: 2g de amostra, 10 mL de água ultrapura, 10 mL de ACN. Sais de Extração: 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl + 1 g SCTD + 0,5 g SCDS					
T7		3	-	-		
T8	Q. Citrato: 2g de amostra, 10 mL de água ultrapura, 10 mL de ACN. Sais de Extração: 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl + 1 g SCTD + 0,5 g SCDS	2	-	-	Filtro de nylon 0,22µm	Avaliação gravimétrica
T9		1	-	-		
T10		2	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 50 mg GCB	5:1 água ultrapura		UHPLC-MS/MS
T11		1				

Tabela 5 - Testes realizados para análise dos compostos selecionados para análise de resíduos de agrotóxico em tabaco

(continuação)

Teste	Método	Limpeza de extrato 1 Tempo de freezer (h) (-25 a -18 °C) (4 mL de extrato)	Limpeza de extrato 2 (1 mL de extrato)	Diluição	Filtração	Análise
T12	Q. Citrato: 2 g de amostra, 10 mL de água ultrapura, 10 mL de ACN. Sais de Extração: 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl + 1 g SCTD + 0,5 g SCDS	Sem Freezer	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 50 mg GC	5 vezes em água ultrapura	Filtro de nylon 0,22µm	UHPLC-MS/MS
T13		1	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 40 mg GCB			
T14			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 30 mg GCB			
T15			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 20 mg GCB			
T16			SPE: Cartucho 1 mL LC-NH_2			
T18			SPE: Cartucho 3 mL PSA/GCB *			
T19			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg Quitosana FURG			
T20			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg Quitosana Sigma			
T21			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg Fase Fluorada			
T22			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg Florisil®			
T23			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg Supel™ QuE Z-Sep+			
T25			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}			
T26			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg PSA			
T27			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB Supelco			
T28			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 400 mesh			
T29			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg MWCNTs-OH			
T30			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg MWCNTs-COOH			

Tabela 5 - Testes realizados para análise dos compostos selecionados para análise de resíduos de agrotóxico em tabaco

(continuação)

Testes	Método	Limpeza de extrato 1 Tempo de freezer (h) (-25 a -18 °C) (4 mL de extrato)	Limpeza de extrato 2 (1 mL de extrato)	Diluição	Filtração	Análise
T32	Q. Citrato: 2 g de amostra, 10 mL de água ultrapura, 10 mL de ACN. Sais de Extração: 4 g $MgSO_4$ + 1 g NaCl + 1 g SCTD + 0,5 g SCDS	1	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 10 mg GCB Supelco	5 vezes em água ultrapura	Filtro de nylon 0,22µm	UHPLC-MS/MS
T33			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 7,5 mg GCB Supelco			
T34			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 5 mg GCB Supelco			
T35			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 10 mg MWCNTs-COOH			
T36			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 5 mg MWCNTs-COOH			
T37			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 10 mg MWCNTs-OH			
T38			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 5 mg MWCNTs-OH			
T39			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 325 mesh			
T40			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 200 mesh			
T41			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 100 mesh			
T17 *			SPE: Cartucho 3 mL Captiva EMR-lipid *			
T24 **			d-SPE: 200 mg EMR-lipid com polish			
T31 ***			d-SPE: 200 mg EMR-lipid sem polish			

* Foi carregado no cartucho 3mL de Extrato diluído 4:1 Extrato:H_2O (1,25 vezes, por tanto ao diluir mais 4 vezes o extrato foi diluído um total de 5 vezes)
** O EMR foi ativado com 1 mL H_2O. Após agitação a fase aquosa foi separada da fase orgânica adicionando 320 mg $MgSO_4$ + 80mg NaCl por 1mL
*** O extrato foi agitado junto ao EMR sem previa ativação com água. Não foram adicionados sais adicionais pois haveria apenas uma fase orgânica

3.5.1 Avaliação gravimétrica de coextrativos

Análises gravimétricas foram realizadas com dois objetivos, num primeiro momento a fim de avaliar a quantidade de coextrativos presentes no extrato após os vários métodos de extração testados. E, em um segundo momento, a fim de avaliar a eficiência de limpeza que pudessem apresentar os diferentes tipos de sorventes de *clean-up* testados.

Esses testes foram realizados em triplicata utilizando a amostra “branco” de tabaco. Inicialmente, 3 tubos de vidro foram lavados e secos em estufa à 110 ºC por 1 h. Após, estes foram colocados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente (±25 ºC), cada tubo foi pesado 6 vezes. Após, transferiram-se 5 mL dos extratos obtidos em triplicata para cada teste. Todos os tubos foram colocados em estufa e o solvente foi evaporado, aumentando a temperatura gradativamente para evitar projeções de líquido (desde 60 até 110 ºC), ficando a 110 °C até secar completamente. Na sequência, os tubos foram colocados no dessecador até atingir a temperatura ambiente e novamente cada um deles foi pesado 6 vezes a fim de obter-se a massa de coextrativos restantes por diferença (Mann, 2017).

3.5.2 Ensaios de recuperação, avaliação da eficiência de extração

Realizaram-se ensaios de fortificação (n= 3) em “amostra branco” de tabaco, na concentração de 25 µg L^{-1} equivalentes a 0,625 mg kg^{-1} na amostra. Antes da adição da solução padrão o tabaco foi hidratado com 10 mL de água, agitado em vórtex e deixado em repouso 10 min, após a adição da solução padrão contendo todos os analitos, e o padrão de controle, agitou-se em vórtex 1 min antes de proceder ao procedimento de extração. Os testes de extração foram avaliados em relação ao número de compostos que apresentaram resultados aceitáveis (recuperação 70-120% e RSD ≤ 20%), encontram-se detalhados na Tabela 5.

Após a escolha do melhor procedimento de extração, avaliou-se como primeira etapa de limpeza a precipitação em frio variando o tempo de exposição às baixas temperaturas. Logo depois foram avaliados diferentes sorventes para a etapa de limpeza do extrato por d-SPE (C_{18}, PSA, GCB, EMR, quitosana, Supel™ QuE Z-Sep+,

MWCNTs-COOH e MWCNTs-COOH) e por SPE (cartuchos Captiva EMR-lipid, PSA/GCB e LC-NH_2).

Para os procedimentos de extração avaliados, calculou-se também o efeito matriz em cada teste de forma pontual a partir das áreas das soluções analíticas preparadas em solvente e no extrato “branco” da matriz (Equação 1).

$$EM\ (\%) = \frac{(Am-As)}{Am} \times 100 \qquad \text{Equação 1}$$

Onde: Am = área da solução analítica preparada no extrato da matriz (tabaco)

As = área da solução analítica preparada no solvente (acetonitrila).

Para os testes preliminares, após a realização das etapas de limpeza, 200 µL de extrato foram diluídos em 800 µL de água ultrapura. Após agitação, a solução diluída foi filtrada empregando filtro de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 µm e por fim o vial, contendo a solução de análise, foi levado para injeção no equipamento.

Uma vez escolhida a melhor metodologia de extração e limpeza do extrato, foi avaliada a diluição final do extrato, com o objetivo de tentar diminuir a diluição total do método, mas sem deixar de lado o efeito matriz e o formato de pico dos analitos.

As diluições testadas foram avaliadas preparando pontos de curva com concentração final 25 µg L^{-1} no “branco” da matriz tabaco. As diferentes diluições em água ultrapura e FM foram:

- T37-a: Diluição 1:5 em água ultrapura
- T37-b: Diluição 1:5 em FM: 90:10
- T37-c: Diluição 1:5 em FM: 50:50
- T37-d: Diluição 1:1 em água ultrapura

3.5.3 Aplicação de testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) e teste Tukey

As análises estatísticas por ANOVA e o teste de Tukey, foram realizadas considerando um nível de confiança de 95%, utilizando o software R (R CORE TEAM, 2021), um software livre para estatística e gráficos. Utilizando esta ferramenta é possível obter p-valor para cada conjunto de medidas (dos diferentes testes) e para cada agrotóxico analisado.

A análise permite, num primeiro momento, discriminar se existe diferença estatística entre vários conjuntos de cálculos de recuperação, e num segundo momento, mediante uma análise por pares, discriminar quais conjuntos de dados de recuperação são estatisticamente diferentes entre si.

Ao realizar variações num procedimento de extração e/ou limpeza não é incomum que a porcentagem de recuperação não seja evidentemente diferente ao olho, especialmente quando realizados três ou mais testes com pequenas variações. Em uma análise multirresíduo, é possível que variações no procedimento de extração afetem de maneira mais significativa alguns compostos do que outros.

Com o objetivo de ajudar na tomada de decisões, alguns conjuntos de testes, foram agrupados para aplicar os testes ANOVA e teste Tukey. Para cada composto foi calculado a porcentagem de recuperação por triplicata para cada teste. Logo depois foi aplicado o teste ANOVA sobre esses dados, para avaliar se algum conjunto de medidas de recuperação era estatisticamente diferente a os outros, isto para cada composto. Quando para algum composto detectou-se uma diferença estatística, foi aplicado o teste Tukey, para determinar quais recuperações resultaram diferentes de quais, em uma avaliação par a par.

Para um nível de confiança de 95%:

p-valor > 0,05 as médias comparadas são estatisticamente iguais entre si

p-valor ≤ 0,05 as médias comparadas são estatisticamente diferentes

Para todos os testes foi avaliado o número de compostos com recuperações entre 70-120% com RSD ≤ 20%. Escolheu-se como o melhor teste aquele com maior número de compostos recuperados na faixa aceitável de recuperação e RSD. Os conjuntos de testes que foram submetidos a análise estatística estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 - Conjuntos de testes onde foi aplicado análise estatística ANOVA e teste de Tukey

Teste	Método	Limpeza 1 (4 mL de extrato)	Limpeza 2 (1 mL de extrato)
T4	Q. Original Modif 5% ácido fórmico	3h Free (-25 - -18 °C)	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 50 mg GCB
T5	Q. Acetato	3h Free (-25 - -18 °C)	
T6	Q. Citrato	3h Free (-25 - -18 °C)	
T6	Q. Citrato	3h Free (-25 - -18 °C)	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 50 mg GCB
T10		2h Free (-25 - -18 °C)	
T11		1h Free (-25 - -18 °C)	
T12		Sem Free	
T11	Q. Citrato	1h Free (-25 - -18 °C)	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 50 mg GCB
T13			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 40 mg GCB
T14			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 30 mg GCB
T15			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}; 50 mg PSA; 20 mg GCB
T27	Q. Citrato	1h Free (-25 - -18 °C)	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB Supelco
T28			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 400 mesh
T29			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg MWCNTs-OH
T30			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg MWCNTs-COOH
T27	Q. Citrato	1h Free (-25 - -18 °C)	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB Supelco
T32			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 10 mg GCB Supelco
T33			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 7,5 mg GCB Supelco
T34			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 5 mg GCB Supelco
T29	Q. Citrato	1h Free (-25 - -18 °C)	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg MWCNTs-OH
T37			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 10 mg MWCNTs-OH
T38			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 5 mg MWCNTs-OH
T30	Q. Citrato	1h Free (-25 - -18 °C)	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg MWCNTs-COOH
T35			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 10 mg MWCNTs-COOH
T36			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 5 mg MWCNTs-COOH
T28	Q. Citrato	1h Free (-25 - -18 °C)	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 400 mesh
T39			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 325 mesh
T40			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 200 mesh
T41			d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 100 mesh
T17	Q. Citrato	1h Free (-25 - -18 °C)	SPE: cartucho 3 mL Captiva EMR-lipid *
T24			d-SPE: 200 mg EMR-lipid com polish
T31			d-SPE: 200 mg EMR-lipid sem polish

3.6 VALIDAÇÃO

O método QuEChERS avaliado neste trabalho foi validado de acordo com os parâmetros descritos resumidamente no Quadro 4, entre eles: seletividade, curva analítica, faixa linear, efeito matriz, limites de detecção e quantificação, exatidão através de ensaios de recuperação, precisão (repetibilidade) e precisão intermediária.

Quadro 4 – Parâmetros de métodos analíticos avaliados na validação do método, com respectivas formas de aplicação, equações (quando aplicável) e critérios de aceitação.

(continua)

Parâmetro	Aplicação	Equações	Critério	Referência
Seletividade	Extração de matriz "branco". Comparação dos cromatogramas de amostras "branco" e da amostra "branco" fortificada com estes compostos	-	Ausência de picos de interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse.	SANTE, 2019
Faixa linear de trabalho	Injeção em triplicata da curva analítica. Avaliação do coeficiente de determinação (r^2).	Equação 1: $y = ax + b$ Onde: y = resposta média (área do pico) x = concentração a = coeficiente angular – inclinação da curva analítica = sensibilidade b = coeficiente linear – intersecção com eixo y, quando x=0	$r^2 \geq 0,99$	INMETRO, 2020
Limite de quantificação (LOQ)	Menor concentração que, fortificada na matriz (n=6), apresente resultados aceitáveis de exatidão e precisão.	-	Recuperações 70 – 120% e RSD ≤ 20%	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017
Limite de detecção (LOD)	Calculado a partir do limite de quantificação	Equação 2: LOD = LOQ / 3,33 Onde: LOQ = Limite de quantificação	-	INMETRO, 2020

Quadro 4 – Parâmetros de métodos analíticos avaliados na validação do método, com respectivas formas de aplicação, equações (quando aplicável) e critérios de aceitação.

(conclusão)

Parâmetro	Aplicação	Equações	Critério	Referência
Precisão	Ensaios de recuperação, fortificando as amostras "branco" em 3 níveis de concentração (0,05; 0,15 0,25 mg kg^{-1}) (n=6) Avaliada em termos de RSD	Equação 3: $RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$ Onde: s = estimativa de desvio padrão absoluto xi = valores individuais; xm = média das medidas em replicatas N = número de medidas	RSD ≤ 20%	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017
Exatidão	Ensaios de recuperação, fortificando as amostras "branco" em níveis (0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,25; 0,5 mg kg^{-1}) (n=6). Avaliada em termos de recuperação (%).	Equação 4: $Rec (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$ Onde: C_1: Concentração determinada na amostra fortificada; C_2: Concentração determinada na amostra não fortificada; C_3: Concentração usada para fortificação	70 - 120%	INMETRO, 2020; ANVISA, 2017
Robustez	Variações nas condições analíticas	-	-	INMETRO, 2020
Efeito matriz	Comparação entre as inclinações das curvas analíticas dos padrões, preparadas no solvente (acetonitrila) e as preparadas no extrato da matriz.	Equação 5: $EM (\%) = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100$ Onde: X_1: inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em extrato da matriz X_2: inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente	Variação aceita de +20 a -20%	SANTE, 2019

Matriz branco: matriz isenta dos analitos em estudo

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A técnica de UHPLC-MS/MS permite a determinação de agrotóxicos em níveis adequados, com seletividade e sensibilidade satisfatórias. A seguir pode-se observar os parâmetros que permitem a identificação e quantificação de cada composto selecionado neste estudo pelo sistema UHPLC-MS/MS.

4.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS

As condições cromatográficas utilizadas neste trabalho foram estabelecidas de acordo com trabalhos realizados no LARP-UFSM, onde o modo de ionização e as transições para a quantificação e identificação dos analitos foram escolhidas utilizando o monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selective reaction monitoring*). A transição de maior intensidade foi utilizada para a quantificação e a segunda de maior intensidade para a confirmação dos compostos. Os parâmetros tempo de retenção, voltagem do cone e energia de colisão para as transições SRM de cada agrotóxico em estudo estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando eletronebulização ESI+/-, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores e produtos utilizados.

(continua)

Agrotóxico	t_R (min)	ESI	Íon Precursor (m/z)	VC (V)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon Produto (m/z)	EC (eV)	Íon Produto (m/z)	EC (eV)
2,4,5-T	6,28	-	255	14	197	14	199	18
2,4-D	5,43	-	219	18	125	13	161	13
Acetamiprido	3,58	+	223	23	126	20	56	15
Acibenzolar-S-metil	6,19	+	211	41	136	30	69	52
Alacloro	6,72	+	271	19	162	20	238	11
Aldicarb	4,21	+	208	7	89	7	116	7
Aldicarb-sulfona	2,40	+	223	22	148	10	86	14
Aldicarb-sulfóxido	2,14	+	207	13	89	14	132	10
Azinfós-etílico	6,38	+	346	10	132	16	77	36
Azoxistrobina	5,88	+	404	17	329	30	372	15
Benalaxil	7,06	+	326	17	148	20	91	34
Butóxido de piperonila	7,56	+	356	17	177	11	119	37
Butralina	8,05	+	296	16	222	20	240	5
Carbaril	5,03	+	202	19	145	22	117	28

Tabela 6 - Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando eletronebulização ESI+/-, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (tR), íons precursores e produtos utilizados.

(continuação)

Agrotóxico	t_R (min)	ESI	Íon Precursor (m/z)	VC (V)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon Produto (m/z)	EC (eV)	Íon Produto (m/z)	EC (eV)
Carbendazim	2,77	+	192	24	160	18	132	28
Carbofurano	4,82	+	222	25	165	16	123	16
Carbofurano-3-OH	3,57	+	238	25	163	16	181	10
Ciantraliniprole	5,38	+	475	20	286	13	444	17
Cimoxanil	3,91	+	199	14	128	8	111	18
Clomazona	5,78	+	240	23	125	18	89	46
Clorantraniliprole	5,70	+	482	20	451	22	284	14
Clorfenvinfós	6,89	+	359	18	155	12	99	30
Clorpirifós-etílico	7,61	+	350	27	97	32	198	20
Clorpirifós-metílico	7,11	+	322	23	125	20	289	16
Demeton-S-metil-sulfona	2,81	+	263	20	169	17	121	17
Diazinon	6,95	+	305	20	169	22	97	35
Diclorvós	4,87	+	221	23	109	22	79	34
Difenoconazol	7,11	+	406	37	251	25	111	60
Diflubenzuron	6,72	+	311	20	158	12	141	28
Dimetoato	3,52	+	230	12	125	20	199	10
Dimetomorfe	6,33	+	388	30	301	20	165	30
Etoprofós	6,46	+	243	18	97	31	131	20
Famoxadona	6,57	+	392	12	331	10	238	20
Fenamidona	6,01	+	312	22	92	25	236	14
Fenamifós	6,58	+	304	27	202	36	217	24
Fentiona	6,88	+	279	25	169	16	247	13
Fluazifope-P-butílico	7,35	+	384	27	282	22	328	16
Flubendiamida	6,92	+	683	14	274	31	408	12
Fluopiram	6,60	+	397	30	173	41	208	35
Forato	6,97	+	261	10	75	12	97	32
Fosalona	6,97	+	367	12	181	14	110	42
Fosfamidona	4,73	+	300	17	174	14	127	25
Foxim	7,18	+	299	16	129	13	153	11
Imidacloprido	3,24	+	256	23	175	20	209	15
Indoxacarbe	7,14	+	528	25	203	40	150	22
Iprodiona	6,88	+	330	12	245	16	288	15
Malationa	6,15	+	331	12	99	24	127	12
Metalaxil	5,51	+	280	15	192	17	220	13
Metamidofós	0,75	+	142	17	93,9	13	125	13
Metidationa	5,63	+	303	10	145	10	85	20

Tabela 6 - Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando eletronebulização ESI+/-, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (tR), íons precursores e produtos utilizados.

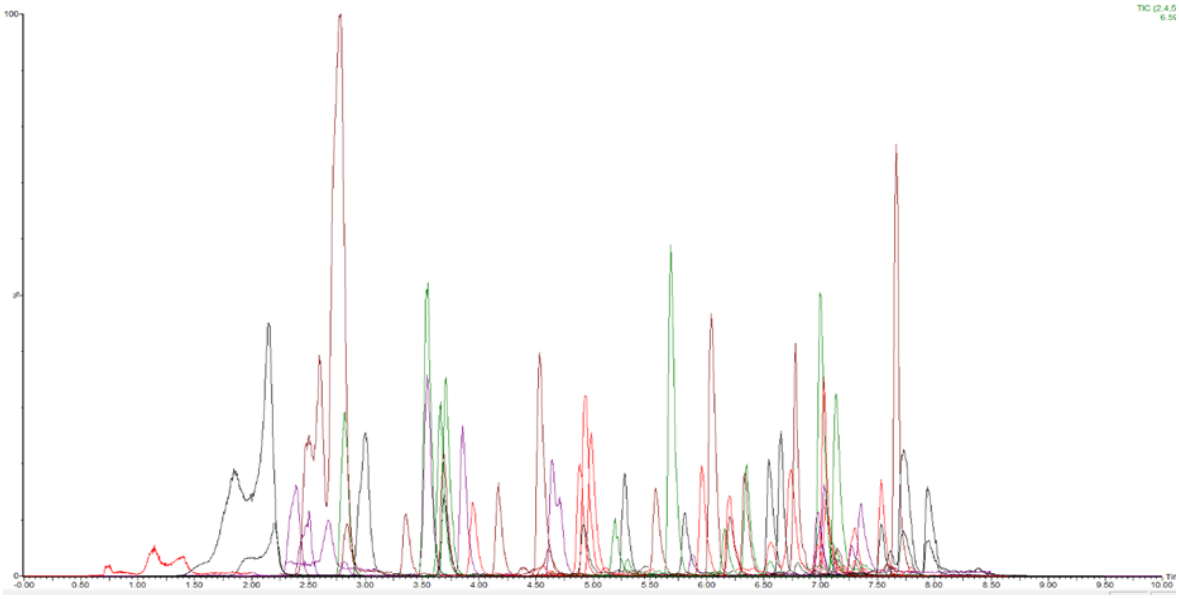
(conclusão)

Agrotóxico	t_R (min)	ESI	Íon Precursor (m/z)	VC (V)	1ª Transição Quantificação		2ª Transição Identificação	
					Íon Produto (m/z)	EC (eV)	Íon Produto (m/z)	EC (eV)
Metiocarbe	6,01	+	226	19	121	22	169	10
Metiocarbe-sulfona	3,72	+	528	22	122	38	107	19
Metiocarbe-sulfoxido	3,52	+	242	17	185	14	122	28
Metomil	2,68	+	163	17	88	10	106	10
Mevinfós	3,74	+	225	13	127	15	193	8
Monocrotofós	2,99	+	224	15	127	16	98	12
Naled	5,91	+	383	30	109	27	127	17
Ometoato	2,01	+	214	16	125	22	183	11
Oxadixil	4,45	+	279	31	219	10	132	34
Oxamil	2,49	+	237	12	72	10	90	10
Parationa-metílica	2,87	+	264	29	109	22	79	36
Pebulato	7,34	+	204	17	57	16	128	11
Penconazol	6,78	+	284	25	159	34	70	16
Pirimicarbe	4,34	+	239	25	182	15	72	18
Pirimifós-metílico	7,07	+	306	25	108	32	164	22
Profenofós	7,35	+	373	25	128	40	303	20
Propamocarbe	2,13	+	189	22	102	17	144	12
Propoxur	4,76	+	210	12	111	16	168	10
Tebuconazol	6,8	+	308	31	125	40	70	22
Terbufós	7,51	+	289	12	103	8	57	22
Tiametoxam	2,84	+	292	19	211	12	132	22
Tiodicarbe	5,12	+	355	17	88	16	108	16
Tiofanato-metílico	4,72	+	343	23	151	21	311	11
Triflumurom	6,96	+	359	23	139	35	156	16
Atrazina-d5 (PC)	5,36	+	221	26	179	18	101	23
Trifenilfosfato (PI)	6,87	+	327	40	152	37	215	28

VC: voltagem do cone; EC: energia de colisão; PI: Padrão interno; PC: padrão controle

A Figura 3 apresenta o cromatograma obtido a partir dos íons selecionados no modo aquisição SRM para a solução analítica preparada no extrato “branco” da matriz tabaco, com os analitos na concentração de 25 µg L^{-1}.

Figura 3 - Cromatograma de íon total obtido por UHPLC-MS/MS a partir de soluções preparadas no extrato “branco” da matriz de tabaco na concentração de 25 µg L^{-1}



Fonte: A autora, 2022

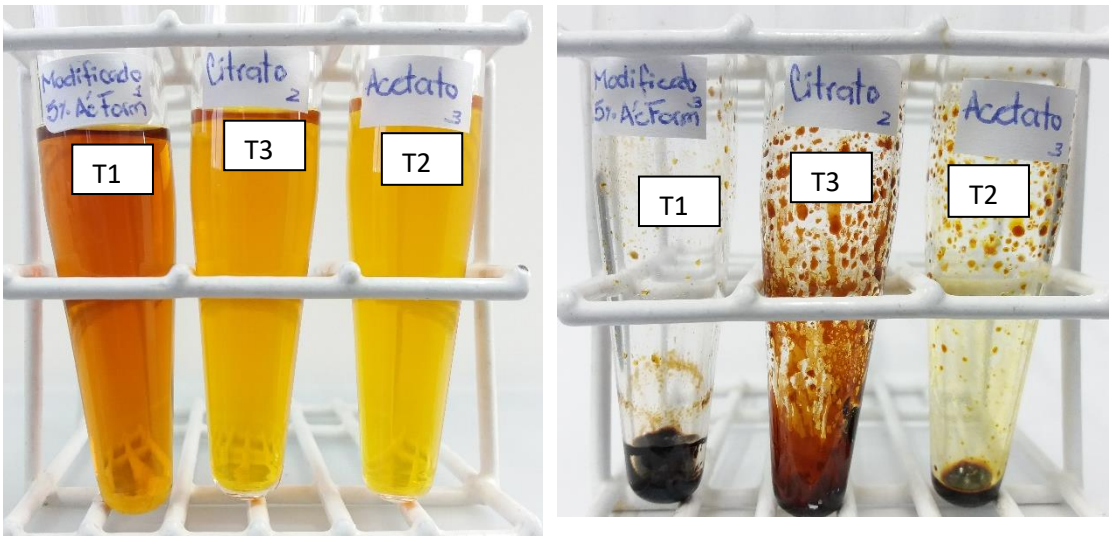
O sistema UHPLC permitiu a separação, enquanto a espectrometria de massas em série (MS/MS) possibilitou a quantificação e identificação dos 74 agrotóxicos em estudo em apenas 10 min de análise. O método cromatográfico foi programado para enviar ao descarte os primeiros segundos (antes da eluição do primeiro analito) e os últimos minutos da corrida (após eluição dos últimos analitos), evitando assim que coextrativos presentes na matriz se depositem nos componentes do espectrômetro de massas.

4.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TABACO

4.2.1 Avaliação do método de extração.

Os métodos QuEChERS, original modificado com 5% ácido fórmico (T1), acetato (T2) e citrato (T3), foram avaliados em relação à quantidade de coextrativos não voláteis, bem como no que diz respeito ao número de analitos recuperados em ensaios de fortificação. Na Figura 4 podemos observar a coloração dos extratos sem limpeza obtidos após estes três métodos de extração. Os procedimentos de extração foram realizados, em triplicata, na amostra “branco” de tabaco.

Figura 4 - A: Aparência dos extratos obtidos após realização das etapas de extração empregando os métodos QuEChERS original modificado com 5% ác. fórmico, citrato e acetato. B: Aparência dos mesmos após evaporação do solvente



A B

Fonte: A autora, 2022

Ao realizar o teste gravimétrico, foi possível quantificar a quantidade de coextrativos não voláteis em cada um destes métodos. Como era esperado de forma intuitiva pela coloração dos extratos e pelo reportado na literatura, o Q. Original Modif ACN 5% ácido fórmico extraiu uma quantidade maior de coextrativos que os métodos Q. Acetato e Q. Citrato, já que quanto mais baixo o pH do meio mais coextrativos são extraídos da matriz (REJCZAK; TUZIMSKI, 2015). O procedimento Q. Acetato foi o método que apresentou menor quantidade de coextrativos extraídos como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis remanescentes em cada versão do método QuEChERS (original modif. ACN 5% ác. fórmico, citrato e acetato) sem etapa de limpeza

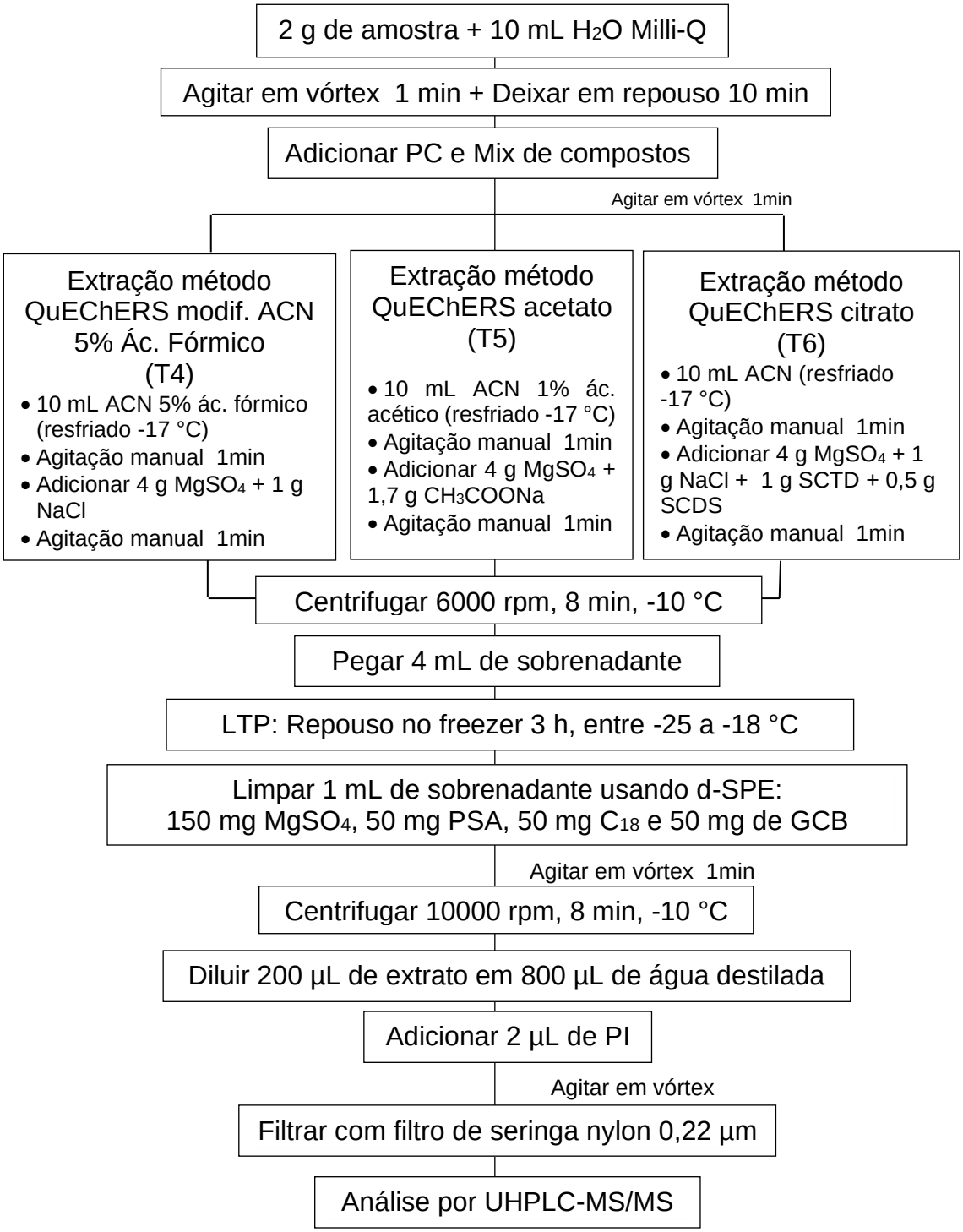
Testes	Método de extração	Limpeza de extrato 1	Limpeza de extato 2	Massa de coextrativos (g)
T1	Q. Original Modif 5% ácido fórmico	-	-	0,1157533
T2	Q. Acetato	-	-	0,0461167
T3	Q. Citrato	-	-	0,0602833

Fonte: A autora, 2022

Sendo assim, estas três metodologias de extração foram testadas enquanto à sua capacidade para recuperar os compostos de interesse. Para isto, devido à grande quantidade de coextrativos presentes nos extratos de tabaco foi selecionada uma etapa de limpeza de extrato que possibilitasse a injeção de um extrato mais limpo no sistema de UHPLC-MS/MS. O procedimento de limpeza de extrato usado, é uma versão adaptada daquele reportado por Bernardi e colaboradores (2016) e descrito na Figura 5.

Mediante os ensaios de fortificação empregando este procedimento adaptado, constatou-se uma recuperação satisfatória (entre 70-120% com RSD ≤ 20%) de 57 compostos para Q. Acetato, 60 compostos para Q. Citrato e 62 compostos para Q. Modif. ACN 5% ácido fórmico, como pode ser observado na Tabela 8.

Figura 5 – Fluxograma do procedimento de extração e limpeza de extrato para testes preliminares QuEChERS original modificado com ACN 5% ácido fórmico, citrato e acetato.



Fonte: A autora, 2022

Tabela 8 - Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação em cada versão do método QuEChERS (T4: original modif. ACN 5% ác fórmico, T5: acetato e T6: citrato)

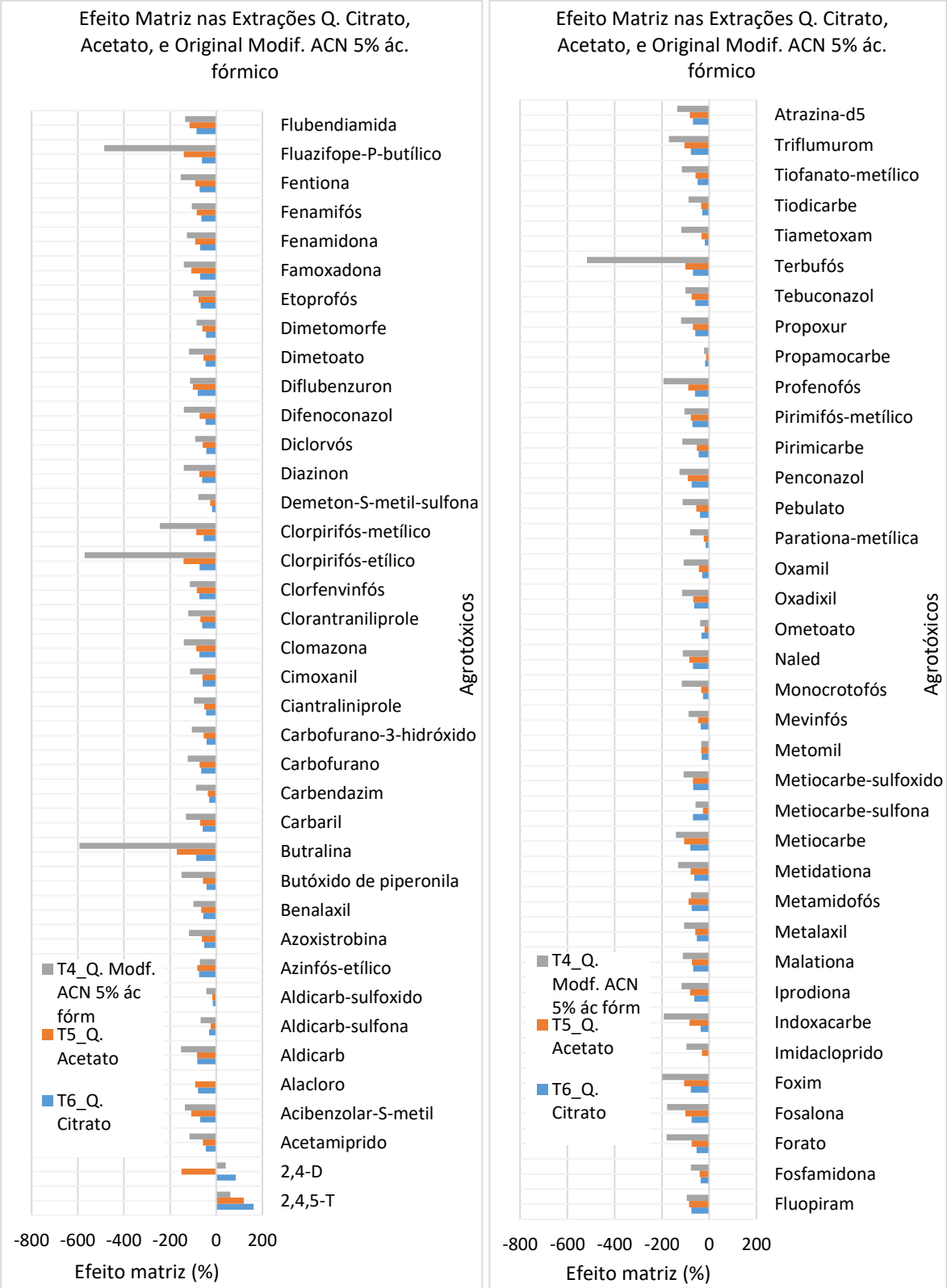
	Número de compostos		
Recuperação (%)	T6: Q. Citrato	T5: Q. Acetato	T4: Q. Mod. ACN 5% ac form
70-120%	60	57	62
60-70 / 120-130%	6	6	5
50-60 / 130-140%	1	1	1
50< / <140%	7	6	2
RSD > 20	-	4	4

Fonte: A autora, 2022

Além dos resultados de recuperação foi calculado o efeito matriz resultante para cada versão do método QuEChERS (original modif. ACN 5% ácido fórmico, citrato e acetato) usando o procedimento de limpeza descrito na Figura 5.

Os resultados do efeito matriz estão apresentados na Figura 6. Como era esperado, o QuEChERS original modif. ACN 5% ácido fórmico que tinha apresentado maior quantidade de coextrativos não voláteis, teve o efeito matriz mais significativo dos três métodos, tendo uma supressão do sinal para a maioria dos analitos.

Figura 6 - Efeito matriz resultante para cada versão do método QuEChERS testado (T4: original modif. ACN 5% ác fórmico, T5: acetato e T6: citrato)



Fonte: A autora, 2022

Já o QuEChERS citrato apresentou efeito matriz levemente inferior ao QuEChERS acetato para a maioria dos compostos, por este motivo e por ter extraído satisfatoriamente um maior número de compostos que o QuEChERS acetato, o QuEChERS citrato foi escolhido como o melhor método de extração para a continuação dos experimentos.

Os resultados de recuperação para cada composto em cada teste estão descritos no Apêndice C, junto aos valores calculados de efeito matriz e a análise estatística (ANOVA e Teste de Tukey). Mediante análise estatística dos valores de recuperação obtidos foi possível concluir que para 36 compostos dos 74 avaliados, se obtiveram resultados de recuperação estatisticamente iguais sem importar a versão de método QuEChERS usada. Já para 38 compostos dos 74 analisados, os resultados de recuperação obtidos foram estatisticamente diferentes dependendo da versão do método QuEChERS usada.

4.2.2 Avaliação de métodos de limpeza do extrato

4.2.2.1 Primeira limpeza do extrato por precipitação a baixa temperatura (LTP - Low Temperature Precipitation)

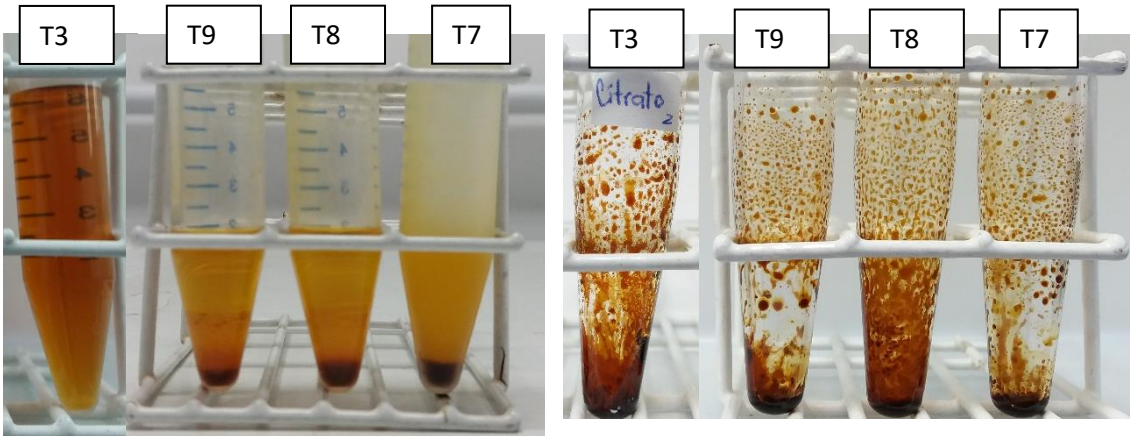
Com o objetivo de propor um método de limpeza do extrato de tabaco mais simples e eficiente que ainda recuperasse satisfatoriamente a maior quantidade de analitos possível, distintos testes foram realizados. Em um primeiro momento avaliou-se a precipitação de coextrativos a baixa temperatura, conhecida como LTP (do inglês, *low temperature precipitation*), em uma tentativa de otimizar a mesma e verificar sua contribuição na limpeza do extrato.

Uma vez ajustada a primeira etapa de limpeza LTP, avaliou-se uma segunda etapa de limpeza por d-SPE analisando o efeito individual de diferentes sorventes (C_{18}, PSA, GCB, EMR, quitosana, Supel™ QuE Z-Sep+, MWCNTs-COOH e MWCNTs-COOH) e por SPE usando cartuchos disponíveis comercialmente (Captiva EMR-lipid, PSA/GCB e LC-NH_2). Na Tabela 5 apresentou-se uma relação dos testes realizados para avaliação dos diferentes métodos de limpeza do extrato.

Em um primeiro momento, o procedimento mostrado no fluxograma da Figura 5, foi repetido apenas para o método Q. citrato, variando então o tempo que o extrato permaneceu em repouso no freezer (-25 a -18 °C) para LTP sem nenhuma outra limpeza nem diluição. Na Figura 7, pode ser observada a aparência do extrato sem

nenhuma limpeza após a extração (T3), e na sequência os extratos com o precipitado no fundo após 1, 2 e 3 h de repouso no freezer (T9, T8 e T7, respectivamente), conforme pode-se observar na Tabela 5.

Figura 7 – A: Aparência do extrato de tabaco sem limpeza (T3), e após LTP 1, 2 e 3 h (T9, T8 e T7 respetivamente), B: Aparência dos mesmos após teste gravimétrico



A B

Fonte: A autora, 2022

A quantidade de coextrativos não voláteis foi quantificada mediante testes gravimétricos para cada um destes testes os resultados podem ser comparados na Tabela 9. Constatou-se que a baixa temperatura consegue precipitar entre 34,5 e 28,5% dos coextrativos extraídos pelo método Q. citrato, dependendo do tempo de repouso. A baixa temperatura pode causar o congelamento e assim a remoção de lipídios (SOBHANZADEH *et al*., 2012), ceras e açúcares, assim como outros coextrativos pouco solúveis em ACN (ANASTASSIADES *et al*., 2007).

Tabela 9 - Comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis remanescentes após diferentes tempos de LTP

Testes	Método	Primeira limpeza de extrato LTP (-25 a -18 °C)	Segunda limpeza de extrato	Massa de coextrativos (g)	% de coextrativos retirados*
T3	Q. Citrato	-	-	0,06028	-
T4	Q. Citrato	3 h	-	0,039513	34,5
T5	Q. Citrato	2 h	-	0,04025	33,2
T6	Q. Citrato	1 h	-	0,043087	28,5

*Em relação à quantidade de coextrativos extraída pelo método citrato sem limpeza

Fonte: A autora, 2022

Verificado o potencial de limpeza da técnica LTP, um ensaio de fortificação foi conduzido a fim de avaliar se a variação no tempo de freezer tinha um efeito significativo sobre as percentagens de recuperação dos analitos.

Foram extraídas em triplicata amostras “branco” fortificadas com concentração final de 25 µg L^{-1} equivalentes a 0,625 mg kg^{-1} na amostra. O procedimento mostrado no fluxograma da Figura 5, foi repetido apenas para Q. citrato variando o tempo de freezer, usando como segunda limpeza do extrato a mistura de sorventes para d-SPE e diluição especificada anteriormente (T6, T10 a T12 da Tabela 5).

Um resumo dos resultados dos ensaios de fortificação para os testes T6, T10 a T12 são apresentados na Tabela 10. Os resultados detalhados por composto podem ser consultados no Apêndice C, junto ao cálculo do efeito matriz calculado de forma pontual entre CTS 25 µg L^{-1} e CTM 25 µg L^{-1}, assim como a análise estatística dos resultados de recuperação.

O efeito matriz foi semelhante para a maioria dos compostos entre os testes T6, T10 a T12, apesar da diferença na quantidade de coextrativos presentes dependendo do tempo de freezer (Tabela 9). Mesmo assim, os testes estatísticos nos permitiram constatar que, para 51 compostos dos 74 analisados as porcentagens de recuperação obtidas eram estatisticamente diferentes ao variar o tempo de freezer.

Tabela 10 – Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação para cada variação do tempo de freezer (T6, T10 a T12) usando Q. citrato.

	Número de compostos			
Recuperação (%)	T6: 3 h freezer	T10: 2 h freezer	T11: 1 h freezer	T12: sem freezer
70-120	60	62	64	64
60-70 / 120-130	6	5	2	2
50-60 / 130-140	1	-	-	3
50< / >140	7	7	7	4
RSD > 20	-	-	1	1

Fonte: A autora, 2022

Ao avaliar caso por caso foi possível concluir que para a maioria dos analitos as porcentagens de recuperação não eram estatisticamente diferentes quando comparadas 2 e 3 h de freezer para LTP. A maioria dos compostos apresentou diferença nas recuperações quando comparado os resultados obtidos no teste sem aplicar a etapa de LTP (T12) frente a aplicação de 1, 2 ou 3 h de repouso no freezer (T11, T10 e T6, respectivamente).

Apesar de alguns analitos apresentarem porcentagens de recuperação estatisticamente diferentes ao aplicar 2 ou 1 h de LTP, em geral para ambos os critérios de Rec% e RSD foram atendidos. Após análise dos resultados foi escolhido como o melhor teste o T11: 1 h de LTP, usando um menor tempo de preparo de amostra, ainda conseguindo limpar aproximadamente 28,5% dos coextrativos no extrato sem prejudicar a percentual de recuperação para a maioria dos analitos em estudo.

4.2.2.2 Segunda limpeza do extrato por SPE ou d-SPE

Na sequência os esforços foram colocados em encontrar uma segunda etapa de limpeza que permitisse limpar o extrato obtido após 1 h de LTP sem prejudicar a recuperação dos compostos que ainda em T11 não tiveram recuperações entre 70 e 120% e RSD ≤ 20%. Procurava-se também por uma limpeza de extrato mais simples que, com eficiência aceitável, necessitasse menor quantidade e/ ou menor número de reagentes.

Para isto uma primeira tentativa foi a modificação da etapa d-SPE proposta na Figura 5, alterando a quantidade de GCB usado (T11, T13, T14 e T15 da Tabela 5), pois entre os compostos que não estavam sendo recuperados na faixa aceitável vários possuem estrutura planar ou anéis aromáticos, que podem ser fortemente retidos pelo excesso de GCB durante a limpeza do extrato (BAEK *et al*., 2021). Um resumo dos resultados obtidos nos testes T11, T13, T14 e T15 encontram-se na Tabela 11.

Ao diminuir a quantidade de GCB usado na limpeza do extrato evidenciou-se uma tendência a aumentar as porcentagens de recuperação (Rec (RSD)%) de alguns compostos, a maioria contendo anéis aromáticos e/ou estrutura planar, como podemos observar na Tabela 11 para compostos como acibenzolar-S-metil (aumento de 35 (5)% até 75 (7)%), carbendazim (aumento de 22 (1)% até 59 (2)%), ciantraniliprole (aumento 30 (3)% até 78 (2)%), clorantraniliprole (aumentou de 34 (2)% até 75 (4)%), diflubenzuron (aumento de 70 (3)% até 82 (5)%) e tebuconazol (aumento de 77 (2)% até 82 (3)). No Apêndice C pode ser consultado o resultado para cada um dos analitos em estudo, enquanto que na Tabela 11 foram adicionados apenas alguns dos resultados de interesse para exemplificação.

Tabela 11 - Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação para os testes T11, T13 a T15 e detalhe de alguns dos compostos de interesse

	Número de compostos			
Recuperação (%)	T15: 20 mg GCB+	T14: 30 mg GCB+	T13: 40 mg GCB+	T11: 50 mg GCB+
70-120	67	67	64	64
60-70 / 120-130	3	2	2	2
50-60 / 130-140	1	1	-	-
50< / <140	3	4	8	7
RSD > 20	-	-	-	1

	T15: 20 mg GCB+		T14: 30 mg GCB+		T13: 40 mg GCB+		T11: 50 mg GCB+		
	%Rec (± RSD)	E. M.	%Rec (± RSD)	E. M.	%Rec (± RSD)	E. M.	%Rec (±RSD)	E. M.	p-valor
2,4,5-T	S/N < 10	-	S/N < 10	-	S/N < 10	-	S/N < 10	-	-
2,4-D	S/N < 10	-	S/N < 10	-	S/N < 10	-	S/N < 10	-	-
Acibenzolar-S-metil	75 (7)	-68	57 (7)	-66	47 (2)	-65	35 (5)	-69	0,000
Carbendazim	59 (2)	-27	47 (1)	-30	35 (1)	-30	22 (1)	-29	0,000
Ciantraniliprole	78 (2)	-33	68 (3)	-40	48 (1)	-35	30 (3)	-39	0,000
Clorantraniliprole	75 (4)	-52	68 (5)	-57	48 (4)	-52	34 (2)	-62	0,000
Diflubenzuron	82 (5)	-82	76 (3)	-82	71 (5)	-82	70 (3)	-82	0,025
Metamidofós	74 (4)	-75	75,4 (0,1)	-76	72 (1)	-76	67 (2)	-74	0,010
Metiocarbe-sulfona	76 (11)	-98	82 (14)	-96	84 (13)	-94	80 (21)	-90	0,935
Propamocarbe	16 (1)	9	16,9 (0,3)	5	17 (1)	3	15 (1)	10	0,046
Tebuconazol	82 (3)	-52	87 (2)	-56	80 (4)	-53	77 (2)	-56	0,016

Fonte: A autora, 2022

O efeito matriz calculado de forma pontual para estes testes teve um comportamento semelhante ao comparar T11, T13, T14 e T15, apesar da diminuição da quantidade de um dos sorventes removedores de coextrativos. Mesmo assim, por meio da análise estatística pode-se concluir que a variação da quantidade de GCB teve recuperações estatisticamente diferentes para pelo menos 38 compostos, os quais resultaram então afetados pela variação da quantidade de GCB.

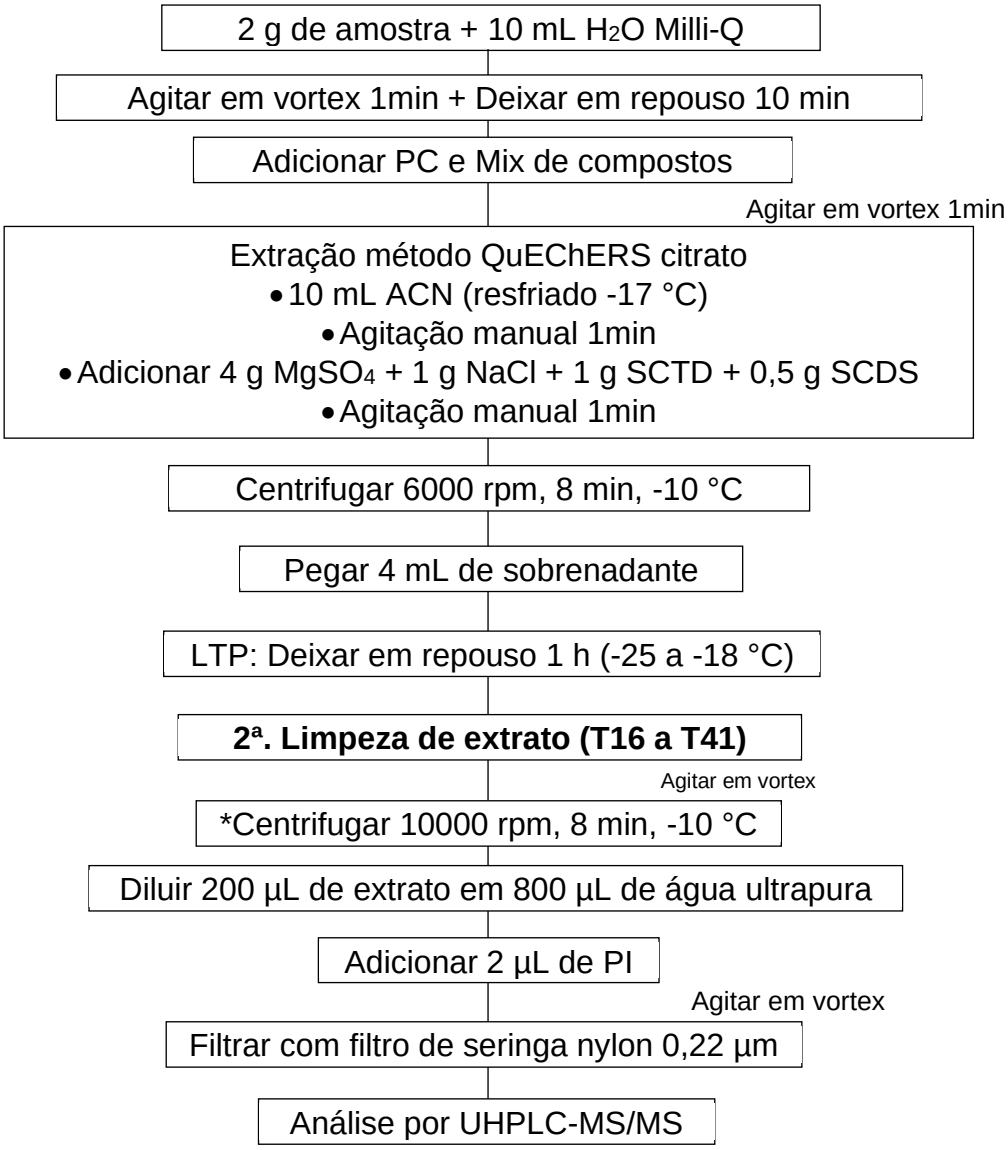
Na Tabela 11 apresentamos os resultados de recuperação para alguns destes 38 agrotóxicos, os quais mostraram um aumento importante na recuperação ao diminuir a quantidade de GCB, conseguindo-se recuperar vários deles na faixa aceitável. Assim o T15 foi o que apresentou melhor resultado entre estes testes para a maioria dos compostos. Esta mistura de sorventes (GCB, PSA e C_{18}) aparece repetidamente na literatura em diferentes proporções mostrando alta efetividade para

limpeza do extrato de tabaco (PAUL *et al.,* 2021; GHOSH *et al*., 2021; BERNARDI *et al*., 2016; KHAN *et al*., 2015a; KHAN *et al.,* 2014).

Apesar do T15 apresentar bons resultados, até este ponto, sete dos compostos de interesse não foram recuperados de forma satisfatória. É o caso dos compostos 2,4,5-T, 2,4-D, butralina, carbendazim, clorpirifós, flubendiamida e propamocarbe. Por esse motivo, na sequência, foram realizados testes para avaliação individual de alguns sorventes alternativos, inclusive numa tentativa de encontrar uma limpeza de extrato mais simples.

Como podemos observar na Figura 8, o procedimento de preparo de amostra escolhido até agora utiliza o Q. Citrato como procedimento de extração e uma primeira limpeza do extrato por LTP de 1h. Na sequência serão apresentados os resultados do uso de diferentes sorventes para uma segunda limpeza do extrato tanto por d-SPE quanto por SPE, utilizados como alternativa à mistura de sorventes de d-SPE mais clássica utilizada amplamente na literatura e na primeira parte deste trabalho nos testes preliminares.

Figura 8 – Fluxograma do procedimento de extração e limpeza de extrato para testes preliminares da segunda limpeza do extrato de tabaco

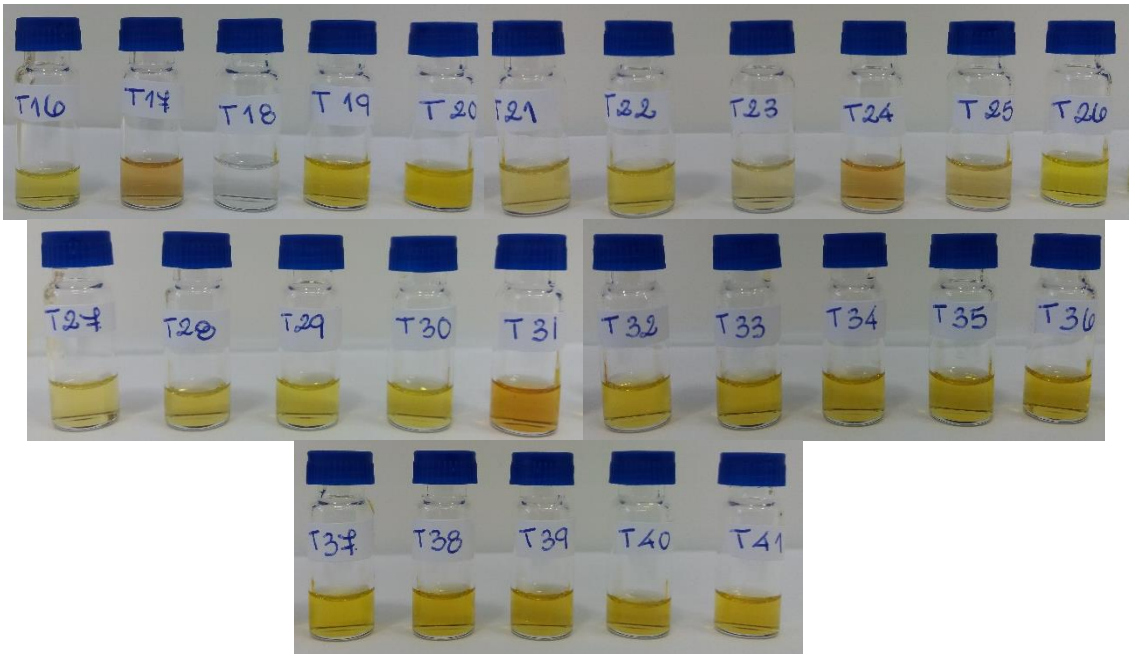


*Centrifugação só foi aplicada para os testes d-SPE

Fonte: A autora, 2022

Na Figura 9, pode-se observar a aparência dos extratos obtidos após a realização dos testes de limpeza T16 a T41. Da mesma forma, na Tabela 12 é apresentado um resumo dos resultados de ensaios de fortificação e ensaios gravimétricos para os mesmos testes.

Figura 9 – Aparência dos extratos obtidos após testes de limpeza T16 a T41



Fonte: A autora, 2022

De forma geral, podemos observar que as limpezas com maior porcentual de coextrativos retirados, resultaram também na recuperação de um menor número de compostos na faixa aceitável (Tabela 12).

Como podemos observar na Tabela 12 e Figura 10, os testes com maior porcentagem de coextrativos retirados foram: T18 (Cartucho GCB/PSA), T16 (Cartucho $–NH_2$), e T26 (d-SPE PSA), com 86, 65,6 e 60,4% de coextrativos retirados respetivamente. Os sorventes amino, são usados eficientemente na remoção de ácidos orgânicos, incluindo ácidos graxos, açúcares e pigmentos (GAO *et al*., 2015); infelizmente pelos mesmos mecanismos de interação com coextrativos podem apresentar perdas na recuperação de analitos com características ácidas, como 2,4,5-T e 2,4-D. Assim apesar da sua eficiência na limpeza do extrato, estes sorventes foram desconsiderados pois não permitiram a recuperação satisfatória de diferentes agrotóxicos de interesse.

Tabela 12 - Resumo dos resultados dos ensaios de fortificação para os testes T16 a T41 e comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis retirados por cada tipo de sorvente em relação à primeira limpeza de extrato realizada.

Teste	Segunda etapa de limpeza do extrato (1mL)	Massa de coextrativos (g)	Coextrativos removidos* (%)	Número de compostos recuperados 70-120%, RSD ≤ 20%
T6	-	0,04309	-	-
T16	SPE: Cartucho 1mL LC-NH_2	0,01483	65,6	69
T17	SPE: Cartucho 3mL Captiva EMR-lipid **	0,03396	21,2	71
T18	SPE: Cartucho 3mL PSA/GCB **	0,00603	86,0	4
T19	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg Quitosana FURG	0,02470	42,7	70
T20	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg Quitosana Sigma	0,02900	32,7	67
T21	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg Fase Fluorada	0,03788	12,1	72
T22	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg Florisil®	0,02943	31,7	70
T23	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg Supel™ QuE Z-Sep+	0,02274	47,2	67
T24	d-SPE: 200 mg EMR-lipid com polish	0,03314	23,1	72
T25	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg C_{18}	0,03314	23,1	71
T26	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 50 mg PSA	0,01704	60,4	68
T27	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB Supelco	0,02853	33,8	72
T28	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 400 mesh	0,03551	17,6	73
T29	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg MWCNTs-OH	-	-	70
T30	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg MWCNTs-COOH	-	-	72
T31	d-SPE: 200 mg EMR-lipid sem polish	0,03788	12,1	73
T32	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 10 mg GCB Supelco	0,03211	25,5	72
T33	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 7,5 mg GCB Supelco	-	-	73
T34	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 5 mg GCB Supelco	-	-	74
T35	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 10 mg MWCNTs-COOH	0,02915	32,3	73
T36	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 5 mg MWCNTs-COOH	-	-	73
T37	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 10 mg MWCNTs-OH	0,02922	32,2	74
T38	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 5 mg MWCNTs-OH	-	-	73
T39	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 325 mesh	0,03666	14,9	72
T40	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 200 mesh	0,03854	10,5	73
T41	d-SPE: 150 mg $MgSO_4$; 20 mg GCB 100 mesh	0,03849	10,7	73

*Respeito a quantidade de coextrativos extraída pelo método citrato após da 1era limpeza 1 h de LTP
**Devido às caraterísticas dos cartuchos disponíveis foram limpos 3 mL de extrato de tabaco

Fonte: A autora, 2022

Figura 10 – Percentual de coextrativos retirados pela segunda limpeza do extrato (T16 a T41)

Fonte: A autora, 2022

Os testes T23 (Supel™ QuE Z-Sep+) e T19 (Quitosana FURG) demonstraram uma redução dos coextrativos de 47,20 e 42,7%, respectivamente. O sorvente Supel™ QuE Z-Sep+ é eficiente na remoção de compostos apolares como gorduras. Tem se reportado sua eficiência na remoção de gorduras em amostras tão variadas como peixe-gato (SAPOZHNIKOVA; LEHOTAY, 2013), abacate, amêndoa (LOZANO *et al*., 2014), óleos vegetais (TUZIMSKI; REJCZAK, 2016), carne suína, salmão (HAN *et al*., 2016) e leite (REJCZAK; TUZIMSKI, 2017), também mostrou eficiência na remoção de pigmentos em couve, abacate (HAN *et al*., 2016) e espinafre (MANN, 2017).

Infelizmente, apenas 67 agrotóxicos foram recuperados dentro da faixa aceitável no T23 (Supel™ QuE Z-Sep+), tendo perdas importantes para os ácidos carboxílicos: 2,4,5-T; 2,4-D, os organofosforados: fenamifós, metamidofós, ometoato e os carbamatos: propamocarbe e aldicarb-sulfóxido. O sorvente Supel™ QuE Z-Sep+ consiste em um suporte de sílica revestido com dióxido de zircônio e grupos octadecilsilano, que dependendo do pH podem agir como base ou ácido de Lewis, podendo ser bom sorvente não apenas para gorduras, mas também para fosfolipídios

e ácidos carboxílicos, sendo que interações eletrostáticas tem um papel importante no mecanismo de adsorção.

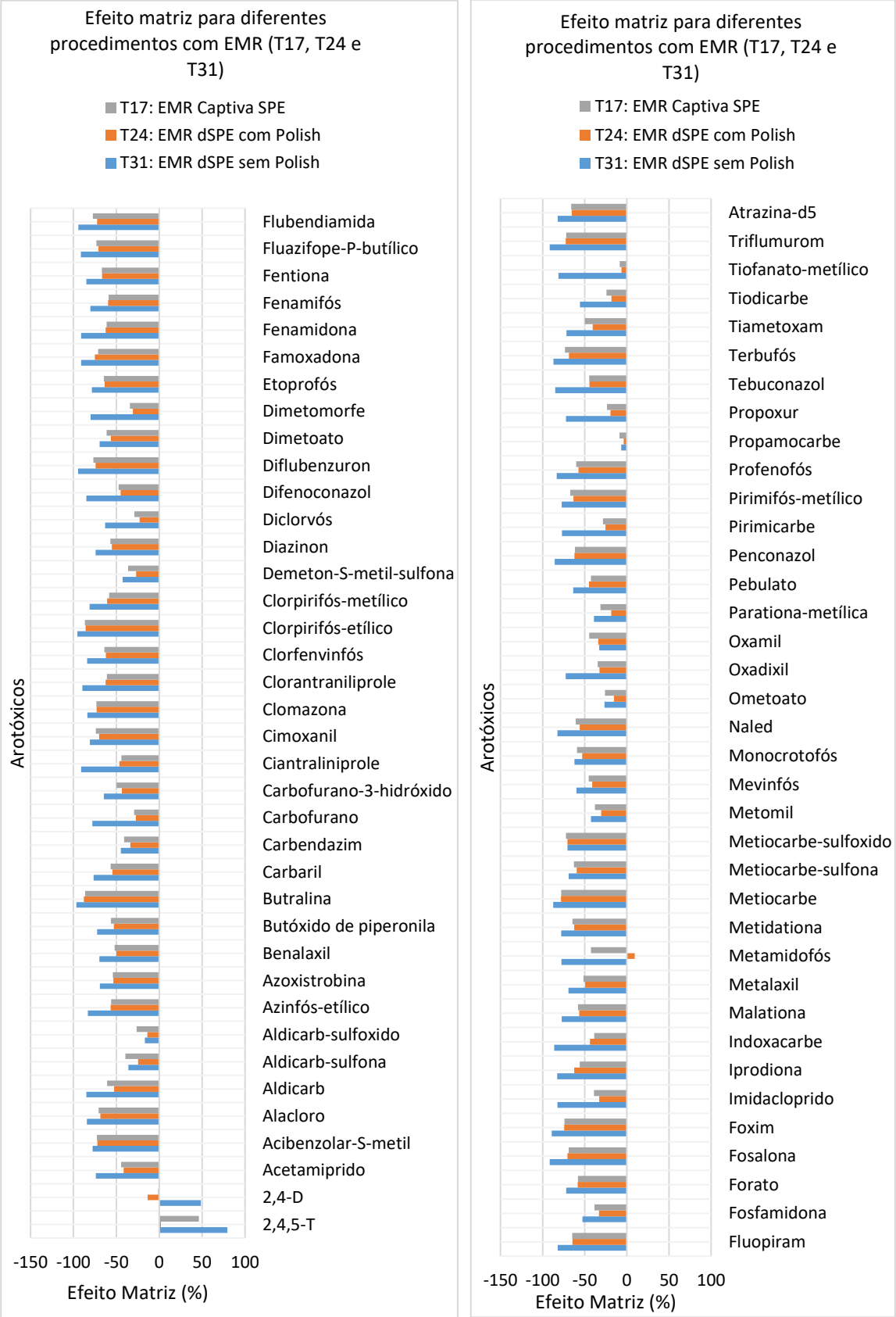
No caso do T19 (Quitosana FURG), conseguiu-se limpar 42,7% dos coextrativos, tendo recuperações baixas para os compostos 2,4,5-T; 2,4-D; flubendiamida e propamocarbe. Foi testado também uma quitosana disponível comercialmente pela SIGMA (T20), obtendo piores resultados de limpeza e baixas recuperações para sete compostos.

Sorventes como fase fluorada (T21) e C_{18} (T25) foram menos eficientes na limpeza do extrato com 12 e 23% de coextrativos removidos respectivamente, tendo ainda perdas de entre 2 a 3 analitos. O sorvente Florisil® (T22) retirou 31,7% de coextrativos, é largamente usado na literatura para limpeza de extratos de tabaco na forma de cartucho para SPE (QUADRONI; BETTINETTI, 2019; LOZOWICKA; RUTKOWSKA; HRYNKO, 2015; MUREYA; MUSUNA-GARWE, 2014; GHOSH *et al*., 2014; WEIYUN *et al*., 2014; QI *et al*., 2014; ZHOU; XIAO; LI, 2012). Porém, o mesmo não apresentou recuperações aceitáveis para 4 dos compostos de interesse.

Já os testes T17, T24 e T31 usando o sorvente EMR em três procedimentos diferentes apresentaram resultados variáveis. O EMR é um produto comercialmente disponível que foi projetado para a retirada de coextrativos lipídicos, mediante um mecanismo que combina exclusão por tamanho e interações hidrofóbicas (Agilent, 2015), ou seja, podendo desta forma ser interessante para a remoção de ceras e esteróis no extrato de tabaco. Destes a maior porcentagem de remoção foi no T24 (d-SPE: 200 mg EMR-Lipid com polish) retirando 23,1% de coextrativos, e em segundo lugar o T17 (SPE: Cartucho Captiva EMR-Lipid) retirando 21,2% de coextrativos.

Evidenciou-se então que, se bem o EMR possui potencial limpador sem prévia ativação com água (diretamente usado sobre o extrato), melhores resultados são obtidos quando o EMR é previamente ativado com água. Os complexos EMR-Lipid formados na acetonitrila aquosa são removidos por centrifugação da fase aquosa, pelo que um passo adicional de polish, para separação da fase aquosa e fase orgânica se faz necessário (ANUMOL *et al*., 2017). Na Figura 11, podemos observar o aumento do efeito matriz em T31 o que evidencia novamente T24 e T17 como melhores limpadores de coextrativos.

Figura 11 - Efeito matriz resultante para diferentes procedimentos com EMR (T17, T24 e T31)



Fonte: A autora, 2022

O GCB alternativo de fabricação local com diferentes tamanhos de partícula (T28, T39 a T41) teve os piores resultados em relação à limpeza do extrato, mesmo com altas recuperações de compostos esta opção foi descartada pois não apresentou grandes benefícios para a limpeza do extrato. Inclusive 10 e 20 mg de GCB comercial Supelco (T32 e T27 respectivamente) tiveram maiores percentuais de coextrativos retirados do que qualquer um dos GCB de fabricação local.

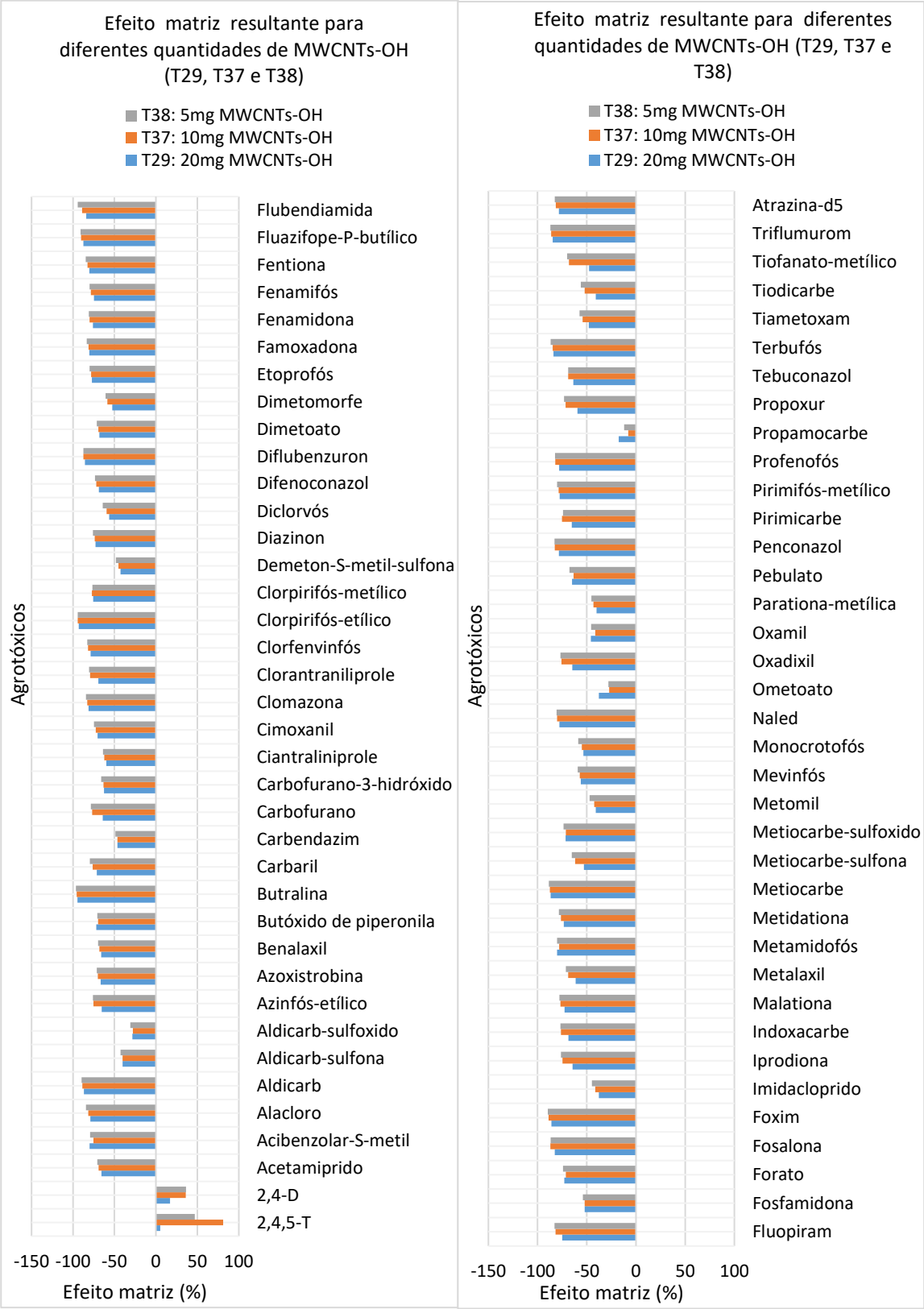
Ao comparar o uso de 20, 10, 7,5 e 5 mg de GCB Supelco (T27, T32, T33 e T34 respectivamente) observa-se um aumento do número de compostos recuperados na faixa aceitável na medida em que uma menor quantidade de GCB é usado. Porém o percentual de coextrativos retirados cai de 33,8% para 25,5% ao diminuir a quantidade de 20 mg (T27) para 10 mg (T32).

A melhor relação entre percentual de coextrativos retirados versus a quantidade de compostos recuperados foi conseguido usando os MWCNTs-OH e MWCNTs-COOH. Foram testadas 20, 10 e 5 mg de cada um deles para a limpeza de 1 mL extrato por d-SPE. Ao comparar, o uso de 20 mg MWCNTs-OH (T29) ou 20 mg MWCNTs-COOH (T30) observou-se baixas recuperações para 2 a 4 agrotóxicos de interesse. No uso de 5 mg de MWCNTs-OH (T36) ou 5 mg MWCNTs-COOH (T38) o agrotóxico flubendiamida não foi recuperado na faixa aceitável. Quando utilizado 10 mg de MWCNTs-OH (T37), obteve-se uma recuperação aceitável para os 74 dos analitos de interesse.

Do teste gravimétrico realizado, concluiu-se que tanto 10 mg de MWCNTs-OH quanto 10 mg de MWCNTs-COOH limpam um percentual de coextrativos bastante semelhante de aproximadamente 32%, e recuperando o 100% dos agrotóxicos com MWCNTs-OH (T37), este foi o material e a quantidade escolhida para a validação do método.

Um leve aumento de efeito matriz foi registrado ao diminuir a quantidade de MWCNTs-OH aplicado para limpeza do extrato, como pode ser observado na Figura 12, este efeito será compensado na validação preparando as curvas na matriz branco.

Figura 12 - Efeito matriz resultante para diferentes quantidades de MWCNTs-OH (T29, T37 e T38)

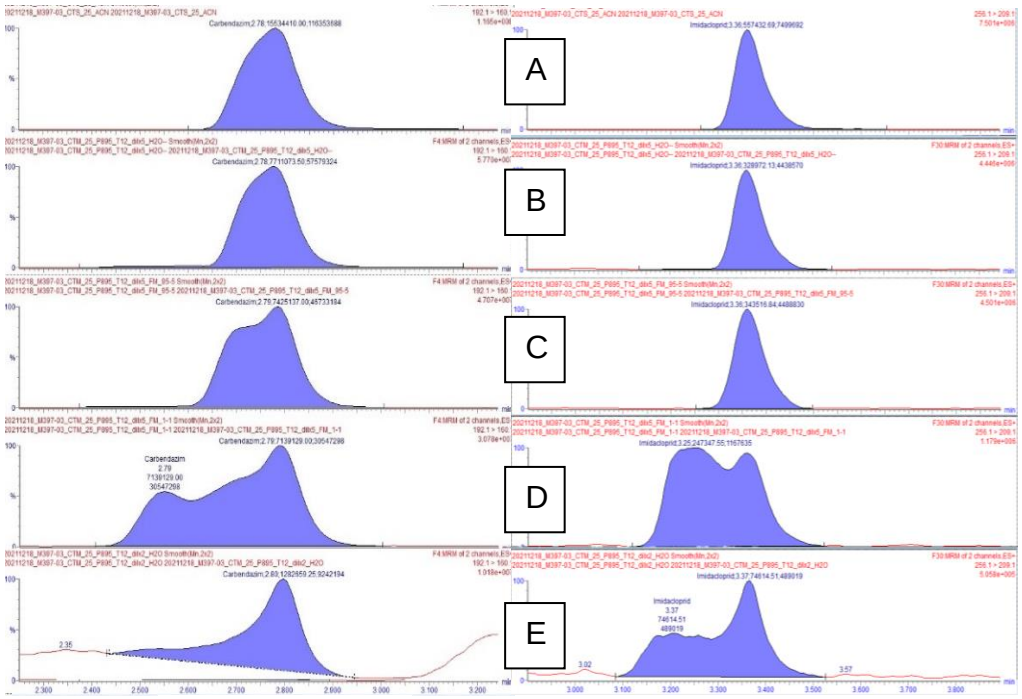


Fonte: A autora, 2022

Da análise estatística (Apêndice C), conclui-se que a variação da quantidade de MWCNTs-OH resultou em recuperações estatisticamente diferentes para 44 dos 74 analitos, sendo que para a maioria destes a diferença se estabelece entre o uso de 10 mg *versus* 5 mg, e na maioria dos casos as recuperações obtidas usando 20 ou 10 mg eram estatisticamente iguais. No entanto, um diferencial importante foi a recuperação na faixa aceitável dos 74 compostos de interesse, portanto, 10 mg de MWCNTs-OH foi escolhido como segunda limpeza do extrato.

Como comentado anteriormente, antes da validação do método foi realizado um teste diluindo o extrato final de tabaco em diferentes proporções de fase móvel e em água ultrapura. Comparou-se as diluições de 1:5 em água ultrapura (T37-a), fase móvel em proporção 90:10 (T37-b) e fase móvel em proporção 50:50 (T37-c), a fim de avaliar se o formato de pico dos compostos que eluem na primeira parte da corrida podiam ser melhorados. Da mesma forma, com o intuito de diminuir o fator de diluição do método, testou-se uma diluição de 1:1 em água ultrapura (T37-d). Os resultados obtidos mostram melhores formatos de pico para a diluição de 5 vezes em água ultrapura, como podemos ver na Figura 13.

Figura 13 – Cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS, para os compostos carbendazim e imidacloprido preparados em branco de tabaco e no solvente (25 µg L^{-1}). A) CTS 25 µg L^{-1}, B) 1:5 em água ultrapura, C) 1:5 em FM 90:10, D) 1:5 em FM 50:50, E) 1:1 em água ultrapura



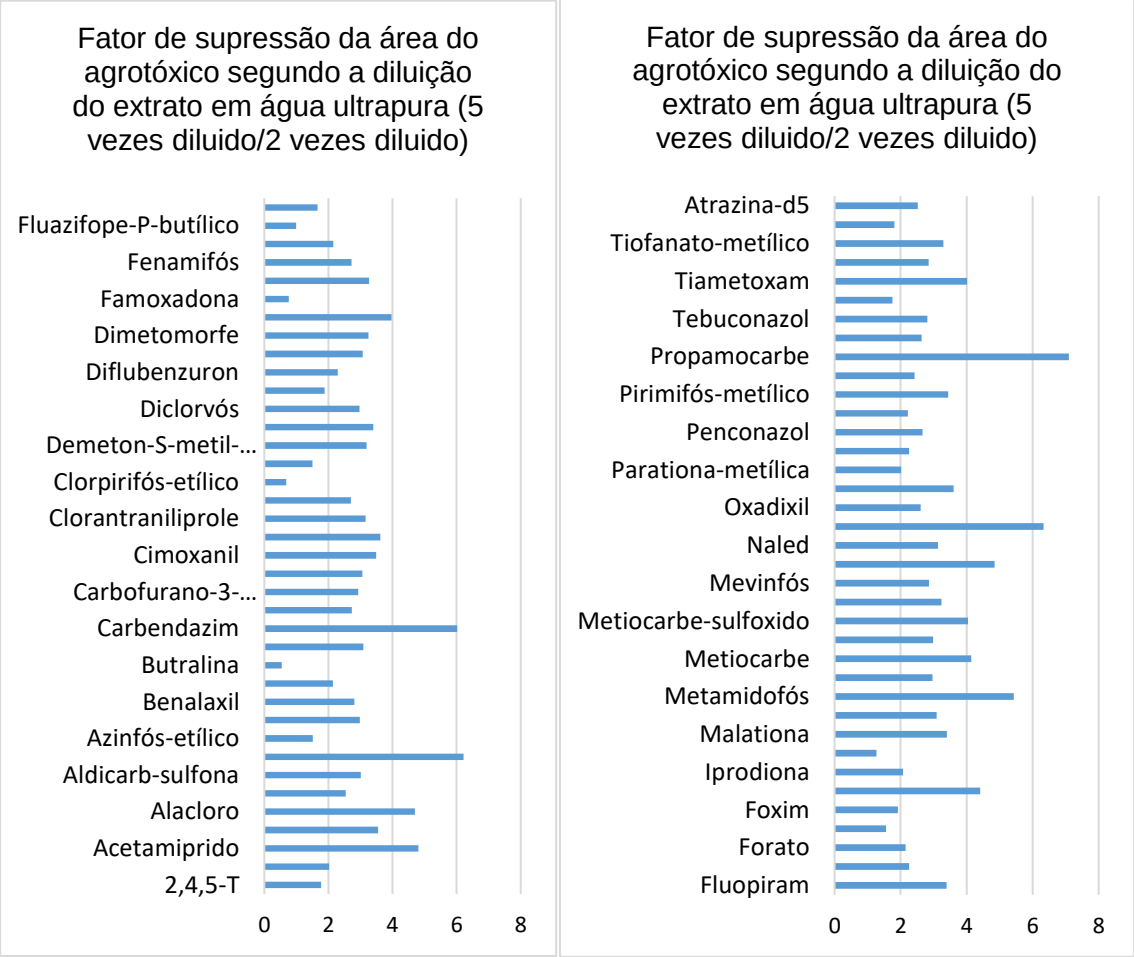
Carbendazim Imidacloprido

Fonte: A autora, 2022

As diluições nas diferentes proporções de FM não mostraram vantagem frente à diluição 1:5 em água ultrapura e, pelo contrário, pioraram o formato de pico destes primeiros analitos eluidos da coluna cromatográfica.

A diluição de duas vezes em água, não apenas piorou o formato de pico para boa parte dos compostos como apresentou um aumento importante do efeito matriz. Ao comparar as áreas de cada composto nos testes T37-a e T37-d constatou-se que as áreas no T37-a (1:5) foram de duas e sete vezes maiores, quando comparada a diluição 1:1 (T37-d). O teste T37-d apresentou um efeito supressor do sinal de entre duas e sete vezes maior dependendo do analito como podemos observar na Figura 14. Desta forma manteve-se a diluição de 5 vezes em água ultrapura para a validação do método.

Figura 14 - Fator de supressão dos agrotóxicos segundo a diluição do extrato em água ultrapura (Área analito no T37-a/ Área analito no T37-d; 5 vezes diluido/2 vezes diluído)

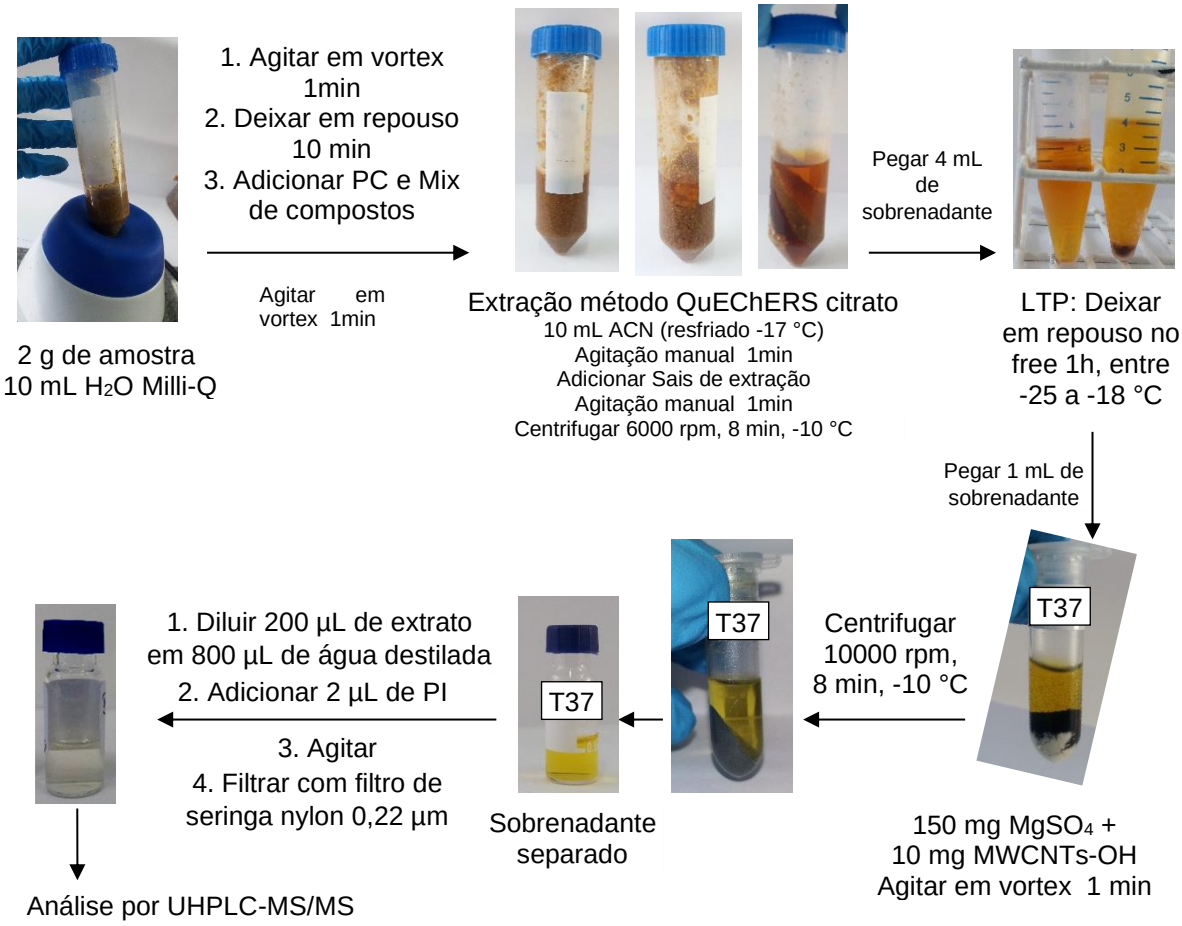


Fonte: A autora, 2022

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

A validação do método, representada na Figura 15, para os agrotóxicos relacionados na Tabela 3 foi realizada de acordo com os guias SANTE (2019), INMETRO (2020) e ANVISA (BRASIL, 2017).

Figura 15 - Fluxograma do procedimento de extração e limpeza de extrato otimizado neste trabalho.



Fonte: A autora, 2022

As soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em acetonitrila (curva no solvente) e no extrato “branco” da matriz tabaco (curva na matriz). Desta forma, foi possível avaliar: seletividade, faixa de trabalho, efeito matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediaria).

Os resultados da validação estão apresentados nas Tabelas 13 e 14. Na Tabela 13 são apresentados os resultados de faixa linear, coeficiente de determinação das curvas analíticas, percentuais de recuperação e precisão para ensaios de repetitividade (RSDr) e precisão intermediaria (RSDpi) do método otimizado, e na Tabela 14 pode-se observar os resultados de efeito matriz e Limites de detecção e quantificação em comparação aos Níveis de Resíduos do Guia (GRL) CORESTA sugeridos para os agrotóxicos em estudo.

4.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi assegurada pela ausência de interferêntes no mesmo tempo de retenção, íons de quantificação e de confirmação de cada agrotóxico. Assim, a amostra foi utilizada para o preparo das curvas analíticas e ensaios de exatidão e precisão. Os solventes e reagentes empregados no preparo de amostra também foram avaliados através da realização do procedimento de extração sem amostra (“branco” reagente). Assim, foi assegurado que os mesmos estavam isentos de contaminantes que poderiam interferir na análise.

4.3.2 Linearidade

A faixa linear e curva analítica foram obtidas em curvas preparadas no extrato da matriz. Os pontos da curva preparados foram, 1, 2, 4, 6, 10, 20, 40 e 60 µg L^{-1}, equivalentes a 0,025; 0,05; 0,1; 0,15, 0,25, 0,50; 1 e 1,5 mg kg^{-1}. A amplitude da faixa garantiu um número mínimo de 5 pontos de curva para todos os compostos avaliados. As curvas para cada composto apresentaram coeficiente de determinação (r^2) maior a 0,99 como pode ser observado na Tabela 13.

Tabela 13 – Faixa linear, coeficiente de determinação das curvas analíticas, percentuais de recuperação e precisão para ensaios de repetitividade (RSDr) e precisão intermediaria (RSDpi) do método validado

(continua)

Composto	Faixa linear (mg kg^{-1})	r^2	Níveis de fortificação (mg kg^{-1})						Níveis de fortificação (mg kg^{-1})		
			0,025	0,05	0,1	0,15	0,25	0,5	0,05	0,15	0,25
			Recuperação (±RDSr)%						Recuperação (±RDSpi)%		
2,4,5-T	0,1 - 1,5	0,9942	-	-	85 (43)	91 (19)	85 (12)	93 (11)	-	95 (19)	99 (17)
2,4-D	0,025 - 1,5	0,9999	88 (22)	89 (8)	91 (5)	93 (9)	95 (9)	97 (4)	109 (6)	103 (8)	98 (8)
Acetamiprido	0,025 - 1	0,9998	114 (2)	102 (2)	99 (4)	105 (3)	100 (3)	98 (2)	112 (5)	102 (2)	104 (4)
Acibenzolar-S-metil	0,1 - 1	0,9982	-	-	104 (9)	100 (6)	93 (6)	86 (6)	-	95 (5)	90 (7)
Alacloro	0,1 - 1,5	0,9946	-	-	120 (29)	103 (14)	98 (10)	88 (14)	-	104 (11)	102 (9)
Aldicarb	0,05 - 5	0,9978	-	84 (13)	90 (7)	103 (5)	100 (11)	97 (4)	114 (3)	105 (6)	104 (6)
Aldicarb-sulfona	0,025 - 1,5	0,9991	130 (7)	113 (4)	100 (6)	104 (5)	100 (3)	99 (2)	115 (5)	106 (1)	102 (6)
Aldicarb-sulfóxido	0,025 - 1,5	0,9991	113 (3)	100 (3)	90 (6)	93 (4)	88 (3)	89 (2)	116 (2)	96 (1)	94 (6)
Azinfós-etílico	0,15 - 1,5	0,9973	-	-	-	119 (5)	105 (5)	89 (5)	-	117 (5)	108 (4)
Azoxistrobina	0,025 - 1,5	0,9962	192 (1)	140 (2)	111 (4)	107 (2)	98 (2)	93 (2)	124 (3)	102 (2)	101 (3)
Benalaxil	0,025 - 1	0,9990	139 (3)	117 (2)	103 (5)	102 (5)	100 (3)	97 (3)	119 (3)	100 (3)	101 (2)
Butóxido de piperonila	0,025 - 1	0,9991	145 (4)	116 (3)	101 (3)	102 (3)	96 (2)	90 (2)	116 (3)	96 (3)	100 (2)
Butralina	0,15 - 1,5	0,9964	-	-	169 (5)	118 (9)	96 (10)	77 (8)	-	116 (6)	110 (3)
Carbaril	0,05 - 1	0,9970	-	121 (7)	111 (3)	109 (5)	101 (4)	95 (3)	113 (7)	101 (3)	100 (2)
Carbendazim	0,025 - 1	0,9997	59 (10)	70 (1)	73 (2)	74 (2)	74 (2)	73 (2)	86 (2)	82 (3)	79 (6)
Carbofurano	0,05 - 1	0,9988	-	125 (2)	106 (3)	109 (1)	100 (4)	94 (2)	138 (3)	104 (2)	104 (4)

r^2: Coeficiente de determinação da curva obtida

Tabela 13 – Faixa linear, coeficiente de determinação das curvas analíticas, percentuais de recuperação e precisão para ensaios de repetitividade (RSDr) e precisão intermediaria (RSDpi) do método validado

(continuação)

Composto	Faixa linear (mg kg^{-1})	r^2	Níveis de fortificação (mg kg^{-1})						Níveis de fortificação (mg kg^{-1})		
			0,025	0,05	0,1	0,15	0,25	0,5	0,05	0,15	0,25
			Recuperação (±RDSr)%						Recuperação (±RDSpi)%		
Carbofurano-3-hidróxido	0,025 - 1	0,9996	124 (5)	104 (3)	102 (4)	106 (5)	100 (4)	99 (2)	113 (2)	101 (1)	103 (5)
Ciantraliniprole	0,025 - 1	0,9996	110 (10)	98 (18)	94 (10)	98 (7)	93 (7)	94 (2)	114 (4)	102 (5)	101 (5)
Cimoxanil	0,025 - 1	0,9985	148 (3)	115 (3)	104 (5)	108 (2)	99 (3)	95 (3)	116 (2)	102 (1)	103 (3)
Clomazona	0,025 - 1	0,9980	154 (3)	118 (3)	106 (4)	105 (3)	99 (3)	93 (3)	108 (4)	102 (1)	98 (3)
Clorantraniliprole	0,025 - 1	0,9967	147 (13)	114 (6)	102 (8)	103 (5)	94 (6)	94 (4)	115 (4)	97 (9)	99 (7)
Clorfenvinfós	0,025 - 1	0,9983	156 (4)	120 (3)	103 (4)	101 (5)	94 (1)	91 (2)	117 (5)	102 (3)	100 (3)
Clorpirifós-etílico	0,1 - 1,5	0,9950	-	-	157 (8)	119 (8)	113 (9)	91 (8)	-	108 (5)	104 (7)
Clorpirifós-metílico	0,1 - 1	0,9988	-	-	102 (17)	104 (8)	101 (8)	92 (7)	-	94 (8)	98 (7)
Demeton-S-metil-sulfona	0,025 - 1,5	0,9993	115 (3)	107 (4)	100 (6)	106 (3)	102 (3)	102 (2)	116 (3)	106 (2)	106 (5)
Diazinon	0,05 - 1	0,9988	-	128 (2)	104 (5)	103 (5)	98 (4)	92 (3)	134 (2)	100 (3)	98 (2)
Diclorvós	0,025 - 1	0,9986	126 (7)	108 (6)	100 (4)	102 (5)	95 (2)	92 (2)	110 (4)	96 (2)	101 (4)
Difenoconazol	0,025 - 0,5	0,9983	120 (9)	107 (5)	98 (4)	103 (5)	96 (4)	91 (3)	105 (7)	97 (8)	99 (2)
Diflubenzuron	0,1 - 1,5	0,9968	-	-	112 (4)	107 (9)	97 (6)	90 (6)	-	105 (11)	97 (5)
Dimetoato	0,025 - 1	0,9996	106 (8)	103 (3)	99 (5)	103 (3)	102 (3)	99 (2)	119 (3)	102 (2)	104 (4)
Dimetomorfe	0,025 - 1	0,9990	142 (2)	118 (2)	101 (4)	102 (3)	96 (2)	94 (2)	114 (4)	101 (3)	100 (2)

r^2: Coeficiente de determinação da curva obtida

Tabela 13 – Faixa linear, coeficiente de determinação das curvas analíticas, percentuais de recuperação e precisão para ensaios de repetitividade (RSDr) e precisão intermediaria (RSDpi) do método validado

(continuação)

Composto	Faixa linear (mg kg^{-1})	r^2	Níveis de fortificação (mg kg^{-1})						Níveis de fortificação (mg kg^{-1})		
			0,025	0,05	0,1	0,15	0,25	0,5	0,05	0,15	0,25
			Recuperação (±RDSr)%						Recuperação (±RDSpi)%		
Etoprofós	0,025 - 1	0,9974	147 (5)	123 (4)	104 (6)	102 (3)	99 (2)	94 (3)	111 (4)	99 (4)	97 (2)
Famoxadona	0,15 - 1,5	0,9935	-	-	-	120 (5)	101 (7)	83 (7)	-	119 (4)	116 (3)
Fenamidona	0,05 - 1	0,9980	-	122 (3)	105 (6)	104 (3)	99 (2)	93 (2)	122 (4)	102 (3)	99 (1)
Fenamifós	0,05 - 1	0,9991	-	108 (3)	99 (5)	101 (4)	99 (6)	95 (2)	116 (4)	101 (2)	97 (3)
Fentiona	0,05 - 1	0,9981	-	114 (6)	104 (5)	98 (6)	98 (4)	89 (4)	110 (3)	102 (5)	101 (2)
Fluazifope-P-butílico	0,05 - 1	0,9968	-	146 (1)	113 (4)	107 (4)	98 (5)	87 (3)	129 (3)	98 (4)	102 (3)
Flubendiamida	0,15 - 1,5	0,9949	-	-	-	100 (15)	92 (17)	86 (17)	-	118 (9)	102 (13)
Fluopiram	0,025 - 1	0,9981	155 (1)	122 (3)	104 (7)	104 (4)	101 (3)	94 (2)	130 (2)	103 (3)	101 (2)
Forato	0,025 - 1	0,9991	110 (4)	104 (2)	99 (6)	103 (1)	101 (3)	99 (1)	100 (6)	102 (1)	105 (4)
Fosalona	0,05 - 1	0,9975	-	118 (6)	109 (5)	101 (7)	97 (5)	88 (4)	120 (6)	99 (6)	97 (7)
Fosfamidona	0,1 - 1	0,9997	-	-	111 (7)	113 (4)	97 (5)	89 (5)	-	106 (7)	103 (3)
Foxim	0,025 - 0,5	0,9992	122 (3)	109 (5)	101 (6)	102 (6)	100 (5)	95 (4)	109 (5)	101 (3)	105 (3)
Imidacloprido	0,025 - 1	0,9995	113 (4)	100 (2)	97 (6)	103 (3)	97 (3)	94 (3)	102 (7)	101 (3)	101 (4)
Indoxacarbe	0,15 - 1,5	0,9973	-	-	-	107 (16)	114 (7)	100 (13)	-	110 (9)	102 (7)
Iprodiona	0,05 - 1	0,9921	-	124 (5)	109 (4)	107 (5)	98 (6)	89 (4)	121 (4)	102 (3)	103 (2)
Malationa	0,025 - 1	0,9992	146 (5)	116 (4)	101 (4)	106 (4)	101 (2)	97 (2)	114 (5)	101 (2)	99 (2)
Metalaxil	0,025 - 1	0,9990	130 (4)	111 (2)	102 (4)	105 (3)	100 (2)	98 (2)	115 (3)	102 (1)	101 (1)
Metamidofós	0,1 - 1,5	0,9966	-	-	102 (5)	97 (3)	82 (2)	80 (2)	112 (1)	96 (2)	87 (5)

r^2: Coeficiente de determinação da curva obtida

Tabela 13 – Faixa linear, coeficiente de determinação das curvas analíticas, percentuais de recuperação e precisão para ensaios de repetitividade (RSDr) e precisão intermediaria (RSDpi) do método validado

(continuação)

Composto	Faixa linear (mg kg^{-1})	r^2	Níveis de fortificação (mg kg^{-1})						Níveis de fortificação (mg kg^{-1})		
			0,025	0,05	0,1	0,15	0,25	0,5	0,05	0,15	0,25
			Recuperação (±RDSr)%						Recuperação (±RDSpi)%		
Metidationa	0,05 - 1	0,9994	-	120 (2)	107 (3)	107 (2)	99 (3)	94 (2)	116 (3)	101 (2)	104 (3)
Metiocarbe	0,025 - 0,5	0,9991	124 (10)	113 (2)	101 (2)	103 (4)	103 (3)	98 (2)	120 (1)	100 (2)	99 (2)
Metiocarbe-sulfona	0,025 - 1	0,9989	147 (3)	125 (3)	115 (5)	120 (1)	113 (3)	112 (1)	125 (2)	103 (1)	104 (4)
Metiocarbe-sulfoxido	0,025 - 1	0,9995	124 (2)	109 (2)	99 (5)	101 (3)	97 (1)	97 (2)	119 (1)	98 (2)	97 (3)
Metomil	0,1 - 1,5	0,9980	-	-	107 (6)	101 (4)	97 (3)	95 (2)	-	109 (3)	106 (2)
Mevinfós	0,025 - 1,5	0,9983	139 (6)	117 (3)	102 (5)	104 (3)	98 (3)	95 (2)	118 (2)	103 (2)	102 (4)
Monocrotofós	0,025 - 1,5	0,9982	140 (5)	116 (2)	99 (6)	105 (4)	99 (3)	97 (2)	117 (5)	110 (2)	104 (4)
Naled	0,15 - 1,5	0,9951	-	-	162 (13)	119 (9)	120 (2)	111 (8)	-	110 (7)	104 (2)
Ometoato	0,1 - 1,5	0,9980	-	-	96 (8)	92 (5)	89 (5)	89 (3)	-	98 (4)	94 (8)
Oxadixil	0,1 - 1,5	0,9983	-	-	107 (6)	100 (5)	99 (7)	94 (3)	-	105 (2)	104 (2)
Oxamil	0,025 - 1	0,9994	124 (7)	109 (5)	96 (8)	104 (6)	97 (3)	100 (3)	116 (5)	102 (2)	103 (6)
Parationa-metílica	0,05 - 1,5	0,9992	-	109 (6)	100 (6)	105 (5)	102 (3)	100 (2)	114 (2)	108 (2)	105 (4)
Pebulato	0,025 - 1	0,9996	132 (9)	114 (4)	99 (4)	97 (6)	94 (5)	87 (3)	111 (3)	94 (4)	100 (4)
Penconazol	0,05 - 1	0,9996	-	120 (6)	105 (5)	102 (6)	97 (4)	93 (2)	118 (3)	100 (3)	99 (4)
Pirimicarbe	0,025 - 1	0,9986	137 (1)	112 (3)	99 (4)	102 (3)	94 (2)	91 (1)	124 (1)	101 (2)	102 (4)
Pirimifós-metílico	0,05 - 1	0,9989	-	132 (3)	110 (5)	106 (3)	100 (4)	91 (2)	125 (2)	98 (3)	96 (1)
Profenofós	0,025 - 1	0,9978	169 (5)	126 (5)	103 (3)	101 (5)	95 (3)	86 (2)	127 (2)	97 (5)	95 (2)

r^2: Coeficiente de determinação da curva obtida

Tabela 13 – Faixa linear, coeficiente de determinação das curvas analíticas, percentuais de recuperação e precisão para ensaios de repetitividade (RSDr) e precisão intermediaria (RSDpi) do método validado

(continuação)

Composto	Faixa linear (mg kg^{-1})	r^2	Níveis de fortificação (mg kg^{-1})						Níveis de fortificação (mg kg^{-1})		
			0,025	0,05	0,1	0,15	0,25	0,5	0,05	0,15	0,25
			Recuperação (±RDSr)%						Recuperação (±RDSpi)%		
Propamocarbe	0,025 - 1,5	0,9971	82 (4)	83 (2)	76 (6)	82 (5)	80 (4)	82 (2)	92 (2)	82 (2)	81 (5)
Propoxur	0,025 - 1	0,9996	134 (4)	113 (5)	102 (5)	107 (4)	102 (3)	98 (3)	110 (7)	103 (1)	103 (1)
Tebuconazol	0,025 - 1	0,9989	115 (8)	114 (4)	94 (10)	101 (5)	99 (2)	97 (3)	111 (5)	99 (4)	99 (4)
Terbufós	0,025 - 0,5	0,9995	94 (15)	102 (15)	93 (15)	95 (12)	100 (6)	94 (4)	118 (2)	104 (8)	103 (4)
Tiametoxam	0,025 - 1	0,9997	103 (7)	100 (5)	102 (6)	108 (3)	104 (3)	101 (3)	115 (5)	102 (2)	106 (3)
Tiodicarbe	0,025 - 1	0,9998	115 (5)	108 (2)	98 (6)	103 (3)	97 (4)	97 (2)	115 (3)	100 (2)	102 (4)
Tiofanato-metílico	0,025 - 1	0,9985	142 (5)	119 (3)	98 (4)	102 (2)	98 (3)	95 (3)	110 93)	90 (4)	93 (3)
Triflumurom	0,05 - 1	0,9968	-	161 (4)	112 (7)	107 (4)	97 (5)	88 (3)	121 (3)	102 (3)	100 (2)

r^2: Coeficiente de determinação da curva obtida

Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação, efeito matriz e Nível de Resíduo Guia (GRL) CORESTA para os agrotóxicos estudados

(continua)

Composto	Efeito matriz	LOQ (mg kg^{-1})	LOD (mg kg^{-1})	GRL CORESTA (mg kg^{-1})
2,4,5-T	4	0,15	0,045	0,05
2,4-D	18	0,05	0,015	0,2
Acetamiprido	-63	0,025	0,008	3
Acibenzolar-S-metil	-73	0,1	0,03	5
Alacloro	-76	0,15	0,045	0,1
Aldicarb	-88	0,05	0,015	
Aldicarb-sulfona	-32	0,05	0,015	0,5 [a]
Aldicarb-sulfoxido	-24	0,025	0,008	
Azinfós-etílico	-71	0,1	0,03	0,1
Azoxistrobina	-53	0,1	0,03	16
Benalaxil	-63	0,05	0,015	2
Butóxido de piperonila	-61	0,05	0,015	3
Butralina	-94	0,15	0,045	5
Carbaril	-74	0,1	0,03	0,5
Carbendazim	-37	0,1	0,03	2 [b]
Tiofanato metílico	-75	0,05	0,015	
Carbofurano	-58	0,1	0,03	0,5 [c]
Carbofurano-3-hidróxido	-55	0,05	0,015	
Ciantraniliprole	-66	0,025	0,008	18
Cimoxanil	-80	0,05	0,015	0,1
Clomazona	-76	0,05	0,015	0,2
Clorantraniliprole	-80	0,05	0,015	14
Clorfenvinfós	-95	0,05	0,015	0,04
Clorpirifós-etílico	-79	0,15	0,045	0,5
Clorpirifós-metílico	-34	0,1	0,03	0,2
Demeton-S-metil-sulfona	-74	0,025	0,008	0,1
Diazinon	-57	0,1	0,03	0,1
Diclorvós	-73	0,05	0,015	0,1 [d]
Naled	-86	0,1	0,03	
Difenoconazol	-53	0,025	0,008	12
Diflubenzuron	-77	0,1	0,03	0,1
Dimetoato	-80	0,025	0,008	0,5 [e]
Ometoato	-78	0,1	0,03	
Dimetomorfe	-77	0,05	0,015	2
Etoprofós	-81	0,1	0,03	0,1

a Somatório de aldicarb, aldicarb-sulfona e aldicarb-sulfóxido expresso como aldicarb
b Somatório de carbendazim e tiofanato metílico expresso como carbendazim
c Somatório de carbofurano e carbofurano-3-hidróxido expresso como carbofurano
d Somatório de diclorvós e naled expresso como diclorvós
e Somatório de dimetoato e ometoato expresso como dimetoato

Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação, efeito matriz e Nível de Resíduo Guia (GRL) CORESTA para os agrotóxicos estudados,

(conclui)

Composto	Efeito matriz	LOQ (mg kg^{-1})	LOD (mg kg^{-1})	GRL CORESTA (mg kg^{-1})
Famoxadona	-91	0,15	0,045	5
Fenamidona	-88	0,1	0,03	3
Fenamifós	-79	0,025	0,008	0,5
Fentiona	-49	0,05	0,015	0,1
Fluazifope-P-butílico	-69	0,1	0,03	1
Flubendiamida	-86	0,15	0,045	18
Fluopiram	-89	0,1	0,03	5
Fosfamidona	-35	0,025	0,008	0,05
Forato	-69	0,05	0,015	0,05
Fosalona	-76	0,1	0,03	0,1
Foxim	-74	0,05	0,015	0,5
Imidacloprido	-65	0,025	0,008	5
Iprodiona	-72	0,15	0,045	0,5
Indoxacarbe	-74	0,1	0,03	6
Malationa	-87	0,05	0,015	0,5
Metalaxil	-55	0,05	0,015	2
Metamidofós	-66	0,05	0,015	1
Metidationa	-37	0,05	0,015	0,1
Metiocarbe	-47	0,05	0,015	
Metiocarbe-sulfona	-52	0,1	0,03	0,2 [f]
Metiocarbe-sulfoxido	-78	0,05	0,015	
Metomil	-26	0,1	0,03	1 [g]
Tiodicarbe	-73	0,025	0,008	
Mevinfós	-45	0,05	0,015	0,04
Monocrotofós	-87	0,05	0,015	0,3
Oxadixil	-33	0,1	0,03	0,1
Oxamil	-61	0,05	0,015	0,5
Parationa-metílica	-60	0,05	0,015	0,1
Pebulato	-17	0,05	0,015	0,5
Penconazol	-73	0,05	0,015	1
Pirimicarbe	63	0,05	0,015	0,5
Pirimifós-metílico	-71	0,1	0,03	0,1
Profenofós	-66	0,1	0,03	0,1
Propamocarbe	-87	0,025	0,008	13
Propoxur	-47	0,05	0,015	0,1
Tebuconazol	-48	0,025	0,008	18
Terbufós	-70	0,025	0,008	0,05
Tiametoxam	-49	0,025	0,008	5
Triflumurom	-85	0,1	0,03	4

f Somatório de metiocarbe, metiocarbe-sulfona e metiocarbe-sulfóxido expresso como metiocarbe
g Somatório de metomil e tiodicarbe

4.3.3 Limites de detecção e Limites de Quantificação do método

Conforme descrito anteriormente estes valores de LOQ foram determinados a partir dos ensaios de fortificação, considerado como LOQ, o nível fortificado mais baixo com exatidão e precisão aceitáveis (SANTE, 2019).

Como pode ser verificado na Tabela 14, os valores de LOD e LOQ do método estiveram na faixa de 0,007-0,045 e 0,025-0,15 mg kg^{-1} respetivamente. Estes valores de LOD e LOQ são considerados satisfatórios para o método desenvolvido e validado para a maioria dos compostos considerando a complexidade da matriz analisada.

Para os agrotóxicos 2,4,5-T; alaclor; clorfenvinfós e mevinfós o LOQ atingido pelo método não atingiu o GRL sugerido pela CORESTA. Dentre a principais causas que poderiam explicar este resultado temos a alta complexidade desta matriz, pelos numerosos e variados coextrativos que a mesma possui o que torna difícil a limpeza do extrato. Especificamente para os compostos alaclor; clorfenvinfós e mevinfós observou-se um efeito matriz depressor do sinal significativo (-76; -95 e -45% respectivamente). Esta supressão de sinal faz mais difícil a obtenção de picos adequados com S/R > 10 a medida que a concentração do analito no extrato é mais baixa.

4.3.4 Exatidão e Precisão

Na Tabela 13 estão apresentados os valores de recuperações (n=6) e RSDr (repetitividade) para os agrotóxicos avaliados em tabaco. Nos níveis 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,25; 0,5 mg kg^{-1} foi avaliada a exatidão. Para avaliação da precisão, foram avaliados e comparados os resultados de RSDs na repetição dos níveis 0,05; 0,15 e 0,25 mg kg^{-1}.

4.3.5 Efeito Matriz

Como pode ser observado na Tabela 14, a maior parte dos compostos apresentaram efeito matriz negativo significativo (acima de -20%), sendo importante a supressão do sinal para a maioria dos analitos avaliados. Apenas os compostos

2,4,5-T; 2,4-D e pirimicarb apresentaram efeito matriz positivo, sendo considerado um efeito significativo apenas no caso do pirimicarb (acima de +20%).

4.3.6 Aplicação do método validado

O método foi aplicado em 18 amostras de tabaco, cultivadas no estado do Rio Grande do Sul (Brasil). De acordo com a tabela 15, todas as amostras analisadas apresentaram resíduos de dois ou mais agrotóxicos. No total foram detectados dois herbicidas (H), cinco fungicidas (F) e dois inseticidas (I).

Os compostos imidacloprido (I) e propamocarbe (F) estavam presentes em todas as amostras analisadas. O composto imidacloprido teve resultados superiores ao estabelecido pelo GRL CORESTA para as amostras A1, A14 e A17, enquanto que o propamocarbe ultrapassou o GRL CORESTA nas amostras A3, A9, A10, A13 e A16. O composto 2,4-D (H) foi detectado em apenas uma amostra, a A6 onde o mesmo passou o valor sugerido como GRL CORESTA, o mesmo aconteceu no caso da iprodiona (F), que teve resultado positivo para a A10 numa concentração que supera a GRL CORESTA.

No caso dos compostos azoxistrobina (F), tebuconazole (F) e tiametoxam (I), como pode ser observado na tabela 15 tiveram resultados positivos para sete, três e oito amostras respectivamente, em nenhum caso ultrapassando o GRL CORESTA.

Os compostos cimoxanil e clomazona tiveram resultado positivo para sete e quatro amostras respectivamente. Para as amostras A1, A3, A6, A9 e A13 o cimoxanil foi detectado abaixo do LOQ, enquanto que para A4 e A5 o resultado esteve acima do GRL CORESTA. No caso da clomazona a amostra A2 teve um resultado abaixo do LOQ, enquanto A5, A6 e A17 estiveram acima do GRL CORESTA para este composto.

Tabela 15 - Resultados das análises das amostras de tabaco empregando o método desenvolvido neste trabalho

Amostra	Concentração nas amostras (mg kg^{-1}) dos agrotóxicos detectados								
	2,4-D (H)	Azoxistrobina (F)	Cimoxanil (F)	Clomazona (H)	Imidacloprido (I)	Iprodiona (F)	Propamocarbe (F)	Tebuconazol (F)	Tiametoxam (I)
A1	n.d	n.d	<LOQ	n.d	6,68	n.d	4,77	n.d	n.d
A2	n.d	n.d	n.d	<LOQ	4,05	n.d	7,05	n.d	1,67
A3	n.d	n.d	<LOQ	n.d	3,39	n.d	36,14	n.d	4,5
A4	n.d	n.d	0,16	n.d	1,68	n.d	3,03	n.d	1,24
A5	n.d	n.d	0,18	0,42	3,48	n.d	4,2	n.d	0,14
A6	0,32	0,82	<LOQ	0,83	4,97	n.d	3,14	2,37	0,85
A7	n.d	1,08	n.d	n.d	1,09	n.d	2,07	n.d	0,2
A8	n.d	n.d	n.d	n.d	1,37	n.d	5,11	0,47	n.d
A9	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	3,49	n.d	31,81	n.d	n.d
A10	n.d	n.d	n.d	n.d	1,68	2,27	15,77	n.d	n.d
A11	n.d	n.d	n.d	n.d	1,15	n.d	0,67	n.d	n.d
A12	n.d	n.d	n.d	n.d	2,65	n.d	5,68	n.d	n.d
A13	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	1,77	n.d	23,09	1,42	n.d
A14	n.d	n.d	n.d	n.d	29,87	n.d	6,36	n.d	n.d
A15	n.d	n.d	n.d	n.d	0,6	n.d	0,37	n.d	n.d
A16	n.d	<LOQ	n.d	n.d	2,69	n.d	17,68	n.d	4,85
A17	n.d	0,63	n.d	0,32	14,1	n.d	5,9	n.d	n.d
A18	n.d	<LOQ	n.d	n.d	4,2	n.d	7,02	n.d	0,27
LOQ (mg kg^{-1})	0,05	0,1	0,05	0,05	0,025	0,25	0,025	0,025	0,025
GRL CORESTA (mg kg^{-1})	0,2	16	0,1	0,2	5	0,5	13	18	5

(F) Fungicida; (H) Herbicida; (I) Inseticida

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, variações do método QuEChERS foram testadas e modificadas a fim de obter um método de preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos em tabaco simples e efetivo. Demonstrou-se o uso de LTP, bem como de novos materiais, na etapa de limpeza do extrato assim como diferentes sorventes para remoção de coextrativos.

A etapa de limpeza do extrato desenvolvida conseguiu uma remoção moderada de coextrativos retirando aproximadamente 50% destes em duas etapas de limpeza, ainda com resultados de recuperação satisfatórios para os 74 agrotóxicos avaliados neste estudo e com GRL estabelecidos no guia do CORESTA.

O método validado para a matriz tabaco usando QuEChERS citrato, 1 h de LTP, d-SPE com 10 mg de MWCNTs-OH, diluição de 5 vezes em água ultrapura, e determinação multirresíduo de agrotóxicos por UHPLC-MS/MS apresentou adequada seletividade e sensibilidade, com valores de LOD e LOQ entre 0,007-0,045 e 0,025-0,15 mg kg^{-1}, respectivamente.

Mesmo após as duas etapas de limpeza e a diluição de 5 vezes o efeito matriz para 72 dos 74 compostos foi considerado significativo (acima de ± 20%). Assim, para compensar este efeito de supressão ou incremento do sinal analítico, as curvas analíticas foram preparadas em extrato de matriz branco de tabaco.

O método validado foi aplicado em 18 amostras de tabaco. Todas as amostras analisadas apresentaram resíduos de dois ou mais agrotóxicos. Dos 74 compostos monitorados 9 foram detectados nas amostras analisadas: 2,4-D (H), azoxistrobina (F), cimoxanil (F), clomazona (H), imidacloprido (I), iprodiona (F), propamocarbe (F), tebuconazol (F) e tiametoxam (I). Em algumas das amostras as concentrações destes agrotóxicos estavam acima dos GRL sugeridos pelo CORESTA, como é o caso para 2,4-D (uma amostra), cimoxanil (duas amostras), clomazona (três amostras), imidaclorprido (três amostras), iprodiona (uma amostra) e propamocarbe (cinco amostras).

Portanto, conclui-se que o método desenvolvido, apesar da complexidade da matriz, é eficiente e adequado para análise multirresíduo de agrotóxicos em tabaco, visto que todos os parâmetros de validação exigidos foram atendidos satisfatoriamente.

6. TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Desenvolver um método de análise cromatográfica por GC-MS/MS para expandir o escopo para os analitos não passíveis de análise por cromatografia líquida.
- ✓ Avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido para matrizes semelhantes de plantas que passam por processo de secagem como *cannabis* ou diferentes tipos de chás.
- ✓ Avaliar a modificação dos MWCNTs com outros grupos funcionais que possam aumentar sua eficiência de limpeza do extrato do tabaco (*clean-up*).

7. DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO LABORATORIO

Os ensaios analíticos realizados neste trabalho geraram resíduos líquidos e sólidos que precisaram de um tratamento e descarte adequados.

Os resíduos líquidos foram recolhidos e colocados em recipientes rotulados como halogenados e não-halogenados e logo após, encaminhados ao setor responsável pelo condicionamento e encaminhamento para a disposição ambientalmente correta destes resíduos, no Departamento de Química da UFSM.

Os resíduos sólidos, foram colocados em sacos plásticos, devidamente rotulados e logo em seguida, encaminhados também ao setor responsável pelo condicionamento e encaminhamento para a disposição ambientalmente correta destes resíduos, no Departamento de Química da UFSM.

8. REFERÊNCIAS

ABDULLAH, N.; TAJUDDIN, M. H.; YUSOF, N. **Carbon-based polymer nanocomposites for dye and pigment removal**: Elsevier Inc., 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813574-7.00013-7. Acesso: 03/01/2020

AGILENT, SIGMA-ALDRICH. **Agilent Captiva EMR—Lipid Method Guide**. Disponível em: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/5991-8308EN.pdf. Acesso em: 13 mar. 2022.

AGILENT, SIGMA-ALDRICH. **Recommended Protocols for Enhanced Matrix Removal – Lipid**. 2015. Disponível em: https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5991-6057EN.pdf Acesso em: 11 mar. 2022.

ANASTASSIADES, M. CRL-SRM 1st Joint CRL Workshop. 2006. Stuttgart. Disponível em http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/1stws2006_lecture_anastassiades_quechers.pdf. Acesso: 03/01/2020.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, **Journal of AOAC international.** v, 86, n, 2, p, 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. **Crop protection, public health, enviromental safety**, Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2007.

ANUMOL, T.; LEHOTAY, S.J.; STEVENS, J.; ZWEIGENBAUM, J. Comparison of veterinary drug residue results in animal tissues by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole or quadrupole–time-of-flight tandem mass spectrometry after different sample preparation methods, including use of a commercial lipid removal product. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 409, p. 2639, 2017.

AOAC International, Official method 2007,01: **Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate**. AOAC International; 2007.

ASENSIO-RAMOS, M.; D’ORAZIO, G.; HERNANDEZ-BORGES, J.; ROCCO, A.; FANALI, S. Multi-walled carbon nanotubes-dispersive solid-phase extraction combined with nano-liquid chromatography for the analysis of pesticides in water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry.** v. 400, n. 4, p. 1113–1123, 2011.

BAEK, S.; NOH, H.H.; KIM, C.J.; SON, K.; LEE, H-D.; KIM, L. Easy and effective analytical method of carbendazim, dimethomorph, and fenoxanil from Protaetia brevitarsis seulensis using LC-MS/MS. **PLoS ONE**. v. 16, p. 1-12, 2021.

BANOŽIĆ, M.; BABIĆ, J.; JOKIĆ, S. Recent advances in extraction of bioactive compounds from tobacco industrial waste-a review. **Industrial Crops & Products**, v, 144, p, 1-11, 2020.

BARCI, P.E.P.; ALVES, L. DA S.; AVELLAR, A.A.S.; CENDON, L.R.; DOS SANTOS, P.J.; STRINGHINI, F.M.; PRESTES, O.D.; ZANELLA, R. Modified QuEChERS Method for Multiresidue Determination of Pesticides in Pecan Nuts by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**. v. 13, p. 793, 2020.

BARRÓN-BRAVO, O.G.; HERNÁNDEZ-MARÍN, J.A.; GUTIÉRREZ-CHÁVEZ, A.J.; FRANCO-ROBLES, E.; MOLINA-OCHOA, J.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.R.; ÁNGEL-SAHAGÚN, C.A. Susceptibility of entomopathogenic nematodes to ivermectin and thiabendazole. **Chemosphere**. v. 253, 2020.

BECKER, A.G.; MORAES, B.S.; MENEZES, C.C.; LORO, V.L.; SANTOS, D.R.; REICHERT, J.M.; BALDISSEROTTO, B. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, Rhamdia quelen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v, 72, p, 1734–1739, 2009.

BERNARDI, G.; KEMMERICH, M.; RIBEIRO, L; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R.; PRESTES, O.D. An effective method for pesticide residues determination in tobacco by GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS employing acetonitrile extraction with low-temperature precipitation and d-SPE clean-up. **Talanta**. v. 161, p, 40-47, 2016.

BERRADA, H.; FONT, G.; MOLTÓ, J.C. Determination of Urea Pesticide Residues in Vegetable, Soil, and Water Samples. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. v. 33, p, 19–41, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências, Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401, Acessado em: 02 de setembro 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), **Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 294 DE 29 de julho de 2019.** Dispõe sobre critérios para avaliação e classificação toxicológica de agrotóxicos.

BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. v. 42, p. 198-213, 2012.

CAI, J.; GAO, Y.; ZHU, X.; SU, Q. Matrix solid phase dispersion–Soxhlet simultaneous extraction clean-up for determination of organochlorine pesticide residues in tobacco. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 383, p, 869–874, 2005.

CAI, J.; LIU, B.; ZHU, X.; SU, Q. Determination of pyrethroid residues in tobacco and cigarette smoke by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 964, n. 1–2, p, 205–211, 2002.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel –influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CAO, J.; SUN, N.; YU, W.; PANG, X.; LIN, Y.; KONG, F.; QIU, J. Multiresidue determination of 114 multiclass pesticides in flue-cured tobacco by solid-phase extraction coupled with gas chromatography and tandem mass spectrometry**. Journal of Separation Science**. v. 39, n, 23, p, 4629–4636, 2016.

CEN, European Committee for Standardization, CEN/TC 275 15662:2008: foods of plant origin - **Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/ partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method**. 2008.

CHEN, J.; WU, S.; ZHENG, K.; ZHANG, H.; MENG, B.; WANG, F.; HE, J.; HU, D.; ZHANG, K. Dissipation dynamics and final residues of flutriafol in tobacco and soil using ultrasound-assisted extraction before liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry.** v. 97, n. 5, p, 431–443, 2017.

CHEN, M.; CHEN, L.; PAN, L.; LIU, R.; GUO, J.; FAN, M.; WANG, X.; LIU, H.; LIU, S. Simultaneous analysis of multiple pesticide residues in tobacco by magnetic carbon composite-based QuEChERS method and liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1668, 2022.

CHEN, X.; BIAN, Z.; HOU, H.; YANG, F.; LIU, S.; TANG, G.; HU, Q. Development and Validation of a Method for the Determination of 159 Pesticide Residues in Tobacco by Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, p,5746-5757, 2013.

CHEN, X.; ZHANG, F.; YAO, H.; WANG, J.; QI, D.; GUO, Y. Analyzing multiple pesticides in tobacco leaf using gas chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Separation Science.** v. 41, n. 9, p, 1983–1989, 2018.

CHEN, X.; ZHAO, K.; FAN, Z.; MAO, W.; LI, J.; JI, X.; HUA, X.; ZONG, G.; LI, F. Determination of tiadinil and its metabolite in flue-cured tobacco. **Journal of Chromatographic Science.** v. 52, n. 7, p. 624–628, 2014.

CHISVERT, A.; CARDENAS, S.; LUCENA, R. Dispersive micro-solid phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 112, p. 226-233, 2019.

CHOUDHARY, V.; GUPT, A. **Polymer/Carbon Nanotube Nanocomposites**. Carbon Nanotubes - Polymer Nanocomposites, [s. l.], n. August 2011, 2011.

CHOWDHURY, A.; PRADHAN, S.; SAHA, M.; SANYAL, N. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal of Microbiology**. v. 48, p. 114–127, 2008.

COCHRAN, J. Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry for the determination of pesticides in tobacco. **Journal of Chromatography A.** v. 1186, p. 202–210, 2008.

CORESTA (COOPERATION CENTRE FOR SCIENTIFIC RESEARCH RELATIVE TO TOBACCO) Disponivel em: https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/Guide-No01-GRLs6th-Issue-Oct20.pdf Acesso: 13/03/2021.

DAMALAS, C.A; ELEFTHEROHORINOS, I.G. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 8, p. 1402-1419, 2011.

DAVIS, D.; NIELSON, M. **Tobacco: Production, Chemistry and Technology**, Blackwell Publishing, p. 104-10, United Kingdom, 1999.

FANG, G.; LAU, H,F.; LAW, W.S.; LI, S.F.Y. Systematic optimisation of coupled microwave-assisted extraction-solid phase extraction for the determination of pesticides in infant milk formula via LC-MS/MS. **Food Chemistry**. v. 134, p. 2473-2480, 2012.

FAO (THE FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **Crop statistics recorded for 173 products, covering the following several categories**. Dados publicados em 2017. Disponível em http://www,fao,org/faostat/en/#data/QC/visualize. Acesso: 12/07/2019.

FAO; WHO (THE FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; World Health Organization). **The International Code of Conduct on Pesticide Management**, 2014.

FLORIANO, L.: Determinação de corantes sintéticos em bebidas isotônicas empregando extração em fase sólida dispersiva e HPLC-UV/Vis. Dissertação de mestrado em Química, UFSM, Santa Maria, 2016.

FRANCESQUETT, J. Z.; Desenvolvimento de método para determinação de paraquate, diquate, clormequate e mepiquate em cevada e trigo utilizando HILIC-UHPLC-MS/MS. Tese de doutorado em Química, UFSM, Santa Maria, 2018.

GAO, J.; WANG, J.; ZUO, M.; MA, L.; CUI, Y.; YANG, T.; DING, M. A highly sensitive method for simultaneous determination of the quaternary ammonium pesticides chlormequat and mepiquat in pears and potatoes by modified QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **The Royal Society of Chemistry**. v. 5, p. 5895-5903, 2015.

GARCÍA-GARCÍA, C.R., PARRÓN, T., REQUENA, M., ALARCÓNC, R., TSATSAKIS, A, M., HERNÁNDEZ, A, F. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. **Life Sciences.** v. 145, p. 274–283, 2016.

GHOSH, R.K.; KHAN, Z.S.; BANERJEE, K.; DAMODAR REDDY, D.; JOHNSON, N.; RAY, D.P. Elucidation of false detection of pesticides during residue analysis in Indian tobacco by multidimensional GC-MS. **Journal of AOAC International**. v. 103, n. 1, p. 55–61, 2021.

GHOSH, R.K.; KHAN, Z.S.; RAO, C.V.N.; BANERJEE, K.; REDDY, D.D.; MURTHY, T.G.K.; JOHNSON, N.; RAY, D.P. Assessment of organochlorine pesticide residues in Indian flue-cured tobacco with gas chromatography-single quadrupole mass spectrometer. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 186, n. 8, p. 5069–5075, 2014.

GONG, J.; YANG, G.; YU, W.; HUANG, M.; LI, F.; JIN, M.; HU, D.; ZHANG, K. The Development and Validation of a Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Procedure for the Determination of Dioctyldiethylenetriamine Acetate Residues in Soil, Green and Cured Tobacco Leaves Using a Modified QuEChERS Approach. **Chromatographia**. v. 81, n. 7, p. 1035–1041, 2018.

GUO, W.; BIAN, Z.; TANG, G.; WANG, D.; LI, G.; WANG, J. Analysis of pesticide residues in tobacco with online size exclusion chromatography with gas chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**. v. 39, n. 14, p. 2754–2759, 2016.

GUPTA, P.K. **Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles Chapter 45 Toxicity of Fungicides,** Third Edition. Academic Press, p. 569–580, 2018.

HAIB, J.; HOFER, I.; RENAUD, J.M. Analysis of multiple pesticide residues in tobacco using pressurized liquid extraction, automated solid-phase extraction clean-up and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.** v. 1020, n. 2, p. 173–187, 2003.

HAN, L.; MATARRITA, J.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**. v. 1499, p. 17-29, 2016.

HOU, Y.; CAO, Q.; XIE, X.; WANG, B.; XU, J.; YANG, L.; YANG, Y.; YANG, Y. Determination of Pyrethroid Pesticide Residues in Tobacco Leaves and Tea Using Stir Bar Sorptive Extraction-Thermal Desorption and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography.** v. 25, n. 1, p. 25–29, 2007.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), 2020. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**, DOQ-CGCRE-008, ver, 08, abril de 2020.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**. 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications. Oxford (1997), Online version (2019) Acesso: 15/01/2020

JAGA, K.; DHARMANI, C. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.** v. 14, 2003

JI, H.; WUA, Y.; FANNIN, F.; BUSH, L. Determination of tobacco alkaloid enantiomers using reversed phase UPLC/MS/MS. **Heliyon**. v. 5, p. 1-6, 2019.

JIN, R.; JI, F.; LIN, H.; LUO, C.; HU, Y.; DENG, C.; CAO, X.; TONG, C.; SONG, G. The synthesis of Zr-metal-organic framework functionalized magnetic graphene nanocomposites as an adsorbent for fast determination of multi-pesticide residues in tobacco samples. **Journal of Chromatography A.** v. 1577, p. 1–7, 2018.

KAROUSIS, N.; TAGMATARCHIS, N.; TASIS, D. Current Progress on the Chemical Modification of Carbon Nanotubes. **Chemical Reviews**. v. 110, n. 9, p. 5366–5397, 2010.

KHAN, M.A.; KHAN, H.; FARID, A.; ALI, A. Evaluation of toxicity of some novel pesticides evaluation of toxicity of some novel pesticides to parasitism by trichogramma chilonis (hymenoptera: trichogrammatidae). **Journal of Agricultural Research**. n, 1, p, 53, 2015b.

KHAN, Z.S.; GHOSH, R.K.; GIRAME, R.; UTTURE, S.C.; GADGIL, M.; BANERJEE, K.; REDDYB, D.; JOHNSON, N. Optimization of a sample preparation method for multiresidue analysis of pesticides in tobacco by single and multi-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1343, p. 200–206, 2014.

KHAN, Z.S.; GIRAME, R.; UTTURE, S.C.; Ghosh, R.K.; BANERJEE, K. Rapid and sensitive multiresidue analysis of pesticides in tobacco using low pressure and traditional gas chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1418, p. 228–232, 2015a.

KIM, L.; BAEK, S.; SON, K.; KIM, E; NOH, H.H.; KIM, D.; OH, M.S.; MOON, B.C.; RO, J.H. Optimization of a simplified and effective analytical method of pesticide residues in mealworms (Tenebrio molitor Larvae) combined with GC–MS/MS and LC–MS/MS. **Molecules**. v. 25, n. 15, 2020.

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

LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 1021–1036, 2011.

LEE, J.; PARK, J.; JANG, G.; HWANG, K. Comparative study of pesticide multi-residue extraction in tobacco for gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1187, p. 25–33, 2008.

LEE, J.; SHIN, Y.; LEE, J.; LEE, J.; KIM, B.J.; KIM, J.H. Simultaneous analysis of 310 pesticide multiresidues using UHPLC-MS/MS in brown rice, orange, and spinach. **Chemosphere**. v. 207, p. 519-526, 2018.

LEE, J.M.; JANG, G.C.; HWANG, K.J. Analysis of Agrochemical Residues in Tobacco Using QuEChERS Method by GC-MS/MS. **Journal of the Korean Society of Tobacco Science**. v. 29, n. 2, p. 132–139, 2007.

LEHOTAY, S.J.; KOK, A.; HIEMSTRA, M.; VAN BODEGRAVEN, P. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of AOAC international**. v. 88, p. 595-614, 2005.

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

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

LIAO, Q.G.; ZHOU, Y.M.; LUO, L.G.; WANG, L.B.; FENG, X, H. Determination of twelve herbicides in tobacco by a combination of solid-liquid-solid dispersive extraction using multi-walled carbon nanotubes, dispersive liquid-liquid micro-extraction, and detection by GC with triple quadrupole mass spectrometry. **Microchimica Acta**. v. 181, n. 1–2, p. 163–169, 2014.

LIU, H.; DANG, Y.; ZHANG, S.; LIU, H.; QU, L.; LIAO, X.; ZHAO, Y.; WU, Y. Determination of diphenamide, napropamide and metolachlor in tobacco by Gel Permeation Chromatographic Clean-Up and High Performance Liquid Chromatography. **Annali di Chimica**. v. 95, p. 1–6, 2005.

LIU, H.; DING, C.; ZHANG, S.; LIU, H.; LIAO, X.; QU, L.; ZHAO, Y.; WU, Y. Simultaneous residue measurement of pendimethalin, isopropalin, and butralin in tobacco using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and electrospray ionization/mass spectrometric identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, n. 23, p. 6912–6915, 2004.

LLORENT-MARTINEZ, E.J.; P, ORTEGA-BARRALES, P.; FERNANDEZ-DE CORDOVA, M.L.; RUIZ-MEDINA, A. Trends in flow-based analytical methods applied to pesticide detection: A review. **Analytica Chimica Acta**. v. 684, p. 30–39, 2011.

LÓPEZ-DÁVILA, E.; HOUBRAKEN, M.; DE ROP, J.; WUMBEI, A.; DU LAING, G.; ROMERO ROMERO, O.; SPANOGHE, P. Pesticides residues in tobacco smoke: risk assessment study. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 192, n. 9, p. 1–15, 2020.

LOZANO, A.; RAJSKI, Ł.; UCLÉS, S.; BELMONTE-VALLES, N.; MEZCUA, M. R. FERNÁNDEZ-ALBA, A. Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta**. v. 118, p. 68–83, 2014.

LOZOWICKA, B.; RUTKOWSKA, E.; HRYNKO, I. Simultaneous determination of 223 pesticides in tobacco by GC with simultaneous electron capture and nitrogen-phosphorous detection and mass spectrometric confirmation. **Open Chemistry**. v. 13, n. 1, p. 1137–1149, 2015.

LUO, Y.; ZHENG, H.; JIANG, X.; LI, X.; ZHANG, H.; ZHU, F.; PANG, Y.; FENG, Y. Determination of Pesticide Residues in Tobacco Using Modified QuEChERS Procedure Coupled to On-line Gel Permeation Chromatography-Gas Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**. v. 43, n. 10, p. 1538–1544, 2015.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quimica Nova.** v. 32, p. 214-222, 2009.

MANN, M.S.M. Analiação de sorventes para remoção de clorofila na determinação de agrotóxicos em espinafre empregando método QuEChERS e GC-ECD, Dissertação de mestrado em Química, UFSM, Santa Maria, 2017

MARTINS, M.L.; KEMMERICHA, M.; PRESTES, O.D.; MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F.; ZANELLA, R. Evaluation of an alternative fluorinated sorbent for dispersive solid-phase extraction clean-up of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for pesticide residues analysis. **Journal of Chromatography A.** v. 1514, p. 36, 2017.

MAYER-HELM, B. Method development for the determination of 52 pesticides in tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1216, n. 51, p. 8953–8959, 2009.

MAYER-HELM, B.; HOFBAUER, L.; MÜLLER, J. Development of a multi-residue method for the determination of 18 carbamates in tobacco by high-performance liquid chromatography/positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 20, n. 4, p. 529–536, 2006.

MAYER-HELM, B.; HOFBAUER, L.; MULLER, J. Method development for the determination of selected pesticides on tobacco by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. **Talanta.** v. 74, n. 5, p. 1184–1190, 2008.

MILLS, P.A.; ONLEY, J.H.; GUITHER, R.A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in non fatty foods. **Journal of AOAC**. v. 46, p. 186–191, 1963.

MOLUGARAM, K.; RAO, G, S. ANOVA (Analysis of Variance). **Statistical Techniques for Transportation Engineering**. p. 451–462, 2017.

MUREYA, C.; MUSUNA-GARWE, C. Analysis of seven Strobilurins in tobacco using Gas Chromatography equipped with Electron Capture Detector (GC-ECD). **Coresta Conference,** 2014.

OSHITA, D.; JARDIM, I.C.S.F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. **Quimica Nova**, v. 38, p. 1273-1281, 2015.

OTTE, S.; INTORP, M. Analysis of pesticides in tobacco by LC-MS/MS: specific matrix effects on quantification for different tobacco grades, CORESTA Meeting, Smoke Science/Product Technology, Stratford-upon-Avon. v. SSPT 39, 2005.

PAREJA, L.; FERNANDEZ-ALBA A,R.; CESIO, V.; HEINZEN, H. Analytical methods for pesticide residues in rice. **Trends in Analytical Chemistry.** v. 30, p. 270- 291, 2011.

PAUL, A.; KHAN, Z.; BHATTACHARYYA, A.; MAJUMDER, S.; BANERJEE, K. Multiclass pesticide residue analysis in tobacco (Nicotiana tabacum) using high performance liquid chromatography-high resolution (Orbitrap) mass spectrometry: A simultaneous screening and quantitative method. **Journal of Chromatography A**. v. 1648, p. 462208, 2021.

PERESTRELO, R.; SILVA, P.; PORTO-FIGUEIRA, P.; PEREIRA, J.A.M.; SILVA, C.; MEDINA, S.; CAMARA, J.S. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta.** v. 1070, p. 1-28, 2019.

POPOVA, V.; IVANOVA, T.; STOYANOVA, A.; NIKOLOVA, V.; HRISTEVA, T.; DOCHEVA, M.; NIKOLOV, N.; ILIEV, I. Polyphenols and triterpenes in leaves and extracts from three Nicotiana species. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**. v. 7, p. 45-49, 2019.

PRESTES, O. D.; Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS. Tese de doutorado em Química, UFSM, Santa Maria, 2011b.

PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**. v. 3, p. 51-64, 2011a

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

PUBCHEM, U.S. **National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information**. Informações dos compostos selecionados, disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/. Acesso: 27/02/20

QI, D.; FEI, T.; SHA, Y.; WANG, L.; LI, G.; WU, D.; LIU, B. A novel fully automated on-line coupled liquid chromatography–gas chromatography technique used for the determination of organochlorine pesticide residues in tobacco and tobacco products. **Journal of Chromatography A**. v. 1374, p. 273–277, 2014.

QIN, X.; LUO, X.; CHEN, Y.; HAN, J.; ZHANG, J.; ZHANG, K.; HU, D. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method to simultaneously determinate dichlorvos and phoxim in tobacco. **Biomedical Chromatography**. v. 33, n. 7, 2019.

QUADRONI, S.; BETTINETTI, R. An unnoticed issue: Organochlorine pesticides in tobacco products around the world. **Chemosphere**. v. 219, p. 54-57, 2019.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>, Acesso: 20/01/22

RAHMAN, M.A.; CHOWDHURY, A.Z.; MONIRUZZAMAN, M.; GAN, S.H.; ISLAM, M.N.; FARDOUS, Z.; ALAM, M.K. Pesticide Residues in Tobacco Leaves from the Kushtia District in Bangladesh. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology volume**. *v. 89,* n. 3, *p. 658–663*, 2012.

REBELO, A.M.; DOLZAN, M.D.; HELLER, M.; DESCHAMPS, F.C.; ABATE, G.; MICKE, G.A.; GRASSI, M.T. Simultaneous determination of herbicides in rice by QuEChERS and LC-MS/MS using matrix-matched calibration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 186-193, 2016.

OHKAWA H, MIYAGAWA H, LEE PW (Eds). Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. **Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety**. Wiley-VCH, Weinheim. 2007.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A QuEChERS-Based Sample Preparation Method for the Analysis of 5-Nitroimidazoles in Bovine Milk by HPLC-DAD. **Food Chemistry**, v. 2017, p. 225-233, 2017.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. **Open Chemistry.**, v. 13, p. 980–1010, 2015.

RODGMAN, A.; PERFETTI, T.A. **The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke**. CRC Press, Boca Raton, Fl, USA, 2013.

SANNINO, A. **Comprehensive Analytical Chemistry**. Capítulo 9: Pesticide Residues, Elsevier B,V. v. 51, p. 257, 2008.

SANTANA-MAYOR, A; SOCAS-RODRIGUEZ, B; HERRERA-HERRERA, A, V,; RODRIGUEZ-DELGADO, M, A, **Current trends in QuEChERS method, A versatile procedure for food, environmental and biological analyses, Trends in Analytical Chemistry,** v. 116, p. 214, 2019.

SANTE, EUROPEAN COMMISSION, 2015. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**. Document n° SANTE/12682/2019.

SANTOS, M.V.; SANSINENA, M.; ZARITZKY, N.; CHIRIFEB, J. Experimental Determination of Surface Heat Transfer Coefficient in a Dry Ice Ethanol Cooling Bath Using a Numerical Approach. **Cryo letters**. v. 38, p. 119-124, 2017.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S.J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.758, p. 80-92, 2013.

SENES, C.E.R.; NICÁCIO, A.E.; RODRIGUES, C.A.; MANIN, L.P.; MALDANER, L.; VISENTAINER, J.V. Evaluation of Dispersive Solid-Phase Extraction (d-SPE) as a Clean-up Step for Phenolic Compound Determination of Myrciaria cauliflora Peel. **Food Analytical Methods**. v. 13, p. 155-165, 2020.

SHEN, J.S.; ZHIXIU, X.; CAI, J.C.; SHAO, X.S. Determination of Pyrethroid Residues in Tobacco by Means of Solid Phase Microextraction and GC / MS with the Aid of Ultrasonic Assisted Extraction Using Water as Extracting Solvent. **Analytical Chemistry**. v. 22, p. 241–244, 2006.

SHEN, S.; CHEN, M.; WANG, T.; FEI, T.; YANG, D.; CAO, M.; WU, D. Determination of Methomyl Residue in Tobacco Samples by Heart-Cutting Two-Dimensional Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. **International Journal of Analytical Chemistry**. v. 2020, 2020.

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

SOUSA, F.A.; COSTA, A.I.G.; QUEIROZ, M.E.L.R.; TEÓFILO, R.F.; NEVES, A.A.; PINHO, G,P, Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemestry.** v. 135, p. 179–185, 2012.

STOYTCHEVA, M.; MORAIS, S.; CORREIA, M.; DOMINGUES, V.; DELERUE-MATOS, C. **Pesticides, Strategies for Pesticides Analysis**. Capitulo 10, InTech, Croatia, p. 241, 2014.

SU, R.; XU, X.; WANG, X.; LI, D.; LI, X.; ZHANG, H.; YU, A. Determination of organophosphorus pesticides in peanut oil by dispersive solid phase extraction gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.** v. 879, n. 30, p. 3423–3428, 2011.

SUN, L.; LEE, H.K. Optimization of microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology. **Journal of Chromatography A**. v. 1014, n. 1–2, p. 165–177, 2003.

TAYOUB, G.; SULAIMAN, H.; ALORFI, M. Determination of nicotine levels in the leaves of some Nicotiana tabacum varieties cultivated in Syria. **Herba Polonica**. v. 61, p. 23-30, 2015.

TEODORO, M.; BRIGUGLIO, G.; FENGA, C.; COSTA, C. Genetic polymorphisms as determinants of pesticide toxicity: Recent advances. **Toxicology Reports**. v. 6, p. 564–570, 2019.

TODD, O.E.; FIGUEIREDO, M.R.A.; MORRAN, S.; SONI, N.; PRESTON, C.; KUBEŠ, M,F.; NAPIER, R.; GAINES, T.A. Synthetic auxin herbicides: finding the lock and key to weed resistance. **Plant Science**. v. 300, p. 1-8, 2020.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J.E. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 45, p. 247–268, 2005.

TREMBLAY, R.; WANG, D.; JEVNIKAR, A, M.; MA, S. Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. **Biotechnology Advances.** v. 28, p. 214–221, 2010.

TROJE, J.Z.; FROBE, Z.; PEROVIC, O. Analysis of selected alkaloids and sugars in tobacco extract. ***Journal of Chromatography A.*** v. 775, p. 101–107, 1997.

TUKEY, J. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. **Biometrics**. v. 5, n. 2, p. 99–114, 1949

TUZIMSKI, T.; REJCZAK, T. Application of HPLC-DAD after SPE/QuEChERS with ZrO2-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. **Food Chemistry**, v. 190, p. 71-70, 2016.

USHERWOOD, P.N.R.; VAIS, H. Towards the development of ryanoid insecticides with low mammalian toxicity. **Toxicology Letters**. v. 82/83, p. 247-254, 1995.

VAN MAELE-FABRY, G.; LANTIN, A.C.; HOET, P.; LISON, D. Residential exposure to pesticides and childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis, **Environment International**. v. 37, p. 280–291, 2011.

VIERA, M.S.; RIZZETTI, T.M.; DE SOUZA, M.P.; MARTINS, M.L.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Multiresidue determination of pesticides in crop plants by the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using a calibration based on a single level standard addition in the sample. **Journal of Chromatography A.** v. 1526, p. 119-127, 2017.

WANG, J.; DUAN, H. L.; FAN, L.; LIN, Y. M.; SUN, J. N.; ZHANG, Z. Q. Magnetic tetraethylenepentamine modified multi-walled carbon nanotubes as matrix clean-up materials for organophosphorus pesticide residues analysis in cucumber**. Food Control**. v. 124, p. 107904, 2021.

WANG, S.; ZHAO, P.; MIN, G.; FANG, G. Multi-residue determination of pesticides in water using multi-walled carbon nanotubes solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.** v. 1165, n. 1–2, p. 166–171, 2007.

WEIYUN, G.; ZHAOYANG, B.; DAOHONG, Z.; GANGLING, T.; LIU, W.; JIANLONG, W.; ZHONGHAO, L.; FEI, Y. Simultaneous determination of herbicides residues in tobacco using ultra performance convergence chromatography coupled with solid-phase extraction. **Journal of Separation Science**. p. 1–23, 2014.

WENDIE H.; MICKEL W.K. **Handbook of cultural practice for flue-cured tobacco, Unpublished**, p. 1-4, 1973.

WU, S.; YU, W.; SUN, C.; ZHENG, K.; ZHANG, H.; HUANG, M.; HU, D.; ZHANG, K. Simultaneous determination of residues of metalaxyl, cyazofamid and a cyazofamid metabolite in tobacco leaves and soil by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**. v. 32, n. 4, p. 1–6, 2018.

XIA, B.; FENG, M.; XU, G.; XU, J.; LI, S.; CHEN, X.; DING, L.; ZHOU, Y. Investigation of the chemical compositions in tobacco of different origins and maturities at harvest by GC−MS and HPLC−PDA-QTOFMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, p. 4979−4987, 2014.

XIONG, W.; TAO, X.; PANG, S.; YANG, X.; TANG, G.L.; BIAN, Z. Separation and quantitation of three acidic herbicide residues in tobacco and soil by dispersive solid-phase extraction and UPLC-MS/MS. **Journal of Chromatographic Science**. v. 52, n. 10, p. 1326–1331, 2014.

YANG, F.; BIAN, Z.; CHEN, X.; LIU, S.; LIU, Y.; TANG, G. Analysis of 118 pesticides in tobacco after extraction with the modified QuEChRS method by LC-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science.** v. 52, n. 8, p. 788–792, 2014.

YANG, F.; ZHANG, X.; SHAO, J.; XIONG, W.; JI, Y.; LIU, S.; TANG, G.; DENG, H.; WANG, Y. A rapid method for the simultaneous stereoselective determination of the triazole fungicides in tobacco by supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry combined with pass-through cleanup. **Journal of Chromatography A**. v. 1642, p. 462040, 2021.

YOUNG, R.A. **Dinitroanilines, Encyclopedia of Toxicology** (Third Edition). Academic Press, p. 172-174, 2014.

YU, F.; CHEN, L.; PAN, L.; HU, B.; LIU, H. Determination of multi-pesticide residue in tobacco using multi-walled carbon nanotubes as a reversed-dispersive solid-phase extraction sorbent. **Journal of Separation Science**. v. 38, n. 11, p. 1894–1899, 2015.

YU, Y.; ZHAO, S.; YANG, Y.; CHEN, Y.; QIU, D.; RAN, X.; LU, P.; HU, D. Simultaneous determination of rimsulfuron and haloxyfop-p-methyl and its metabolite haloxyfop in Tobacco Leaf by LC-MS/MS. **Journal of AOAC International**. v. 102, n. 5, p. 1632–1640, 2019.

ZHANG, X.; WU, M.; YAO, H.; YANG, Y.; CUI, M.; TU, Z.; STALLONES, L.; XIANG, H. Pesticide poisoning and neurobehavioral function among farm workers in Jiangsu, People's Republic of China. **Cortex**. v. 74, p. 396-404, 2016.

ZHAO, W.; WANG, X.; GUO, J.; GUO, Y.; LAN, C.; XIE, F.; ZHANG, S. Evaluation of sulfonic acid functionalized covalent triazine framework as a hydrophilic-lipophilic balance/cation-exchange mixed-mode sorbent for extraction of benzimidazole fungicides in vegetables, fruits and juices. **Journal of Chromatography A.** v. 1618, p.1-9, 2020.

ZHOU, T.; XIAO, X.; LI, G. Hybrid field-assisted solid-liquid-solid dispersive extraction for the determination of organochlorine pesticides in tobacco with gas chromatography. **Analytical Chemistry**. v. 84, n. 1, p. 420–427, 2012.

9. APÊNDICE

9.1 APÊNDICE A - NÍVEIS DE RESÍDUOS DE ORIENTAÇÃO CPA (GRLS) GUIA CORESTA N° 1, OUT., 2021

(continua)

	Composto	GRL CORESTA (ppm)	Definição do resíduo
1	2,4,5-T	0,05	
2	2,4-D	0,2	
3	Acephate	0,1	
4	Acetamiprid	3	
5	Acibenzolar-s-metil	5	
6	Alaclor	0,1	
7	Aldicarb (soma)	0,5	soma de aldicarbe, sulfoxido de aldicarbe e aldicarbe sulfona
	Sulfoxido de aldicarbe		
	Aldicarbe sulfona		
8	Aldrin (Soma)	0,02	soma de aldrin e dieldrin expresso como a soma de ambos
	Dieldrin		
9	Azinfos-etil	0,1	
10	Azinfos-metil	0,3	
11	Azoxistrobina	16	
12	Benalaxil	2	
13	Benfluralin	0,06	
21	Carbendazim		soma de benomil, carbendazin, tiofanato metílico expresado como carbendazim
14	Benomil	2	soma de benomil carbendazin, tiofanato metílico expresado como carbendazim
	Tiofanato metílico		
15	Bifentrina	3	
16	Bromofos metilico	0,04	
17	Butralina	5	
18	Camfeclor (soma) (Toxafeno)	0,3	soma de camfenos clorados
19	Captan	0,3	
20	Carbaril	0,5	

APÊNDICE A - NÍVEIS DE RESÍDUOS DE ORIENTAÇÃO CPA (GRLS) GUIA CORESTA N° 1, OUT., 2021

(continuação)

	Composto	GRL CORESTA (ppm)	Definição do resíduo
22	Carbofurano (soma)	0,5	soma de Carbofurano e 3-Hidroxicarbofurano expresso como carbofurano
	3-Hidroxicarbofurano		
23	Quinometionato	0,1	
24	Clorantraniliprole	14	
25	Clordano (soma)	0,1	soma de cis-clordano e trans-clordano
26	Clorfenvinfos (soma)		soma de (E)-clorfenvinfos e (Z)-Clorfenvinfos
	(E)-clorfenvinfos	0,04	
	(Z)-Clorfenvinfos		
27	Clorotalonil	1	
28	Clorpirifos	0,5	
29	Clorpirifos-metil	0,2	
30	Clortal-dimetil	0,5	
31	Clomazone	0,2	
32	Ciantraniliprole	18	
33	Ciflutrina (soma)	2	soma de todos seus isomeros
34	Cialotrina (soma)	0,5	soma de todos seus isomeros
	Lambda Cialotrina		
	Gamma Cialotrina		
35	Cimoxanil	0,1	
36	Cipermetrina (soma)	1	soma de todos seus isomeros
37	DDT (soma)	0,2	soma de o,p'- e p,p'-DDT, o,p'- e p,p'-DDD (TDE), o,p'- e p,p'-DDE expresso como DDT
	4,4-DDT		
	2,2-DDT		
	o,p'- e p,p'-DDT, o,p'- e p,p'-DDD (TDE), o,p'- e p,p'-DDE		

APÊNDICE A - NÍVEIS DE RESÍDUOS DE ORIENTAÇÃO CPA (GRLS) GUIA CORESTA N° 1, OUT., 2021

(continuação)

	Composto	GRL CORESTA (ppm)	Definição do resíduo
38	Deltametrina (soma)	1	soma de Deltametrina e Tralometrina expresso como Deltametrina
114	Tralometrina		
39	Demeton-S-metil (soma)	0,1	soma de demeton-S-metil, oxidemeton-metil e demeton-S-metil sulfona expresso como demeton-S-metil
	Oxidemeton-metil		
	Demeton-S-metil sulfona		
40	Diazinon	0,1	
41	Dicamba	0,2	
42	Diclorvos (soma)	0,1	Soma de diclorvos, Naled e Triclorfon expresso como diclorvos
83	Naled		soma de Diclorvos, Naled, e Triclorfon expresso como Diclorvos
115	Triclorfon		soma de Diclorvos, Naled, and Triclorfon expresso como Diclorvos
43	Diclorana	0,1	
44	Difenoconazol	12	
45	Diflubenzuron	0,1	
46	Dimetoato	0,5	Soma de dimetoato e ometoato expresso como dimetoato
85	Ometoato		soma de Dimetoato and Ometoato expresso como Dimetoato
47	Dimetomorfe (soma)	2	soma de (E)- dimetomorfe e (z)-dimetomorfe
48	Disulfoton (soma)	0,1	soma de disulfoton, sulfoxido de disulfoton e disulfoton sulfona expresso como disulfoton
49	Ditiocarbamatos	5	Ditiocarbamatos expresso como CS_2
50	Endosulfan (soma)	1	soma de alfa e beta isomeros e sulfato de endosulfan exresso como endosulfan
	sulfato		
	α		
	β		

APÊNDICE A - NÍVEIS DE RESÍDUOS DE ORIENTAÇÃO CPA (GRLS) GUIA CORESTA N° 1, OUT., 2021

(continuação)

	Composto	GRL CORESTA (ppm)	Definição do resíduo
51	Endrim	0,05	
52	Etoprofos	0,1	
53	Famoxadona	5	
54	Fenamidona	3	
55	Fenamifos (soma)	0,5	soma de Fenamifos, sulfoxido de Fenamifos e Fenamifos sulfona expresso como Fenamifos
	Sulfoxido de fenamifós		
	Fenamifós sulfona		
56	Fenitrotion	0,1	
57	Fentiona (soma)	0,1	soma de fentiona, sulfoxido de fentiona e sulfona de fentiona
	Sulfoxido de fentiona		
	Sulfona de fentiona		
58	Fenvalerato (soma)	1	soma de todos seus isomeros incluindo esfenvalerato
	Esfenvalerato		
59	Fluasifope-P-butílico (soma)	1	soma de todos seus isomeros
60	Flubendiamida	18	
61	Flumetralina	5	
62	Fluopiram	5	
63	Fluopiradifurona	21	
64	Folpet	0,2	
65	HCH (a-, b-, d-)	0,05	soma de HCH alfa, beta e delta
	α		
	β		
	δ		
66	HCH (g-) (Lindano)	0,05	
67	Heptacloro (soma)	0,02	soma de Heptacloro e Cis e Trans epoxido de Heptacloro expresso como Heptacloro
	epox trans (endo)		
	epox cis (exo)		

APÊNDICE A - NÍVEIS DE RESÍDUOS DE ORIENTAÇÃO CPA (GRLS) GUIA CORESTA N° 1, OUT., 2021

(continuação)

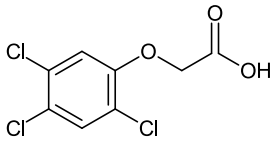
	Composto	GRL CORESTA (ppm)	Definição do resíduo
68	Hexaclorobenzeno	0,02	
69	Imidacloprida	5	
70	Indoxacarbe (soma)	6	Soma de isomeros S e R
71	Iprodiona (soma)	0,5	Soma de Iprodiona e N-3,5-diclorofenil-3-isoropil-2,4-dioxoimidazolizin-1-carboxamida expresso como Iprodiona
	N-3,5-diclorofenil-3-isoropil-2,4-dioxoimidazolizin-1-carboxamida		
72	Malationa	0,5	
73	Hidrazida maleica	80	
74	Metalaxil (soma)	2	soma de todos seus isomeros incluindo Metalaxil-M /Mefenoxan
	Metalaxil-M		
	Mefenoxan		
75	Metamidofos	1	
76	Metidationa	0,1	
77	Metiocarbe (soma)	0,2	soma de metiocarbe, sulfoxido de metiocarbe e metiocarbe sulfona expresso como metiocarbe
	Metiocarbe-sulfona		
	Sulfóxido de metiocarbe		
78	Metomil	1	soma de Metomil, Metomil-oxima, e Tiodicarbe expresso como Metomil
79	Metoxiclor	0,05	
80	Mevinfos (soma)	0,04	soma de isomeros E e Z Mevinfos
	(E)- Mevinfos		
	(Z)- Mevinfos		
81	Mirex	0,08	
82	Monocrotofos	0,3	
84	Nitrofen	0,02	
86	Oxadixil	0,1	
87	Oxamil	0,5	

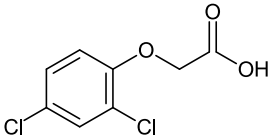
APÊNDICE A - NÍVEIS DE RESÍDUOS DE ORIENTAÇÃO CPA (GRLS) GUIA CORESTA N° 1, OUT., 2021

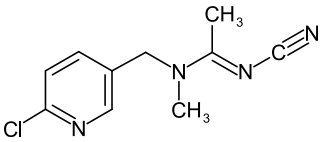
(continuação)

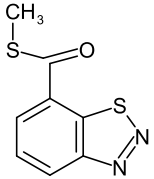
	Composto	GRL CORESTA (ppm)	Definição do resíduo
88	Paration-etil	0,06	
89	Paration-metil	0,1	
90	Pebulato	0,5	
91	Penconazol	1	
92	Pendimetalina	5	
93	Permetrina (soma)	0,5	soma de todos seus isomeros
94	Forate	0,05	
95	Fosalone	0,1	
96	Fosfamidona (soma) (E)- Fosfamidona (Z)- Fosfamidona	0,05	soma de isomeros E e Z de fosfamidon
97	Foxim	0,5	
98	Butóxido de piperonila	3	
99	Pirimicarbe	0,5	
100	Pirimifos-metil	0,1	
101	Profenofos	0,1	
102	Propanocarb	13	
103	Propoxur	0,1	
104	Pimetrozina	1	
105	Piretrinas (soma) Cinerinas Jasmolinas	0,5	Soma de Piretrinas1, piretrinas 2, cinerinas 1, cinerinas 2, Jasmolinas 1 e Jasmolinas 2
106	Tebuconazol	18	
107	Teflubenzuron	3	
108	Teflutrina	0,1	
109	Terbufos (soma) Sulfoxido de terbufos Terbufos sulfona	0,05	soma de terbufos, sulfoxido de terbufos e terbufos sulfona expresso como terbufos
110	Tiametoxam	5	
112	Tionazina	0,04	
117	Trifluralin	0,1	

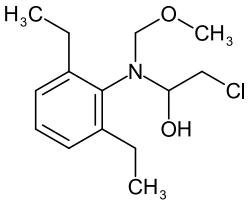
9.2 APÊNDICE B – ESTRUTURAS DOS AGROTÓXICOS AVALIADOS

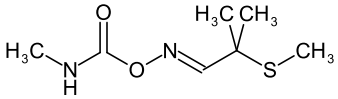

2,4,5-T

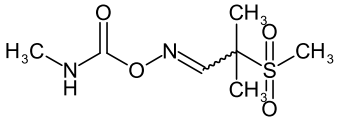

2,4-D

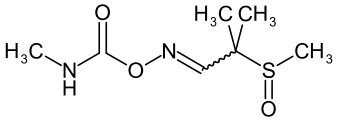

Acetamiprido

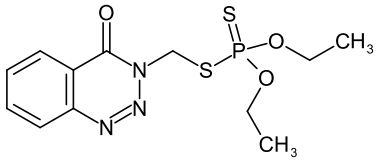

Acibenzolar-S-metil

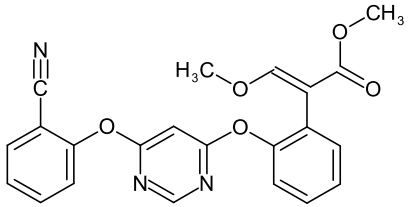

Alacloro

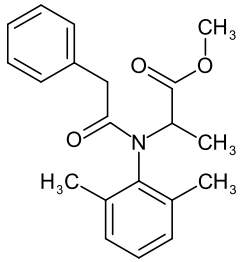

Aldicarbe

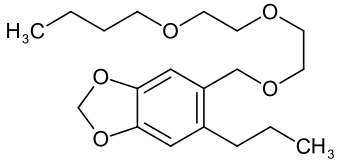

Aldicarbe sulfona

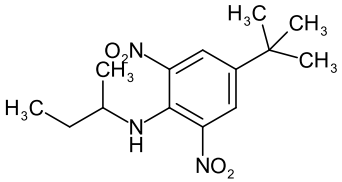

Aldicarbe sulfóxido

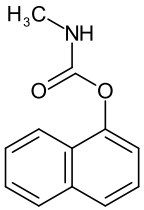

Azinfós-etil

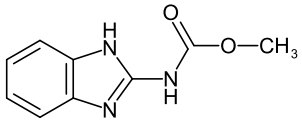

Azoxystrobina

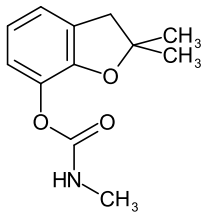

Benalaxil


Butóxido de piperonilo

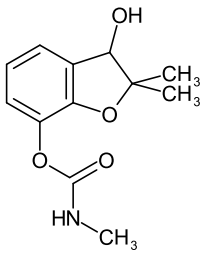

Butralina

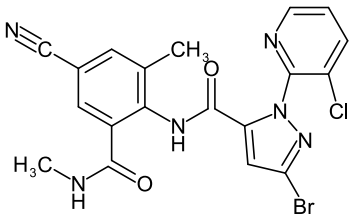

Carbaril

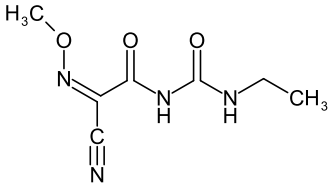

Carbendazim

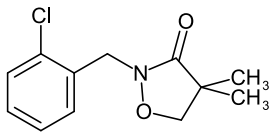

Carbofurano

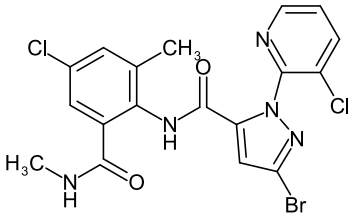
APÊNDICE B –ESTRUTURAS DOS AGROTÓXICOS AVALIADOS

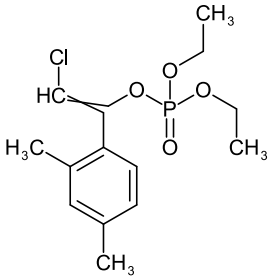

Carbofurano-3-hidróxido

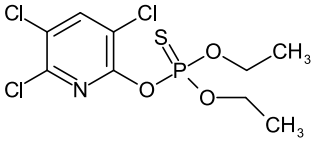

Ciantraliniprole

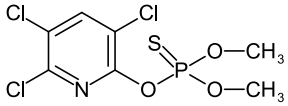

Cimoxanil

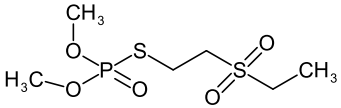

Clomazona

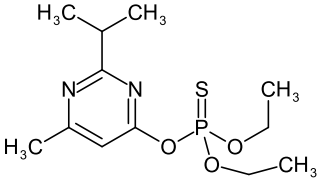

Clorantraniliprole

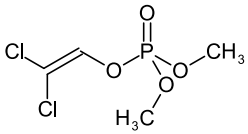

Clorfenvinfós

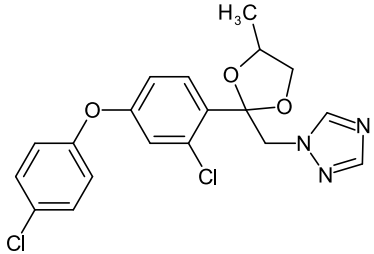

Clorpirifós-etílico


Clorpirifós-metílico

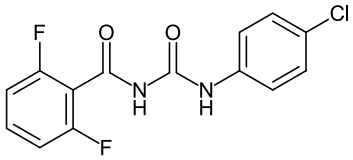

Demeton-S-metil-sulfona


Diazinon

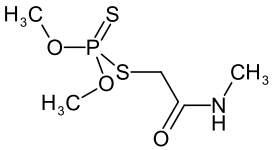

Diclorvós


Difenoconazol

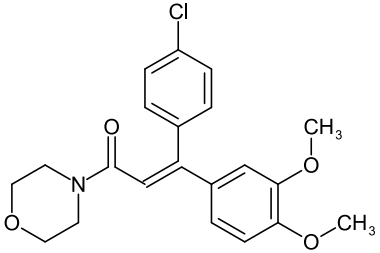
APÊNDICE B –ESTRUTURAS DOS AGROTÓXICOS AVALIADOS



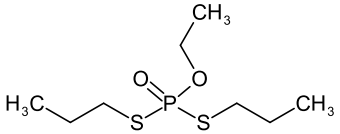
Diflubenzuron



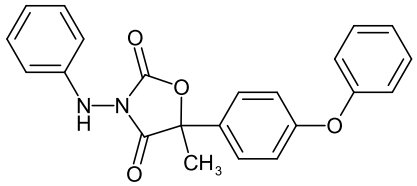
Dimetoato



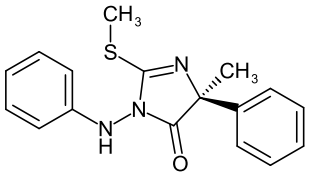
Dimetomorfe



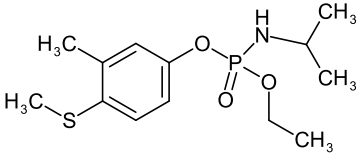
Etoprofós



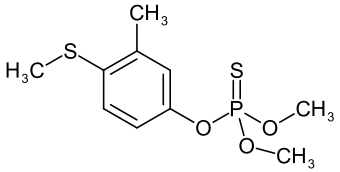
Famoxadona



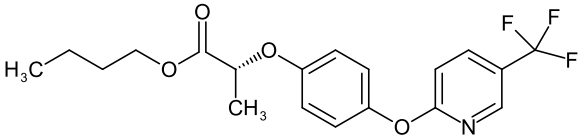
Fenamidona



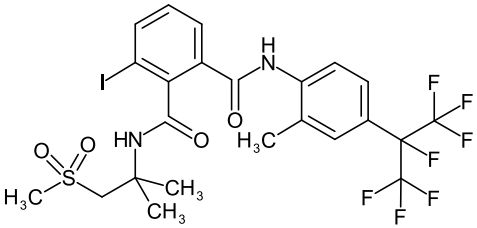
Fenamifós



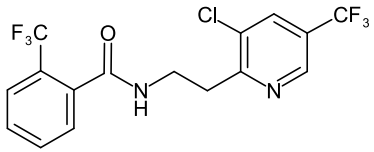
Fentiona



Fluazifope-P-butílico

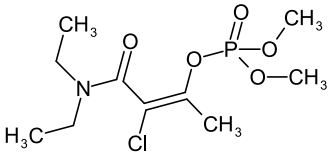


Flubendiamida

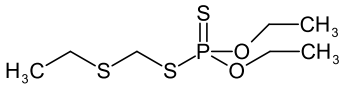


Fluopiram

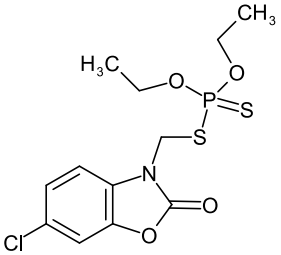
APÊNDICE B –ESTRUTURAS DOS AGROTÓXICOS AVALIADOS



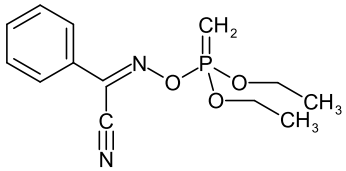
Fosfamidona



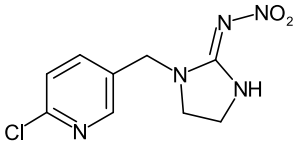
Forato



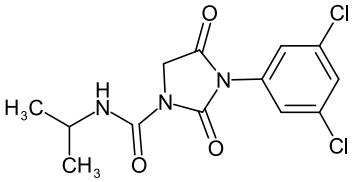
Fosalona



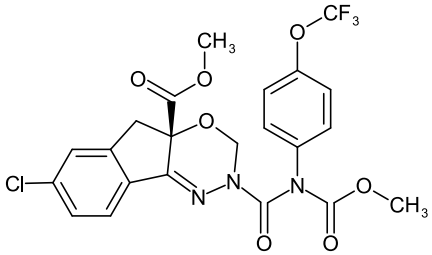
Foxim



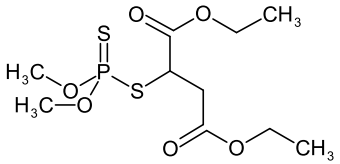
Imidacloprido



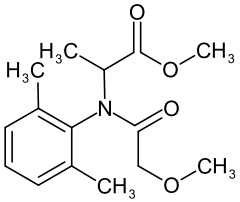
Iprodiona



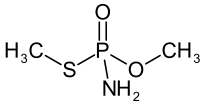
Indoxacarbe



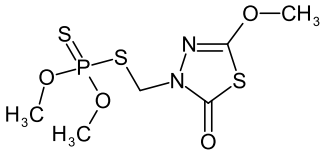
Malationa



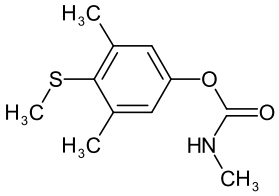
Metalaxil



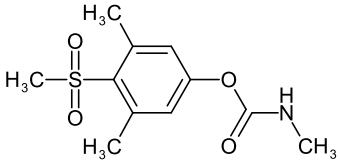
Metamidofós



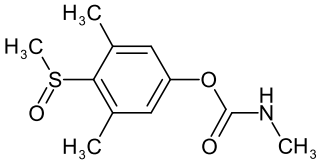
Metidationa



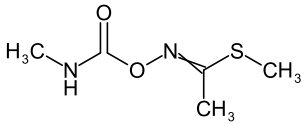
Metiocarbe



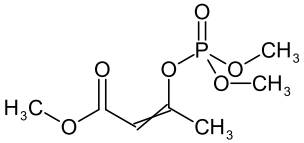
Metiocarbe-sulfona



Metiocarbe-sulfoxido

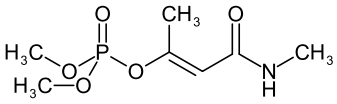


Metomil

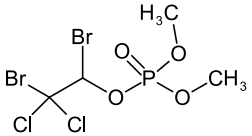


Mevinfós

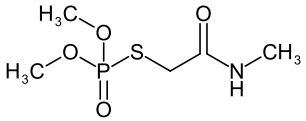
APÊNDICE B –ESTRUTURAS DOS AGROTÓXICOS AVALIADOS



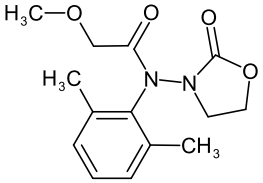
Monocrotofós



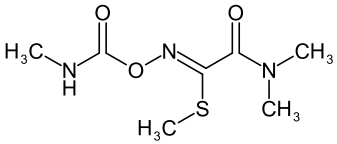
Naled



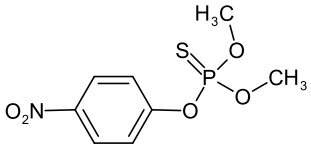
Ometoato



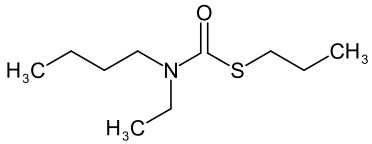
Oxadixil



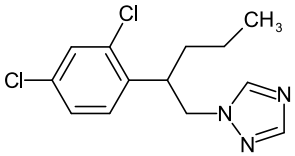
Oxamil



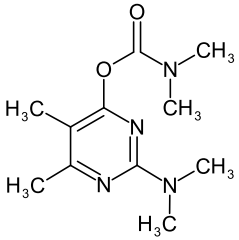
Parationa-metílica



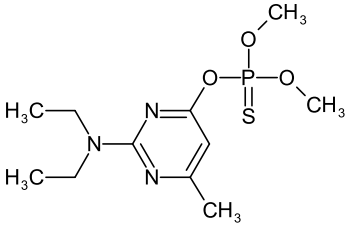
Pebulato



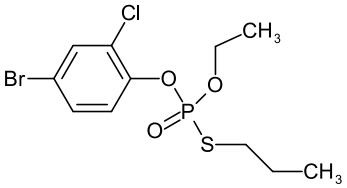
Penconazol



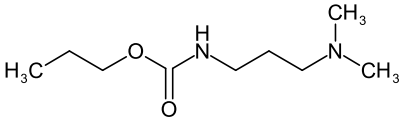
Pirimicarbe



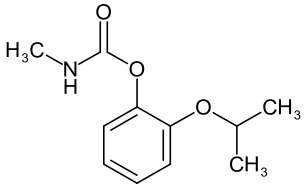
Pirimifós-metil



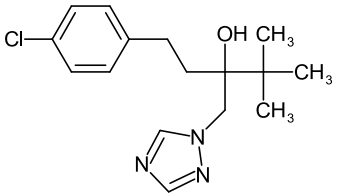
Profenofós



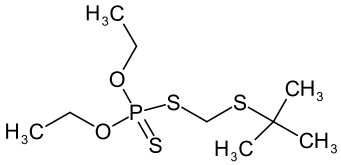
Propamocarbe



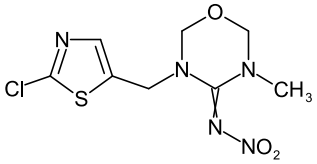
Propoxur



Tebuconazol

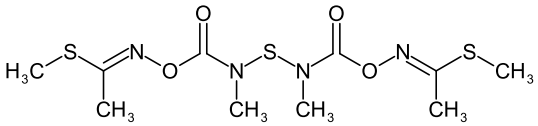


Terbufós

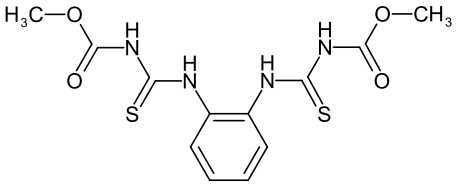


Tiametoxam

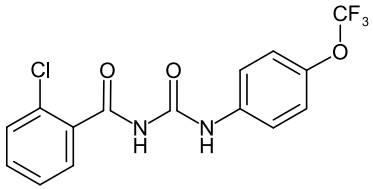
APÊNDICE B –ESTRUTURAS DOS AGROTÓXICOS AVALIADOS



Tiodicarbe



Tiofanato-metílico



Triflumurom

9.3 APÊNDICE C – RESULTADOS DE ENSAIOS DE FORTIFICAÇÃO, EFEITO MATRIZ E ANÁLISE ESTATISTICA ANOVA E TESTE DE TUKEY

Tabela C.1 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T4, T5 e T6

(continua)

	T6: Q. Citrato		T5: Q. Acetato		T4: Q. Mod. ACN 5% ác fórmico		p-valor ANOVA
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	
2,4,5-T	0,4 (± 0,4)b	162	13 (± 23)a	120	63 (± 6)a	61	0,002
2,4-D	0,7 (± 0,1)c	85	9 (± 3)b	-150	83 (± 3)a	41	0,000
Acetamiprido	89 (± 3)	-45	88 (± 3)	-57	84 (± 3)	-116	0,174
Acibenzolar-S-metil	33 (± 1)b	-69	37 (± 5)b	-108	58 (± 6)a	-135	0,001
Alacloro	87 (± 4)	-78	88 (± 13)	-91	-	-	0,911
Aldicarb	99 (± 10)	-82	86 (± 3)	-84	88 (± 8)	-152	0,152
Aldicarb-sulfona	96 (± 9)	-31	83 (± 10)	-24	96 (± 9)	-67	0,221
Aldicarb-sulfoxido	84 (± 3)	-15	83 (± 7)	-17	80 (± 1)	-43	0,501
Azinfós-etílico	69 (± 5)b	-75	70 (± 2)b	-83	81 (± 4)a	-71	0,017
Azoxistrobina	91 (± 2)	-52	91 (± 3)	-62	92 (± 2)	-118	0,888
Benalaxil	91 (± 1)a	-56	86,8 (± 0,3)b	-66	84 (± 1)c	-99	0,000
Butóxido de piperonila	80 (± 3)b	-42	66 (± 8)b	-57	110 (± 9)a	-150	0,001
Butralina	89 (± 14)ab	-86	63 (± 26)b	-170	145 (± 31)a	-593	0,017
Carbaril	90 (± 4)	-59	88 (± 2)	-69	84 (± 4)	-131	0,193
Carbendazim	17 (± 1)b	-30	14 (± 2)c	-36	26 (± 2)a	-88	0,000
Carbofurano	100 (± 3)a	-65	93 (± 3)ab	-72	89 (± 3)b	-124	0,013
Carbofurano-3-hidróxido	93 (± 3)	-41	91 (± 5)	-54	88 (± 4)	-105	0,350
Ciantraliniprole	24 (± 3)b	-44	27 (± 2)b	-52	70 (± 2)a	-96	0,000
Cimoxanil	90 (± 4)	-59	86 (± 2)	-59	85 (± 3)	-114	0,158
Clomazona	89 (± 3)	-73	89 (± 1)	-87	85 (± 2)	-141	0,172
Clorantraniliprole	30 (± 1)b	-61	28 (± 2)b	-69	74 (± 2)a	-122	0,000
Clorfenvinfós	85 (± 2)	-73	82 (± 2)	-84	81 (± 3)	-114	0,165
Clorpirifós-etílico	69 (± 4)b	-72	53 (± 15)b	-142	106 (± 19)a	-570	0,010
Clorpirifós-metílico	69 (± 2)b	-55	62 (± 9)b	-86	106 (± 6)a	-245	0,000
Demeton-S-metil-sulfona	97 (± 3)	-18	94 (± 4)	-26	94 (± 4)	-77	0,442
Diazinon	90 (± 2)ab	-61	83 (± 9)b	-73	98 (± 3)a	-141	0,050
Diclorvós	100 (± 2)a	-43	96 (± 1)a	-59	85 (± 5)b	-91	0,003
Difenoconazol	74 (± 4)	-47	74 (± 1)	-73	70 (± 5)	-140	0,261
Diflubenzuron	56 (± 4)b	-80	71 (± 7)a	-101	63 (± 2)ab	-113	0,029
Dimetoato	93 (± 3)	-47	91 (± 4)	-56	86 (± 1)	-118	0,075
Dimetomorfe	86 (± 2)	-44	88 (± 2)	-59	83 (± 2)	-85	0,088
Etoprofós	93 (± 1)a	-67	89 (± 3)ab	-76	85 (± 4)b	-100	0,017
Famoxadona	101 (± 8)	-70	118 (± 22)	-108	79 (± 25)	-141	0,120
Fenamidona	93,8 (± 0,1)a	-69	92 (± 2)a	-91	86 (± 1)b	-126	0,001
Fenamifós	78 (± 1)b	-64	77 (± 2)b	-84	85 (± 2)a	-105	0,002

Tabela C.1 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T4, T5 e T6.

(conclui)

	T6: Q. Citrato		T5: Q. Acetato		T4: Q. Mod. ACN 5% ác fórmico		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
Fluazifope-P-butílico	87 (± 4)ab	-62	75 (± 21)b	-140	127 (± 17)a	-485	0,018
Flubendiamida	79 (± 15)	-85	78 (± 3)	-116	71 (± 25)	-135	0,825
Fluopiram	90 (± 1)a	-76	88 (± 1)b	-85	85 (± 1)c	-94	0,001
Fosfamidona	96 (± 2)	-35	94 (± 5)	-41	90 (± 2)	-77	0,151
Forato	89 (± 6)b	-54	81 (± 17)b	-74	122 (± 6)a	-180	0,007
Fosalona	67 (± 2)	-74	64 (± 4)	-101	83 (± 17)	-178	0,131
Foxim	87 (± 6)	-77	80 (± 13)	-106	103 (± 8)	-199	0,072
Imidacloprido	87 (± 3)	-3	90 (± 4)	-30	88 (± 5)	-96	0,721
Indoxacarbe	87 (± 3)a	-36	89 (± 7)a	-83	67 (± 12)b	-192	0,028
Iprodiona	83 (± 9)b	-64	80 (± 7)b	-81	105 (± 7)a	-116	0,013
Malationa	96 (± 3)a	-67	90 (± 2)b	-73	92 (± 1)ab	-111	0,040
Metalaxil	95 (± 1)	-52	93 (± 3)	-59	88 (± 4)	-106	0,054
Metamidofós	69 (± 3)	-74	70 (± 3)	-88	73 (± 6)	-77	0,480
Metidationa	83 (± 3)	-63	89 (± 3)	-79	91 (± 4)	-131	0,093
Metiocarbe	87 (± 3)ab	-79	88 (± 2)a	-106	82 (± 2)b	-141	0,035
Metiocarbe-sulfona	97 (± 7)	-69	89 (± 3)	-26	88 (± 3)	-58	0,097
Metiocarbe-sulfoxido	83 (± 3)	-68	86 (± 1)	-69	85 (± 2)	-108	0,271
Metomil	98 (± 5)	-32	89 (± 5)	-34	92 (± 2)	-33	0,099
Mevinfós	94 (± 2)	-36	91 (± 2)	-46	88 (± 2)	-88	0,053
Monocrotofós	85 (± 2)	-26	86 (± 4)	-33	82 (± 1)	-115	0,177
Naled	79 (± 7)b	-69	101 (± 3)a	-84	81 (± 5)b	-112	0,004
Ometoato	85 (± 12)	-32	75 (± 12)	-19	88 (± 3)	-38	0,289
Oxadixil	92 (± 4)	-63	90 (± 1)	-67	90 (± 5)	-115	0,706
Oxamil	91 (± 3)	-30	93 (± 3)	-44	90 (± 6)	-108	0,671
Parationa-metílica	95 (± 2)	-15	91 (± 4)	-22	99 (± 6)	-80	0,153
Pebulato	94 (± 3)ab	-39	91 (± 9)b	-55	108 (± 3)a	-112	0,022
Penconazol	81 (± 3)ab	-74	85 (± 2)a	-90	76 (± 2)b	-126	0,008
Pirimicarbe	72 (± 1)b	-44	72 (± 3)b	-52	80 (± 3)a	-114	0,016
Pirimifós-metílico	83 (± 3)ab	-71	71 (± 9)b	-77	91 (± 2)a	-105	0,011
Profenofós	69 (± 1)b	-59	64 (± 8)b	-88	95 (± 6)a	-193	0,001
Propamocarbe	15 (± 3)c	-17	30 (± 9)b	-13	77 (± 2)a	-22	0,000
Propoxur	102 (± 3)a	-59	97 (± 4)ab	-69	91 (± 4)b	-119	0,033
Tebuconazol	72 (± 2)b	-58	77 (± 5)ab	-74	80 (± 1)a	-100	0,043
Terbufós	85 (± 5)b	-68	66 (± 20)b	-100	161 (± 12)a	-517	0,000
Tiametoxam	91 (± 3)	-18	91 (± 3)	-33	94 (± 8)	-117	0,690
Tiodicarbe	80 (± 1)b	-30	76 (± 3)b	-34	85 (± 2)a	-87	0,006
Tiofanato-metílico	80 (± 2)	-49	75 (± 3)	-57	76 (± 4)	-116	0,183
Triflumurom	74 (± 1)b	-78	70 (± 2)b	-105	87 (± 5)a	-170	0,002
Atrazina-d5	87 (± 2)a	-69	77,2 (± 0,3)b	-82	84 (± 2)a	-136	0,001

Tabela C.2 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T6, T10, T11 e T12.

(continua)

Composto	T6_3h free		T10_2h free		T11_1h free		T12_sem free		p-valor ANOVA
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	
2,4,5-T	0,4 (± 0,4)	162	-	-	-	-	-	-	-
2,4-D	0,7 (± 0,1)	85	-	-	-	-	-	-	-
Acetamiprido	89 (± 3)bc	-45	93 (± 2)ab	-43	94 (± 1)a	-45	85 (± 1)c	-46	0,001
Acibenzolar-S-metil	33 (± 1)b	-69	31 (± 2)b	-67	35 (± 5)b	-69	51 (± 1)a	-69	0,000
Alacloro	87 (± 4)	-78	88 (± 13)	-78	107 (± 12)	-80	96 (± 14)	-81	0,179
Aldicarb	99 (± 10)	-82	103 (± 3)	-76	95 (± 8)	-76	90 (± 5)	-79	0,188
Aldicarb-sulfona	96 (± 9)	-31	96 (± 1)	-19	95 (± 3)	-20	89 (± 3)	-21	0,329
Aldicarb-sulfoxido	84 (± 3)	-15	84 (± 1)	-10	85 (± 1)	-10	84 (± 1)	-9	0,624
Azinfós-etílico	69 (± 5)b	-75	63 (± 3)b	-67	72 (± 5)b	-70	88 (± 9)a	-72	0,004
Azoxistrobina	91 (± 2)	-52	93 (± 2)	-52	96 (± 3)	-53	91 (± 1)	-53	0,070
Benalaxil	91 (± 1)bc	-56	92 (± 2)ab	-55	96 (± 3)a	-56	87 (± 1)c	-54	0,001
Butóxido de piperonila	80 (± 3)	-42	79 (± 1)	-45	83 (± 1)	-49	83 (± 2)	-47	0,056
Butralina	89 (± 14)ab	-86	99 (± 4)a	-85	106 (± 4)a	-87	76 (± 6)b	-82	0,010
Carbaril	90 (± 4)	-59	95 (± 2)	-57	93 (± 4)	-58	88 (± 1)	-58	0,066
Carbendazim	17 (± 1)c	-30	18 (± 1)c	-30	22 (± 1)b	-29	38 (± 1)a	-30	0,000
Carbofurano	100 (± 3)a	-65	100 (± 3)a	-61	97 (± 1)a	-62	86 (± 5)b	-59	0,003
Carbofurano-3-hidróxido	93 (± 3)a	-41	97 (± 1)a	-39	97 (± 2)a	-41	87 (± 2)b	-43	0,001
Ciantraliniprole	24 (± 3)b	-44	24 (± 2)b	-35	30 (± 3)b	-39	54 (± 3)a	-38	0,000
Cimoxanil	90 (± 4)	-59	93 (± 1)	-57	92 (± 2)	-61	89 (± 3)	-62	0,407
Clomazona	89 (± 3)b	-73	92 (± 2)ab	-70	95 (± 3)a	-71	89 (± 2)b	-72	0,040
Clorantraniliprole	30 (± 1)bc	-61	27 (± 2)c	-60	34 (± 2)b	-62	52 (± 2)a	-60	0,000
Clorfenvinfós	85 (± 2)b	-73	84 (± 2)b	-69	97 (± 1)a	-73	86 (± 1)b	-71	0,000
Clorpirifós-etílico	69 (± 4)b	-72	67 (± 4)b	-83	87 (± 5)a	-86	67 (± 5)b	-80	0,001
Clorpirifós-metílico	69 (± 2)	-55	73 (± 3)	-54	77 (± 8)	-56	74 (± 5)	-53	0,365
Demeton-S-metil-sulfona	97 (± 3)a	-18	101 (± 1)a	-19	100 (± 2)a	-18	92 (± 1)b	-20	0,001
Diazinon	90 (± 2)b	-61	89,1 (± 0,3)b	-58	100 (± 1)a	-63	87 (± 2)b	-60	0,000
Diclorvós	100 (± 2)a	-43	100 (± 5)a	-38	99 (± 4)a	-36	86 (± 2)b	-30	0,004
Difenoconazol	74 (± 4)	-47	75 (± 1)	-43	79 (± 1)	-45	75 (± 2)	-43	0,056
Diflubenzuron	56 (± 4)b	-80	67 (± 3)a	-82	70 (± 3)a	-82	74 (± 4)a	-82	0,001
Dimetoato	93 (± 3)ab	-47	96 (± 2)a	-46	97 (± 2)a	-46	89 (± 1)b	-49	0,002
Dimetomorfe	86 (± 2)b	-44	86 (± 2)ab	-35	90 (± 2)a	-39	86 (± 1)ab	-39	0,041
Etoprofós	93 (± 1)ab	-67	89 (± 6)ab	-68	96 (± 1)a	-70	87 (± 1)b	-69	0,031
Famoxadona	101 (± 8)a	-70	106 (± 5)a	-72	113 (± 6)a	-77	84 (± 7)b	-67	0,004
Fenamidona	93,8 (± 0,1)b	-69	93 (± 2)bc	-63	99 (± 3)a	-67	88 (± 2)c	-65	0,001
Fenamifós	78 (± 1)b	-64	85 (± 1)ab	-67	83 (± 1)ab	-67	89 (± 6)a	-70	0,015
Fentiona	87 (± 1)	-72	89 (± 2)	-70	89 (± 4)	-71	87 (± 3)	-72	0,574
Fluazifope-P-butílico	87 (± 4)c	-62	97 (± 1)b	-65	105 (± 2)a	-69	84 (± 4)c	-66	0,000
Flubendiamida	79 (± 15)	-85	96 (± 14)	-86	91 (± 12)	-82	105 (± 14)	-88	0,206
Fluopiram	90 (± 1)ab	-76	88 (± 3)b	-72	94 (± 2)a	-74	92 (± 2)ab	-74	0,018
Forato	89 (± 6)ab	-54	98 (± 4)ab	-55	100 (± 5)a	-58	89 (± 2)b	-56	0,039
Fosalona	67 (± 2)	-74	71 (± 2)	-74	75 (± 7)	-75	72 (± 1)	-71	0,218
Fosfamidona	96 (± 2)a	-35	99 (± 1)a	-36	98 (± 1)a	-36	91 (± 1)b	-35	0,000
Foxim	87 (± 6)	-77	87 (± 1)	-75	94 (± 1)	-78	88 (± 4)	-77	0,157
Imidacloprido	87 (± 3)b	-2	97 (± 4)a	0.0	94 (± 3)a	0.5	82 (± 1)b	-6	0,001
Indoxacarbe	87 (± 3)c	-36	94 (± 1)ab	-37	96 (± 2)a	-40	89 (± 2)bc	-37	0,003
Iprodiona	83 (± 9)b	-64	107 (± 9)a	-71	99 (± 79)ab	-68	84 (± 3)b	-70	0,010

Tabela C.2 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T6, T10, T11 e T12.

(conclui)

Composto	T6_3h free		T10_2h free		T11_1h free		T12_sem free		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
Malationa	96 (± 3)a	-67	95 (± 4)ab	-65	100 (± 3)a	-68	89 (± 1)b	-65	0,007
Metalaxil	95 (± 1)ab	-52	94 (± 2)ab	-49	97 (± 1)a	-52	91 (± 3)b	-52	0,033
Metamidofós	69 (± 3)	-74	66 (± 1)	-73	67 (± 2)	-74	63 (± 3)	-76	0,065
Metidationa	83 (± 3)b	-63	91 (± 2)a	-61	94 (± 1)a	-63	90 (± 2)a	-63	0,002
Metiocarbe	87 (± 3)	-79	84 (± 4)	-77	89 (± 2)	-79	84 (± 2)	-79	0,158
Metiocarbe-sulfona	97 (± 7)	-69	103 (± 8)	-75	80 (± 21)	-90	122 (± 52)	-93	0,412
Metiocarbe-sulfoxido	83 (± 3)	-68	87 (± 1)	-64	85 (± 3)	-69	83 (± 5)	-71	0,444
Metomil	98 (± 5)	-32	93 (± 1)	-28	94 (± 2)	-27	90 (± 1)	-30	0,077
Mevinfós	94 (± 2)a	-36	97 (± 2)a	-34	96 (± 2)a	-35	87 (± 2)b	-34	0,001
Monocrotofós	85 (± 2)b	-26	90 (± 1)a	-25	89 (± 1)a	-24	85,2 (± 0,3)b	-25	0,000
Naled	79 (± 7)b	-69	94 (± 3)a	-65	93 (± 3)ab	-69	85 (± 7)ab	-69	0,028
Ometoato	85 (± 12)	-32	84 (± 3)	-16	79 (± 1)	-13	79 (± 5)	-12	0,608
Oxadixil	92 (± 4)	-63	97 (± 4)	-60	95 (± 2)	-62	89 (± 4)	-63	0,132
Oxamil	91 (± 3)bc	-30	94 (± 2)ab	-28	97 (± 1)a	-35	88 (± 2)c	-37	0,006
Parationa-metílica	95 (± 2)b	-15	101 (± 2)a	-17	102 (± 1)a	-17	92 (± 2)b	-16	0,000
Pebulato	94 (± 3)	-39	89 (± 1)	-36	95 (± 1)	-41	95 (± 4)	-41	0,065
Penconazol	81 (± 3)ab	-74	83 (± 2)ab	-71	87 (± 3)a	-71	80 (± 1)b	-71	0,033
Pirimicarbe	72 (± 1)b	-44	74 (± 2)ab	-47	77 (± 2)a	-52	78 (± 2)a	-52	0,023
Pirimifós-metílico	83 (± 3)ab	-71	79 (± 1)b	-68	86 (± 1)a	-70	80 (± 2)b	-69	0,006
Profenofós	69 (± 1)b	-59	70 (± 1)b	-59	77 (± 1)a	-63	71 (± 2)b	-61	0,000
Propamocarbe	15 (± 3)b	-17	16 (± 1)b	10	15 (± 1)b	10	24 (± 1)a	12	0,001
Propoxur	102 (± 3)a	-59	103 (± 4)a	-51	99 (± 2)a	-51	89 (± 4)b	-48	0,004
Tebuconazol	72 (± 2)b	-58	76 (± 2)ab	-58	77 (± 2)ab	-56	80 (± 3)a	-57	0,016
Terbufós	85 (± 5)	-68	94 (± 5)	-65	95 (± 7)	-69	86 (± 7)	-68	0,163
Tiametoxam	91 (± 3)b	-18	91 (± 1)b	-12	96 (± 2)a	-14	89,6 (± 0,4)b	-14	0,004
Tiodicarbe	80 (± 1)b	-30	81 (± 2)b	-23	83 (± 2)ab	-23	86 (± 1)a	-23	0,004
Tiofanato-metílico	80 (± 2)b	-49	83 (± 2)ab	-46	86 (± 1)a	-48	80 (± 2)b	-48	0,008
Triflumurom	74 (± 1)ab	-78	72 (± 3)b	-76	79 (± 2)a	-78	79 (± 3)a	-76	0,014
Atrazina-d5	87 (± 2)ab	-69	84 (± 2)b	-67	88 (± 1)a	-68	84,6 (± 0,3)ab	-69	0,023

Tabela C.3 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T11, T13, T14 e T15.

(continua)

Composto	T15_20 mg GCB+		T14_30 mg GCB+		T13_40 mg GCB+		T11_50 mg GCB+		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
2,4,5-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetamiprido	91 (± 4)	-40	97 (± 3)	-43	93 (± 4)	-41	94 (± 1)	-45	0,252
Acibenzolar-S-metil	75 (± 7)a	-68	57 (± 7)b	-66	47 (± 2)bc	-65	35 (± 5)c	-69	0,000
Alacloro	83 (± 3)b	-71	83 (± 6)b	-71	92 (± 12)ab	-75	107 (± 12)a	-80	0,036
Aldicarb	89 (± 6)	-77	86 (± 7)	-77	88 (± 7)	-78	95 (± 8)	-76	0,547
Aldicarb-sulfona	96 (± 6)b	-16	104 (± 2)ab	-22	108 (± 5)a	-26	95 (± 3)b	-20	0,010
Aldicarb-sulfoxido	87 (± 2)bc	-7	90 (± 1)a	-11	90 (± 2)ab	-11	85 (± 1)c	-10	0,003
Azinfós-etílico	95 (± 4)a	-71	88 (± 1)ab	-71	81 (± 7)bc	-70	72 (± 4.6)c	-70	0,002
Azoxistrobina	92 (± 3)	-47	98 (± 1)	-51	94 (± 3)	-49	95.9 (± 3.3)	-53	0,159
Benalaxil	91 (± 5)	-50	92 (± 4)	-53	92 (± 4)	-51	95.9 (± 2.7)	-56	0,521
Butóxido de piperonila	91 (± 2)a	-47	89 (± 1)ab	-46	83 (± 5)b	-43	82.6 (± 1.3)b	-49	0,009
Butralina	65 (± 9)b	-87	82 (± 2)b	-88	78 (± 9)b	-86	105.5 (± 4.1)a	-87	0,001
Carbaril	91(± 5)	-53	95 (± 3)	-57	89 (± 4)	-54	93.3 (± 3.9)	-58	0,377
Carbendazim	59 (± 2)a	-27	47 (± 1)b	-30	35 (± 1)c	-30	22.2 (± 0.9)d	-29	0,000
Carbofurano	97 (± 6)	-61	101 (± 1)	-63	97 (± 3)	-61	97.2 (± 1)	-62	0,394
Carbofurano-3-hidróxido	93 (± 5)	-36	100 (± 2)	-40	95 (± 4)	-38	96.6 (± 2)	-41	0,229
Ciantraliniprole	78 (± 2)a	-33	68 (± 3)b	-40	48 (± 1)c	-35	30 (± 3)d	-39	0,000
Cimoxanil	91 (± 5)ab	-64	93 (± 4)a	-64	85 (± 1)b	-60	92 (± 2)ab	-61	0,044
Clomazona	85 (± 3)b	-66	95 (± 3)a	-70	91 (± 4)ab	-68	95 (± 3)a	-71	0,022
Clorantraniliprole	75 (± 4)a	-52	68 (± 5)a	-57	48 (± 4)b	-52	34 (± 2)c	-62	0,000
Clorfenvinfós	88 (± 2)b	-71	91 (± 2)ab	-73	88 (± 4)b	-71	97 (± 1)a	-73	0,011
Clorpirifós-etílico	64 (± 4)b	-83	71 (± 2)ab	-85	66 (± 11)b	-82	87 (± 5)a	-86	0,010
Clorpirifós-metílico	82 (± 2)ab	-59	88 (± 2)a	-59	69 (± 1)c	-54	77 (± 8)bc	-56	0,003
Demeton-S-metil-sulfona	100 (± 4)	-15	103 (± 3)	-17	102 (± 2)	-16	100 (± 2)	-18	0,437
Diazinon	87 (± 7)	-57	93 (± 4)	-61	90 (± 5)	-58	100 (± 1)	-63	0,052
Diclorvós	98 (± 6)	-25	104 (± 4)	-30	101 (± 7)	-29	99 (± 4)	-36	0,601
Difenoconazol	80 (± 2)ab	-41	84 (± 2)a	-46	78 (± 1)b	-41	79 (± 1)b	-45	0,008
Diflubenzuron	82 (± 5)a	-82	76 (± 3)ab	-82	71 (± 5)b	-82	70 (± 3)b	-82	0,025
Dimetoato	91 (± 5)	-41	100 (± 4)	-46	96 (± 3)	-43	97 (± 2)	-46	0,098
Dimetomorfe	88 (± 4)	-31	92 (± 2)	-36	87 (± 2)	-32	90 (± 2)	-39	0,131
Etoprofós	85 (± 3)b	-66	96 (± 3)a	-70	86 (± 5)b	-66	96 (± 1)a	-70	0,003
Famoxadona	84 (± 11)b	-72	86 (± 2)b	-70	83 (± 6)b	-68	113 (± 6)a	-77	0,002
Fenamidona	91 (± 4)b	-64	94 (± 2)ab	-66	91 (± 3)b	-64	99 (± 3)a	-67	0,024
Fenamifós	85 (± 5)	-67	84 (± 2)	-67	83 (± 1)	-68	83 (± 1)	-67	0,928
Fentiona	87 (± 5)	-71	94 (± 1)	-73	88 (± 2)	-71	89 (± 4)	-71	0,165
Fluazifope-P-butílico	75 (± 4)c	-68	90 (± 3)b	-71	86 (± 7)bc	-67	105 (± 2)a	-69	0,000
Flubendiamida	67 (± 7)c	-77	104 (± 3)a	-84	83 (± 3)bc	-81	91 (± 12)ab	-82	0,002

Tabela C.3 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T11, T13, T14 e T15.

(conclui)

Composto	T15_20 mg GCB+		T14_30 mg GCB+		T13_40 mg GCB+		T11_50 mg GCB+		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
Fluopiram	95 (± 4)	-73	96 (± 2)	-74	90 (± 5)	-72	94 (± 2)	-74	0,161
Forato	90 (± 4)ab	-55	90 (± 1)ab	-56	86 (± 7)b	-53	100 (± 5)a	-58	0,042
Fosalona	80 (± 3)	-73	80 (± 7)	-74	74 (± 2)	-72	75 (± 7)	-75	0,383
Fosfamidona	95 (± 3)	-28	99 (± 2)	-33	96 (± 5)	-30	98 (± 1)	-36	0,306
Foxim	86 (± 3)	-78	92 (± 1)	-79	86 (± 6)	-77	94 (± 1)	-78	0,060
Imidacloprido	90 (± 3)	14	96 (± 3)	7	96 (± 5)	6	94 (± 3)	0.5	0,201
Indoxacarbe	89 (± 3)	-47	92 (± 4)	-47	89 (± 6)	-42	96 (± 2)	-40	0,190
Iprodiona	88 (± 6)b	-70	84 (± 11)b	-72	142 (± 16)a	-82	99 (± 7)b	-68	0,001
Malationa	91 (± 5)b	-61	98 (± 1)ab	-64	93 (± 4)ab	-62	100 (± 3)a	-68	0,030
Metalaxil	92 (± 4)	-46	96 (± 2)	-49	92 (± 3)	-47	97 (± 1)	-52	0,055
Metamidofós	74 (± 4)a	-75	75,4 (± 0,1)a	-76	72 (± 1)ab	-76	67 (± 2)b	-74	0,010
Metidationa	90 (± 6)	-57	99 (± 2)	-62	91 (± 6)	-59	94 (± 1)	-63	0,142
Metiocarbe	86 (± 5)	-77	89 (± 1)	-78	86 (± 4)	-77	89 (± 2)	-79	0,638
Metiocarbe-sulfona	76 (± 11)	-98	82 (± 14)	-96	84 (± 13)	-94	80 (± 21)	-90	0,935
Metiocarbe-sulfoxido	86 (± 5)a	-77	79 (± 4)ab	-75	71 (± 4)b	-70	85 (± 3)a	-69	0,004
Metomil	97 (± 5)ab	-24	101 (± 1)ab	-28	102 (± 2)a	-28	94 (± 2)b	-27	0,044
Mevinfós	96 (± 3)	-32	101 (± 3)	-37	96 (± 3)	-33	96 (± 2)	-35	0,120
Monocrotofós	90 (± 2)ab	-22	93 (± 1)ab	-25	93 (± 2)a	-25	89 (± 1)b	-24	0,023
Naled	76 (± 11)ab	-66	74 (± 3)b	-66	74 (± 6)b	-64	93 (± 3)a	-69	0,024
Ometoato	84 (± 4)bc	-13	88 (± 1)ab	-16	92 (± 4)a	-21	79 (± 1)c	-13	0,002
Oxadixil	93 (± 4)	-59	94 (± 2)	-62	95 (± 3)	-59	95 (± 2)	-62	0,798
Oxamil	95 (± 5)	-32	96 (± 2)	-33	98 (± 4)	-33	97 (± 1)	-35	0,707
Parationa-metílica	98 (± 3)	-11	101 (± 4)	-14	103 (± 3)	-15	102 (± 1)	-17	0,195
Pebulato	90 (± 3)	-44	95 (± 4)	-50	89 (± 5)	-47	95 (± 1)	-41	0,184
Penconazol	81 (± 4)	-68	82 (± 2)	-69	83 (± 4)	-69	87 (± 3)	-71	0,218
Pirimicarbe	89 (± 4)a	-46	89 (± 2)ab	-49	82 (± 3)bc	-47	77 (± 2)c	-52	0,002
Pirimifós-metílico	82 (± 3)b	-68	90 (± 1)a	-71	86 (± 3)ab	-69	86 (± 1)ab	-70	0,010
Profenofós	77 (± 3)ab	-60	82 (± 2)a	-63	75 (± 2)b	-59	77 (± 1)ab	-63	0,014
Propamocarbe	16 (± 1)ab	9	16.9 (± 0.3)a	5	17 (± 1)ab	3	15 (± 1)b	10	0,046
Propoxur	96 (± 4)	-48	101 (± 1)	-52	95 (± 4)	-49	99 (± 2)	-51	0,078
Tebuconazol	82 (± 3)ab	-52	87 (± 2)a	-56	80 (± 4)ab	-53	77 (± 2)b	-56	0,016
Terbufós	81 (± 5)	-68	82 (± 3)	-69	84 (± 8)	-68	95 (± 7)	-69	0,076
Tiametoxam	92 (± 3)	-6	100 (± 2)	-13	96 (± 4)	-10	96 (± 2)	-14	0,055
Tiodicarbe	92 (± 3)a	-13	94 (± 2)a	-21	90 (± 3)a	-18	83 (± 2)b	-23	0,003
Tiofanato-metílico	97 (± 2)a	-49	90 (± 1)b	-46	83 (± 2)c	-44	86 (± 1)bc	-48	0,000
Triflumurom	82 (± 3)	-76	85 (± 7)	-77	77 (± 2)	-75	79 (± 2)	-78	0,181
Atrazina-d5	83 (± 2)b	-63	86 (± 2)ab	-66	83 (± 2)b	-65	88 (± 1)a	-68	0,024

Tabela C.4 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T17, T24 e T31.

(continua)

Composto	T31: EMR d-SPE sem polish		T24: EMR d-SPE com polish		T17: EMR Captiva_SPE		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
2,4,5-T	10 (± 13)a	79	112 (± 1)a	2	78 (± 1)b	46	0,005
2,4-D	92 (± 3)a	49	95 (± 3)a	-14	82 (± 3)b	-1	0,003
Acetamiprido	92 (± 3)a	-74	86 (± 2)ab	-42	86 (± 2)b	-45	0,032
Acibenzolar-S-metil	92 (± 4)	-78	91 (± 3)	-72	90 (± 6)	-73	0,907
Alacloro	111 (± 8)	-84	87 (± 4)	-69	93 (± 17)	-71	0,089
Aldicarb	86 (± 7)	-85	83 (± 3)	-53	94 (± 8)	-61	0,186
Aldicarb-sulfona	94 (± 3)a	-36	92 (± 2)a	-25	86 (± 1)b	-40	0,008
Aldicarb-sulfoxido	87 (± 2)a	-17	78 (± 2)b	-14	79 (± 1)b	-27	0,001
Azinfós-etílico	94 (± 5)	-83	86 (± 5)	-57	89 (± 7)	-56	0,356
Azoxistrobina	96 (± 2)a	-69	94 (± 2)a	-54	87 (± 3)b	-54	0,013
Benalaxil	96 (± 3)	-67	93 (± 2)	-50	90 (± 3)	-52	0,093
Butóxido de piperonila	92 (± 4)a	-72	90 (± 5)ab	-53	81 (± 1)b	-56	0,021
Butralina	74 (± 4)a	-97	80 (± 11)a	-88	54 (± 4)b	-86	0,012
Carbaril	90 (± 3)	-76	91 (± 2)	-55	87 (± 5)	-57	0,341
Carbendazim	85 (± 3)a	-45	81 (± 2)ab	-34	77 (± 1)b	-41	0,016
Carbofurano	96 (± 1)a	-78	98,2 (± 0,4)a	-27	90 (± 3)b	-29	0,003
Carbofurano-3-hidróxido	95 (± 4)a	-65	92 (± 3)ab	-44	87 (± 2)b	-50	0,040
Ciantraliniprole	92 (± 3)	-91	92 (± 10)	-47	86 (± 4)	-44	0,411
Cimoxanil	92 (± 3)	-81	88 (± 3)	-70	85 (± 3)	-74	0,096
Clomazona	91 (± 4)	-84	89 (± 3)	-73	84 (± 3)	-73	0,096
Clorantraniliprole	83 (± 2)	-90	83 (± 5)	-63	83 (± 5)	-61	0,995
Clorfenvinfós	87 (± 2)	-84	87 (± 4)	-62	84 (± 4)	-64	0,408
Clorpirifós-etílico	83 (± 11)	-96	75 (± 1)	-86	75 (± 4)	-87	0,282
Clorpirifós-metílico	100 (± 6)a	-81	98 (± 4)ab	-61	85 (± 8)b	-58	0,045
Demeton-S-metil-sulfona	99 (± 2)a	-43	95 (± 2)a	-27	87 (± 1)b	-36	0,000
Diazinon	95 (± 3)a	-74	93 (± 1)a	-55	84 (± 4)b	-57	0,008
Diclorvós	93 (± 2)	-63	92 (± 3)	-23	88 (± 5)	-29	0,164
Difenoconazol	86 (± 5)a	-85	88 (± 5)a	-45	75 (± 3)b	-47	0,024
Diflubenzuron	92 (± 4)	-95	86 (± 5)	-74	89 (± 5)	-77	0,364
Dimetoato	95 (± 3)a	-69	89 (± 2)b	-56	85 (± 1)b	-61	0,006
Dimetomorfe	92 (± 2)	-80	89 (± 4)	-31	86 (± 3)	-34	0,143
Etoprofós	92 (± 4)	-79	90 (± 9)	-64	86 (± 4)	-65	0,487
Famoxadona	77 (± 16)	-91	76 (± 14)	-75	65 (± 3)	-71	0,441
Fenamidona	94 (± 1)a	-91	93 (± 4)a	-63	85 (± 3)b	-61	0,016
Fenamifós	96 (± 5)a	-80	95 (± 4)a	-60	84 (± 2)b	-59	0,009
Fentiona	98 (± 1)a	-85	89 (± 5)ab	-67	85 (± 3)b	-67	0,015
Fluazifope-P-butílico	84 (± 4)	-92	85 (± 3)	-71	79 (± 1)	-73	0,065
Flubendiamida	80 (± 13)	-94	88 (± 20)	-72	87 (± 12)	-77	0,813
Fluopiram	93 (± 2)	-82	94 (± 2)	-65	89 (± 3)	-65	0,112
Fosfamidona	98 (± 2)a	-53	96 (± 2)a	-33	89 (± 2)b	-38	0,003
Forato	86 (± 5)	-72	92 (± 3)	-58	85 (± 2)	-58	0,121
Fosalona	88 (± 3)	-92	84 (± 4)	-70	80 (± 2)	-69	0,054
Foxim	87 (± 5)	-89	88 (± 5)	-74	82 (± 3)	-74	0,286
Imidacloprido	88 (± 3)a	-83	85 (± 3)ab	-33	80 (± 3)b	-39	0,037
Iprodiona	113 (± 14)	-83	107 (± 9)	-63	85 (± 12)	-56	0,057
Indoxacarbe	88 (± 5)ab	-86	93 (± 4)a	-44	80 (± 2)b	-39	0,022
Malationa	96 (± 2)a	-77	92 (± 4)ab	-57	87 (± 4)b	-58	0,036
Metalaxil	95 (± 2)a	-69	94 (± 2)a	-50	88 (± 2)b	-52	0,008

Tabela C.4 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T17, T24 e T31.

(conclui)

Composto	T31: EMR d-SPE sem polish		T24: EMR d-SPE com polish		T17: EMR Captiva_SPE		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
Metamidofós	72 (± 2)a	-78	55 (± 4)b	9	70 (± 1)a	-43	0,000
Metidationa	91 (± 1)	-78	91 (± 2)	-62	91 (± 6)	-64	0,975
Metiocarbe	89 (± 4)	-87	90 (± 2)	-78	86 (± 5)	-78	0,549
Metiocarbe-sulfona	94 (± 2)	-69	89 (± 5)	-60	86 (± 2)	-63	0,066
Metiocarbe-sulfoxido	89 (± 2)a	-71	87 (± 1)a	-71	82 (± 1)b	-72	0,002
Metomil	95 (± 3)	-43	91 (± 2)	-31	90 (± 2)	-38	0,071
Mevinfós	93 (± 2)ab	-60	93 (± 3)a	-41	88 (± 2)b	-45	0,050
Monocrotofós	94 (± 2)a	-62	85 (± 2)b	-53	83 (± 2)b	-59	0,001
Naled	95 (± 8)a	-83	80 (± 3)b	-56	82 (± 3)b	-61	0,024
Ometoato	80 (± 3)	-27	77 (± 3)	-15	80 (± 4)	-26	0,486
Oxadixil	96 (± 4)	-73	98 (± 5)	-33	92 (± 4)	-35	0,250
Oxamil	94 (± 3)a	-33	96 (± 1)a	-34	80,6 (± 0,2)b	-45	0,000
Parationa-metílica	98 (± 1)a	-39	95 (± 1)ab	-19	92 (± 2)b	-31	0,008
Pebulato	88 (± 2)b	-64	94 (± 3)a	-45	82 (± 2)c	-43	0,002
Penconazol	88 (± 5)ab	-86	90 (± 3)a	-62	79 (± 4)b	-62	0,036
Pirimicarbe	92 (± 2)a	-77	94 (± 2)a	-26	84 (± 3)b	-28	0,005
Pirimifós-metílico	91 (± 3)	-77	89 (± 5)	-63	82 (± 3)	-67	0,083
Profenofós	84 (± 1)a	-83	82 (± 2)a	-57	76 (± 2)b	-60	0,004
Propamocarbe	66 (± 3)a	-7	45 (± 1)b	-4	66 (± 1)a	-9	0,000
Propoxur	93 (± 3)b	-72	98 (± 1)a	-19	90 (± 2)b	-24	0,009
Tebuconazol	91 (± 2)	-85	91 (± 3)	-44	85 (± 5)	-45	0,139
Terbufós	88 (± 4)	-87	91 (± 2)	-69	92 (± 6)	-74	0,571
Tiametoxam	97 (± 3)a	-72	88 (± 1)b	-40	90 (± 4)b	-50	0,018
Tiodicarbe	93 (± 1)	-56	90 (± 4)	-18	89 (± 2)	-24	0,269
Tiofanato-metílico	84 (± 2)	-81	86 (± 2)	-6	81 (± 3)	-9	0,109
Triflumurom	82 (± 5)	-92	88 (± 6)	-73	80 (± 4)	-72	0,254
Atrazina-d5	89 (± 3)ab	-82	94 (± 2)a	-65	85 (± 2)b	-66	0,009

Tabela C.5 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T27, T32, T33 e T34.

(continua)

Composto	T27: 20mg GCB sulpelco		T32: 10mg GCB		T33: 7.5mg GCB		T34: 5mg GCB		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
2,4,5-T	115 (± 14)	7	134 (± 7)	37	97 (± 23)	66	99 (± 11)	65	0,055
2,4-D	104 (± 4)	3	102 (± 2)	46	99 (± 1)	44	99 (± 1)	41	0,114
Acetamiprido	92 (± 1)b	-66	96 (± 2)ab	-70	98 (± 3)a	-71	99 (± 1)a	-72	0,007
Acibenzolar-S-metil	84 (± 15)	-78	96 (± 2)	-77	92 (± 3)	-77	97 (± 4)	-78	0,197
Alacloro	85 (± 6)	-80	97 (± 16)	-81	87 (± 12)	-81	84 (± 2)	-81	0,472
Aldicarb	99 (± 6)	-88	99 (± 9)	-86	94 (± 2)	-86	98 (± 5)	-87	0,760
Aldicarb-sulfona	98 (± 1)	-42	103 (± 3)	-35	102 (± 2)	-34	104 (± 3)	-36	0,087
Aldicarb-sulfoxido	89 (± 2)	-30	91 (± 2)	-14	92 (± 2)	-15	94 (± 2)	-17	0,065
Azinfós-etílico	94 (± 7)b	-67	99 (± 5)ab	-83	108 (± 5)a	-85	95 (± 2)b	-83	0,033
Azoxistrobina	97 (± 1)	-68	100.6 (± 0.4)	-68	99 (± 2)	-69	100 (± 2)	-70	0,084
Benalaxil	92 (± 4)b	-66	98 (± 2)ab	-69	97 (± 3)ab	-69	100 (± 1)a	-71	0,037
Butóxido de piperonila	89 (± 2)b	-69	94 (± 2)ab	-72	94 (± 3)ab	-72	98 (± 4)a	-74	0,019
Butralina	78 (± 8)bc	-95	65 (± 5)c	-95	79 (± 5)b	-96	101 (± 1)a	-97	0,000
Carbaril	96 (± 2)	-72	96 (± 1)	-75	98 (± 4)	-77	98 (± 2)	-77	0,653
Carbendazim	65 (± 1)d	-49	82 (± 1)c	-41	87 (± 2)b	-41	92 (± 2)a	-44	0,000
Carbofurano	98 (± 2)b	-66	105 (± 3)a	-77	103 (± 2)ab	-78	104 (± 3)ab	-79	0,030
Carbofurano-3-hidróxido	99 (± 2)	-65	99 (± 2)	-62	98 (± 1)	-63	96 (± 1)	-64	0,228
Ciantraliniprole	102 (± 2)ab	-63	96 (± 2)b	-90	103 (± 1)a	-91	105 (± 4)a	-91	0,009
Cimoxanil	95 (± 1)b	-72	98 (± 2)ab	-77	100 (± 2)a	-78	101.1 (± 0.3)a	-79	0,011
Clomazona	95 (± 5)	-81	97 (± 3)	-83	97 (± 1)	-83	99 (± 2)	-84	0,477
Clorantraniliprole	93 (± 8)	-70	102 (± 6)	-89	89 (± 3)	-88	94 (± 1)	-89	0,103
Clorfenvinfós	94 (± 8)	-79	97 (± 1)	-85	94.9 (± 0.2)	-85	97 (± 3)	-85	0,730
Clorpirifós-etílico	79 (± 4)	-94	84 (± 10)	-95	92 (± 5)	-95	78 (± 3)	-95	0,094
Clorpirifós-metílico	87 (± 5)	-78	90 (± 5)	-75	95 (± 5)	-80	98 (± 9)	-81	0,213
Demeton-S-metil-sulfona	98 (± 3)b	-44	100 (± 1)ab	-40	103 (± 2)ab	-42	106 (± 2)a	-44	0,010
Diazinon	94 (± 3)	-73	96 (± 2)	-73	95 (± 2)	-74	96 (± 3)	-75	0,687
Diclorvós	96 (± 2)b	-57	103 (± 2)a	-62	106 (± 2)a	-65	101 (± 2)a	-64	0,002
Difenoconazol	84 (± 2)b	-69	86 (± 2)ab	-85	91 (± 4)ab	-85	94 (± 3)a	-87	0,013
Diflubenzuron	81 (± 1)c	-85	98 (± 3)a	-95	93 (± 1)ab	-95	86 (± 5)bc	-94	0,001
Dimetoato	95 (± 2)	-69	100 (± 3)	-68	98 (± 3)	-68	99 (± 1)	-69	0,115
Dimetomorfe	95 (± 3)	-52	98 (± 2)	-80	98 (± 2)	-80	99 (± 3)	-81	0,282
Etoprofós	101 (± 3)	-78	99 (± 2)	-79	98 (± 1)	-79	96 (± 3)	-79	0,265
Famoxadona	90 (± 7)ab	-86	104 (± 2)a	-90	89 (± 6)ab	-90	84 (± 11)b	-91	0,050
Fenamidona	98 (± 3)	-76	97 (± 3)	-91	98 (± 1)	-91	97 (± 2)	-91	0,827
Fenamifós	94 (± 5)	-74	95 (± 3)	-79	99 (± 4)	-80	97 (± 3)	-80	0,471
Fentiona	85 (± 2)c	-80	93 (± 1)b	-83	102 (± 2)a	-85	93 (± 5)b	-85	0,001
Fluazifope-P-butílico	81 (± 3)b	-88	84 (± 3)ab	-90	89 (± 4)ab	-91	90 (± 3)a	-92	0,028
Flubendiamida	152 (± 44)a	-91	90 (± 10)ab	-95	107 (± 7)ab	-96	85 (± 15)b	-95	0,034
Fluopiram	93 (± 3)b	-73	100 (± 2)a	-83	99 (± 3)ab	-83	99 (± 2)ab	-83	0,041
Fosfamidona	98 (± 2)b	-53	101 (± 3)ab	-51	100 (± 3)ab	-52	105 (± 3)a	-54	0,045
Forato	87 (± 9)	-73	99 (± 6)	-74	99 (± 4)	-74	91 (± 6)	-73	0,129

Tabela C.5 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T27, T32, T33 e T34.

(conclui)

Composto	T27: 20mg GCB sulpelco		T32: 10mg GCB		T33: 7.5mg GCB		T34: 5mg GCB		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
Fosalona	87 (± 9)	-83	93 (± 6)	-91	93 (± 6)	-91	100 (± 1)	-92	0,210
Foxim	92 (± 3)	-87	92 (± 1)	-89	95 (± 1)	-89	91 (± 4)	-90	0,188
Imidacloprido	93 (± 3)	-41	96 (± 2)	-81	92 (± 2)	-80	97 (± 3)	-82	0,124
Iprodiona	86 (± 13)	-65	95 (± 13)	-80	102 (± 10)	-80	110 (± 14)	-82	0,211
Indoxacarbe	91 (± 3)bc	-70	88 (± 4)c	-85	99 (± 1)a	-86	97 (± 3)ab	-87	0,005
Malationa	98 (± 2)	-73	99 (± 3)	-77	100 (± 2)	-77	102 (± 2)	-78	0,165
Metalaxil	96 (± 2)	-62	99 (± 2)	-67	100 (± 3)	-68	102 (± 4)	-69	0,117
Metamidofós	73 (± 3)	-80	75 (± 4)	-78	75 (± 1)	-77	79 (± 1)	-79	0,112
Metidationa	97 (± 4)	-74	99 (± 1)	-77	102 (± 1)	-78	97 (± 3)	-77	0,208
Metiocarbe	94 (± 2)	-86	96 (± 3)	-88	99 (± 2)	-88	96 (± 1)	-88	0,086
Metiocarbe-sulfona	96 (± 1)	-55	98 (± 3)	-64	99 (± 2)	-66	100 (± 2)	-67	0,142
Metiocarbe-sulfoxido	93 (± 1)b	-72	95 (± 2)b	-68	95 (± 2)b	-69	100 (± 1)a	-71	0,004
Metomil	95 (± 1)	-41	99 (± 4)	-40	100 (± 3)	-42	100.2 (± 0.1)	-43	0,197
Mevinfós	99 (± 2)	-56	97 (± 3)	-57	97 (± 2)	-57	100 (± 1)	-60	0,351
Monocrotofós	90 (± 2)b	-55	98 (± 4)a	-53	97 (± 2)a	-54	100 (± 2)a	-57	0,004
Naled	90 (± 2)b	-76	87 (± 3)b	-79	110 (± 4)a	-83	103 (± 4)a	-83	0,000
Ometoato	84 (± 4)	-30	88.3 (± 0.4)	-25	90 (± 2)	-26	90 (± 7)	-28	0,307
Oxadixil	95 (± 2)b	-65	100 (± 4)ab	-72	95 (± 1)b	-72	104 (± 1)a	-74	0,002
Oxamil	97 (± 1)	-48	97 (± 2)	-27	102 (± 4)	-30	100 (± 6)	-30	0,373
Paratione-metílica	105 (± 3)	-46	100 (± 4)	-37	102 (± 1)	-38	105 (± 2)	-40	0,139
Pebulato	97 (± 2)	-65	96 (± 1)	-63	98 (± 3)	-65	96 (± 6)	-65	0,816
Penconazol	89 (± 2)	-77	96 (± 6)	-86	94 (± 5)	-86	90 (± 1)	-86	0,189
Pirimicarbe	96 (± 2)	-66	97 (± 3)	-77	97 (± 1)	-78	99 (± 1)	-79	0,617
Pirimifós-metílico	92 (± 3)b	-77	99 (± 3)a	-79	99 (± 1)a	-79	99 (± 3)a	-79	0,021
Profenofós	90 (± 4)	-79	92 (± 2)	-84	89 (± 2)	-83	94 (± 5)	-85	0,388
Propamocarbe	75 (± 2)	-19	78 (± 2)	-3	78 (± 2)	-4	79 (± 2)	-6	0,099
Propoxur	98 (± 1)	-60	105 (± 3)	-72	103 (± 3)	-73	103 (± 3)	-74	0,068
Tebuconazol	93 (± 3)	-64	95 (± 4)	-85	97 (± 2)	-86	98 (± 5)	-86	0,352
Terbufós	82 (± 6)	-83	95 (± 8)	-87	90 (± 6)	-87	85 (± 4)	-87	0,121
Tiametoxam	98 (± 2)b	-53	102 (± 3)ab	-69	98 (± 2)b	-68	107 (± 2)a	-71	0,004
Tiodicarbe	97 (± 1)	-41	97 (± 2)	-53	98 (± 3)	-54	101 (± 2)	-56	0,130
Tiofanato-metílico	89 (± 1)a	-49	84 (± 1)b	-80	82 (± 1)b	-81	81 (± 2)b	-82	0,000
Triflumurom	88 (± 7)	-85	93 (± 2)	-92	96,4 (± 0,4)	-92	92 (± 4)	-93	0,182
Atrazina-d5	97 (± 3)	-78	99 (± 2)	-83	94 (± 3)	-82	95 (± 1)	-83	0,157

Tabela C.6 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T27, T28, T29 e T30.

(continua)

Composto	T27: 20mg GCB Sulpelco		T28: 20mg GCB 400mesh		T29: 20mg MWCNTsOH		T30: 20mg MWCNTsCOOH		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
2,4,5-T	115 (± 14)a	7	86 (± 14)b	68	111 (± 5)ab	5	110(± 10)ab	16	0,048
2,4-D	104 (± 4)a	3	90 (± 2)b	18	88 (± 3)b	17	94 (± 3)b	10	0,001
Acetamiprido	92 (± 1)	-66	91 (± 1)	-67	93 (± 1)	-66	91 (± 1)	-65	0,302
Acibenzolar-S-metil	84 (± 15)	-78	88 (± 5)	-78	86 (± 6)	-80	85 (± 3)	-77	0,942
Alacloro	85 (± 6)	-80	90 (± 10)	-85	73 (± 4)	-79	87 (± 13)	-79	0,176
Aldicarb	99 (± 6)	-88	94 (± 8)	-88	89 (± 3)	-87	95 (± 4)	-88	0,265
Aldicarb-sulfona	98 (± 1)a	-42	93 (± 1)c	-39	96,1 (± 0,4)b	-40	94,0 (± 0,3)c	-36	0,000
Aldicarb-sulfoxido	89 (± 2)	-30	85 (± 1)	-27	88 (± 1)	-2	86 (± 2)	-26	0,051
Azinfós-etílico	94 (± 7)	-67	99 (± 10)	-70	90 (± 5)	-66	97 (± 6)	-69	0,461
Azoxistrobina	97 (± 1)	-68	94 (± 1)	-67	97 (± 4)	-67	96 (± 2)	-66	0,423
Benalaxil	92 (± 4)	-66	92 (± 3)	-66	93 (± 6)	-66	95 (± 1)	-66	0,794
Butóxido de piperonila	89 (± 2)bc	-69	85 (± 1)c	-70	93 (± 3)ab	-72	97 (± 2)a	-73	0,001
Butralina	78 (± 8)	-95	65 (± 11)	-95	59 (± 7)	-95	62 (± 8)	-95	0,114
Carbaril	96 (± 2)	-72	94 (± 2)	-73	93 (± 1)	-71	93 (± 4)	-71	0,361
Carbendazim	65 (± 1)b	-49	85 (± 1)a	-47	60 (± 1)d	-47	62,0 (± 0,1)c	-45	0,000
Carbofurano	98 (± 2)	-66	95 (± 3)	-67	94 (± 1)	-64	93 (± 3)	-63	0,065
Carbofurano-3-hidróxido	99 (± 2)a	-65	93 (± 1)c	-65	93 (± 2)bc	-63	100 (± 1)ab	-64	0,002
Ciantraliniprole	102 (± 2)a	-63	89 (± 4)b	-60	96 (± 5)ab	-60	91 (± 3)b	-58	0,013
Cimoxanil	95 (± 1)a	-72	90 (± 3)b	-74	92 (± 1)ab	-70	93 (± 1)ab	-71	0,022
Clomazona	95 (± 5)	-81	93 (± 3)	-82	97 (± 4)	-81	93 (± 2)	-81	0,468
Clorantraniliprole	93 (± 8)	-70	88 (± 2)	-71	93 (± 7)	-69	99 (± 1)	-72	0,191
Clorfenvinfós	94 (± 8)	-79	87 (± 5)	-79	92 (± 6)	-79	93 (± 6)	-79	0,541
Clorpirifós-etílico	79 (± 4)b	-94	84 (± 2)b	-94	64 (± 2)c	-93	10 (± 9)a	-95	0,000
Clorpirifós-metílico	87 (± 5)	-78	87 (± 5)	-80	86 (± 14)	-76	72 (± 7)	-75	0,159
Demeton-S-metil-sulfona	98 (± 3)	-44	95,0 (± 0,4)	-45	98 (± 2)	-43	96 (± 1)	-41	0,145
Diazinon	94 (± 3)	-73	93 (± 6)	-74	90 (± 2)	-73	97 (± 1)	-74	0,214
Diclorvós	96 (± 2)ab	-57	97 (± 3)a	-60	93 (± 2)ab	-56	91 (± 2)b	-56	0,043
Difenoconazol	84 (± 2)	-69	87 (± 2)	-70	83 (± 5)	-69	87 (± 1)	-69	0,233
Diflubenzuron	81 (± 1)b	-85	99 (± 9)a	-87	83 (± 8)b	-86	82,8 (± 0,4)b	-85	0,023
Dimetoato	95 (± 2)a	-69	91 (± 2)ab	-69	94 (± 1)a	-68	90 (± 2)b	-66	0,014
Dimetomorfe	95 (± 3)ab	-52	95 (± 3)ab	-53	98 (± 1)a	-53	90 (± 1)b	-49	0,039
Etoprofós	101 (± 3)a	-78	104 (± 4)a	-80	97 (± 2)a	-77	89 (± 2)b	-75	0,001
Famoxadona	90 (± 7)ab	-86	80 (± 3)bc	-82	72 (± 4)c	-80	99 (± 6)a	-84	0,001
Fenamidona	98 (± 3)	-76	95 (± 4)	-76	97 (± 4)	-76	96 (± 4)	-76	0,678
Fenamifós	93 (± 5)	-74	93 (± 4)	-75	92 (± 6)	-75	92 (± 4)	-74	0,971
Fentiona	85 (± 2)	-80	92 (± 1)	-82	86 (± 5)	-80	91 (± 3)	-81	0,054
Fluazifope-P-butílico	81 (± 3)	-88	84 (± 3)	-89	75 (± 6)	-88	83 (± 2)	-89	0,059
Flubendiamida	152 (± 44)	-91	98 (± 17)	-86	87 (± 23)	-84	105 (± 5)	-86	0,068
Fluopiram	93 (± 3)	-73	94 (± 5)	-74	100 (± 4)	-75	99 (± 4)	-75	0,207
Fosfamidona	98 (± 2)	-53	95 (± 2)	-52	99 (± 3)	-52	95 (± 1)	-50	0,155
Forato	87 (± 9)	-73	89 (± 3)	-76	87 (± 11)	-73	89 (± 1)	-74	0,951
Fosalona	87 (± 9)	-83	83 (± 5)	-82	86 (± 6)	-83	82 (± 2)	-81	0,706
Foxim	92 (± 3)a	-87	93 (± 6)a	-88	79 (± 6)b	-86	85 (± 3)ab	-87	0,016
Imidacloprido	93 (± 3)	-41	89 (± 1)	-41	91 (± 3)	-38	91,0 (± 0,3)	-38	0,142

Tabela C.6 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T27, T28, T29 e T30.

(conclui)

Composto	T27: 20mg GCB Sulpelco		T28: 20mg GCB 400mesh		T29: 20mg MWCNTsOH		T30: 20mg MWCNTsCOOH		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
Iprodiona	86 (± 13)	-65	73 (± 2)	-63	82 (± 6)	-64	98 (± 13)	-68	0,078
Indoxacarbe	91 (± 3)	-70	86 (± 3)	-70	85 (± 8)	-69	86 (± 3)	-70	0,453
Malationa	98 (± 2)	-73	92 (± 5)	-73	97 (± 4)	-73	92 (± 3)	-70	0,123
Metalaxil	96 (± 2)	-62	94 (± 1)	-63	97 (± 2)	-61	93 (± 2)	-60	0,155
Metamidofós	73 (± 3)	-80	72 (± 2)	-80	77 (± 2)	-80	71 (± 3)	-78	0,103
Metidationa	97 (± 4)	-74	95 (± 2)	-75	96 (± 2)	-73	96 (± 2)	-73	0,857
Metiocarbe	94 (± 2)	-86	94 (± 5)	-87	98 (± 5)	-87	88 (± 3)	-86	0,059
Metiocarbe-sulfona	96 (± 1)a	-55	91 (± 2)b	-59	94 (± 1)ab	-53	92 (± 1)b	-52	0,004
Metiocarbe-sulfoxido	93 (± 1)a	-72	87,5 (± 0,3)c	-72	92 (± 1)ab	-72	90 (± 1)b	-71	0,000
Metomil	95 (± 1)	-41	94 (± 1)	-41	95 (± 2)	-41	93 (± 1)	-38	0,289
Mevinfós	99 (± 2)a	-56	92 (± 3)b	-56	99 (± 1)a	-56	94 (± 2)ab	-52	0,009
Monocrotofós	90 (± 2)ab	-55	92,0 (± 0,4)a	-60	91 (± 1)a	-54	88 (± 1)b	-50	0,008
Naled	90 (± 2)	-76	95 (± 9)	-80	92 (± 12)	-78	102 (± 7)	-78	0,345
Ometoato	84 (± 4)b	-30	90 (± 2)b	-34	99 (± 2)a	-38	84 (± 3)b	-23	0,001
Oxadixil	95 (± 2)	-65	99 (± 7)	-67	93 (± 1)	-65	96 (± 4)	-65	0,382
Oxamil	97 (± 1)a	-48	90 (± 1)b	-44	98 (± 2)a	-46	88 (± 2)b	-38	0,000
Parationa-metílica	105 (± 3)a	-46	94 (± 4)b	-42	94 (± 1)b	-40	92 (± 2)b	-38	0,001
Pebulato	97 (± 2)	-65	91 (± 1)	-64	93 (± 5)	-65	90 (± 3)	-64	0,119
Penconazol	89 (± 2)	-77	91 (± 1)	-78	93 (± 3)	-78	93 (± 3)	-78	0,151
Pirimicarbe	96 (± 2)	-66	92 (± 3)	-66	92 (± 2)	-65	92 (± 2)	-65	0,085
Pirimifós-metílico	92 (± 3)	-77	95 (± 3)	-78	95 (± 7)	-78	92 (± 2)	-77	0,720
Profenofós	90 (± 4)a	-79	82 (± 2)ab	-79	81 (± 4)b	-78	87 (± 4)ab	-80	0,034
Propamocarbe	75 (± 2)	-19	73 (± 2)	-15	75 (± 3)	-17	73 (± 2)	-14	0,670
Propoxur	98 (± 1)a	-60	95 (± 2)bc	-61	97 (± 1)ab	-60	93 (± 1)c	-58	0,002
Tebuconazol	93 (± 3)	-64	91 (± 2)	-63	94 (± 5)	-64	94 (± 1)	-65	0,533
Terbufós	82 (± 6)	-83	85 (± 5)	-85	76 (± 10)	-84	86 (± 9)	-86	0,456
Tiametoxam	98 (± 2)a	-53	94 (± 1)ab	-54	93 (± 3)b	-48	92 (± 1)b	-47	0,020
Tiodicarbe	97 (± 1)	-41	99 (± 2)	-44	97 (± 1)	-41	96 (± 1)	-40	0,132
Tiofanato-metílico	89 (± 1)	-49	85 (± 2)	-57	88 (± 3)	-48	86 (± 2)	-48	0,084
Triflumurom	88 (± 7)	-85	84 (± 4)	-86	78 (± 5)	-85	90 (± 2)	-86	0,085
Atrazina-d5	97 (± 3)b	-78	103 (± 2)a	-80	95 (± 2)b	-78	94 (± 2)b	-78	0,005

Tabela C.7 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T29, T37 e T38.

(continua)

Composto	T29: 20mg MWCNTs-OH		T37: 10mg MWCNTs-OH		T38: 5mg MWCNTs-OH		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
2,4,5-T	111 (± 5)a	5	71 (± 13)b	81	92 (± 17)ab	47	0,024
2,4-D	88 (± 3)	17	85 (± 7)	36	86 (± 4)	36	0,802
Acetamiprido	93 (± 1)b	-66	92 (± 1)b	-69	96 (± 1)a	-71	0,011
Acibenzolar-S-metil	86 (± 6)b	-80	80 (± 2)b	-75	101 (± 4)a	-80	0,003
Alacloro	73 (± 4)b	-79	83 (± 9)ab	-82	93 (± 1)a	-85	0,014
Aldicarb	89 (± 3)	-87	89 (± 3)	-89	100 (± 11)	-90	0,146
Aldicarb-sulfona	96.1 (± 0.4)	-40	96 (± 2)	-40	100 (± 2)	-43	0,071
Aldicarb-sulfoxido	88 (± 1)ab	-28	85 (± 2)b	-28	90 (± 2)a	-31	0,048
Azinfós-etílico	89.5 (± 5)b	-66	94 (± 1)b	-76	103 (± 1)a	-76	0,003
Azoxistrobina	97 (± 4)	-67	93 (± 1)	-70	97,0 (± 0,2)	-71	0,174
Benalaxil	93 (± 6)	-66	91 (± 2)	-68	96 (± 1)	-70	0,278
Butóxido de piperonila	93 (± 3)	-72	91 (± 1)	-70	95 (± 1)	-71	0,150
Butralina	59 (± 7)b	-95	78 (± 19)ab	-96	98 (± 13)a	-96	0,042
Carbaril	93 (± 1)b	-71	90 (± 1)b	-76	104 (± 4)a	-80	0,001
Carbendazim	60 (± 1)c	-47	75 (± 3)b	-46	86 (± 2)a	-49	0,000
Carbofurano	94 (± 1)ab	-64	92 (± 3)b	-77	98 (± 3)a	-79	0,039
Carbofurano-3-hidróxido	93 (± 2)b	-63	92 (± 2)b	-63	100 (± 3)a	-66	0,005
Ciantraliniprole	96 (± 5)	-60	91 (± 3)	-62	97 (± 1)	-64	0,236
Cimoxanil	92 (± 1)b	-70	90 (± 1)b	-73	98 (± 3)a	-75	0,003
Clomazona	97 (± 4)a	-81	88 (± 2)b	-83	98 (± 1)a	-85	0,008
Clorantraniliprole	93 (± 7)	-69	97 (± 4)	-80	97 (± 5)	-81	0,586
Clorfenvinfós	92 (± 6)	-79	92 (± 2)	-82	100 (± 1)	-83	0,056
Clorpirifós-etílico	64 (± 2)b	-93	81 (± 8)a	-94	81 (± 3)a	-94	0,009
Clorpirifós-metílico	86 (± 14)	-76	84 (± 5)	-77	78 (± 2)	-77	0,488
Demeton-S-metil-sulfona	98 (± 2)ab	-43	94 (± 1)b	-45	100 (± 2)a	-48	0,015
Diazinon	90 (± 2)b	-73	91 (± 2)b	-74	98 (± 1)a	-76	0,004
Diclorvós	93 (± 2)b	-56	88 (± 3)b	-60	100 (± 3)a	-64	0,003
Difenoconazol	83 (± 5)b	-69	87 (± 3)ab	-72	96 (± 3)a	-74	0,013
Diflubenzuron	83 (± 8)	-86	81 (± 1)	-88	87 (± 5)	-88	0,463
Dimetoato	94 (± 1)ab	-68	93 (± 2)b	-69	97 (± 2)a	-71	0,026
Dimetomorfe	98 (± 1)a	-53	91 (± 2)b	-58	97 (± 2)a	-61	0,005
Etoprofós	97 (± 2)a	-77	91 (± 2)b	-78	101 (± 1)a	-80	0,002
Famoxadona	72 (± 4)	-80	76 (± 10)	-81	85 (± 8)	-84	0,233
Fenamidona	97 (± 4)a	-76	90 (± 2)b	-80	98 (± 1)a	-81	0,014
Fenamifós	92 (± 6)	-75	90 (± 2)	-78	100 (± 3)	-80	0,056
Fentiona	86 (± 5)b	-80	87 (± 5)b	-82	98 (± 1)a	-85	0,022
Fluazifope-P-butílico	75 (± 6)b	-88	85 (± 3)ab	-90	91 (± 2)a	-91	0,007
Flubendiamida	87 (± 23)b	-84	97 (± 11)b	-89	172 (± 12)a	-94	0,001
Fluopiram	100 (± 4)a	-75	91 (± 1)b	-82	97 (± 1)ab	-83	0,020
Fosfamidona	99 (± 3)	-52	94 (± 2)	-52	97 (± 1)	-54	0,153
Forato	87 (± 11)	-73	89 (± 1)	-71	97 (± 6)	-74	0,254
Fosalona	86 (± 6)	-83	90 (± 6)	-87	86 (± 8)	-87	0,749
Foxim	79 (± 6)b	-86	92 (± 1)a	-89	98 (± 2)a	-90	0,002
Imidacloprido	91 (± 3)	-38	91 (± 2)	-41	96 (± 3)	-45	0,130
Iprodiona	82 (± 6)b	-64	117 (± 8)a	-75	103 (± 1)a	-76	0,001
Indoxacarbe	85 (± 8)	-69	87 (± 4)	-76	92 (± 1)	-77	0,301
Malationa	97 (± 4)	-73	95 (± 3)	-77	98 (± 2)	-78	0,546
Metalaxil	97 (± 2)a	-61	92 (± 2)b	-69	99 (± 1)a	-71	0,005
Metamidofós	77 (± 2)a	-80	72 (± 2)b	-78	77 (± 2)a	-80	0,021
Metidationa	96 (± 2)ab	-73	94 (± 2)b	-76	101 (± 2)a	-78	0,018
Metiocarbe	98 (± 5)ab	-87	90 (± 3)b	-88	101 (± 2)a	-89	0,024

Tabela C.7 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T29, T37 e T38.

(conclui)

Composto	T29: 20mg MWCNTs-OH		T37: 10mg MWCNTs-OH		T38: 5mg MWCNTs-OH		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
Metiocarbe-sulfona	94 (± 1)b	-53	92 (± 1)b	-62	99 (± 2)a	-65	0,001
Metiocarbe-sulfoxido	92 (± 1)b	-72	90 (± 2)b	-71	95,8 (± 0,2)a	-74	0,001
Metomil	95 (± 2)ab	-41	93 (± 3)b	-42	100 (± 2)a	-47	0,024
Mevinfós	99 (± 1)	-56	95 (± 2)	-57	99 (± 3)	-59	0,070
Monocrotofós	91 (± 1)ab	-54	89 (± 2)b	-55	94 (± 1)a	-59	0,010
Naled	92 (± 12)	-78	93 (± 2)	-80	92 (± 4)	-81	0,987
Ometoato	99 (± 2)a	-38	86 (± 4)b	-27	82 (± 1)b	-28	0,000
Oxadixil	93 (± 1)	-65	92 (± 2)	-76	95 (± 2)	-77	0,293
Oxamil	98 (± 2)	-46	91 (± 2)	-41	96 (± 5)	-46	0,108
Parationa-metílica	94 (± 1)ab	-40	93 (± 2)b	-43	99 (± 2)a	-45	0,025
Pebulato	93 (± 5)	-65	96 (± 2)	-63	100 (± 5)	-68	0,174
Penconazol	93 (± 3)	-78	93 (± 2)	-83	95 (± 2)	-83	0,334
Pirimicarbe	92 (± 2)ab	-65	88 (± 2)b	-75	94 (± 3)a	-74	0,024
Pirimifós-metílico	95 (± 7)	-78	93 (± 1)	-79	99 (± 2)	-80	0,284
Profenofós	81 (± 4)b	-78	87 (± 1)ab	-82	92 (± 2)a	-82	0,004
Propamocarbe	75 (± 3)	-17	73 (± 2)	-8	76 (± 2)	-12	0,383
Propoxur	97 (± 1)a	-60	91 (± 3)b	-72	99 (± 1)a	-73	0,004
Tebuconazol	94 (± 5)	-64	91 (± 1)	-69	93 (± 1)	-69	0,507
Terbufós	76 (± 10)	-84	88 (± 3)	-85	92 (± 3)	-87	0,057
Tiametoxam	93 (± 3)b	-48	94 (± 1)ab	-54	98 (± 2)a	-57	0,043
Tiodicarbe	97 (± 1)a	-41	91 (± 2)b	-52	98 (± 3)a	-56	0,008
Tiofanato-metílico	88 (± 3)	-48	86 (± 1)	-68	88 (± 2)	-70	0,439
Triflumurom	78 (± 5)b	-85	83 (± 4)ab	-86	89 (± 1)a	-87	0,039
Atrazina-d5	95 (± 2)b	-78	95 (± 2)b	-81	101 (± 1)a	-83	0,002

Tabela C.8 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T30, T35 e T36.

(continua)

Composto	T30: 20mg MWCNTs-COOH		T35: 10mg MWCNTs-COOH		T36: 5mg MWCNTs-COOH		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
2,4,5-T	110 (± 10)	16	97 (± 8)	45	96 (± 11)	54	0,216
2,4-D	94 (± 3)	10	96 (± 6)	26	91 (± 5)	31	0,530
Acetamiprido	91 (± 1)a	-65	88 (± 1)b	-68	93 (± 1)a	-70	0,005
Acibenzolar-S-metil	85 (± 3)	-77	89 (± 2)	-75	91 (± 2)	-78	0,074
Alacloro	87 (± 13)	-79	102 (± 3)	-85	85 (± 5)	-82	0,081
Aldicarb	95 (± 4)	-88	83 (± 5)	-88	86 (± 8)	-89	0,136
Aldicarb-sulfona	94,0 (± 0,3)b	-36	103 (± 5)a	-46	96 (± 2)ab	-41	0,030
Aldicarb-sulfoxido	86 (± 2)	-26	84 (± 2)	-28	85 (± 2)	-29	0,494
Azinfós-etílico	97 (± 6)	-69	90 (± 3)	-74	87 (± 7)	-73	0,158
Azoxistrobina	96 (± 2)	-66	93 (± 2)	-69	93 (± 1)	-71	0,110
Benalaxil	95 (± 1)a	-66	92 (± 1)ab	-68	91 (± 1)b	-69	0,010
Butóxido de piperonila	97 (± 2)a	-73	90 (± 1)b	-69	90 (± 1)b	-70	0,001
Butralina	62 (± 8)	-95	78 (± 16)	-95	78 (± 19)	-96	0,356
Carbaril	93 (± 4)	-71	95 (± 2)	-78	94 (± 1)	-78	0,781
Carbendazim	62,0 (± 0,1)c	-45	74 (± 4)b	-48	81 (± 1)a	-48	0,000
Carbofurano	93 (± 3)	-63	95 (± 2)	-77	92 (± 1)	-78	0,218
Carbofurano-3-hidróxido	97 (± 1)a	-64	91 (± 2)b	-63	95 (± 1)a	-65	0,007
Ciantraliniprole	91 (± 3)	-58	92 (± 4)	-61	96 (± 2)	-65	0,229
Cimoxanil	93 (± 1)a	-71	88 (± 2)b	-72	92 (± 2)a	-74	0,012
Clomazona	93 (± 2)	-81	89 (± 1)	-83	91 (± 1)	-84	0,057
Clorantraniliprole	99 (± 1)a	-72	90 (± 4)b	-78	92 (± 3)b	-80	0,017
Clorfenvinfós	93 (± 6)	-79	87 (± 3)	-81	90 (± 1)	-82	0,227
Clorpirifós-etílico	104 (± 9)a	-95	69 (± 7)b	-92	78 (± 2)b	-94	0,001
Clorpirifós-metílico	72 (± 7)b	-75	73 (± 7)b	-74	97 (± 9)a	-80	0,013
Demeton-S-metil-sulfona	96 (± 1)	-41	93 (± 2)	-44	95 (± 2)	-47	0,126
Diazinon	97 (± 1)a	-74	93 (± 2)b	-75	94 (± 2)ab	-75	0,030
Diclorvós	91 (± 2)	-56	91 (± 2)	-60	92 (± 2)	-62	0,927
Difenoconazol	87 (± 1)c	-69	82 (± 1)b	-70	88,8 (±0,3)a	-73	0,000
Diflubenzuron	82,8 (±0,4)b	-85	84 (± 2)b	-87	94 (± 4)a	-88	0,005
Dimetoato	90 (± 2)b	-66	90 (± 2)b	-69	95 (± 1)a	-71	0,008
Dimetomorfe	90 (± 1)	-49	91 (± 1)	-59	93 (± 1)	-60	0,072
Etoprofós	89 (± 2)b	-75	87,6 (± 0,3)b	-77	93 (± 2)a	-79	0,020
Famoxadona	99 (± 6)a	-84	79 (± 9)b	-79	76 (± 6)b	-82	0,012
Fenamidona	96 (± 4)	-76	92 (± 1)	-80	95 (± 2)	-81	0,224
Fenamifós	92 (± 4)	-74	93 (± 1)	-79	91 (± 2)	-79	0,798
Fentiona	91 (± 3)	-81	86 (± 5)	-82	87 (± 2)	-83	0,181
Fluazifope-P-butílico	83 (± 2)a	-89	77 (± 4)b	-89	85 (± 1)a	-91	0,021
Flubendiamida	105 (± 5)	-86	96 (± 15)	-90	82 (± 22)	-90	0,261
Fluopiram	99 (± 4)a	-75	92 (± 2)b	-82	94 (± 2)ab	-82	0,046
Fosfamidona	95 (± 1)	-50	94 (± 2)	-53	93 (± 2)	-53	0,334
Forato	89 (± 1)	-74	90 (± 3)	-71	89 (± 7)	-73	0,911
Fosalona	82 (± 2)	-81	82 (± 8)	-84	89 (± 4)	-87	0,260
Foxim	85 (± 3)b	-87	82 (± 2)b	-88	91 (± 2)a	-89	0,005
Imidacloprido	91,0 (± 0,3)	-38	87 (± 2)	-39	93 (± 4)	-45	0,060
Iprodiona	98 (± 13)	-68	105 (± 2)	-76	98 (± 14)	-75	0,647
Indoxacarbe	86 (± 3)	-70	85 (± 5)	-74	88 (± 1)	-77	0,548

Tabela C.8 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T30, T35 e T36.

(conclui)

Composto	T30: 20mg MWCNTs-COOH		T35: 10mg MWCNTs-COOH		T36: 5mg MWCNTs-COOH		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
Malationa	92 (± 3)ab	-70	91 (± 1)b	-77	96 (± 1)a	-78	0,024
Metalaxil	93 (± 2)	-60	92 (± 1)	-69	92 (± 1)	-70	0,540
Metamidofós	71 (± 3)	-78	71 (± 1)	-79	73 (± 1)	-80	0,466
Metidationa	96 (± 2)a	-73	91 (± 1)b	-75	93 (± 1)ab	-77	0,012
Metiocarbe	88 (± 3)	-86	87 (± 2)	-87	92 (± 2)	-88	0,060
Metiocarbe-sulfona	92 (± 1)	-52	91 (± 1)	-62	93 (± 2)	-65	0,334
Metiocarbe-sulfoxido	90 (± 1)	-71	88 (± 2)	-71	90 (± 2)	-73	0,258
Metomil	93 (± 1)ab	-38	91 (± 2)b	-42	96 (± 2)a	-46	0,047
Mevinfós	94 (± 2)	-52	91 (± 2)	-56	92 (± 2)	-58	0,163
Monocrotofós	88 (± 1)	-50	89 (± 1)	-55	90 (± 2)	-58	0,209
Naled	102 (± 7)ab	-78	86 (± 9)b	-78	103 (± 5)a	-82	0,047
Ometoato	84 (± 3)b	-23	97 (± 3)a	-37	89 (± 6)ab	-29	0,022
Oxadixil	96 (± 4)	-65	89 (± 3)	-75	96 (± 3)	-77	0,055
Oxamil	88 (± 2)	-38	88 (± 2)	-38	94 (± 4)	-44	0,060
Parationa-metílica	92 (± 2)	-38	92 (± 3)	-43	97 (± 2)	-46	0,105
Pebulato	90 (± 3)ab	-64	87 (± 1)b	-61	93 (± 2)a	-64	0,040
Penconazol	93 (± 3)	-78	90 (± 2)	-82	89 (± 2)	-82	0,148
Pirimicarbe	92 (± 2)	-65	89 (± 1)	-75	90 (± 2)	-74	0,246
Pirimifós-metílico	92 (± 2)	-77	93 (± 3)	-79	93 (± 2)	-79	0,843
Profenofós	87 (± 4)	-80	83 (± 3)	-81	89 (± 1)	-82	0,077
Propamocarbe	73 (± 2)b	-14	84 (± 3)a	-21	72 (± 2)b	-7	0,001
Propoxur	93 (± 1)	-58	93 (± 3)	-71	94 (± 1)	-72	0,806
Tebuconazol	95 (± 1)a	-65	90 (± 2)b	-68	90 (± 1)b	-70	0,006
Terbufós	86 (± 9)	-86	85 (± 4)	-84	95 (± 2)	-86	0,119
Tiametoxam	92 (± 1)a	-47	85 (± 2)b	-50	95 (± 2)a	-56	0,002
Tiodicarbe	96 (± 1)	-40	91 (± 2)	-52	93 (± 2)	-55	0,063
Tiofanato-metílico	86 (± 2)	-48	84 (± 1)	-68	84 (± 1)	-69	0,228
Triflumurom	90 (± 2)a	-86	84 (± 1)b	-86	83,4 (± 0,4)b	-87	0,001
Atrazina-d5	94 (± 2)	-78	91 (± 2)	-81	93 (± 1)	-82	0,108

Tabela C.9 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T28, T39, T40 e T41.

(continua)

Composto	T28: 20mg GCB 400mesh		T39: GCB 325mesh 20mg		T40: GCB 140mesh 20mg		T41: GCB 100mesh 20mg		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
2,4,5-T	86 (± 14)ab	68	78 (± 5)b	67	105 (± 6)a	26	104 (± 8)a	20	0,015
2,4-D	90 (± 2)c	18	98 (± 2)ab	32	100 (± 2)a	28	92 (± 4)bc	32	0,003
Acetamiprido	91 (± 1)b	-67	93 (± 1)ab	-71	93 (± 2)ab	-71	93,6 (± 0,4)a	-71	0,046
Acibenzolar-S-metil	88 (± 5)	-78	87 (± 2)	-76	88 (± 6)	-76	85 (± 2)	-75	0,819
Alacloro	90 (± 10)	-85	112 (± 21)	-87	81 (± 6)	-83	90 (± 11)	-84	0,081
Aldicarb	94 (± 8)	-88	94 (± 4)	-88	96 (± 5)	-89	91 (± 6)	-88	0,826
Aldicarb-sulfona	93 (± 1)b	-39	97 (± 1)a	-43	93 (± 1)b	-40	96 (± 1)a	-42	0,008
Aldicarb-sulfoxido	85 (± 1)b	-27	89 (± 2)a	-30	88 (± 2)ab	-29	89 (± 1)a	-31	0,016
Azinfós-etílico	99 (± 10)	-70	88 (± 3)	-73	94 (± 4)	-75	98 (± 3)	-76	0,143
Azoxistrobina	94 (± 1)b	-67	97 (± 1)a	-72	97 (± 1)a	-72	94,8 (± 0,1)b	-72	0,004
Benalaxil	92 (± 3)	-66	95 (± 1)	-71	93,8 (± 0,3)	-71	95 (± 1)	-72	0,285
Butóxido de piperonila	85 (± 1)b	-70	92 (± 2)a	-70	93 (± 1)a	-71	94 (± 2)a	-71	0,000
Butralina	65 (± 11)	-95	87 (± 9)	-96	84 (± 17)	-96	72 (± 17)	-96	0,248
Carbaril	94 (± 2)	-73	95 (± 2)	-78	95 (± 1)	-78	92 (± 3)	-78	0,581
Carbendazim	85 (± 1)	-47	86 (± 1)	-48	86 (± 1)	-48	87,2 (± 0,3)	-49	0,057
Carbofurano	95 (± 3)	-67	93,8 (± 0,3)	-78	98 (± 3)	-79	93 (± 1)	-78	0,107
Carbofurano-3-hidróxido	93 (± 1)	-65	95 (± 4)	-66	93 (± 2)	-66	91 (± 1)	-65	0,353
Ciantraliniprole	89 (± 4)	-60	91 (± 5)	-64	97 (± 4)	-66	98 (± 3)	-66	0,050
Cimoxanil	90 (± 3)	-74	93 (± 2)	-75	93 (± 2)	-75	94 (± 1)	-76	0,278
Clomazona	93 (± 3)	-82	92 (± 1)	-84	93 (± 1)	-84	92 (± 2)	-84	0,793
Clorantraniliprole	88 (± 2)	-71	90,3 (± 0,2)	-80	95 (± 4)	-80	91 (± 5)	-79	0,154
Clorfenvinfós	87 (± 5)	-79	90 (± 2)	-83	92 (± 2)	-83	94 (± 2)	-84	0,071
Clorpirifós-etílico	84 (± 2)	-94	74 (± 5)	-94	84 (± 2)	-94	82 (± 7)	-95	0,094
Clorpirifós-metílico	87 (± 5)	-79	89 (± 8.9)	-78	89 (± 2)	-80	92 (± 9)	-80	0,802
Demeton-S-metil-sulfona	95,0 (± 0,4)b	-45	98 (± 1)a	-47	96 (± 1)ab	-47	98 (± 1)a	-48	0,002
Diazinon	93 (± 6)	-74	94 (± 1)	-76	91 (± 1)	-75	96 (± 2)	-77	0,446
Diclorvós	97 (± 3)a	-60	93 (± 2)ab	-62	93 (± 2)a	-63	91 (± 2)b	-61	0,048
Difenoconazol	87 (± 2)	-70	90 (± 1)	-74	86 (± 2)	-74	90 (± 1)	-75	0,093
Diflubenzuron	99 (± 9)	-87	87 (± 3)	-88	96 (± 8)	-89	95 (± 3)	-88	0,199
Dimetoato	91 (± 2)b	-69	94 (± 1)a	-72	95 (± 2)a	-72	94 (± 1)ab	-72	0,043
Dimetomorfe	95 (± 3)	-53	95 (± 1)	-62	95 (± 1)	-61	94 (± 1)	-61	0,796
Etoprofós	104 (± 4)a	-80	100 (± 2)ab	-80	92 (± 1)c	-80	94 (± 3)bc	-80	0,003
Famoxadona	80 (± 3)	-82	84 (± 5)	-82	97 (± 14)	-84	93 (± 11)	-84	0,158
Fenamidona	95 (± 4)	-76	94 (± 1)	-81	94 (± 1)	-81	94 (± 1)	-81	0,786
Fenamifós	93 (± 4)	-75	94 (± 4)	-80	95 (± 2)	-80	95 (± 2)	-80	0,806
Fentiona	92 (± 1)	-82	92 (± 2)	-84	93 (± 3)	-84	90 (± 2)	-84	0,222
Fluazifope-P-butílico	84 (± 3)	-89	84 (± 1)	-91	89 (± 2)	-91	85 (± 3)	-91	0,159
Flubendiamida	98 (± 17)a	-86	68 (± 8)b	-89	91 (± 24)b	-92	159 (± 13)b	-93	0,001
Fluopiram	94 (± 5)	-75	95 (± 1)	-83	95 (± 1)	-84	95 (± 1)	-83	0,985
Fosfamidona	95 (± 2)	-52	98 (± 2)	-54	96,7 (± 0,3)	-55	98 (± 1)	-55	0,101
Forato	89 (± 3)ab	-76	91 (± 3)ab	-74	97 (± 3)a	-73	87 (± 4)b	-71	0,033
Fosalona	83 (± 5)	-82	80 (± 6)	-87	91 (± 8)	-88	81 (± 3)	-87	0,156
Foxim	93 (± 6)	-88	88 (± 2.5)	-89	90 (± 1)	-90	86 (± 1)	-89	0,085
Imidacloprido	89 (± 1)b	-41	93 (± 3)a	-46	92 (± 1)ab	-46	93 (± 1)a	-46	0,026
Iprodiona	73 (± 2)c	-63	110 (± 5)a	-77	91 (± 3)b	-74	81 (± 4)c	-71	0,000
Indoxacarbe	86 (± 3)ab	-70	83,6 (± 0,1)b	-77	91 (± 1)a	-79	92 (± 5)a	-80	0,023
Malationa	92 (± 5)ab	-73	90,8 (± 0,2)b	-78	95 (± 2)ab	-79	98 (± 2)a	-79	0,037

Tabela C.9 - Resultados de ensaios de fortificação, efeito matriz e análise estatística Anova e teste de Tukey para T28, T39, T40 e T41.

(conclui)

Composto	T28: 20mg GCB 400mesh		T39: GCB 325mesh 20mg		T40: GCB 140mesh 20mg		T41: GCB 100mesh 20mg		
	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	Rec. (± RSD) (%)	Efeito Matriz (%)	p-valor ANOVA
Metalaxil	94 (± 1)b	-63	95 (± 1)b	-71	93 (± 1)b	-70	98 (± 1)a	-72	0,001
Metamidofós	72 (± 2)	-80	72 (± 2)	-79	73 (± 1)	-79	71 (± 2)	-79	0,710
Metidationa	95 (± 2)b	-75	97 (± 2)ab	-79	97 (± 1)ab	-78	102 (± 4)a	-79	0,048
Metiocarbe	94 (± 5)	-87	89 (± 3)	-87	95 (± 1)	-88	94 (± 1)	-88	0,107
Metiocarbe-sulfona	91 (± 2)b	-59	94 (± 1)a	-55	94 (± 1)a	-56	95 (± 1)a	-56	0,006
Metiocarbe-sulfoxido	87,5 (± 0,3)c	-72	92 (± 1)a	-73	90 (± 1)b	-73	91,5 (± 0,3)a	-73	0,000
Metomil	94 (± 1)ab	-41	92,2 (± 0,4)b	-43	94 (± 2)ab	-43	96 (± 2)a	-44	0,032
Mevinfós	92 (± 3)	-56	97 (± 2)	-59	95 (± 1)	-59	95 (± 1)	-59	0,071
Monocrotofós	92,0 (± 0,4)	-60	91 (± 1)	-60	92 (± 1)	-60	92 (± 1)	-61	0,249
Naled	95 (± 9)	-80	103 (± 5)	-81	98 (± 8)	-81	103 (± 5)	-81	0,414
Ometoato	90 (± 2)a	-34	83 (± 3)b	-29	79 (± 3)b	-26	92 (± 1)a	-35	0,001
Oxadixil	99 (± 7)	-67	102 (± 3)	-79	99 (± 2)	-79	95 (± 4)	-78	0,352
Oxamil	90 (± 1)b	-44	93 (± 2)ab	-46	94 (± 1)ab	-46	95 (± 1)a	-47	0,029
Parationa-metílica	94 (± 4)	-42	97 (± 1)	-44	97 (± 3)	-44	98 (± 1)	-45	0,178
Pebulato	91 (± 1)	-64	92 (± 3)	-62	92 (± 3)	-62	92,3 (± 0,4)	-63	0,792
Penconazol	91 (± 1)	-78	93 (± 1)	-84	91 (± 2)	-84	92 (± 3)	-85	0,562
Pirimicarbe	92 (± 3)	-66	93 (± 1)	-74	94 (± 1)	-74	93 (± 2)	-73	0,746
Pirimifós-metílico	95 (± 3)	-78	93 (± 2)	-79	93 (± 1)	-79	96 (± 1)	-80	0,095
Profenofós	82 (± 2)	-79	87 (± 5)	-83	89 (± 2)	-84	86 (± 3)	-84	0,089
Propamocarbe	73 (± 2)b	-15	78 (± 1)a	-11	75 (± 2)ab	-9	78 (± 1)ab	-13	0,036
Propoxur	95 (± 2)	-61	92 (± 1)	-73	97 (± 2)	-73	95 (± 2)	-73	0,101
Tebuconazol	91 (± 2)a	-63	89 (± 1)b	-71	94 (± 1)a	-72	94 (± 2)a	-72	0,028
Terbufós	85 (± 5)	-85	96 (± 6)	-87	79 (± 7)	-85	89 (± 8)	-87	0,065
Tiametoxam	94 (± 1)ab	-54	92 (± 3)b	-56	95 (± 1)ab	-57	98 (± 3)a	-57	0,040
Tiodicarbe	99 (± 2)	-44	96 (± 1)	-55	96 (± 1)	-56	97 (± 1)	-56	0,060
Tiofanato-metílico	85 (± 2)a	-57	75 (± 1)b	-71	75 (± 1)b	-72	75 (± 2)b	-72	0,000
Triflumurom	84 (± 4)	-86	86 (± 3)	-88	89 (± 2)	-88	89 (± 2)	-88	0,235
Atrazina-d5	103 (± 2)a	-80	91 (± 2)b	-81	97 (± 2)b	-83	96 (± 3)b	-82	0,001