

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

Juliana Diniz de Barros Kuntz

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA
EMPREGANDO GC-MS/MS**

Santa Maria, RS

2022

Juliana Diniz de Barros Kuntz

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA EMPREGANDO GC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof^o. Dr. Osmar Damian Prestes

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Kuntz, Juliana
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA EMPREGANDO GC
MS/MS / Juliana Kuntz.- 2022.
107 p.; 30 cm

Orientador: Osmar Damian Prestes
Coorientador: Renato Zanella
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Azeitona 2. Azeite de Oliva 3. Agrotóxicos 4.
QuEChERS, 5. GC-MS/MS I. Damian Prestes, Osmar II.
Zanella, Renato III. Título.

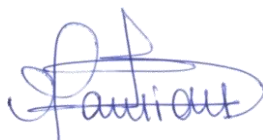
sistema de geração automática de ficha catalográfica da usm. dados fornecidos pelo autor(a). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca central. bibliotecária responsável paula schoenfeldt patta cma 10/1728.

Declaro, JULIANA KUNTZ, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA EMPREGANDO GC-MS/MS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Aprovada em 16 de março de 2022:



Osmar Damian Prestes, Dr., UFSM
(Orientador)



Samile Martel Rhoden, Dra., IFFAR



Sandra Cadore Peixoto, Dra., UFN

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus por ter me dado saúde e forças pra me manter durante essa jornada.

Agradecer a minha família que esteve ao meu lado nos meus momentos mais difíceis, que não soltaram minha mão e acreditaram em mim. Especialmente a minha mãe, pai e irmãos.

Ao meu noivo que esteve presente, me incentivando, apoiando e aconselhando. Obrigada pelo companheirismo. Te amo!

Aos professores do LARP, Renato, Martha e Osmar, que me deram a oportunidade de fazer parte do LARP e compartilharam seus conhecimentos comigo. Em especial ao professor Osmar, que foi meu orientador e sempre esteve disposto a me ajudar, e compreender minhas maiores dificuldades.

Aos membros da banca Professora Samile Martel Rhoden e Professora Sandra Cadore Peixoto pelas excelentes contribuições e comentários desta defesa de dissertação.

A todos meus colegas de laboratório, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a Luana, que sempre esteve disposta a me ajudar e a me orientar; e a Pimperelli que não mediu esforços para me auxiliar no desenvolvimento desse trabalho.

Às minhas amigas e colegas desde a graduação, Graziela, Karolaine e Adriane, que sempre estiveram ao meu lado, e fazem parte dessa jornada acadêmica.

À UFSM e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) pela contribuição essencial na minha formação.

Ao Ademir e Miguel, funcionários do PPGQ, pela gentileza e atenção na execução de suas tarefas.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA EMPREGANDO GC-MS/MS

AUTORA: Juliana Diniz de Barros Kuntz

ORIENTADOR: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

No Brasil, o azeite de oliva é definido como um produto obtido dos frutos da oliveira *Olea europaea L.* e já se configura no cenário internacional como o segundo maior importador do azeite. O azeite de oliva tem sido utilizado na culinária a milhares de anos. O Rio Grande do Sul é o estado com maior produção de azeitonas. Com a intenção de melhorar o cultivo e a qualidade do produto final, costuma-se empregar agrotóxicos. No Brasil, a legislação vigente é apenas para azeitonas com LMR de 9 agrotóxicos. Assim, os usos de agrotóxicos não permitidos acabam sendo utilizados. Portanto, para garantir a qualidade dos azeites de oliva, desenvolver um método analítico que permita determinar agrotóxicos em azeite de oliva é fundamental. Dessa forma, essa pesquisa desenvolveu e validou um método analítico para determinação de 79 diferentes agrotóxicos em azeite de oliva, empregando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS). O método foi validado para 79 compostos, sendo que o limite de quantificação (LOQ) variou de 25 a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o limite de detecção (LOD) de 7,5 a 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dentro da faixa de aceitação utilizada que foi de 70 a 120% com RSD <20%. Aplicou-se o método para 18 amostras de azeite de oliva. Dessas, 7 amostras de azeite de oliva apresentaram resíduos de agrotóxicos de diferentes classes e características em concentrações que variam de 8,91 a 689,41 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Considerando os resultados obtidos, o método proposto mostrou-se ser eficiente na determinação de 79 agrotóxicos em azeite de oliva.

Palavras-chave: azeitona, azeite de oliva, agrotóxicos, QuEChERS, GC-MS/MS.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINING PESTICIDE RESIDUES IN OLIVE OIL USING GC-MS/MS

AUTHOR: Juliana Diniz de Barros Kuntz

ADVISOR: Prof. Dr. Osmar Damian Prestes

In Brazil, olive oil is defined as a product obtained from the fruits of the olive tree *Olea europaea* L. and it is already configured in the international scenario as the second largest importer of olive oil. Olive oil has been used in cooking for thousands of years. Rio Grande do Sul is the state with the highest production of olives. With the intention of improving the cultivation and the quality of the final product, it is customary to use pesticides. In Brazil, the current legislation is only for olives with an MRL of 9 pesticides. Thus, the uses of pesticides that are not allowed end up being used. Therefore, to guarantee the quality of olive oils, developing an analytical method that allows the determination of pesticides in olive oil is essential. Thus, this research developed and validated an analytical method for the determination of 79 different pesticides in olive oil, using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). The method was validated for 79 compounds, and the limit of quantification (LOQ) ranged from 25 to 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and the limit of detection (LOD) from 7.5 to 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ within the acceptance range used, which was 70 to 120% with RSD <20%. The method was applied to 18 samples of olive oil. Of these, 7 olive oil samples showed pesticide residues of different classes and characteristics at concentrations ranging from 8.91 to 689.41 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Considering the results obtained, the proposed method proved to be efficient in the determination of 79 pesticides in olive oil.

Keywords: olive, olive oil, pesticides, QuEChERS, GC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras.....	19
Figura 2 - Cidades do estado gaúcho com plantações de oliveiras.....	23
Figura 3 - Representação esquemática da extração de analitos de amostras aquosas utilizando LLE.....	33
Figura 4 - Esquema da MSPD.....	34
Figura 5 - Esquema da MSPD assistida por vórtex.....	35
Figura 6 - Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS a) original; b) acetato; e c) citrato.....	37
Figura 7 - Fluxograma da avaliação gravimétrica para os testes (T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7).....	60
Figura 8 - Cromatograma de íons totais obtido por GC-MS/MS no modo MRM a partir de uma solução padrão $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (acetonitrila).....	68
Figura 9 - Avaliação visual dos extratos obtidos, após a análise gravimétrica, pelos diferentes testes com e sem etapa de limpeza.....	71
Figura 10 - Varredura no modo <i>full scan</i> por GC-MS/MS do extrato da matriz branco.....	72
Figura 11 - Avaliação da eficiência de extração (% recuperação e RSD%) dos diferentes testes (T4, T5, T6 e T7).....	73
Figura 12 - Avaliação da eficiência de extração (% recuperação e RSD%) do teste T5 utilizando LTP em diferentes tempos.....	76
Figura 13 - Cromatograma no modo varredura obtido por GC-MS comparando os ensaios com congelamento em diferentes tempos.....	77
Figura 14 - Método otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em azeite de oliva por GC-MS/MS.....	78
Figura 15 - Cromatograma do branco reagente (a), branco da matriz em azeite de oliva (b) e braço fortificado na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (c) obtido no modo MRM por GC-MS/MS.....	79
Figura 16 - Cromatogramas do composto tetraconazol (a) obtido por GC-MS/MS em amostras reais de azeite de oliva (A1), com seu pico de identificação e confirmação (b).....	89

Figura 17 - Cromatogramas do composto tebuconazol (a) obtido por GC-MS/MS em amostras reais de azeite de oliva (A1, A12 e A15), com seu pico de identificação e confirmação (b).....	90
Figura 18 - Cromatogramas do composto trifloxistrobina (a) obtido por GC-MS/MS em amostras reais de azeite de oliva (A12 e A15), com seu pico de identificação e confirmação (b).....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limite dos parâmetros de qualidade para cada categoria de azeite de oliva.....	21
Tabela 2 – Classificação dos agrotóxicos por espécie-alvo.....	26
Tabela 3 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	26
Tabela 4 – LMRs dos Agrotóxicos permitidos para a matriz azeitona, de acordo com a ANVISA.....	27
Tabela 5 - Limites Máximos de Resíduos (LMR), mg kg ⁻¹ , estabelecidos para os agrotóxicos avaliados neste estudo para a cultura da azeitona pela ANVISA, União Européia (EU) e <i>Codex alimentarius</i>	28
Tabela 6 - Aplicações empregando diferentes técnicas de preparo de amostra e cromatográficas para determinação de agrotóxicos em óleos comestíveis.....	42
Tabela 7 – Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos.....	47
Tabela 8 – Agrotóxicos analisados, pKa, fórmula molecular, classe química, ação agrônômica, grupo químico e massa molecular.....	52
Tabela 9 – Diferentes versões do método QuEChERS avaliadas neste trabalho.....	61
Tabela 10 - Parâmetros de validação utilizados para o método analítico proposto neste estudo.....	63
Tabela 11 – Compostos determinados neste trabalho com seus respectivos tempos de retenção, íon precursor e íons produtos utilizados na quantificação e identificação.....	65
Tabela 12 – Comparação dos testes gravimétricos para os testes realizados.....	70
Tabela 13 - Comparação do teste gravimétrico para o teste T5 com LTP em diferentes tempos (1, 2 e 3 horas).....	72
Tabela 14 - Resultados obtidos na etapa de validação do método proposto para os parâmetros de validação LOQ, LOD, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz.....	82

Tabela 15 - Resultados em $\mu\text{g kg}^{-1}$ das 7 amostras de azeite de oliva (que apresentaram resíduos de agrotóxicos) analisadas utilizando o método validado por GC/MS-MS.....88

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18	Octadecilsilano sílica modificada com hidrocarboneto linear
COI	Conselho Oleícola Internacional
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva do inglês, <i>dispersive solid phase extraction</i>
ECD	Detector por captura de elétrons do inglês, <i>electron capture detector</i>
EMATER	Instituto de Assistência Técnica e Extensão Rural
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EU	União Europeia
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação do inglês, <i>food and agriculture organization of the united nations</i>
FID	Ionização em chama, do inglês <i>flame ionization detector</i>
GC	Cromatografia gasosa
GCB	Carvão grafitizado do inglês, <i>grafitized carbono black</i>
GC-MS/MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série do inglês, <i>gas chromatography - tandem mass spectrometry</i>
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel do inglês, <i>gel permeation chromatography</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LARP	Laboratório de Análises de Resíduo de Pesticidas
LC	Cromatografia Líquida
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOD	Limite de detecção do inglês, <i>Limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação do inglês, <i>Limit of Quantification</i>
LTDA	Limitada ou Sociedade Limitada
LTP	Precipitação a baixa temperatura do inglês, <i>low temperature precipitation</i>
m/z	Razão massa/carga

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Espectrometria de massas do inglês, <i>mass spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de massas em série do inglês, <i>tandem mass spectrometry</i>
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida do inglês, <i>matrix solid phase dispersion</i>
NPD	Detector de nitrogênio-fosforo do inglês, <i>Nitrogen-phosphorus detectors</i>
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	Padrão de Controle
PI	Padrão Interno
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	Amina primária secundária, do inglês <i>primary secondary amine</i>
PVPP	Polivilpolipirrolidona
QqQ	Triplo Quadrupolo
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico robusto e seguro do inglês, <i>quick, easy, cheap, effective, rugged, safe</i>
R ²	Coefficiente de determinação da reta
REC	Valores de recuperação
RSD	Desvio padrão relativo do inglês, <i>relative standard deviation</i>
SANTE	Saúde e proteção do consumidor do francês, Santé et
SPE	Extração em fase sólida do inglês, <i>solid phase extraction</i>
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série do inglês, <i>ultra-high performance liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry</i>

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivos Gerais	14
1.1.2 Objetivos Específicos	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 OLIVEIRA (<i>Olea europaea</i>)	15
2.1.1 A cultura da Oliveira	15
2.1.2 Histórico da produção de azeitonas no Brasil	15
2.2 AZEITE DE OLIVA.....	16
2.2.1 Características da Qualidade	16
2.2.2 Obtenção do Azeite de Oliva	20
2.2.3 Classificação dos Azeites de Oliva	20
2.2.4 Produção de Azeite de Oliva no Rio Grande do Sul	22
2.2.5 Composição Química do Azeite de Oliva	24
2.3 AGROTÓXICOS.....	25
2.3.1 Classificação dos agrotóxicos	26
2.3.2 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos	27
2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS	31
2.4.1 Extração Líquido- Líquido (LLE)	32
2.4.2 Método MSPD	33
2.4.3 Método QuEChERS	35
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	49
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS	50
3.3 AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA	50
3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	51
3.4.1 Utilização do Padrão Interno (PI) e Padrão de Controle (PC)	57
3.5 CONDIÇÕES DO SISTEMA GC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA	57
3.6 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA	58
3.6.1 Avaliação gravimétrica para verificação da presença de coextrativos provenientes do azeite de oliva	58
3.6.2 Avaliação da presença de coextrativos empregando sistema GC-MS/MS no modo varredura (full scan)	62
3.6.3 Avaliação da eficiência de extração dos compostos selecionados para análise	

em azeite de oliva	62
3.6.4 Avaliação da influência da etapa de congelamento na remoção dos coextrativos do extrato da matriz azeite de oliva.....	62
3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA POR GC-MS/MS.....	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	65
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA GC-MS/MS EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA	65
4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA	69
4.2.1 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de extração.....	69
4.2.2 Avaliação da presença de coextrativos empregando sistema GC-MS/MS no modo varredura (<i>full scan</i>)	71
4.2.3 Avaliação da eficiência de extração dos compostos selecionados para análise em azeite de oliva	72
4.2.4 Avaliação da influência da etapa de congelamento na remoção dos coextrativos do extrato da matriz azeite de oliva.....	74
4.2.5 Método proposto para validação	78
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA.....	79
4.3.1 Seletividade e Linearidade	79
4.3.2 Efeito Matriz	85
4.3.3 Exatidão e Precisão	85
4.3.4 Limites de detecção e quantificação	86
5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA.....	88
6 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

O azeite de oliva é um produto rico em ácidos graxos essenciais, obtido a partir das azeitonas, que são frutos com alto teor de gordura. Nos últimos anos, tem-se percebido um aumento significativo no consumo de azeite de oliva no Brasil e no mundo. Este aumento tem sido impulsionado pela mudança no comportamento dos consumidores, que buscam a valorização do consumo de alimentos saudáveis e, estão cada vez mais exigentes e atentos às características dos produtos. Isso implica na expansão da produtividade que pode ser conseguida pelo incremento das áreas cultivadas ou pela melhora no rendimento das colheitas (BRASIL, 2015; NUNES, 2007).

No Brasil, o maior produtor de azeitonas é o estado do Rio Grande do Sul. Para um cultivo em larga escala, visando melhorar a qualidade do produto final e as taxas de produtividade, costuma-se realizar o manejo com o uso de agrotóxicos para o controle de pragas e ervas daninhas (BRASIL, 1992). No entanto, quando estes compostos são utilizados sem controle e fora do intervalo de segurança, pode ocorrer a contaminação dos frutos. Nesse sentido, é fundamental que as boas práticas agrícolas sejam seguidas (AGRICULTURA, 2018).

Para garantir a segurança do consumidor são estabelecidos níveis seguros para a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, estes são denominados de Limites Máximos de Resíduos (LMRs). No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o azeite de oliva não possui LMRs estabelecidos para agrotóxicos, entretanto, por ser um subproduto da azeitona, considera-se a legislação do fruto para fins de monitoramento (ANVISA, [s.d.]).

A complexidade da amostra de azeite de oliva, acompanhada das baixas concentrações dos resíduos de agrotóxicos presentes, é um grande desafio no monitoramento destas substâncias em alimentos. Assim, para a determinação desses compostos, se faz necessário realizar uma etapa adequada de preparo de amostra, para que se tenha a obtenção de resultados confiáveis (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007).

O método QuEChERS (acrônimo do inglês para *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*), vêm sendo muito empregado para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Isto, devido a facilidade de execução, e realização da

etapa de limpeza, entre outros. Além disso, esse método permite que os extratos obtidos sejam analisados por cromatografia líquida ou gasosa. Essas técnicas cromatográficas têm se destacando devido à eficiência no acoplamento com a espectrometria de massas em série, que possibilita a determinação simultânea de um grande número de compostos, com excelente detectabilidade (SANTANA-MAYOR et al., 2019; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar um método analítico para a determinação de diferentes classes de agrotóxicos em azeite de oliva empregando o método QuEChERS e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em série (GC-MS/MS).

Desenvolvido, validado e aplicado no preparo de amostras de azeite de oliva.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as condições cromatográficas do sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS) visando proporcionar a separação e determinação multirresíduo de agrotóxicos;
- Avaliar diferentes versões do método QuEChERS, visando encontrar as melhores condições de extração dos analitos selecionados;
- Validar o método QuEChERS com detecção por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS), para determinação multirresíduos de agrotóxicos;
- Aplicar o método validado na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de azeite de oliva.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OLIVEIRA (*Olea europaea*)

2.1.1 A cultura da Oliveira

A oliveira pertence à família das Oleáceas, gênero *Olea europaea*. É uma planta de clima temperado, que se desenvolve bem, em ambientes com verões longos, quentes e secos, e com baixos índices pluviométricos (SANTOS, 2002).

Devido a suas características, aspectos relacionados ao clima, como temperatura, pluviometria, umidade relativa do ar e ocorrência de geada, são fundamentais na escolha da região do plantio, pois influenciam o florescimento, polinização, fixação e maturação dos frutos, bem como, na qualidade da azeitona e do azeite (WREGE et al., 2009).

2.1.2 Histórico da produção de azeitonas no Brasil

O Brasil está entre os maiores importadores de azeitonas e azeite de oliva do mundo, com uma importação de 86.362 toneladas de azeite e 117.500 toneladas de azeitona de mesa, ficando atrás apenas para os Estados Unidos (IOC, 2020). Seus principais fornecedores são Portugal, Argentina, Espanha e Itália (INMETRO, 2015).

Oficialmente, a cultura da oliveira iniciou-se no Rio Grande do Sul em 1948, através da Secretaria Estadual da Agricultura, criando o serviço oleícola, com a finalidade de orientar as pesquisas da época. Essa iniciativa não apresentava base técnica adequada, como resultado formou-se olivais de baixa qualidade, dificultando o desenvolvimento da cultura. Após quase vinte anos começaram os plantios, onde a cidade de Uruguaiana foi pioneira. A partir disso, foram realizados testes em laboratórios e verificaram que a qualidade das azeitonas e azeites de oliva se igualava aos produzidos na Itália. Após, ocorreu à intensificação do plantio por todo território gaúcho, em cidades como Bagé, Cachoeira do Sul, Caçapava do Sul, Dom Pedrito, Encruzilhada do Sul, Rio Grande, Santana do Livramento e Vacaria (Coutinho et. al., 2009).

Em 2006 foi iniciada uma pesquisa pela Embrapa juntamente com um

conjunto de outras instituições nacionais e internacionais, a fim de avaliar a viabilidade do cultivo comercial da oliveira na região Sul do Brasil, com o objetivo de introduzir, avaliar e identificar as cultivares de oliveiras produtoras de azeitonas com qualidade, para a elaboração da conserva ou do azeite (WREGGE et al., 2009).

2.2 AZEITE DE OLIVA

O azeite é produzido a partir do fruto originário da oliveira, a azeitona ou oliva, possui coloração variando de verde aos tons acinzentados, dourados, castanho-claros, roxos ou pretos. Quanto mais escuro, mais tempo o fruto maturou no pé. Segundo INMETRO (2000), o azeite de oliva é um produto obtido através do processamento do fruto das oliveiras, para obter a denominação de azeite de oliva não pode ser misturado com nenhum outro tipo de óleo.

Depois de extraído, o azeite de oliva representa o sumo obtido de azeitonas, que devem estar em perfeitas condições de maturação. A qualidade obtida deste produto é influenciada por fatores como variedade da azeitona, condições climáticas, tipo de solo, estado de maturação e tempo de processamento das azeitonas após a colheita (EPAMIG, 2008).

As substâncias presentes em maior quantidade no azeite de oliva são os ácidos graxos, depois em menor quantidade vêm os hidrocarbonetos, fosfatídeos, esteróis, tocoferóis (vitamina E) e demais vitaminas lipossolúveis (A, D e K), polifenóis (responsáveis pelo sabor amargo ou picante), 19 pigmentos (responsáveis pela cor verde: clorofila e amarela: caroteno) e voláteis (responsáveis pelo odor do azeite) são formados por reações secundárias (EPAMIG, 2008).

O azeite de oliva possui características sensoriais, que fazem referência ao seu sabor, aroma e cor, e analíticas, relacionadas à sua acidez e demais dados físico-químicos (OLIVA, 2016).

2.2.1 Características da Qualidade

O azeite possui características sensoriais e analíticas, fazendo referência ao seu sabor, aroma, cor, acidez e demais dados físico-químicos (EPAMIG, 2008).

A regulamentação atual considera parâmetros de qualidade e características

sensoriais, que ajudam em possíveis adulterações utilizando outros óleos vegetais (BRASIL, 2012).

2.2.1.1 Sabor, Aroma e Cor

O aroma e sabor naturais dependem da qualidade do azeite, da variedade da oliveira e das condições climáticas. A maior concentração de componentes aromáticos do azeite de oliva é obtida ao longo do período no qual a fruta muda de verde vivo a levemente violáceo (EPAMIG 2008; EUROPEAN OLIVE OIL, 2009 apud ROSA, 2009).

A cor do azeite pode variar de verde, quando rico em clorofila, ou amarelo, quando rico em carotenos. O sabor frutado e gosto amargo podem estar presentes dependendo da variedade e qualidade das azeitonas, esse sabor do azeite é atribuído a compostos voláteis que se desenvolvem durante e depois da extração do óleo (KALUA et al., 2007 apud RODRIGUES, 2015).

2.2.1.2 Acidez Livre

A acidez livre mede a quantidade de ácidos graxos livres expressos em porcentagem de ácido oleico (EPAMIG, 2008), os quais são originados pela ação química ou enzimática (lipases), pela degradação dos triglicerídeos, liberando ácidos graxos e, conseqüentemente, induzindo ao aumento da acidez (TOUS et al., 1997; PEIXOTO et al., 1998; UCEDA et al., 2006).

O grau de acidez está relacionado principalmente com as condições de conservação do azeite, mas também, com a qualidade da matéria prima, o grau de pureza do óleo e o processamento (MORETTO; FETT, 1998). Fatores como, ataques de pragas, clima, manipulação, produção e armazenamento do azeite podem afetar a acidez, facilitando a ação das enzimas. Quanto maior o teor de ácidos graxos livres, pior o estado de conservação dos frutos, tratamento ou conservação do azeite (POULIAREKOU et al., 2011; ISSAOUI et al., 2009; MÉNDEZ; FALQUÉ, 2007; FIGUERES et al., 1997).

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2012), a acidez permitida em azeite de oliva próprio para consumo humano deve ser no máximo 2%.

2.2.1.3 Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos mede o estado de oxidação inicial e rancidez de um azeite de oliva e também, a deterioração que pode ter ocorrido nos antioxidantes naturais, como os tocoferóis e os polifenóis. Os seus valores são expressos em miliequivalentes (mEq) de oxigênio por quilograma de óleo (CARDOSO, 2006).

A oxidação lipídica envolve uma sequência de alterações químicas resultantes da interação de ácidos graxos insaturados com o oxigênio, gerando moléculas com odores e sabores indesejados, podendo afetar a qualidade nutricional, devido à degradação das vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais (ORDÓÑEZ et al., 2005; GRANADOS, 2000; MCCLEMENTS; DECKER, 2010).

O índice de peróxidos também é apresentado na legislação brasileira (BRASIL, 2012), sendo o limite máximo de 20 mEq.O₂ kg⁻¹ para ser considerado próprio para consumo humano.

2.2.1.4 Absorbância na região do ultravioleta

Os ácidos graxos absorvem luz em comprimentos de onda específicos da região ultravioleta, assim, este parâmetro pode ser utilizado para determinar a qualidade do azeite de oliva.

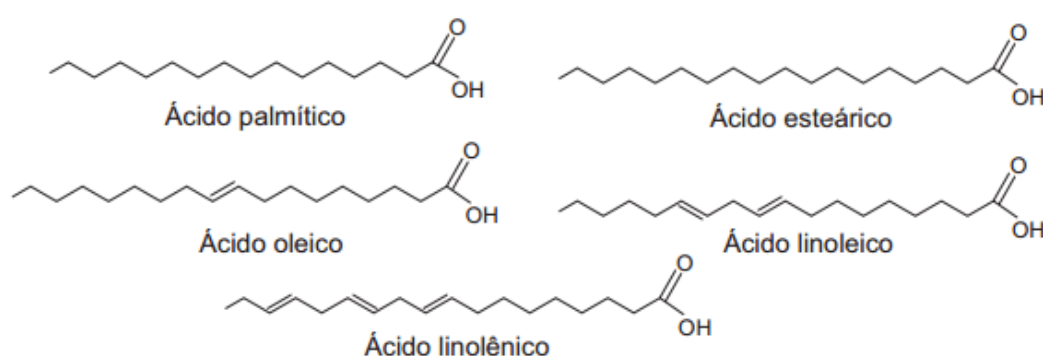
Quando começa a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, ocorre a formação de ligações duplas conjugadas, que originam os dienos e trienos conjugados, além, de compostos carbonílicos. No azeite de oliva, os dienos conjugados são observados num comprimento de onda de 232 nm, e os ostrienos conjugados e os compostos carbonílicos são identificados em um comprimento de onda de 270 nm (UCEDA; HERMOSO; AGUILERA, 2004). A presença de óleos refinados, podem indicar valores acima dos limites, pois o refino provoca mudanças nas configurações de ácidos graxos e a formação de dienos e trienos conjugados (ANGEROSA et al., 2006).

2.2.1.5 Lipídeos

Os exemplos mais conhecidos de lipídeos são os ácidos graxos e derivados, como ceras, esteróis e carotenoides.

Os ácidos graxos são substâncias orgânicas encontradas em temperatura ambiente nas fases sólidas, líquidas e semissólidas. Possuem cadeias carbônicas longas e abertas, e são monocarboxílicos, ou seja, apresentam apenas um grupo carboxila. Entre si, diferem pelo número de carbonos e pelas instaurações da cadeia (Figura 1). (NELSON et al., 2014).

Figura 1 - Principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras.



Fonte: Cantinho do azeite. Disponível em: <<https://cantinhodoazeite.com.br/sobre-azeite/as-gorduras-do-azeite-de-oliva/>>.

Nos azeites, os ácidos graxos também determinam a sua qualidade e podem ser encontrados livres ou combinados. O ácido graxo predominante no azeite de oliva é o ácido oleico, que é monoinsaturado, formado por 18 átomos de carbono (JORGE, 2010). O conteúdo de ácido oleico deve apresentar de 55 a 83% dos ácidos graxos presentes no azeite, para ser considerado extra virgem (BRASIL, 2012).

Além dos oxidantes presentes no azeite de oliva, a estabilidade oxidativa do azeite está correlacionada com a razão entre os ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados (AGUILERA et al., 2005). Deste modo, a composição dos ácidos graxos do azeite de oliva pode ser influenciada pelo índice de maturação, cultivar e diferentes locais de cultivo, além de outros fatores.

2.2.2 Obtenção do Azeite de Oliva

O azeite de oliva deve apresentar-se dentro de determinados padrões físico-químicos e sensoriais, que estão diretamente ligados a características do fruto, para ser considerado de boa qualidade. Diversos fatores estão relacionados, que vão desde a colheita até o armazenamento.

A produção do azeite de oliva começa com a seleção das azeitonas, que devem ser firmes e não conter danos físicos. Os frutos colhidos, destinados à extração do azeite, devem ser antes das azeitonas estarem completamente maduras, pois é nesta fase que ela apresenta melhores características sensoriais e físico-químicas, e oferece máxima quantidade de azeite (COSTA, 1978; ALBA, 2004).

Segundo ALBA, 2004; UCEDA et al., 2006, as etapas de elaboração do azeite, são as seguintes:

- a) operações prévias: recepção, caracterização, limpeza, lavagem e armazenamento do fruto;
- b) preparação da pasta: moagem e batimento (destruição da estrutura dos tecidos vegetais e liberação do azeite de oliva);
- c) separação das fases sólidas e líquidas: prensagem, centrifugação (sistema de duas fases e sistema de três fases);
- d) separação de fases líquidas: decantação natural e centrifugação (obtenção da fase aquosa e do azeite de oliva);
- e) armazenamento do azeite.

Para armazenagem, o ideal é que seja protegido de luz e do ar, sempre mantendo a temperatura constante entre 15 e 25 °C, evitando a oxidação do azeite. Também, para manter a qualidade do aroma e sabor, o azeite deve ser armazenado em aço inoxidável (VILLALTA, 1999; FERNÁNDEZ et al., 1991; APARÍCIO; HARWOOD, 2003).

2.2.3 Classificação dos Azeites de Oliva

Segundo o Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

(MAPA), o azeite de oliva é classificado em função de seus requisitos de identidade (matéria-prima e processo de obtenção) e qualidade (percentual de acidez livre, índice de peróxidos e da absorvância no UV), conforme a Tabela 1, e suas definições são:

a) Azeite de oliva virgem: produto extraído do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros meios físicos, sob controle de temperatura adequada, mantendo-se a natureza original do produto; o azeite assim obtido pode, ainda, ser submetido aos tratamentos de lavagem, decantação, centrifugação e filtração.

Os azeites de oliva do grupo azeite de oliva virgem, de acordo com os parâmetros de qualidade, pode ser classificado segundo três tipos, podendo, ainda, ser enquadrado como fora de tipo e desclassificado:

- i) Azeite de oliva extra virgem;
- ii) Azeite de oliva virgem;
- iii) Azeite de oliva lampante.

b) Azeite de oliva: produto constituído pela mistura de azeite de oliva refinado com azeite de oliva virgem ou com azeite de oliva extra virgem.

c) Azeite de oliva refinado: produto proveniente de azeite de oliva do grupo azeite de oliva virgem, mediante técnicas de refino que não provoquem alteração na estrutura glicéridica inicial.

Tabela 1 - Limite dos parâmetros de qualidade para cada categoria de azeite de oliva.

Categoria do Azeite	AC (% ácido oléico)	IP (mEq O ₂ kg ⁻¹)	Absorvância no UV			
			K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK	
Azeite de oliva virgem	Extra Virgem	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01
	Virgem	≤ 2,0	≤ 20	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01
	<u>Lampante</u>	> 2,0	*	*	*	*
Azeite de oliva	≤ 1,0	≤ 15				
Azeite de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	*	≤ 1,1	≤ 0,16	

Fonte: adaptado do Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva (BRASIL, 2012). * = não se aplica; AC = acidez livre; IP = índice de peróxidos.

O azeite lampante não pode ser destinado diretamente à alimentação

humana, porém, poderá ser refinado para enquadramento no grupo azeite de oliva refinado, ou, ainda, destinado a outros fins que não seja para alimentação humana. Sua acidez livre é maior que 2%.

O Conselho Oleícola Internacional – COI (2011) classifica o azeite de oliva em dois grandes grupos, os considerados aptos para consumo, e os impróprios para consumo, levando em consideração suas características físico-químicas e sensoriais. Suas definições são:

a) Azeites de oliva considerados aptos para consumo:

i) Azeite de oliva extravirgem: azeites virgem cuja acidez livre, expressa em ácido oleico, não seja superior a 0,8 gramas por 100 gramas.

ii) Azeite de oliva virgem: azeite virgem cuja acidez livre, expressa em ácido oleico, não seja superior a 2,0 gramas por 100 gramas.

iii) Azeite de oliva virgem comum: azeite virgem cuja acidez livre, expressa em ácido oleico, não seja superior a 3,3 gramas por 100 gramas.

b) Azeite de oliva virgem impróprio para consumo:

i) Azeite de oliva virgem lampante: azeite virgem acidez livre, expressa em ácido oleico, não seja superior a 3,3 gramas por 100 gramas.

2.2.4 Produção de Azeite de Oliva no Rio Grande do Sul

A Região Sul está entre as duas maiores regiões produtoras de azeite de oliva no Brasil, ao lado da Serra da Mantiqueira. Conforme a EMATER, o estado conta com uma área de 1.500 hectares com olivais plantados por cento e nove produtores. A implantação de olivais vem crescendo, assim como a instalação de fábricas de azeite. Algumas cidades se destacam na produção deste produto, como, Bagé, Cachoeira do Sul, Caçapava do Sul, Santana do Livramento, Canguçu, Dom Pedrito, Candiota, Jaguarão, Encruzilhada do Sul, Formigueiro e Pinheiro Machado, como mostrado na Figura 2.

Em 2006, a empresa Olivas do Sul Agroindústria Ltda inicia as atividades na cidade de Cachoeira do Sul. Com a implantação de um pomar de doze hectares de azeitona com mudas importadas da Espanha (OLIVAS DO SUL, 2016). A produção comercial de azeite de oliva da marca Olivas do Sul teve início no ano de 2011. Em teste de qualidade realizado pela Associação Brasileira de Defesa do Consumidor

(Proteste), o azeite Olivas do Sul obteve melhor avaliação, se destacando no quesito qualidade. No ano de 2013 a empresa Tecnolivas inaugura uma fábrica de azeite de oliva na cidade de Caçapava do Sul, poucos meses depois se tem o primeiro azeite de oliva produzido na região (TECNOPLANTA, 2012).

Figura 2 - Cidades do estado gaúcho com plantações de oliveiras.



Fonte: Adaptado de Coutinho (2014)

O município de Pinheiro Machado destaca-se pela plantação de quarenta e dois mil pés de oliveiras, localizados em uma propriedade rural da família Batalha. Em 2013 foi fabricado o primeiro azeite de oliva do município (SEAPI, 2013). Em

Santana do Livramento, a empresa Olivopampa atua em diversas etapas da cadeia olivícola, como, na produção de azeitonas, produção e comercialização de azeites, implantação de olivais e consultorias agrônômicas. Os primeiros azeites de oliva da dessa empresa foram produzidos em 2014 (OLIVOPAMPA, 2016).

No ano de 2005, a região de Bagé começou a fazer parte do Programa de Cooperação Brasil Itália (Brasil Próximo). Um acordo entre os países, com o objetivo de viabilizar projetos de cooperação com foco no desenvolvimento local. O projeto disponibiliza a produtores rurais as mudas de oliveiras, dando o suporte necessário para o plantio e cultivo (BRASIL PRÓXIMO, 2010). Em 2009, o município integrou o Projeto Olivais do Pampa, que integra o Programa Brasil Próximo, que disponibilizou aos produtores os subsídios necessários para o plantio e cultivo das oliveiras, mas em 2012 teve seu último plantio.

2.2.5 Composição Química do Azeite de Oliva

A composição química do azeite de oliva pode variar devido a diversas condições, como o clima, o cultivo, a qualidade do fruto, o sistema de extração e aos processos de refino. Também, os cuidados com o armazenamento, pois podem gerar alterações nos compostos majoritários e minoritários, devido a reações de hidrólise, de esterificação e de oxidação (CERT; MOREDA; PÉREZ-CAMINO, 2000).

O azeite de oliva é constituído cerca de 98% por triglicerídeos, que são os ésteres de ácidos graxos e glicerol (BOSKOU, 1998). A maior proporção de ácidos graxos presentes no azeite está na forma insaturada, cerca de 61,2 e 79,6%, com predominância dos monoinsaturados. Os ácidos graxos saturados se encontram entre 10,5 e 20,2% e os poli-insaturados estão em menor proporção, com apenas 5,8 e 13,6% do total (AGUILERA et al., 2005; ALLALOUT et al., 2009; HADDADA et al., 2007; MATOS et al., 2007). O ácido linoleico (C18:2) é o poli-insaturado mais abundante, pertencente à série ω -6, já o ácido linolênico (serie ω -3), está presente em pequena quantidade no azeite de oliva.

Os componentes em menor quantidade no azeite são denominados como fração insaponificável, e são mais de 200 compostos químicos, entre eles, os álcoois alifáticos e triterpênicos, esteróis, hidrocarbonetos, compostos aldeídicos, compostos cetônicos, tocoferóis, compostos fenólicos, pigmentos, dentre outros, os quais

perfazem cerca de 2% do total do azeite (BOSKOU, 1996; CRIADO et al., 2008; KANDYLIS et al., 2011).

Os compostos fenólicos se destacam pela estabilização das espécies reativas de oxigênio, auxiliando na vida útil do azeite (PARDO; CUESTA; ALVARRUIZ, 2007). E também, interferem no índice de amargor, influenciando no sabor (BELTRAN et al., 2000).

Os tocoferóis são antioxidantes lipofílicos e precursores da vitamina E (BELTRÁN et al., 2010). O α -tocoferol é a forma mais abundante dentre os tocoferóis presentes no azeite de oliva, perfazendo em torno de 95 % dos tocoferóis (BACCOURI et al., 2008).

Os pigmentos como as clorofilas e os carotenoides são fatores que influenciam na coloração do azeite de oliva, que é influenciada pela época da colheita do fruto e pelo processo de extração (ROCA; MINGUEZ-MOSQUERA, 2001; CRIADO et al., 2008 e MOYANO et al., 2008). A clorofila pode estar associada à atividade oxidativa do azeite, devido a função da ação pró-oxidante na presença de luz (FAKOURELIS; LEE; MINN, 1987).

2.3 AGROTÓXICOS

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, que são destinados ao uso em setores como, de produção, armazenamento, pastagens, beneficiamento de produtos agrícolas, entre outros, tendo como finalidade a preservação da fauna e flora dos seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 2002). Segundo o Decreto Federal Brasileiro nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entendem-se por *agrotóxicos*: “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”.

2.3.1 Classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com o seu modo de ação no organismo vivo, ingrediente ativo e podem ser divididos em classes químicas como, fungicidas, inseticidas, herbicidas, acaricidas e nematicidas, como mostrado na Tabela 2 (YADAV; DEVI, 2017, p. 143).

Tabela 2 – Classificação dos agrotóxicos por espécie-alvo.

Tipo de Agrotóxico	Espécies-alvo/função
Inseticida	Causa a morte de insetos e artrópodes
Fungicidas	Causa a morte de fungos
Bactericidas	Causa a morte e age contra bactérias
Acaricidas	Causa a morte de ácaros
Repelentes	Repelem pragas através do seu sabor e cheiro
Dessecantes	Age nas plantas secando seus tecidos
Nematicidas	Causa a morte de nematódeos que atuam como parasitas em plantas
Termiticidas	Causa a morte de cupins

Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de YADAV; DEVI, 2017, p. 143

Também, podem ser classificados quanto a sua composição química como, carbamatos, piretróides, organoclorados, organofosforados, entre outros (ANVISA, 2018). Outro modo de classificação dos agrotóxicos é quanto a sua toxicidade, que considere a dose letal oral, cutânea e inalatória. A RDC nº 294, de 29 de julho de 2019 (ANVISA, 2019), apresenta no art. 39 a classificação por categorias como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Categoria	Toxicidade	Cor
I	Produto Extremamente tóxico	Vermelha
II	Produto Altamente Tóxico	Vermelha
III	Produto Moderadamente Tóxico	Amarela
IV	Produto Pouco Tóxico	Azul
V	Produto Improvável de Causar Dano Agudo	Azul
Não Classificado	Produto Não Classificado	Verde

Fonte: (ANVISA 2022)

Com o objetivo de assegurar a qualidade dos azeites de oliva, e também devido ao uso desordenado e aos possíveis efeitos tóxicos dos agrotóxicos aos consumidores e ao meio ambiente, autoridades estabelecem LMRs para o controle e monitoramento de resíduos e contaminantes.

De acordo com ANVISA, apenas 9 agrotóxicos têm limites estabelecidos para a matriz de azeitona, como fungicidas (cresoxim-metílico, difeconazol, fluxapirroxade, piraclostrobina, fluazinam e tiofanato-metílico), acaricida (fenpiroximato e fluazinam) e inseticida (espinetoram e flupiradifurone). Os analitos com seus respectivos valores de LMRs estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – LMRs dos Agrotóxicos permitidos para a matriz azeitona, de acordo com a ANVISA.

Ingrediente Ativo	LMR (mg/kg)
Flupiradifurone	2,000
Fluxapirroxade	1,500
Espinetoram	0,300
Piraclostrobina	1,500
Tiofanato-metílico	0,500
Fenpiroximato	0,010
Cresoxim-metílico	1,500
Difeconazol	0,500
Fluazinam	2,000

Fonte: (ANVISA, 2022).

2.3.2 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável por monitorar e estabelecer a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico no Brasil. Estes limites (LMRs) são expressos em mg kg^{-1} . Em outros países os órgãos responsáveis pelo monitoramento são *European Commission*, *Codex Alimentarius*, entre outros (ANVISA, [s.d.]; EUROPEAN COMMISSION, [s.d.]; FAO, [s.d.]).

No Brasil existem dois programas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, o Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA), que tem como finalidade avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal e é realizado pela ANVISA (ANVISA, 2019) e o Plano Nacional de Controle

de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC/Vegetal), que tem como objetivo monitorar a ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos em produtos de origem vegetal produzidos no país, destinados ao mercado interno e também à exportação. Este programa é realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MAPA, 2020).

É de extrema importância o controle dos LMRs e o cuidado com o tempo de carência na aplicação dos agrotóxicos, para garantir a qualidade dos alimentos entregues a mesa do consumidos (FERRONATO, 2018).

Por isso, o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de determinar agrotóxicos em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou $\mu\text{g kg}^{-1}$) é fundamental para assegurar a qualidade dos produtos comercializados. A Tabela 5 apresenta os valores de LMR dos agrotóxicos avaliados neste estudo, estabelecidos pela ANVISA, União Europeia (UE) e *Codex Alimentarius* para a cultura da azeitona.

Tabela 5 - Limites Máximos de Resíduos (LMR), mg kg^{-1} , estabelecidos para os agrotóxicos avaliados neste estudo para a cultura da azeitona pela ANVISA, União Europeia (EU) e *Codex alimentarius*.

Nº	Analitos	LMR (mg/kg)		
		EU	ANVISA	CODEX ALIMENTARIUS (azeitona/azeite de oliva)
1	Acrinatrina	0,02 *	-	-
2	Alacloro	0,02*	-	-
3	Aldrin	0,01*	-	-
4	Atrazina	0,05*	-	-
5	Benalaxil	0,05*	-	-
6	Bifentrina	0,02*	-	-
7	Boscalida	0,01*	-	-
8	Bromopropilato	0,01*	-	-
9	Bupurimato	0,01*	-	-
10	Buprofezina	0,01*	-	-
11	Cadusafós	0,01*	-	-
12	Carbofenotiona	-	-	-
13	Clordano	0,02*	-	-
14	Clorofenapir	0,02*	-	-
15	Clorofenvinfós	0,02*	-	-
16	Clorotalonil	0,01*	-	-

№	Analitos	LMR (mg/kg)		
		EU	ANVISA	CODEX ALIMENTARIUS (azeitona/azeite de oliva)
17	Cloroprofam	0,01*	-	-
18	Cloropirifós	0,01*	-	-
19	Cloropirifós-metil	0,01*	-	-
20	Ciflutrina	0,02*	-	-
21	Cialotrina (lambda)	0,50	-	1,00
22	Cipermetrina	0,05*	-	0,05/0,50
23	Ciproconazol	0,05*	-	-
24	Ciprodinil	0,02*	-	-
25	Cresoxim-metil	0,2	-1,5	0,20/0,70
26	DDT	0,05*	-	-
27	Deltametrina	0,6	-	-
28	Diazinon	0,02*	-	-
29	Diclofluanida	-	-	-
30	Dicloran	0,01*	-	-
31	Diclorvós	0,01*	-	-
32	Dicofol	0,05*	-	-
33	Dieldrin	0,01*	-	-
34	Difeconazol	2,00	0,5	2,00
35	Dissulfutom	0,02*	-	-
36	Endosulfan	0,05*	-	-
37	Endrin	0,01*	-	-
38	Epoxiconazol	0,05*	-	-
39	Etiona	0,01*	-	-
40	Etoprofós	0,02*	-	-
41	Etrinfós	-	-	-
42	Espirodiclofeno	0,02*	-	-
43	Espiromesifeno	0,02*	-	-
44	Fenamidona	0,01*	-	-
45	Fenarimol	0,02*	-	-
46	Fenazaquina	0,01*	-	-
47	Fenitrotiona	0,02*	-	-
48	Fenpropatrina	0,01*	-	-
49	Fempropimorfe	0,01*	-	-
50	Fentiona	0,01*	-	1,00/1,00
51	Fenvrelato	0,05*	-	-
52	Fenotrina	0,05*	-	-
53	Fentoato	-	-	-
54	Forato	0,02*	-	-
55	Fosfomete	3,00	-	-
56	Fipronil	0,005*	-	-
57	Fluazifope-p-butílico	0,01*	-	0,01
58	Fluquinconazol	0,01*	-	-
59	Flusilazol	0,01*	-	-

№	Analitos	LMR (mg/kg)		
		EU	ANVISA	CODEX ALIMENTARIUS (azeitona/azeite de oliva)
60	Flutriafol	0,02*	-	-
61	Fostiazato	0,02*	-	-
62	Heptacloro	0,01*	-	-
63	Hexaclorobenzeno	0,01*	-	-
64	Hexaconazol	0,02*	-	-
65	Hexazinona	-	-	-
66	HCH-alfa	0,01*	-	-
67	HCH-beta	0,01*	-	-
68	HCH-gama	-	-	-
69	Indoxicarbe	0,02*	-	-
70	Malationa	0,02*	-	-
71	Metconazol	0,05*	-	-
72	Metidationa	0,02*	-	-
73	Metiocarbe	0,20	-	-
74	Metoxicloro	0,01*	-	-
75	Metolacloro	0,05*	-	-
76	Mevinfós -E, -Z	0,01	-	-
77	Mirex	-	-	-
78	Miclobutanil	0,01*	-	-
79	Nuarimol	-	-	-
80	Oxadixil	0,02*	-	-
81	Parationa	0,05*	-	-
82	Parationa-metíllica	0,02*	-	-
83	Penconazol	0,01*	-	-
84	Pendimetalina	0,05*	-	-
85	Permetrina	0,05*	-	-
86	Picoxistrobina	0,01*	-	-
87	Pirimicarbe	0,02*	-	-
88	Pirimifós-metil	0,01*	-	-
89	Procimidona	0,02*	-	-
90	Profenofós	0,02*	-	-
91	Prometrina	-	-	-
92	Propiconazol	0,01*	-	-
93	Protiofós	-	-	-
94	Pirazofós	0,02*	--	-
95	Piridabem	0,02*	-	-
96	Pirimetanil	0,02*	-	-
97	Quinalfós	0,02*	-	-
98	Tebuconazol	0,50	-	0,05
99	Tebufenpirade	0,01*	-	-
100	Teflutrina	0,05	-	-
101	Terbufós	0,01*	-	-
102	Tetraconazol	0,02*	-	-

№	Analitos	LMR (mg/kg)		
		EU	ANVISA	CODEX ALIMENTARIUS (azeitona/azeite de oliva)
103	Tetradifona	0,01*	-	-
104	Tolilfluanida	0,02*	-	-
105	Triadimefona	0,01*	-	-
106	Triazofós	0,01*	-	-
107	Trifloxistrobina	0,30	-	0,30/ 0,90
108	Trifluralina	0,01*	-	-
109	Vinclozolina	0,02*	-	-

Fonte: (ANVISA, 2022; EU, 2022, *Codex Alimentarius*, 2022).

*limite mínimo de determinação analítica.

2.4 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

A determinação de contaminantes orgânicos tornou-se um grande desafio, devido à diversidade de compostos químicos presentes nos alimentos.

As técnicas cromatográficas vêm apresentando grandes avanços na determinação de diversos analitos e com baixos limites de detecção. Apesar destas características, em determinações de resíduos de agrotóxicos é fundamental uma etapa previa de preparo de amostra, pois estes apresentam baixas concentrações (mg kg^{-1}) de analitos em matrizes com alta complexidade (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007; PRESTES *et al.*, 2009). O preparo de amostra tem como objetivo realizar a extração, homogeneizando a amostra, enriquecendo os analitos de interesse e removendo os interferentes, quando possível. Portanto, nessa etapa é fundamental ter cautela ao manusear a amostra, pois é uma etapa crucial dentro do processo analítico (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015, p. 9; PRESTES *et al.*, 2009).

Quando se trata de amostras complexas como alimentos, é necessário uma etapa de limpeza (*clean-up*) do extrato. Essa etapa é fundamental para a remoção de um maior número de interferentes possíveis e diminuição do efeito matriz, proporcionando melhor seletividade durante a análise (CALDAS *a, et al.*, 2013).

Na literatura há diversos métodos de preparo de amostra empregados para a extração de resíduos de agrotóxicos no azeite de oliva (Tabela 6). Dentre as técnicas mais aplicadas estão: extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*), dispersão de matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase*

Dispersion), e o método QuEChERS. E como principais técnicas utilizadas para a determinação de resíduos de agrotóxicos estão a cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*).

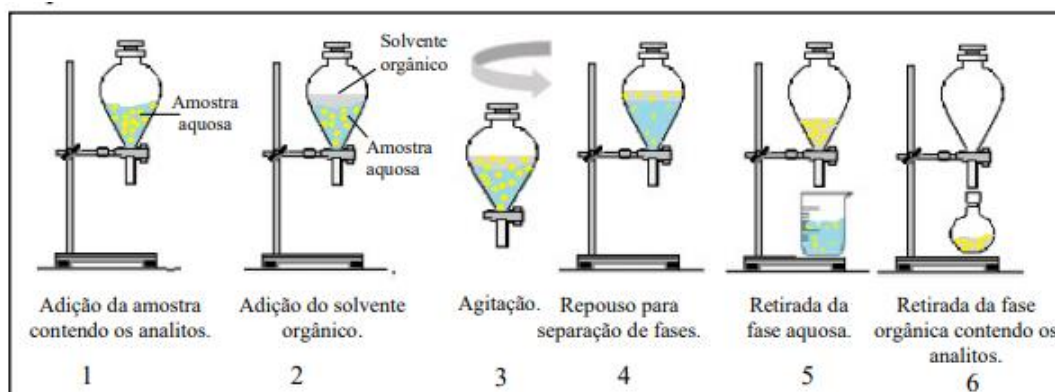
2.4.1 Extração Líquido- Líquido (LLE)

A técnica de extração líquido-líquido (LLE do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) é o tratamento básico de amostras líquidas, semi-sólidas ou sólidas, onde essas são homogeneizadas com um solvente adequado para promoção de separação entre as fases (aquosa e orgânica), antes de etapas de limpeza como SPE e d-SPE (DALLEGRAVE, et al., 2016).

A LLE pode ser aplicada como fracionamento preliminar da amostra antes da dispersão da matriz em fase sólida (MSPD). Deste modo, oferece vantagens como simplicidade e eficácia no isolamento de agrotóxicos de diferentes polaridades dependendo do solvente em uso, e como desvantagem apresenta uso de grandes volumes de solvente tóxicos e exige longo tempo de análise (LICHTMANNEGGER, et al., 2015).

A extração líquido-líquido é considerada uma técnica clássica de preparo de amostras e tem sido amplamente empregada em diversos tipos de análises, como, por exemplo, para determinação de pesticidas em alimentos e água (SCHIO, 2021). Este método é composto por 6 etapas, conforme a Figura 3, onde se utiliza funil de separação, nele é colocado a amostra líquida, contendo os analitos, em seguida coloca-se o solvente orgânico e agita-se. Deixa-se em repouso, para que haja a separação das fases, em seguida retira-se a fase aquosa, permanecendo apenas a fase orgânica, onde ficam concentrados os analitos.

Figura 3 – Representação esquemática da extração de analitos de amostras aquosas utilizando LLE.



Fonte: Adaptado de SCHIO, 2021.

Anagnostopoulos e colaboradores (2013) desenvolveram um estudo para determinar 32 agrotóxicos de diferentes classes em amostras de azeitona e azeite de oliva, utilizando como preparo de amostra LLE e precipitação a baixa temperatura (LTP), e GC-MS/MS para identificação e quantificação dos analitos. Foram analisadas 72 amostras de azeitona e 89 de azeite de oliva, o resíduo de 15 agrotóxico como o tetraconazol, clorpirifós-etil, benalaxil, diazinon, entre outros foi positivo em 19 amostras.

Rastrelli, L. e colaboradores (2002) determinaram 18 resíduos de agrotóxicos organofosforados amostras de azeite virgem, utilizando como preparo de amostra a técnica de LLE e quantificação dos analitos por GC-NPD. Foram analisadas 65 amostras, sendo que, os analitos mais encontrados nas amostras foram o dimetoato (29 amostras), sendo duas amostras com concentração acima do LMR permitido pelo *Codex Alimentarius* ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$) e fentião (18 amostras), outros agrotóxicos como, clorpirifos-metil, diazinonm, paration-metil e paration também foram positivos nas amostras em algumas amostras.

2.4.2 Método MSPD

Esse método foi introduzido para a extração de contaminantes em amostras viscosas, sólidas e semissólidas, como uma alternativa à Extração em Fase Sólida (SPE), já que esta necessitava que a amostra fosse homogênea e estivesse no

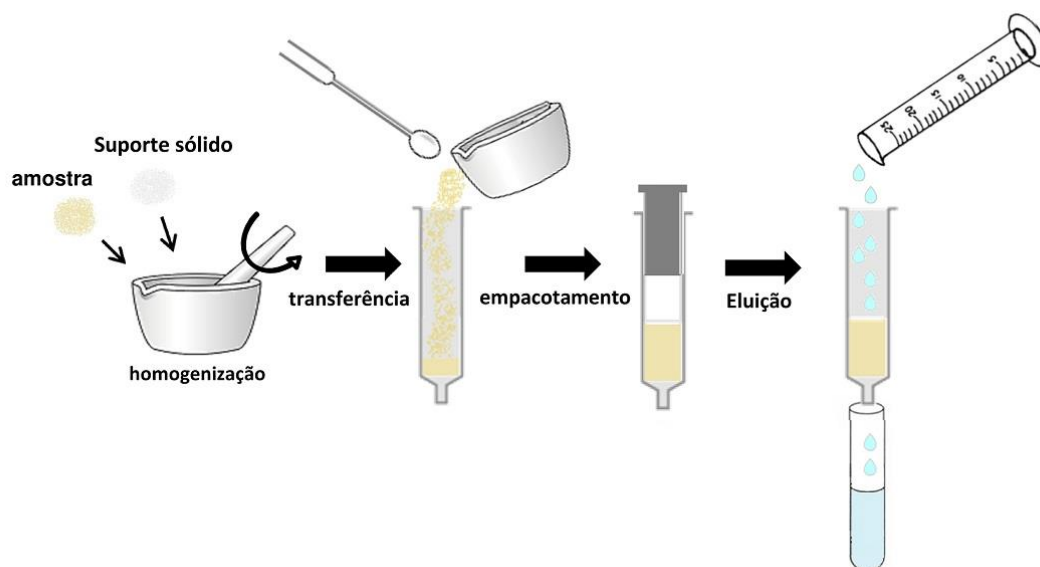
estado líquido antes da eluição (CALDAS a, et al., 2013).

A MSPD tem como principal vantagem a possibilidade de realizar a etapa de extração e limpeza simultaneamente, e em temperatura ambiente, sem necessitar de instrumentos para controle desses parâmetros, tornando o procedimento fácil e rápido (BARKER, 2007).

Essa técnica tem sido bastante utilizada, até mesmo pela diversidade de sorventes que podem ser empregados, dentre eles, estão o C18, terra diatomácea, Florisil®, nanotubos de carbono, amina primária secundária (PSA), carbono grafitizado (GCB), polivinilpirrolidona (PVPP), sílica, alumina, quitina, quitosana (CAI et al., 2017, CAO et al., 2015, SOARES et al., 2017).

A MSPD tem uma instrumentação muito simples, necessitando apenas de garrafa, pistilo, tubos para empacotamento da mistura, seringas ou sistema de vácuo, como na Figura 4 (CALDAS a, et al., 2013).

Figura 4 – Esquema da MSPD.

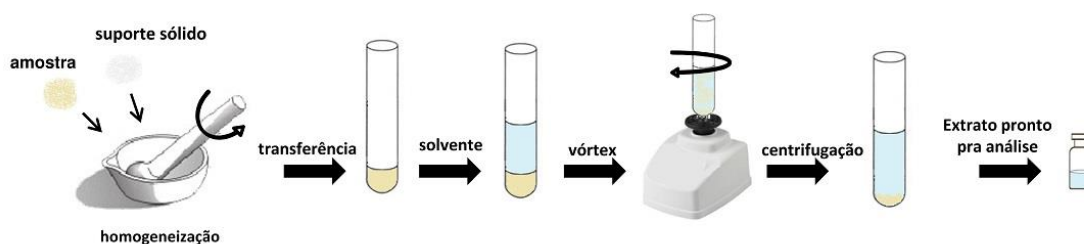


Fonte: Adaptado de CALDAS a, et al. (2013)

O método tem como propósito a dispersão da amostra, juntamente com um suporte sólido que atua como abrasivo, auxiliando na ruptura da estrutura física da amostra. A amostra irá sofrer uma dispersão na superfície do material, ocasionando

o isolamento dos analitos em diversas matrizes, devido à formação de uma nova fase, que é empacotada em uma coluna vazia, onde é colocado um filtro de polietileno antes e após o empacotamento, por fim, é realizada a eluição. Já a modificação da técnica, foi proposta a introdução de vórtex, para substituir a etapa convencional de eluição, como na Figura 5. Quando seguida por centrifugação, oferece a vantagem de uma etapa de extração mais rápida. (CALDAS a, et al., 2013). Porém, a maior dificuldade deste método é a automatização e a otimização das variáveis como quantidade de amostra e de dispersante, tipo e volume de solvente (CHUNG e CHEN, 2015).

Figura 5 – Esquema da MSPD assistida por vórtex.



Fonte: Adaptado de CALDAS a, et al. (2013)

Ferrer e colaboradores (2005) desenvolveram um método baseado em MSPD para determinar 9 agrotóxicos (dimetoato, simazina, atrazina, diuron, terbutilazina, paration-metil, pirimifos-metil, endosulfan I e II, endosulfa sulfato, cipermetrina e deltametrina) em amostras de azeitona e azeite de oliva, utilizando GC-MS/MS e LC-MS/MS para identificação e quantificação dos analitos. Na análise de uma amostra de azeite, 2 analitos apresentaram positivos, o terbutilazina e o sulfato de endosulfan por GC-MS/MS e LC-MS/MS.

2.4.3 Método QuEChERS

Em 2003 Anastassiades e colaboradores desenvolveram o método QuEChERS (do inglês, **quick, easy, cheap, effective, rugged, safe**), com o objetivo de superar as limitações dos métodos multirresíduos existentes. Esse método tem como características ser rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, e trata-se de uma nova técnica de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos

(BANDEIRA *et al.*, 2014; PRESTES *et al.*, 2011).

O método QuEChERS é dividido nas seguintes etapas: extração, partição e limpeza. Na etapa de extração a amostra é agitada com acetonitrila (na proporção 1:1), de forma manual ou com auxílio de um vórtex. O uso de acetonitrila promove uma extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos e é o solvente mais adequado para LC-MS/MS e GC-MS/MS. Na etapa de partição é onde se adiciona os sais de partição (sulfato de magnésio e cloreto de sódio) que irá promover o efeito *salting out*, diminuindo a solubilidade dos compostos polares na fase aquosa e a remoção da água na fase orgânica. E na etapa de limpeza do extrato (*clean-up*), é realizada por d-SPE (do inglês, *dispersive solid phase extraction*), utiliza-se sulfato de magnésio que irá promover a remoção a água presente no extrato e PSA (amina primária-secundária, com efeito quelante), que irá reter os ácidos graxos e compostos polares, presentes na matriz. Essa etapa é essencial para garantir a robustez e confiabilidade dos resultados obtidos no sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2009; BRUZZONITI *et al.*, 2014).

2.4.3.1 Modificações do método QuEChERS

O método QuEChERS original (Figura 6a) é aplicado a uma ampla gama de compostos e diferentes matrizes, porém, em estudos, percebeu-se que para alguns compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz, isso por quê estão em sua forma protonada e solubilizados na fase aquosa. Desta forma, foram necessárias algumas modificações no método original para melhorar a recuperação desses compostos (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES *et al.*, 2011).

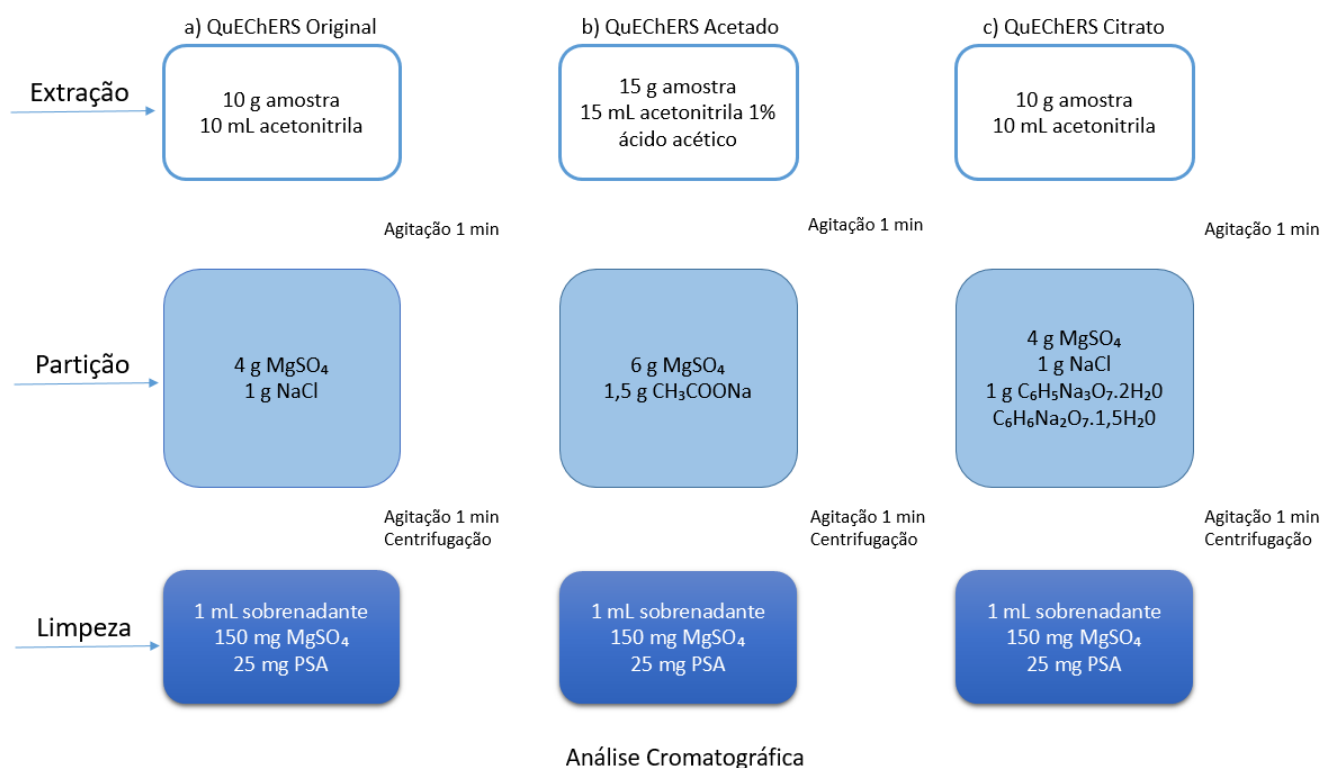
A adição de uma etapa de tamponamento foi a primeira modificação proposta por Lehotay e colaboradores (2005), e desenvolveram o método QuEChERS acetato (Figura 6b), que utiliza acetonitrila acidificada com 1% de ácido acético e acetato de sódio como sal de partição, formando um tampão em pH 4,8. Em 2007 esse método foi considerado como método oficial Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES *et al.*, 2011).

Em 2007, Anastassiades e colaboradores desenvolveram o método citrato

(Figura 6c), que utiliza uma mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado, que promovem o efeito tamponante em pH 5,0-5,5 (PRESTES et al., 2009; PRESTES *et al.*, 2011).

Devido a sua grande versatilidade, esse método permite que sejam realizadas diversas alterações, como de solventes, sais de partição, formas de agitação, etc., que irão proporcionar os resultados mais adequados. Dentre estas adequações, se destaca os sorventes de limpeza na etapa d-SPE, que podem ser utilizados de acordo com a composição da matriz, como por exemplo, o uso de C18 para a remoção de lipídeos e o carbono grafiteado (GCB) para a remoção de pigmentos, como clorofila. O método QuEChERS e suas modificações vem sendo aplicadas para a determinação de vários compostos em uma grande variedade de matrizes em alimentos e ambientais (CABRERA *et al.*, 2012; PRESTES *et al.*, 2011).

Figura 6 - Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS a) original; b) acetato; e c) citrato.



Fonte: Adaptada de PRESTES et al., 2009 e PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011.

Zeying He e Yuehua Wang e colaboradores (2017) desenvolveram um método

para determinação de resíduos de 255 agrotóxicos de diferentes classes em óleos vegetais (azeite de oliva, óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de linhaça, óleo de gergelim, óleo de colza, óleo de semente de perilla e uma mistura de óleos). Neste trabalho o método QuEChERS foi empregado como método de extração associado a GC-MS/MS para a separação e detecção dos compostos, respectivamente. Foram detectados 14 pesticidas em 16 amostras. Os óleos de amendoim foram os que obtiveram maior taxa de detecção, já nos óleos de soja e de milho não foi detectado nenhum pesticida. A variedade de pesticidas encontrados inclui oito inseticidas (bifentrina, cialotrina, ciflutrina, deltametrina, fenvalerato, clorpirifos, fenitrotona, fipronil), três fungicidas (bifenil, iprodiona e triadimefon), dois herbicidas (pendimetalina e oxifluorfen) e um acaricida (piridabeno).

David Moreno-González e colaboradores (2018) desenvolveram um método para determinação de 162 agrotóxicos de diferentes classes em azeite de oliva. Foi empregado o método QuEChERS como preparo de amostra juntamente com a técnica de separação GC-MS/MS. Não foram detectados resíduos de agrotóxicos, todos ficaram inferiores aos seus LMR estabelecidos para azeite de oliva.

Por meio destes estudos é possível observar a importância da determinação de resíduos de agrotóxicos em azeites de oliva, visto que é um produto consumido rotineiramente. Atualmente, devido à complexidade da matriz e a baixa concentração dos analitos, vem sendo necessário o desenvolvimento de metodologias rápidas, exatas e precisas, com uma boa sensibilidade para garantir a qualidade dos resultados (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015, p. 2).

2.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

As principais técnicas utilizadas para a determinação de resíduos de agrotóxicos são a cromatografia líquida (LC, do inglês liquid chromatography) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês gas chromatography).

A escolha do método analítico adequado para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos deve levar em consideração a complexidade da matriz, podendo ter teores variáveis de lipídeos, carboidratos, pigmentos, entre outros. Além disso, os agrotóxicos devem ser quantificados em baixas concentrações, portanto,

necessitam de uma alta detectabilidade. As técnicas cromatográficas (LC e GC) combinadas à detecção da espectrometria de massas (MS) e/ou espectrometria de massas em série (MS/MS) são as mais utilizadas, pois possuem características adequadas de sensibilidade e especificidade (MEIRA; 2015).

2.5.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é uma técnica com excelente resolução, tornando possível a determinação de diversos analitos em uma mesma matriz (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1995). Além disso, essa técnica possui alta sensibilidade, que permite a utilização de pequenas quantidades de amostra, fornecendo resultados quantitativos em concentração na faixa de picograma a miligrama (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Essa técnica está sendo muito utilizada atualmente para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos com alto teor de gordura, tendo em vista as propriedades de volatilidade e hidrofobicidade dos agrotóxicos. Além disso, esta técnica é aplicada para determinação de compostos orgânicos voláteis ou volatilizáveis que apresentam estabilidade térmica. A disseminação desta técnica veio por meio da facilidade de acoplamento GC-MS (RAINA, 2011; PRESTES et al., 2009). A GC-MS é uma das principais técnicas utilizadas para análise de resíduos de agrotóxicos, pois permite a realização das etapas de quantificação e identificação simultânea de diversos compostos. Além disso, devido sua alta sensibilidade, obtém baixos limites de detecção (LD) (PRESTES et al., 2009). O uso da técnica de GC acoplada à espectrometria de massas em série (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*) permite a análise de resíduos de agrotóxicos em nível de traços, devido ao aumento de seletividade e a redução do ruído, sem que perca a capacidade de identificação (PRESTES et al., 2009).

2.5.2 Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida é uma técnica com alta seletividade e sensibilidade combinada à espectrometria de massas (MS). É também muito utilizada para a determinação de resíduos de agrotóxicos, sendo mais adequada para analitos

polares, não voláteis e/ou termicamente instáveis. Baseia-se na separação dos componentes de uma mistura através de sua distribuição em uma fase estacionária e uma fase móvel (líquida), de acordo com a polaridade. Podendo ser do tipo normal (fase estacionária é mais polar que a fase móvel) ou do tipo reversa (fase estacionária é mais apolar que a fase móvel) (JADHAV, et al., 2019; (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2009).

A cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*) foi desenvolvida para análises mais rápidas, sem comprometer a resolução e a eficiência cromatográfica. Essa técnica vem se destacando devido às vantagens, como diminuição do tempo de análise, resolução e detectabilidade melhores, economia de fase móvel, pequeno volume de amostra, grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis, entre outras (MALDANER & JARDIM, 2012).

2.5.3 Espectrometria de Massas

O acoplamento dessas técnicas (GC e LC) com a espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é o ideal para a determinação de agrotóxicos, devido à alta sensibilidade e especificidade. Segundo Skoog e colaboradores (2012, p. 445), a espectrometria de massas é utilizada para a “identificação e determinação quantitativa de um ou mais elementos em uma amostra”. É considerada a técnica mais importante e versátil para a determinação de compostos orgânicos em baixas concentrações (LANÇAS, 2009).

Todo espectrômetro de massas consiste em três componentes básicos: fonte de íons, analisador de massas e um detector (RAINA, 2011). Basicamente, a fonte de íons gera íons de compostos orgânicos ou inorgânicos, no analisador de massas ocorre a separação destes íons, de acordo com a sua respectiva razão massa/carga (m/z), e em seguida, ocorre a detecção qualitativa, quantitativa e abundância (WONG, SO e YAO, 2016).

A espectrometria de massas em série (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*) é utilizada normalmente com um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ). Os analitos são ionizados seletivamente e seus íons são separados no primeiro espectrômetro de massas. No pseudo-quadrupolo, os íons

são selecionados e fragmentados em uma célula de colisão. No terceiro quadrupolo, os íons gerados são quantificados (VESSECCHI et al., 2011; ALMULLA, 2016).

O acoplamento com as técnicas cromatográficas tem como vantagens o aumento da seletividade, a alta eficiência analítica, diminuição do tempo de desenvolvimento de métodos e a elevada robustez (PRESTES et al., 2009).

Tabela 6 - Aplicações empregando diferentes técnicas de preparo de amostra e cromatográficas para determinação de agrotóxicos em óleos comestíveis.

Autores	Compostos	Matriz	Método de preparo de amostra	Clean-up	Determinação	Recuperação
Carmen Ferrer et al., 2005.	12 agrotóxicos (multirresíduos)	Azeitona e Azeite de Oliva	Extração com solvente (5 g de amostra extraídas com 15 mL de éter de petróleo saturado com ACN, evaporado até 2 mL) + MSPD (1g de amostra com 2 g de aminopropil)	2 g de Florisil, eluído com ACN	LC-MS/MS e GC-MS/MS	85-115%
C. Anagnostopoulos, G.E. Miliadis, 2013.	102 agrotóxicos (multirresíduos)	Azeitona e Azeite de Oliva	Extração com solvente (5 g de amostra extraída com 10 mL de ACN, centrifugada e armazenada por 12 h a -20 °C)	6 mL de extrato com 150 mg PSA, 12,5 mg GCB e 900 mg MgSO ₄	LC-MS/MS e GC-MS/MS	70 a 120%
Juan F. García-Reyes et al., 2007.	500 agrotóxicos (multirresíduos)	Azeitona e Azeite de Oliva	MSPD, GPC, QuEChERS	Alumina	LC-MS/MS e GC-MS/MS	-
Anastasia E. Hiskia, et al., 1998.	15 agrotóxicos (organofosforados)	Azeite de Oliva	Extração com solvente (10 g de amostra extraída com 50 mL de n-hexano saturado com ACN, evaporadas em banho a 30 °C até 1 mL, redissolvida com acetona.	-	GC-FPD e GC-NPD	73% a 114% (FPD) e 73% e 121% (NPD)

Autores	Compostos	Matriz	Método de preparo de amostra	Clean-up	Determinação	Recuperação
Elpiniki G. Amvrazi e Triantafyllos A. Albanis, 2006.	35 agrotóxicos (multirresíduos)	Azeite de Oliva	Extração com solvente (5 g de amostra dissolvida em 5 mL de n-hexano e extraída duas vezes com 10 mL de ACN)	SPE - ENVI-Carb (condicionado com 12 mL de ACN e eluído com 10 mL de ACN + 10 mL de ACN/Tolueno) e Diol (eluído com 6 mL de n-hexano + 6 mL de hexano/acetato de etila/metanol)	GC-NPD e GC-ECD	70-129%
Zeying He e Yuehua Wang et al., 2017.	255 agrotóxicos (multirresíduos)	Óleos vegetais	QuEChERS (1 g de amostra extraída com 5 mL de água + 10 mL de ACN e particionada com 4 g de NaCl)	d-SPE (6,5 mL do sobrenadante com 150 mg de PSA + 150 mg de C18)	GC-MS/MS	70-120%
Cristina Yague, et al., 2005.	23 agrotóxicos (organofosforados e organoclorados)	Azeite	15 g de amostra com 25 mL de n-hexano, disso 3 mL foi passado por uma minicoluna Extrelut-QE, que foi eluído com 20 mL de ACN saturada com hexano, diluída com acetona, e levada a secar a 40 °C. O resíduo foi redissolvido em 3 mL de acetona. Para o GC-ECD foi evaporada até 20 mL, adicionado isooctano e evaporada até 0,5 mL. Redissolvida em 8 mL de 20% diclorometano e hexano. Transferida para a coluna contendo alumina e eluída com 20 mL de 20% diclorometano e hexano. O eluato foi evaporado até 0,5 mL e o resíduo redissolvido com 3 mL de hexano.	-	GC-NPD / ECD e GC-MS	80-105%

Autores	Compostos	Matriz	Método de preparo de amostra	Clean-up	Determinação	Recuperação
Li Li, et al., 2007.	33 agrotóxicos (multirresíduos)	Óleo de Amendoim	5 g de amostra extraída com 10 mL de ACN, levada ao freezer por -20 °C durante a noite. Agitado por 5 minutos.	Com 1 mL do extrato foi realizado SPE com 0,050 g de PSA, 0,050 g de C18 e 0,150 g de MgSO ₄ . Foram tampados, agitados e centrifugados.	GC-MS	70-110%
Rui Su, et al., 2011.	9 agrotóxicos (organofosforados)	Óleo de Amendoim	5 g amostra extraída com 10 mL ACN, levada ao freezer a -20 °C pela noite. O sobrenadante foi transferido e foi adicionado 0,5 g Na ₂ SO ₄ , 100 mg MWCNTs e 1 g de alumina, agitado e centrifugado. O sobrenadante (7 mL) foi filtrado e evaporado a 35 °C. O resíduo foi redissolvido com 1 mL de hexano e o frasco lavado com 0,5 mL de hexano. O resíduo foi evaporado e redissolvido com 200 µL de hexano.	-	GC-MS	85,9-114,3%

Autores	Compostos	Matriz	Método de preparo de amostra	Clean-up	Determinação	Recuperação
David Moreno-González, et al., 2018.	162 agrotóxicos (multirresíduos)	Azeite de Oliva	QuEChERS (3 g de amostra extraída com 7 mL de água + 10 mL de MeCN (1% HOAc) e particionada com 4 g de MgSO ₄ + 1 g de NaCl)	d-SPE (5 mL de extrato com 1 g de EMR ativado com 5 mL de água, após 5 mL do sobrenadante com 1,6 g de MgSO ₄ + 0,4 g de NaCl)	GC-MS/MS	75-119%
Luca Rastrelli, et al., 2002.	18 agrotóxicos (organofosforados)	Azeite virgem	Extração com solvente (6 g de amostra extraída com 10 mL de n-hexano)	SPE (Em um cartucho de sílica gel e um cartucho de C18, 3 mL de extrato foram eluídos com 5 mL de ACN saturado com hexano. Ao eluato foi adicionado 4 mL de MeOH que foi evaporado a 45 °C. O resíduo foi redissolvido com 1 mL de acetona).	GC-NPD	82-110%
Antonia Garrido Frenich, et al., 2007.	100 agrotóxicos (multirresíduos)	Azeite de Oliva	Extração com solvente (4 g de amostra foi dissolvida em 20 mL de n-hexano e extraída com 20 mL de ACN saturada com n-hexano. O extrato foi evaporado a 50 °C até a secura. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de acetato etil-ciclohexano)	-	GC-MS/MS	70-110%

Autores	Compostos	Matriz	Método de preparo de amostra	Clean-up	Determinação	Recuperação
Tianshun Liu, et al., 2013.	5 agrotóxicos (organofosforados)	Óleos Comestíveis	8 mg de microesferas de Fe ₃ O ₄ foram coletadas em um frasco de vidro, a elas foi adicionado 10 mL de amostra, 5 µL de água e 200 µL de ACN. Com ajuda de um ímã para a separação das microesferas. O sobrenadante foi descartado. As microesferas foram lavadas com 50 µL de ACN. O extratante foi transferido e foi adicionado 1 mg de MgSO ₄ . Um alíquota (1 µL) da mistura foi injetada.	-	GC-MS	63,8-102,7%
P. Parrilla Vázquez, et al.,	213 agrotóxicos (multirresíduos)	Soja, Girassol e Azeite extra virgem	QuEChERS modificado (15 g de amostra extraída com 15 mL de ACN e particionada com 4 g de MgSO ₄ + 1 g de C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O + 0,5 g de C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O)	d-SPE (10 mL do sobrenadante foi congelado em gelo serco a -76 °C por 5 minutos. Após, 5 mL de extrato 2 g de EMR-Lipid ativado com 5 mL de água, após 5 mL do sobrenadante com 4 g de MgSO ₄ + 1 g de NaCl)	GC-MS/MS	70-120%

- não contém/ não informa

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

A validação de um método tem como objetivo comprovar que os resultados obtidos sejam confiáveis e reprodutíveis. É um processo que envolve conjuntos de experimentos planejados que caracterizam a metodologia desenvolvida (ZANELLA et al., 2015). Existe uma série de normas nacionais e internacionais que auxiliam e regulamentam a validação dos métodos analíticos.

No Brasil, a ANVISA, o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e o MAPA são alguns órgãos oficiais responsáveis por credenciar laboratórios de ensaios. A ANVISA, através da Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 estabelece critérios para a validação de métodos analíticos (BRASIL b, 2017).

Durante o processo de validação, alguns parâmetros de desempenho devem ser avaliados, como a seletividade; linearidade; faixa de trabalho; efeito matriz; precisão; exatidão; estabilidade; limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Estes parâmetros estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos.

Parâmetro	Definição	Aplicação	Critério
Seletividade	Capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz	Extração da matriz “branco”	Ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos
Linearidade	Capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito	Curva analítica ($y = ax + b$)	$r^2 \geq 0,99$
Faixa de Trabalho	Faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando linearidade do método	Curva analítica ($y = ax + b$)	$r^2 \geq 0,99$
Efeito Matriz	Supressão ou aumento de sinal cromatográfico dos compostos em estudo	Comparação das respostas das curvas de calibração no solvente e na matriz	$\pm 20\%$
Precisão	Avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra	Repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária	$RSD \leq 20\%$

Parâmetro	Definição	Aplicação	Critério
Exatidão	Concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico	Ensaio de fortificação	70-120%
Estabilidade	Capacidade da solução padrão, preparada na matriz, de conservar os analitos sem que se degradem	Comparação do número de compostos recuperados em uma solução padrão, preparada na matriz, injetada em diferentes dias	-
Limite de Detecção (LOQ)	A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada pelo instrumento	S/R = 3	-
Limite de Quantificação (LOQ)	A menor Concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis	S/R = 10	≤LMR

Fonte: INMETRO, 2020; ANVISA, 2017; BRITO, 2003; SANTE, 2019.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste estudo consistiu na otimização e validação de um método de preparo de amostra utilizando método QuEChERS para a extração de resíduos de agrotóxicos em azeite de oliva e posterior etapa de quantificação por GC-MS/MS. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (DQ-UFSM), laboratório que atua como sistema de gestão pela ISO 17025:2017 - Requisitos gerais a competência de laboratórios de ensaio e calibração.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados a seguir:

- ✓ Sistema de purificação de água, Milli-Q Direct UV3 (Millipore, Molsheim, França);
- ✓ Estufa de secagem TE-394/1-MP (Tecnal, Brasil);
- ✓ Centrífuga refrigerada NT 825 (Nova Técnica, Brasil);
- ✓ Agitador Vórtex VX-38 (IonLab, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão AUX220 (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica de precisão UX420H (Shimadzu, Japão);
- ✓ Balança analítica de precisão UXW220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ Sistema GC-MS/MS modelo Agilent Intuvo 9000 GC equipado com:
 - Amostrador automático modelo Agilent 7693 (Agilent Technologies, EUA);
 - Detector: analisador de massas tipo quadrupolo (QqQ);
 - Coluna analítica: coluna planar HP-5 MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent Technologies, EUA);
 - Pré-coluna: “*guard chip*” P/N G4587-60565 (Agilent Technologies, EUA);
 - Liner: Ultra-Inert liner (Agilent Technologies, EUA);
 - Gás Nitrogênio grau de pureza 6.5 (Air Liquide, Brasil);

- Gás Hidrogênio grau de pureza 5.0 (Air Liquide, Brasi);
- Gás Hélio grau de pureza 6.0 (Air Liquide, Brasil).

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS

Os reagentes, solventes e demais materiais utilizados no desenvolvimento deste estudo estão citados abaixo:

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha);
- ✓ Ácido acético glacial, grau HPLC (Scharlau, Espanha);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3;
- ✓ Acetona grau HPLC (Merck, Alemanha);
- ✓ Hexano, grau HPLC (Merck, Alemanha);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 15 e 50 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro em pó, pureza $\geq 99,5\%$ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Cloreto de sódio, pureza $\geq 90\%$ (Merck, Alemanha);
- ✓ Sorvente EMR Lipid (Bond Elut Polish Tube NaCl/MgSO₄) (Agilent, EUA);
- ✓ Acetato de sódio anidro em pó, pureza $\geq 99\%$ (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Citrato de sódio diidratado, pureza $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado, pureza $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ PSA sílica, tamanho de partícula de 50 μm (Supelco, Alemanha);
- ✓ Filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,22 μm (Allcrom, Brasil);
- ✓ Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 e 4 mL (Agilent, EUA);
- ✓ Demais vidrarias comuns de laboratório.

3.3 AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA

A amostra de azeite de oliva utilizada como “branco analítico” foi adquirida em um mercado local. Esta amostra foi produzida no Rio Grande do Sul, e após análise em GC-MS/MS foram encontrados resíduos dos agrotóxicos de diclofluanida e fenazaquina. O método desenvolvido e validado foi aplicado em 18 amostras de

azeite de oliva, adquiridas em supermercados da cidade de Santa Maria-RS. Todas as amostras foram produzidas no estado do Rio Grande do Sul, nas cidades de Caçapava, Formigueiro, Bagé, São Sepé, Dom Feliciano, Pinheiro Machado e Bento Gonçalves. As amostras foram mantidas em sua embalagem original, à temperatura ambiente e armazenadas em local escuro, até sua análise. O processo de homogeneização foi realizado, com agitação manual do frasco original, do procedimento de extração.

3.4 COMPOSTOS SELECIONADOS E PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Foram selecionados 109 agrotóxicos de diferentes classes para este estudo. Esta escolha foi baseada nos compostos de uso permitido para a cultura da azeitona no Brasil e que pudessem ser analisados pela técnica de GC-MS/MS Além disso, foram analisados compostos que são encontrados com maior frequência nas análises de rotina realizadas no LARP a fim de complementar o método. Porém, na etapa de validação, alguns agrotóxicos não obtiveram bons resultados de recuperação (acrinatrina, alacloro, fenazaquina, diclofluanida, DDT, dentametrina, cipermetrinam, ciflutrina, entre outros). Portanto, nesta etapa foram avaliados 81 compostos e, por fim, 79 agrotóxicos foram validados.

Os padrões sólidos dos agrotóxicos selecionados foram adquiridos das empresas Dr. Ehrenstofer (Alemanha), Sigma-Aldrich (EUA) e ChemService (EUA) e estão listados na Tabela 8, além de algumas características físico-químicas, massa molecular, classe agrônômica e grupo químico. Todos os padrões utilizados possuem pureza maior que 90%.

Tabela 8 – Agrotóxicos analisados, pKa, fórmula molecular, classe química, ação agrônômica, grupo químico e massa molecular.

Nº	Analitos	pKa	Fórmula Molecular	Classe Química	Ação Agrônômica	Massa Molecular (g mol ⁻¹)
1	Acrinatrina	-	C ₂₆ H ₂₁ F ₆ NO ₅	Piretróide	Inseticida e acaricida	541,44
2	Alacloro	16,6	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	Cloroacetanilida	Herbicida	269,77
3	Aldrin	-	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	Organoclorado	Inseticida	364,91
4	Atrazina	1,6	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	Triazina	Herbicida	215,68
5	Benalaxil	1,52	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	Acilalaninato	Fungicida	325,4
6	Bifentrina	-	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	Piretróide	Inseticida e acaricida	422,88
7	Boscalida	-	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	Anilida	Fungicida	343,21
8	Bromopropilato	-	C ₁₇ H ₁₆ Br ₂ O ₃	Benzilato	Acaricida	428,1
9	Bupurimato	4,4	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	Pirimidinol	Fungicida	316,42
10	Buprofezina	-	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	Tiadiazinona	Inseticida e acaricida	305,44
11	Cadusafós	-	C ₁₀ H ₂₃ O ₂ PS ₂	Organofosforado	Inseticida e nematicida	270,39
12	Carbofenotiona	-	C ₁₁ H ₁₆ ClO ₂ PS ₃	Organofosforado	Inseticida e acaricida	342,9
13	Clordano	-	C ₁₀ H ₆ Cl ₈	Organoclorado	Inseticida	409,78
14	Clorofenapir	-	C ₁₅ H ₁₁ BrClF ₃ N ₂ O	Pirazol (análogo de)	Inseticida e acaricida	407,62
15	Clorofenvinfós	-	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	Organofosforado	Inseticida	359,6
16	Clorotalonil	-	C ₈ Cl ₄ N ₂	Cloronitrila	Fungicida	265,91
17	Cloroprofam	14,5	C ₁₀ H ₁₂ ClNO ₂	Carbamato	Herbicida	213,66
18	Cloropirifós	-	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	Organofosforado	Inseticida e acaricida	350,58
19	Cloropirifós-metil	-	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	Organofosforado	Inseticida, acaricida e Formicida	322,53
20	Ciflutrina	-	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃	Piretróide	Inseticida	434,29
21	Cialotrina (lambda)	-	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃	Piretróide	Inseticida	449,85
22	Cipermetrina	-	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	Piretróide	Inseticida	416,3
23	Ciproconazol	-	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	Triazol	Fungicida	291,78

Nº	Analitos	pka	Fórmula Molecular	Classe Química	Ação Agronômica	Massa Molecular (g mol⁻¹)
24	Ciprodinil	4,4	C ₁₄ H ₁₅ N ₂	Anilino pirimidina	Fungicida	225,29
25	Cresoxim-metil	-	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	Estrobilurina	Fungicida, bactericida	313,35
26	DDT	-	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	Organoclorado	Inseticida	354,48
27	Deltametrina	-	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	Piretróide	Inseticida	505,2
28	Diazinon	2,6	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	Organofosforado	Inseticida, Acaricida, Repelente	304,35
29	Diclofluanida	-	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	Biocida	Fungicida	333,23
30	Dicloran	-	C ₆ H ₄ Cl ₂ N ₂ O ₂	Clorofenil	Fungicida	207,01
31	Diclorvós	-	C ₄ H ₇ C ₁₂ O ₄ P	Organofosfato	Inseticida, acaricida e Metabólito	220,98
32	Dicofol	-	C ₁₄ H ₉ Cl ₅ O	Organoclorado	Acaricida	370,49
33	Dieldrin	-	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	Hidrocarboneto clorado	Inseticida e metabólito	380,91
34	Difeconazol	1,01	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	Triazol	Fungicida	406,26
35	Dissulfutom	-	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₃	Organofosforado	Inseticida e acaricida	274,4
36	Endosulfan	-	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	Organoclorado	Inseticida e acaricida	406,93
37	Endrin	-	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	Organoclorado	Inseticida	380,91
38	Epoxiconazol	-	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	Triazol	Fungicida	329,76
39	Etiona	-	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	Organofosfato	Inseticida, Acaricida, Metabólito	384,48
40	Etoprofós	-	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂	Organofosforado	Inseticida e nematocida	242,3
41	Etrinfós	-	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ OPS	Organofosforado	Inseticida	292,29
42	Espirodiclofeno	-	C ₂₁ H ₂₄ Cl ₂ O ₄	Ácido tetrônico	Inseticida, acaricida	411,32
43	Espiromesifeno	-	C ₂₃ H ₃₀ O ₄	Cetoenol	Inseticida	370,48
44	Fenamidona	-	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS	Imidazol	Fungicida	311,4
45	Fenarimol	-	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	Pirimidinilcarbinol	Fungicida	331,2
46	Fenazaquina	2,44	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O	Quinalzolona	Inseticida, acaricida	306,4
47	Fenitrotona	-	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	Organofosforado	Inseticida	277,23
48	Fenpropatrina	-	C ₂₂ H ₂₃ NO ₃	Piretróide	Inseticida, acaricida	349,42
49	Fempropimorfe	6,98	C ₂₀ H ₃₃ NO	Morfolina	Fungicida	303,48
50	Fentiona	-	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	Organofosforado	Inseticida	278,33

Nº	Analitos	pka	Fórmula Molecular	Classe Química	Ação Agronômica	Massa Molecular (g mol⁻¹)
51	Fenvrelato	-	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	Piretróide	Inseticida, acaricida	419,9
52	Fenotrina	-	C ₂₃ H ₂₆ O ₃	Piretróide	Inseticida	350,45
53	Fentoato	-	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ PS ₂	Organofosfato	Inseticida, acaricida	320,39
54	Forato	-	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃	Organofosfato	Inseticida, acaricida, Nematicida	260,4
55	Fosfomete	-	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	Organofosfato	Inseticida, acaricida	317,33
56	Fipronil	-	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	Pirazol	Inseticida, formicida e cupinicida	437,15
57	Fluazifope-p-butílico	-	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄	Ácido arilfenoxipropiônico	Herbicida	383,36
58	Fluquinconazol	0,9	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	Triazol	Fungicida	376,17
59	Flusilazol	2,5	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	Organosilicado	Fungicida	315,39
60	Flutriafol	-	C ₉ H ₁₈ NO ₃ PS ₂	Organofosforado	Inseticida e nematicida	301,29
61	Fostiazato	-	C ₉ H ₁₈ NO ₃ PS ₂	Organofosfato	Inseticida, nematicida	283,35
62	Heptacloro	-	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	Organoclorado	Inseticida	373,32
63	Hexaclorobenzeno	-	C ₆ H ₆	Organoclorado	Fungicida	284,8
64	Hexaconazol	2,3	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O	Triazol	Fungicida	314,21
65	Hexazinona	2,2	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₂	Triazinona	Herbicida	252,31
66	HCH-alfa	-	C ₆ H ₆ Cl ₆	Organoclorado	Inseticida e rodenticida	290,83
67	HCH-beta	-	C ₆ H ₆ Cl ₆	Organoclorado	Inseticida	290,82
68	HCH-gama	-	C ₆ H ₆ Cl ₆	Organoclorado	Inseticida, acaricida e rodenticida	290,82
69	Indoxicarbe	-	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇	Oxadiazina	Inseticida, formicida e cupinicida	527,83
70	Malationa	-	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	Organofosforado	Inseticida e acaricida	330,36
71	Metconazol	11,4	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O	Triazol	Fungicida	319,83
72	Metidationa	-	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	Organofosforado	Inseticida e acaricida	302,3
73	Metiocarbe	-	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	Carbamato	Inseticida, moluscicida e repelente de pássaros	225,31
74	Metoxicloro	-	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₃ O ₂	Organoclorado	Inseticida	345,65
75	Metolacloro	-	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	Cloroacetamida	Herbicida	283,8
76	Mevinfós –E, -Z	-	C ₇ H ₁₃ O ₆ P	Organofosforado	Inseticida e acaricida	224,1
77	Mirex	-	C ₁₀ Cl ₁₂	Organoclorado	Inseticida	545,54

Nº	Analitos	pka	Fórmula Molecular	Classe Química	Ação Agronômica	Massa Molecular (g mol⁻¹)
78	Miclobutanil	2,3	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	Triazol	Fungicida	288,78
79	Nuarimol	-	C ₁₇ H ₁₂ ClFN ₂ O	Pirimidina	Fungicida	314,7
80	Oxadixil	-	C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₄	Fenilamida	Fungicida	278,3
81	Parationa	-	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS	Organofosforado	Inseticida, acaricida	291,27
82	Parationa-metílica	-	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	Organofosforado	Inseticida	263,21
83	Penconazol	1,5	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	Triazol	Fungicida	284,18
84	Pendimetalina	2,8	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	Dinitroanilina	Herbicida	281,31
85	Permetrina	-	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	Piretróide	Inseticida e acaricida	391,3
86	Picoxistrobina	-	C ₁₈ H ₁₆ F ₃ NO ₄	metoxiacrilato	Fungicida	367,32
87	Pirimicarbe	4,4	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	Dimetilcarbamato	Inseticida	238,39
88	Pirimifós-metil	4,3	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	Organofosforado	Inseticida e acaricida	305,33
89	Procimidona	-	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	Dicarboximida	Fungicida	284,14
90	Profenofós	-	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	Organofosforado	Inseticida e acaricida	373,63
91	Prometrina	4,1	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	Triazina	Herbicida	241,36
92	Propiconazol	1,09	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	Triazol	Fungicida	342,22
93	Protiofós	-	C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ O ₂ PS ₂	Organofosforado	Inseticida	345,25
94	Pirazofós	-	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	Fosforotioato de heterociclo	Inseticida e fungicida	373,36
95	Piridabem	-	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS	Piridazinona	Inseticida, acaricida	364,93
96	Pirimetanil	3,5	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	Anilino pirimidina	Fungicida	199,28
97	Quinalfós	-	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	Organofosforado	Inseticida e acaricida	298,3
98	Tebuconazol	5	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	Triazol	Fungicida	307,82
99	Tebufenpirade	-	C ₁₈ H ₂₄ ClN ₃ O	Pirazol	Inseticida e acaricida	333,8
100	Teflutrina	9,0	C ₁₇ H ₁₄ ClF ₇ O ₂	Piretróide	Inseticida	418,73
101	Terbufós	-	C ₉ H ₂₁ O ₂ PS ₃	Organofosfato	Inseticida, nematocida	288,4
102	Tetraconazol	0,6	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	Triazol	Fungicida	372,15
103	Tetradifona	-	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S	Difenil em ponte	Inseticida, acaricida	356,06
104	Tolilfluánida	-	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	Sulfamida	Fungicida	347,27

Nº	Analitos	pka	Fórmula Molecular	Classe Química	Ação Agronômica	Massa Molecular (g mol⁻¹)
105	Triadimefona	-	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	Azol	Fungicida	293,8
106	Triazofós	-	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	Organofosfato	Inseticida, acaricida, nematicida	313,3
107	Trifloxistrobina	-	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	Estrobilurina	Fungicida	408,37
108	Trifluralina	-	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	Dinitroanilina	Herbicida	335,28
109	Vinclozolina	-	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₃	Oxazol	Fungicida	286,11

Inicialmente, foram preparadas soluções estoque individuais (10 mL) de cada analito, na concentração de 1000 mg L^{-1} . O cálculo para o preparo de cada uma das soluções estoque foi realizado através da massa a ser pesada, considerando a pureza de cada padrão. Após pesados, os padrões sólidos foram dissolvidos em solventes como acetonitrila ou metanol. As soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas em freezer a temperatura abaixo de $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Através das soluções estoque preparou-se duas soluções (em acetonitrila), contendo todos os analitos de interesse, nas concentrações de 10 e 5 mg L^{-1} . A partir das soluções citadas anteriormente preparou-se uma solução padrão em acetonitrila na concentração de 1 mg L^{-1} . Esta solução foi utilizada para a fortificação das amostras “branco” e também para a construção das curvas analíticas preparadas no extrato da matriz e no solvente. Para injeção no sistema GC-MS/MS as concentrações finais das soluções foram 1, 2, 5, 10, 20, 50 e $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, em todos os testes realizados as concentrações das fortificações correspondem a 25, 50 e $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.4.1 Utilização do Padrão Interno (PI) e Padrão de Controle (PC)

Segundo SANTE (2019), a presença do padrão de controle (PC) e do padrão interno (PI) tem a finalidade de verificar a execução correta do método. Estes devem ser adicionados nas amostras e no extrato final, em concentrações conhecidas.

Neste trabalho, utilizou-se como PC uma solução de atrazina-d5 com concentração de 10 mg L^{-1} preparada em acetonitrila, que foi adicionada às amostras antes da extração dos analitos, em concentração de $25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, afim de avaliar o procedimento de extração nos resultados de recuperação (70-120%). O PI utilizado foi o trifenilfosfato (TPP) com concentração $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (adição de $2 \text{ } \mu\text{L}$ de uma solução 5 mg L^{-1} , preparada em acetonitrila). O PI é empregado para verificar a execução correta da análise cromatográfica, sendo aceito valores de variação de área de até 20%. Este foi adicionado no vial de injeção, antes da análise cromatográfica (SANTE, 2019).

3.5 CONDIÇÕES DO SISTEMA GC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA

As condições do sistema cromatográfico GC-MS/MS, modelo Agilent Intuvo 9000, foram sugeridas pelo fabricante do equipamento e estão descritas a seguir:

- ✓ Vazão/pressão: vazão constante 1,2 mL min⁻¹
- ✓ Gás carreador: hélio
- ✓ Temperatura do injetor: 280 °C
- ✓ Volume e modo de injeção: 1 µL – *splitless* pulsado
- ✓ Pressão: 12,4 psi
- ✓ Temperatura do forno: mantido por 1 min a 60°C, 40°C/min para 170 °C e 10°C/min para 310 °C.
- ✓ Coluna capilar planar HP-5 MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
- ✓ Temperatura do “*guard-chip*”: 150 °C
- ✓ Temperatura do “*bus temperature*”: 280 °C
- ✓ Temperatura do *transfer line*: 300 °C
- ✓ Temperatura da fonte: 300 °C
- ✓ Modo de ionização: impacto por elétrons (High Efficiency Source- HES)
- ✓ Modo de aquisição: monitoramento de reações múltiplas dinâmico (dMRM)
- ✓ Gás de colisão e vazão: nitrogênio: 1,5 mL min⁻¹
- ✓ Temperatura dos quadrupolos MS1 e MS2: 150 °C

3.6 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA

Os métodos de preparo de amostra para determinação de agrotóxicos em azeite de oliva propostos neste trabalho foram desenvolvidos considerando trabalhos da literatura para determinação de multiresíduo de agrotóxicos em azeite de oliva, azeitonas e óleos comestíveis. Foram realizados testes utilizando as três versões QuEChERS: original (ANASTASSIADES, et al., 2003); acetato (LEHOTAY; MASTOVSKA; LIGHTFIELD; 2005) e citrato (ANASTASSIADES, et al., 2007). Além disso, para cada método QuEChERS avaliado foram realizados testes com e sem a realização da etapa de limpeza, como descrito na Tabela 9.

3.6.1 Avaliação gravimétrica para verificação da presença de coextrativos provenientes do azeite de oliva

A capacidade de cada método de preparo de amostra testado em extrair coextrativos da amostra foi avaliada quantitativamente através do resíduo em massa (mg) obtido após a etapa de extração (SAPOZHNIKOVA; LEHOTAY, 2013).

Esses testes foram realizados em triplicata utilizando a amostra “branco” de azeite de oliva. Inicialmente, 6 tubos de vidro foram lavados e secos em estufa à 105 °C por 1 hora. Após, estes foram colocados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente (± 25 °C), cada tubo foi pesado 6 vezes e as massas foram anotadas. Após, transferiram-se 5 mL dos extratos obtidos nos testes T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 (conforme a Tabela 9) para cada tubo, respectivamente. Os tubos foram colocados em estufa e o solvente foi evaporado, aumentando a temperatura gradativamente (para que não ocorresse projeção) de 60 até 110 °C, até secar completamente. Na sequência, o tubo foi colocado no dessecador até atingir a temperatura ambiente e foi novamente pesado 6 vezes para obter-se a massa de coextrativos restantes (Figura 7).

Todos os testes foram realizados com e sem etapa de limpeza. O teste T5 também utilizou precipitação a baixa temperatura (LTP, do inglês *low temperature precipitation*). Onde foi realizada a etapa de extração e partição conforme descrito na Tabela 9, e antes da etapa de limpeza, foi retirado uma alíquota de 8 mL de extrato e levado ao freezer a uma temperatura de -20 °C em diferentes períodos tempo (1, 2 e 3 horas). Após o tempo necessário, continuou-se normalmente com a etapa de limpeza.

Para todos os testes foi realizado utilizando apenas o método QuEChERS devido a sua rapidez, facilidade, também, permite o uso do solvente acetonitrila, que promove uma extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos e também a etapa de limpeza, que garante a robustez e confiabilidade dos resultados obtidos no sistema cromatográfico.

Figura 7 – Fluxograma da avaliação gravimétrica para os testes (T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7).

Avaliação Gravimétrica



Figura 6: Tubos da avaliação gravimétrica na estufa



Fonte: o autor

Tabela 9 – Diferentes versões do método QuEChERS avaliadas neste trabalho.

TESTES REALIZADOS							
Etapas	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Extração	3 g amostra	3 g amostra	3 g amostra	3 g amostra	1 g amostra	3 g amostra	3 g amostra
	7 mL água	7 mL água	7 mL água	7 mL água	5 mL água	7 mL água	5 mL água
	10 mL ACN	10 mL ACN	10 mL ACN	10 mL ACN	10 mL ACN	10 mL ACN 1% Ác. Acético	10 mL ACN
Partição	3 g MgSO ₄	3 g MgSO ₄		4g MgSO ₄		4 g MgSO ₄	
	1 g NaCl	1 g NaCl	6 g MgSO ₄	1 g NaCl	4 g NaCl	1 g NaCl	4 g NaCl
		1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O	1,5 g CH ₃ COONa				
		0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O					
Limpeza	4 mL sobrenadante	4 mL sobrenadante	4 mL sobrenadante	4 mL sobrenadante	6,5 mL extrato	1 g de EMR	6,5 mL extrato
	600 mg MgSO ₄	600 mg MgSO ₄	600 mg MgSO ₄	400 mg Alumina	150 mg PSA	5 mL água	150 mg PSA
	100 mg PSA	100 mg PSA	100 mg PSA	400 mg MgSO ₄	150 mg C18	5 mL sobrenadante	150 mg C18
				800 mg MgSO ₄	800 mg MgSO ₄	1,6 g MgSO ₄	800 mg MgSO ₄
						400 mg NaCl	

*Antes da injeção no equipamento, a solução foi filtrada empregando filtro de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 µm.

3.6.2 Avaliação da presença de coextrativos empregando sistema GC-MS/MS no modo varredura (*full scan*)

Quando uma maior quantidade de informação de uma determinada amostra é desejada costuma-se analisar a mesma por GC-MS no modo *full scan*. Para avaliação da presença de coextrativos no extrato branco da matriz obtido nos testes listados na Tabela 9 (item 3.6.1), realizou-se também análise do tipo varredura ou *full scan* por GC-MS/MS. Assim, os dados das razões massa/carga (m/z) são coletados em um amplo espectro de varredura, na faixa de 40 a 500 Da (MELLON, STARTIN, SELF, 2007).

3.6.3 Avaliação da eficiência de extração dos compostos selecionados para análise em azeite de oliva

Os testes (T4, T5, T6 e T7) descritos na Tabela 9 foram avaliados em relação as melhores condições de extração para os agrotóxicos em estudo. Realizaram-se ensaios de fortificação ($n=4$) em “amostra branco” de azeite de oliva, nas concentrações de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o teste T5 e $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ para os testes T4, T5, T6 e T7. Os testes de extração foram avaliados em relação ao número de compostos que apresentaram resultados aceitáveis de recuperação (70-120%) e $\text{RSD} \leq 20\%$.

3.6.4 Avaliação da influência da etapa de congelamento na remoção dos coextrativos do extrato da matriz azeite de oliva

Muitos autores citam a etapa de congelamento como significativa para minimizar a presença de coextrativos provenientes de amostras com alto teor de gordura. Nessa etapa do estudo optou-se por testar a influência do congelamento sob as extrações de agrotóxicos em azeite de oliva. Foram realizados ensaios utilizando o teste T5 ($n=4$) em diferentes tempos (1, 2 e 3 horas) a uma temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Assim como nos ensaios anteriores, os percentuais de recuperação e RSD foram avaliados em níveis de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $75 \mu\text{g kg}^{-1}$.

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA POR GC-MS/MS

O método proposto foi validado para azeite de oliva obedecendo aos parâmetros de seletividade, linearidade, curva analítica, limites de detecção e de quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão avaliada através de ensaios de recuperação e avaliação do efeito matriz (ANVISA, 2017, DOC-CGCRE-008, 2016, SANTE, 2017, ZANELLA et al., 2015).

Os parâmetros de validação avaliados do desenvolvimento do método analítico proposto estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros de validação utilizados para o método analítico proposto neste estudo.

Parâmetro	Aplicação	Equações	Critério
Seletividade	Comparação dos cromatogramas obtidos para extratos de amostra “branco” e “branco” fortificado.	-	Ausência de picos de interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse.
Faixa linear	Correlação entre resposta analítica e concentração.	Equação 1: $y = ax + b$ Onde: y = resposta medida (área do pico); x = concentração; a = coeficiente angular - inclinação da curva analítica = sensibilidade; b = coeficiente linear - interseção com o eixo y, quando x = 0.	$r^2 \geq 0,99$
Efeito Matriz	Comparação entre as inclinações das curvas analíticas dos padrões no solvente (acetoneitrila) e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato da matriz	Equação 2: $EM(\%) = \frac{X1-X2}{X2} \times 100$ Onde: X1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em extrato da matriz. X2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente.	em $\geq 20\%$

Parâmetro	Aplicação	Equações	Critério
Limite de quantificação	Menor concentração que, fortificada na matriz (n=6), apresente resultados aceitáveis de exatidão e precisão.	-	Recuperações 70 - 120% e RSD ≤ 20%.
Limite de detecção	A menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não quantificada.	Equação 3: $LOD = \frac{LOQ}{3,33}$ Onde: LOQ = limite de quantificação	-
Exatidão	Ensaio de recuperação, fortificando as amostras “branco” em 4 níveis de concentração (10, 25, 50 e 100 µg L ⁻¹) (n=6). Avaliada em termos de recuperação (%).	Equação 4: $REC(\%) = \frac{C1-C2}{C3} \times 100$ Onde: C1= Concentração determinada na amostra fortificada; C2= Concentração determinada na amostra não fortificada; C3 = Concentração usada para fortificação.	70 – 120%
Precisão	Ensaio de recuperação, fortificando as amostras “branco” em 4 níveis de concentração (5, 10, 20 e 50 µg L ⁻¹) (n=6). Avaliada em termos de RSD.	Equação 5: $RSD(\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) \times 100$ Onde: s = estimativa de desvio padrão absoluto = $\{\sum(xi - \bar{x})^2/n-1\}^{1/2}$; xi = valores individuais; \bar{x} = média das medidas em replicatas; n = número de medidas.	RSD ≤ 20%

Fonte: SANTE, (2019); INMETRO, (2018).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA GC-MS/MS EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA

Os parâmetros utilizados no sistema GC-MS/MS para a determinação de todos os 79 agrotóxicos, PC e PI estão apresentados na Tabela 11. Estas condições (tempo de retenção (tr), transições (íon precursor→íon produto) utilizadas nas etapas de quantificação e identificação de cada analito em estudo, foram obtidas conforme descrito no item 3.5.2.

Tabela 11 - Compostos determinados neste trabalho com seus respectivos tempos de retenção, íon precursor e íons produtos utilizados na quantificação e identificação.

№	Analitos	tr (min)	1º Transição Quantificação		2ª transição Identificação	
			Íon precursor	CV (eV)	Íon Produto	CV (eV)
1	Alacloro	8,86	188,1 → 160,1	10	160,1 → 132,1	15
2	Atrazina	7,59	214,9 → 214,9	10	200,2 → 58,1	10
3	Atrazine-d5 (PC)	7,56	205 → 205	10	127 → 105	15
4	Benalaxil	12,32	266 → 148	5	148,1 → 105,1	20
5	Boscalida	15,98	140 → 140	10	112 → 76	25
6	Bromopropilato	13,35	185 → 183	15	13,35 → 13,35	15
7	Bupurimato	11,30	272,9 → 272,9	5	193,1 → 108	15
8	Buprofezina	11,27	104 → 104	10	11,27 → 11,27	35
9	Cadusafós	7,16	158,8 → 158,8	5	131 → 97	15
10	Carbofenotiona	12,28	342 → 153	10	157 → 96,9	10
11	Clorofenapir	11,53	247,1 → 137	20	227,1 → 102	15
12	Clorofenvinfós	10,19	294,9 → 266,9	5	266,9 → 159	20
13	Cloroprofam	6,87	153 → 127	10	125,1 → 65,1	25
14	Cloropirifós	9,51	198,9 → 196,9	15	171 → 169	15
15	Cloropirifós-metil	8,75	124,9 → 78,9	15	169 → 47	10
16	Cialotrina (lambda)	14,12	208,1 → 181,1	10	181,1 → 152,1	30
17	Ciprodinil	9,94	225,2 → 224,2	10	224,3 → 208,2	20
18	Cresoxim-metil	12,42	116 → 116	15	89 → 63	30
19	Dicloran	7,51	206,1 → 160,1	10	176 → 124,1	10
20	Diclorvós	4,65	184,9 → 109	10	93 → 79	5
21	Dieldrin	11,19	277 → 262,9	5	241 → 193	35
22	Difeconazol	17,20	324,8 → 264,9	15	266,8 → 202	20

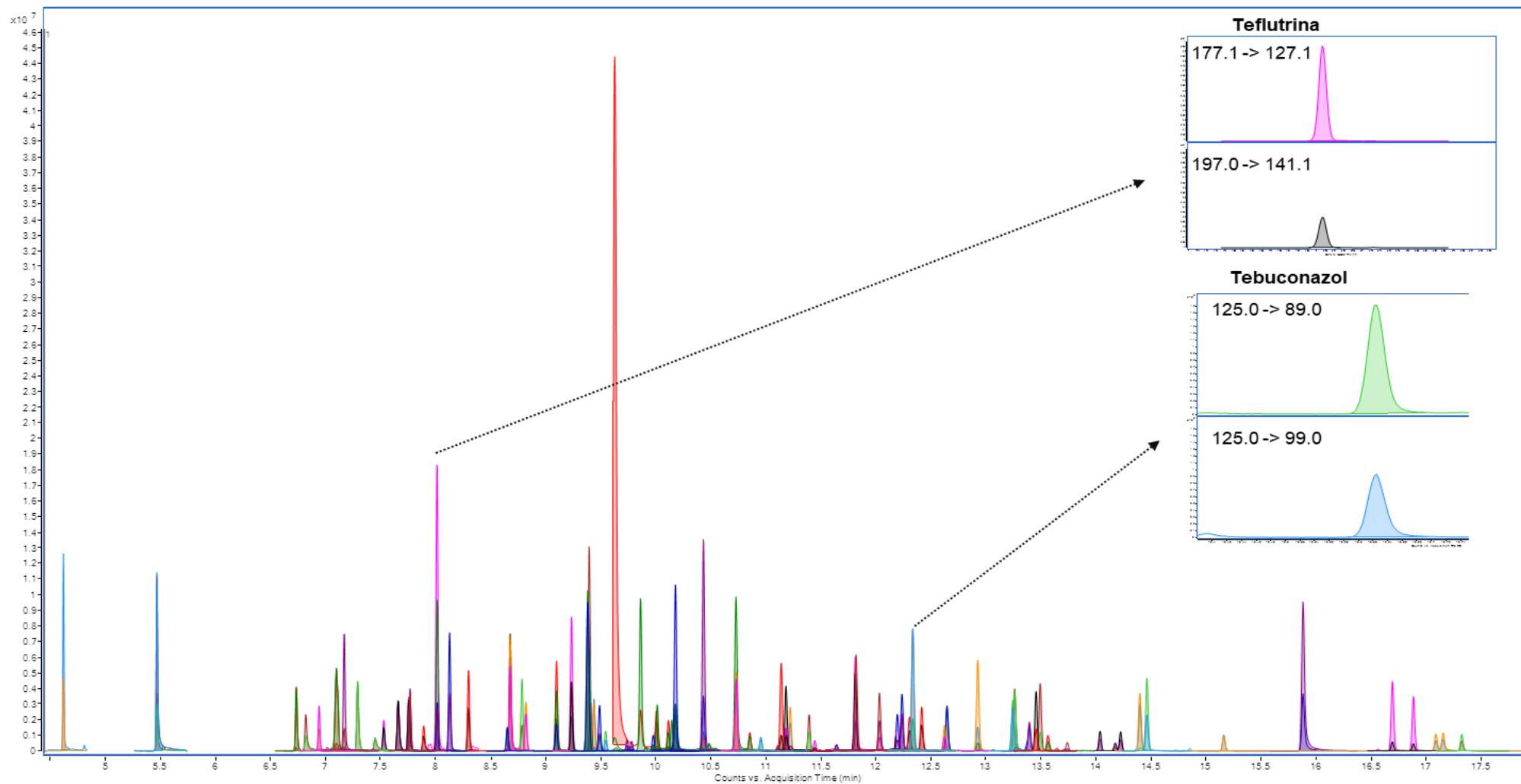
№	Analitos	tr (min)	1º Transição Quantificação		2ª transição Identificação	
			Íon precursor	CV (eV)	Íon Produto	CV (eV)
23	Dissulfutom	8,08	142 → 88	5	109 → 60	5
24	Endosulfan	11,73	206,9 → 194,9	15	172 → 158,9	10
25	Epoxiconazol	13,01	192 → 165	10	138,1 → 138	10
26	Etiona	11,90	152,9 → 124,9	10	96,9 → 96,9	0
27	Etoprofós	6,79	157 → 157	5	114 → 97	15
28	Etrinfós	8,19	292,1 → 181,1	5	181,1 → 153,1	10
29	Fenamidona	13,58	268 → 238	20	180,2 → 237,2	10
30	Fenarimol	14,49	219 → 139	10	107,1 → 75	30
31	Fenitrotona	13,63	125,1 → 125,1	5	79 → 47	15
32	Fenpropatrina	13,48	207,9 → 181,1	5	181 → 152,1	25
33	Fempropimorfe	9,47	128,1 → 128,1	5	110,1 → 70,1	10
34	Fentiona	10,26	124,9 → 124,9	5	79 → 47	10
35	Fenvrelato	16,79	181 → 167	20	152,1 → 125,1	5
36	Fentoato	10,26	274 → 121	10	121 → 77	25
37	Forato	7,23	128,9 → 121	15	65 → 65	10
38	Fosfomete	13,33	160 → 160	10	133,1 → 77,1	20
39	Fipronil	10,19	366,8 → 350,8	25	212,8 → 254,8	15
40	Fluazifope-p-butílico	11,47	281,9 → 281,9	15	238 → 91	15
41	Fluquinconazol	15,26	340 → 108	15	298 → 57	15
42	Flusilazol	11,27	314,7 → 233	10	232,9 → 165,1	15
43	Flutriafol	10,81	123,1 → 123,1	15	95 → 75,1	25
44	Fostiazato	9,82	195 → 195	5	103 → 60	20
45	Hexaconazol	10,94	175 → 175	10	147 → 111	20
46	HCH-alfa	7,35	216,9 → 180,9	5	181 → 145	15
47	HCH-beta	7,73	218,9 → 181	5	183,1 → 145	15
48	HCH-gama	7,82	218,9 → 181	5	183,1 → 145	15
49	Indoxicarbe	17,42	202,9 → 202,9	15	134 → 106	25
50	Malationa	9,31	157,8 → 126,9	5	125 → 99	5
51	Metconazol	13,66	125 → 125	20	99 → 89	20
52	Metidationa	10,51	144,9 → 144,9	5	89 → 85	15
53	Metolaclo	9,18	238 → 162,2	10	162,2 → 133,2	15
54	Mevinfós, E-	5,50	127 → 127	10	109 → 94,9	15
55	Mevinfós, Z-	5,50	127 → 127	10	109 → 94,9	20
56	Miclobutanil	11,22	179 → 150	10	125,1 → 123	15
57	Nuarimol	12,74	203 → 139	10	107 → 111	15
58	Oxadixil	11,90	163 → 132	5	132,1 → 117,1	15
59	Parationa-metílica	8,75	125 → 125	5	79 → 47	10
60	Penconazol	10,08	248 → 248	15	192,1 → 157,1	25
61	Pendimetalina	10,05	251,8 → 161,9	10	162,2 → 161,1	10
62	Picoxistrobina	10,81	145 → 145	15	115,1 → 102,1	25
63	Pirimicarbe	8,37	238 → 166	10	166,2 → 55,1	20
64	Pirimifós-metil	9,17	290 → 232,9	20	125 → 151	5
65	Profenofós	11,04	338,8 → 296,8	15	268,7 → 268,7	5
66	Prometrina	8,89	241 → 226	10	184,2 → 184,2	10

№	Analitos	tr (min)	1º Transição Quantificação		2ª transição Identificação	
			Íon precursor	CV (eV)	Íon Produto	CV (eV)
67	Propiconazol	12,39	172,9 → 172,9	15	145 → 109	30
68	Pirazofós	14,55	323 → 221	10	204,1 → 193,1	10
69	Pirimetanil	7,96	198 → 198	15	183,1 → 158,1	20
70	Quinalfós	10,26	146 → 146	10	118 → 91	30
71	Tebuconazol	12,71	125 → 125	20	99 → 89	15
72	Tebufenpirade	13,55	332,9 → 275,9	15	171 → 171,1	10
73	Teflutrina	8,04	197 → 177,1	10	141,1 → 127,1	15
74	Terbufós	7,83	230,9 → 152,9	20	129 → 97	5
75	Tetraconazol	9,62	336 → 170,9	20	217,9 → 136	10
76	Triadimefona	9,57	208 → 128	5	181,1 → 65	20
77	Triazofós	12,12	161,2 → 161,2	5	134,2 → 106,1	10
78	Trifloxistrobina	12,42	116 → 116	15	89 → 63	30
79	Trifluralina	7,00	306,1 → 264	5	264 → 206	5
80	Trifenilfosfato (PI)	12,81	325,1 → 325,1	20	169,1 → 77,1	40
81	Vinclozolina	8,72	197,9 → 187	15	145 → 124	20

A figura 8 apresenta um cronograma de íons totais (TIC) obtido para uma solução padrão (preparada em acetonitrila) na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, contendo todos os agrotóxicos validados neste estudo.

Observa-se também as transições MRM para os agrotóxicos teflutrina e tebuconazol.

Figura 8 - Cromatograma de íons totais obtido por GC-MS/MS no modo MRM a partir de uma solução padrão 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (acetonitrila).



4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA

4.2.1 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de extração

O conhecimento da composição centesimal da amostra é de extrema importância para o procedimento analítico e posterior análise cromatográfica. O azeite de oliva é uma amostra complexa devido ao alto teor de ácidos graxos e esteróis (ANTONIASSI, et al., 1998).

Assim, realizou-se a análise gravimétrica dos extratos com intuito de verificar a presença dos componentes da matriz presentes no extrato final. Os testes gravimétricos são alternativas úteis para a etapa de quantificação dos coextrativos provenientes da matriz em estudo, mesmo que se trate de massas remanescentes muito baixas é possível inferir uma massa comparativa da limpeza dos extratos (OSHITA e JARDIM, 2014).

Os testes gravimétricos foram usados como critério de decisão para a escolha do método que seria empregado no desenvolvimento do método analítico validado. Realizou-se a extração dos azeites de oliva conforme o procedimento descrito na Tabela 9 (item 3.6.1). Dessas reservou-se uma alíquota de 5 mL do extrato final para que fosse evaporada. Para cada teste foram realizadas três replicatas. Ainda, fizeram-se extrações sem a etapa de limpeza para todos os testes.

A remoção de coextrativos foi calculada de acordo com a diferença em massa de coextrativos antes e depois do processo de limpeza com sorvente, de acordo com a equação 6 (SAPOZHNIKOVA & LEHOTAY, 2013). Os resultados são apresentados na Tabela 12.

$$\%Coextrativos = \frac{C_a - C_d}{C_a} \times 100 \quad (\text{Equação } 6)$$

Em que: C_a = massa dos coextrativos antes da etapa de secagem

C_d = massa dos coextrativos depois da etapa de secagem

Tabela 12 – Comparação dos testes gravimétricos para os testes realizados.

Testes	Sem Limpeza (g)	Com Limpeza (g)	% remoção de coextrativos
T1	0,00639	0,00567	11,27%
T2	0,00678	0,00522	23,0%
T3	0,00756	0,00506	33,0%
T4	0,01054	0,00570	45,9%
T5	0,00800	0,00428	46,5%
T6	0,02051	0,01380	32,7%
T7	0,00986	0,00401	59,3%

Fonte: O autor. T1= teste 1; T2= teste 2; T3= teste 3; T4= teste 4; T5= teste 5; T6= teste 6; T7= teste 7.

A Figura 9 apresenta a aparência de cada um dos testes (T1 a T7), após a realização dos experimentos descritos no item 3.6.1. Os testes com “*” foram realizados sem a etapa de limpeza. Observa-se que os extratos que possuem as maiores quantidades de coextrativos são aqueles provenientes dos testes que não foi realizada a etapa de limpeza. Estes resultados corroboram com os resultados descritos na Tabela 12. Nos testes T1, T2 e T3 foi utilizado o sorvente etilenodiamino-N-propil (PSA) que é uma amina primária e secundária, com exceção do T6. Este sorvente (PSA) atua na remoção de pigmentos, ácidos graxos de cadeia curta, açúcares e compostos polares através do seu elevado efeito quelante, fornecido pela estrutura bidentada (CABRERA, 2012). Nos testes T5 e T7 utilizou-se PSA juntamente com C18. A utilização de C18 diminui os coextrativos da matriz, principalmente compostos altamente lipofílicos, quando usado na etapa de limpeza dispersiva (LEHOTAY e colaboradores, 2010).

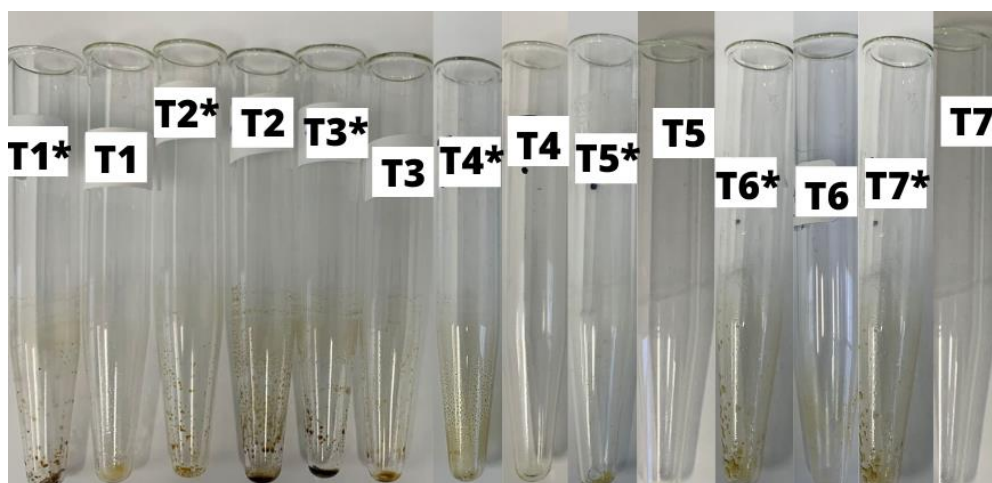
No teste T4 utilizou-se alumina como sorvente, que tem características alcalinas, e, costuma ser empregada na separação de compostos lipofílicos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Já no teste T6 utilizou-se o sorvente de remoção de matriz aprimorado (EMR). Segundo González e colaboradores (2018), o uso desse sorvente foi proposto para a remoção das principais classes de lípidos da matriz, sem grandes efeitos nas recuperações. Este sorvente foi utilizado para a derminação de agrotóxicos neste tipo de matriz em combinação com cromatografia gasosa (GC).

Observou-se, através dos resultados na Tabela 12, que o uso do sorvente PSA em combinação com o C18 eliminou a maior quantidade de coextrativos (59,3 e 46,5 %) e facilitou a etapa de limpeza.

Assim, fica evidente a necessidade de realização de etapa de limpeza, a fim de que se tenha uma menor quantidade de coextrativos não voláteis no extrato final. Esta avaliação teve a finalidade de verificar a quantidade (em g) de coextrativos não voláteis remanescentes em cada extrato seco.

Figura 9 - Avaliação visual dos extratos obtidos, após a análise gravimétrica, pelos diferentes testes com e sem etapa de limpeza.

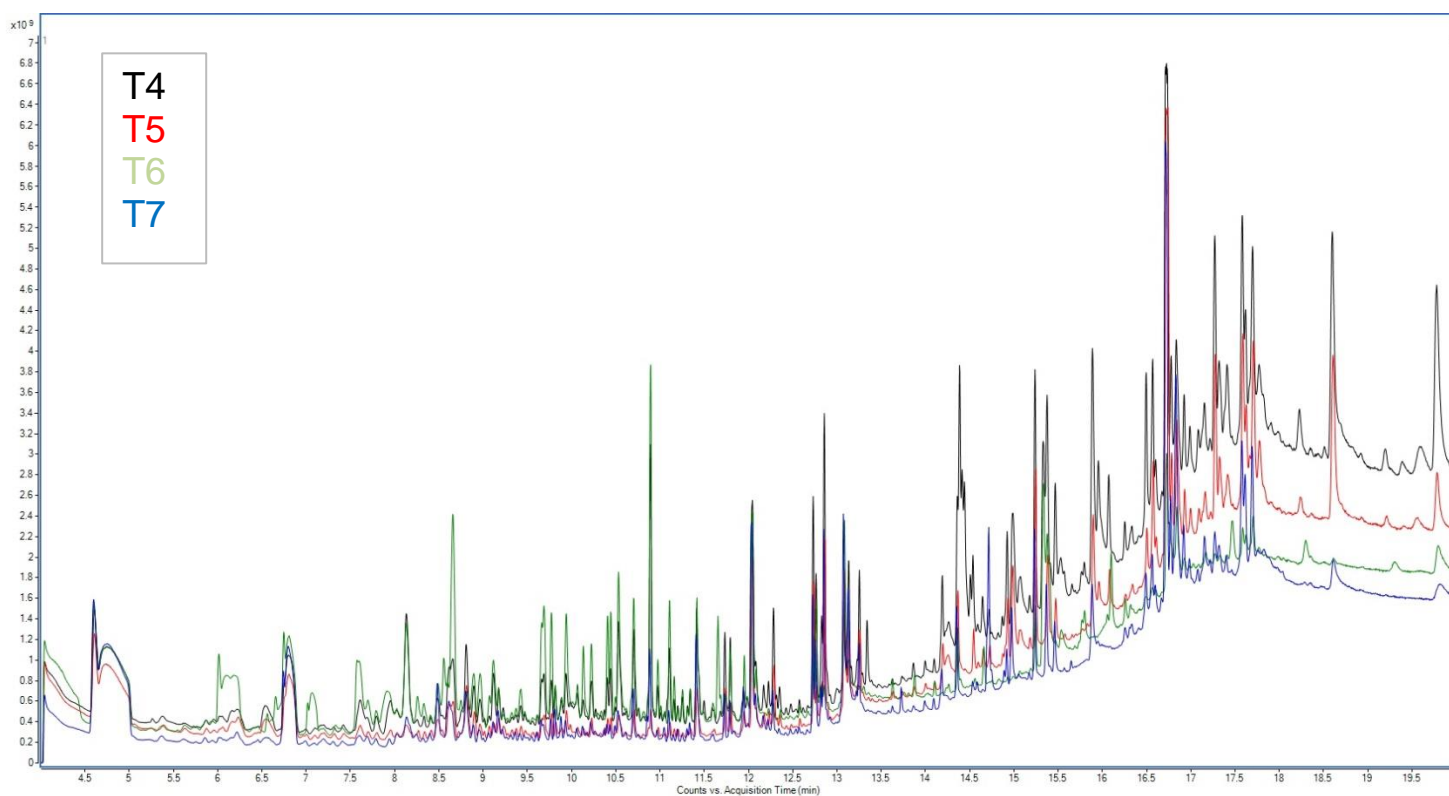


Fonte: O autor. T= teste sem limpeza; T*= teste com limpeza.

4.2.2 Avaliação da presença de coextrativos empregando sistema GC-MS/MS no modo varredura (*full scan*)

No modo de análise por varredura podem-se identificar íons característicos dos analitos através do cromatograma de íon total, ou seja, é possível ter uma visão mais global do tipo de coextrativos presentes no extrato. Foi utilizado um espectro de varredura na faixa de 40 a 500 m/z, para os testes T4, T5, T6 e T7, pois estes foram os escolhidos para seguir com o estudo, com base na literatura e nos resultados de remoção de coextrativos (item 4.2.10). Conforme as intensidades dos sinais analíticos para os diferentes testes (T4, T5, T6 e T7) é possível observar na Figura 10 que o teste T7 possibilitou a maior redução de coextrativos presente no extrato da “amostra branco”, confirmando o teste gravimétrico (item 4.2.1).

Figura 10 - Varredura no modo *full scan* por GC-MS/MS do extrato da matriz branco.



Fonte: o autor.

4.2.3 Avaliação da eficiência de extração dos compostos selecionados para análise em azeite de oliva

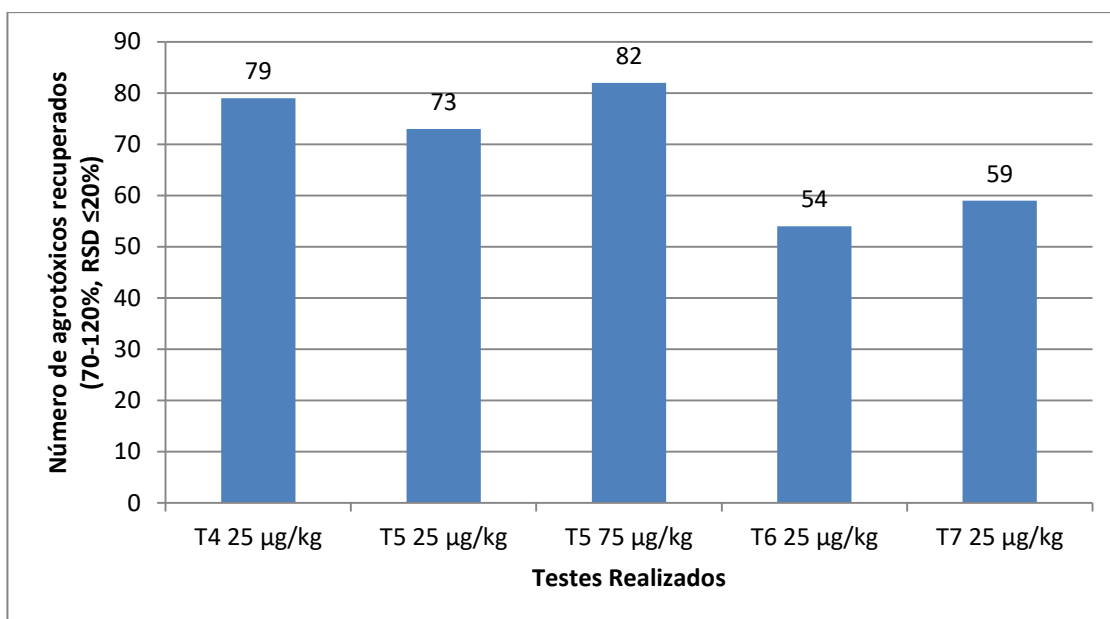
A partir de informações obtidas na literatura sobre a determinação multirresíduo de agrotóxicos e dos melhores resultados obtidos no item 4.2.1 e 4.2.2, foram inicialmente realizados quatro testes para avaliação da extração de agrotóxicos em azeite de oliva (Tabela 9). Como pode ser observado, foram avaliados os testes T4, T5, T6 e T7. Em cada um dos testes avaliados a “amostra branco” foi fortificada na concentração de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=4$) e o T5 foi também fortificado na concentração de $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=4$) e posterior injeção no sistema GC-MS/MS.

A Figura 11 apresenta os resultados considerados adequados (recuperação 70-120%, $\text{RSD} \leq 20\%$), para todos os testes. Para os 109 agrotóxicos selecionados, o teste T5 no nível de fortificação de $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ apresentou resultado adequado para 82 compostos. O teste T4 apresentou resultado adequado para 79 compostos. Já o

teste T5 no nível de fortificação de 25 µg kg⁻¹ apresentou resultado adequado para 73 compostos. Além dos testes T6 e T7 que apresentaram resultados adequados de 54 e 59 compostos, respectivamente. Os agrotóxicos que não tiveram boas recuperações na grande maioria foram os piretróides (acrinatrina, bifentrina, ciflutrina, cipermetrina) e organoclorados (aldrin, HCH, clordano, DDT).

Os resultados obtidos são semelhantes a outros presentes na literatura. Zeying He e colaboradores (2016) realizaram testes de fortificação em 255 agrotóxicos, e concluíram que alguns compostos altamente lipofílicos tiveram recuperações baixas, como aldrin, hexaclorobenzeno, DDT e clordano. Eram principalmente compostos organoclorados, e suas recuperações variaram entre 35 e 67%, mas com o RSD inferior a 20%.

Figura 11 - Avaliação da eficiência de extração (% recuperação e RSD%) dos diferentes testes (T4, T5, T6 e T7).



Fonte: Arquivo pessoal. T4= teste 4; T5= teste 5; T6= teste 6; T7= teste 7.

Pode-se concluir que o T5 obteve um número maior de compostos com recuperações adequadas (70-120%). O uso do método QuEChERS como preparo de amostra, juntamente com uma limpeza utilizando PSA e C18, que obtiveram os melhores resultados de remoção de coextrativos e baseado nas recuperações dos

analitos, escolheu-se o teste T5 com concentração de $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ para continuar nesse estudo.

4.2.4 Avaliação da influência da etapa de congelamento na remoção dos coextrativos do extrato da matriz azeite de oliva

A etapa de congelamento ajuda a reduzir os coextrativos que apresentam baixa solubilidade no solvente extrator. A precipitação a baixa temperatura é indicada para determinar analitos hidrofóbicos, pois estes tentem a ficar retidos na parte aquosa (ANASTASSIADES et al., 2007, Lee et al., 2011). Para esse ensaio, utilizou-se o teste T5 em níveis de fortificação de 25 e $75 \mu\text{g kg}^{-1}$, pois de acordo com o ensaio descrito no item 4.2.3, este foi o teste com melhores recuperações. Foi realizado a etapa de extração e partição, retirado uma alíquota de 8 mL de extrato e levado ao freezer, a uma temperatura de $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em diferentes tempos de congelamento, sendo de uma, duas e três horas. Juntamente foi preparado um ensaio sem essa etapa de congelamento para uma possível comparação. Após, foi realizado o teste gravimétrico, apenas utilizando o extrato com a etapa de limpeza e também a injeção no equipamento GC-MS/MS para obter as possíveis recuperações adequadas (70-120% e $\text{RSD} \leq 20\%$). A Tabela 13 apresenta os resultados da massa de coextrativos (em g).

Tabela 13 - Comparação do teste gravimétrico para o teste T5 com LTP em diferentes tempos (1, 2 e 3 horas).

Testes	Com Limpeza (g)	% remoção de coextrativos
Sem Congelamento	0,00407	-
1h	0,00278	31,7%
2h	0,00105	74,2%
3h	0,00059	85,5%

Fonte: o autor

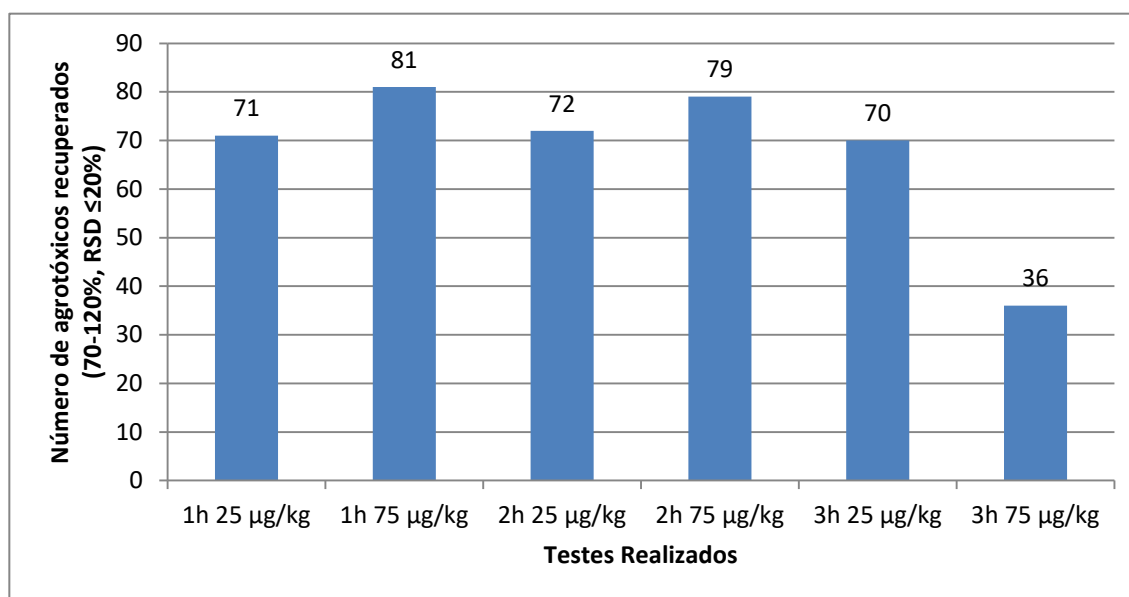
Neste teste, pode-se observar que quanto mais horas o extrato ficava a baixa temperatura, menores as quantidades de coextrativos. Portanto, o teste sem congelamento foi o que possuía maiores quantidades de coextrativos, e o de três

horas no congelador foi o que obteve menores de quantidades de coextrativos (0,00059 g).

Comparando esse ensaio, onde o teste T5 utilizando LTP, com o citado no item 4.2.1, onde o teste T5 com limpeza obteve uma massa de coextrativos de 0,00428 g e percentual de remoção de 46,5%, este teve uma diminuição de coextrativos, onde nos diferentes tempos de congelamento, o percentual de coextrativos removidos foi maior (85,5%). Esses resultados são similares aos encontrados na literatura. Sobhanzadeh e colaboradores (2011) realizaram a precipitação a baixa temperatura em amostras de óleo de palma para determinação de agrotóxicos e concluíram que o procedimento foi capaz de remover cerca de 90% dos lipídeos da matriz, diminuindo assim a quantidade de coextrativos presente na amostra.

Também, com a fortificação da “amostra branco” em níveis de 25 e 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=4) e após a injeção no sistema GC-MS/MS, pode-se obter os resultados de recuperação e RSD dos compostos analisados. A Figura 12 mostra resultados considerados adequados (recuperação 70-120%, RSD \leq 20%), para o teste T5 com LTP. Para 109 agrotóxicos selecionados, no tempo de congelamento de uma hora, no nível de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ apresentaram resultados adequados de 71 compostos e no nível de 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de 81 compostos, no tempo de freezer de duas horas, com nível de fortificação de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ os resultados adequados foram de 72 compostos e no nível de 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram 79 compostos. Já no tempo de congelamento de três horas no nível de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ os resultados adequados foram para 70 compostos, e no nível de 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram de apenas 36 compostos.

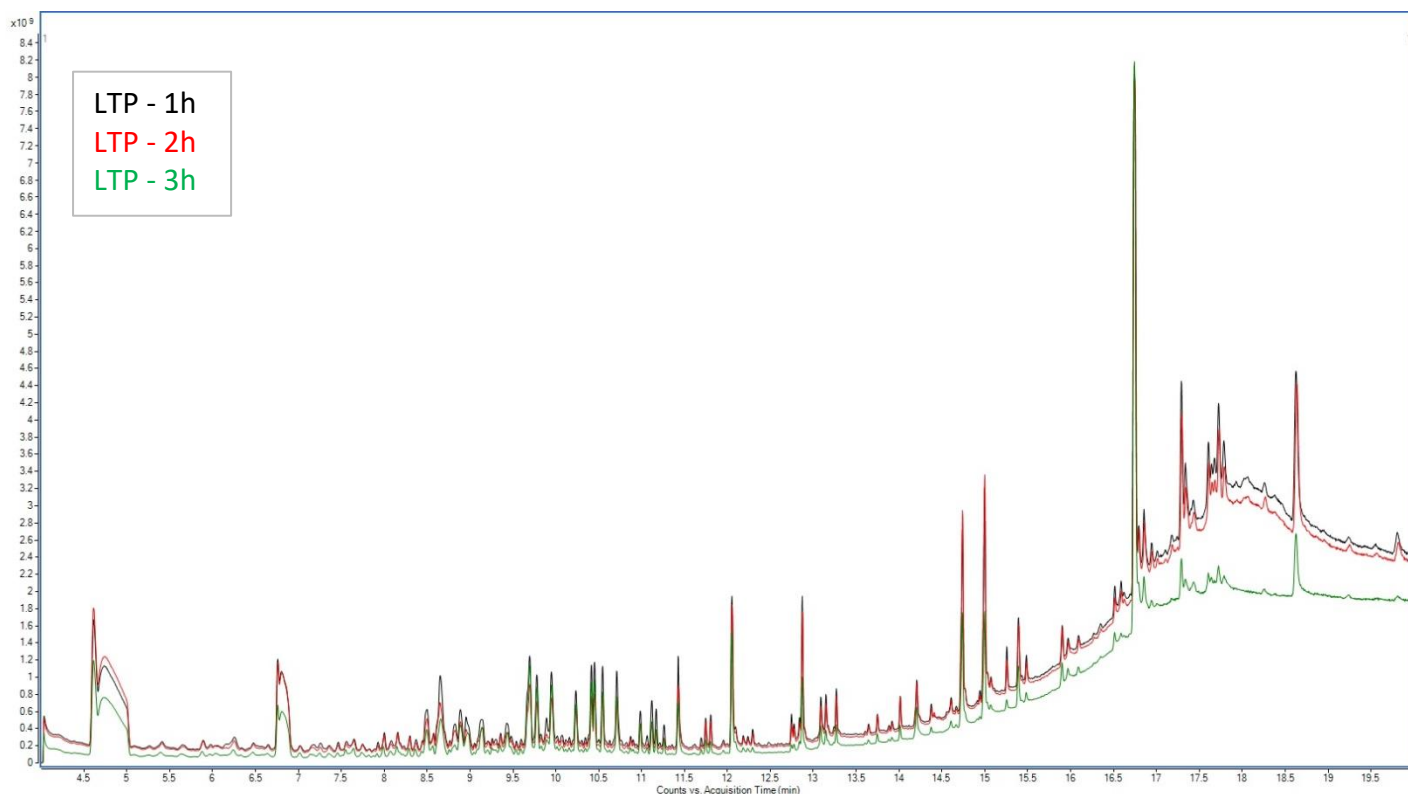
Figura 12 - Avaliação da eficiência de extração (% recuperação e RSD%) do teste T5 utilizando LTP em diferentes tempos.



Fonte: Arquivo pessoal. 1h= uma hora de congelamento; 2h= duas horas de congelamento; 3h= três horas de congelamento.

Como alternativa, realizou-se a análise no modo varredura por GC-MS para averiguar e confirmar a diferença entre os ensaios. A Figura 13 compara o ensaio de congelamento em diferentes tempos (uma hora, duas horas e três horas) e confirma que o teste com três horas de congelamento foi o que removeu a maior quantidade de coextrativos presente na amostra.

Figura 13 - Cromatograma no modo varredura obtido por GC-MS comparando os ensaios com congelamento em diferentes tempos.



Fonte: o autor.

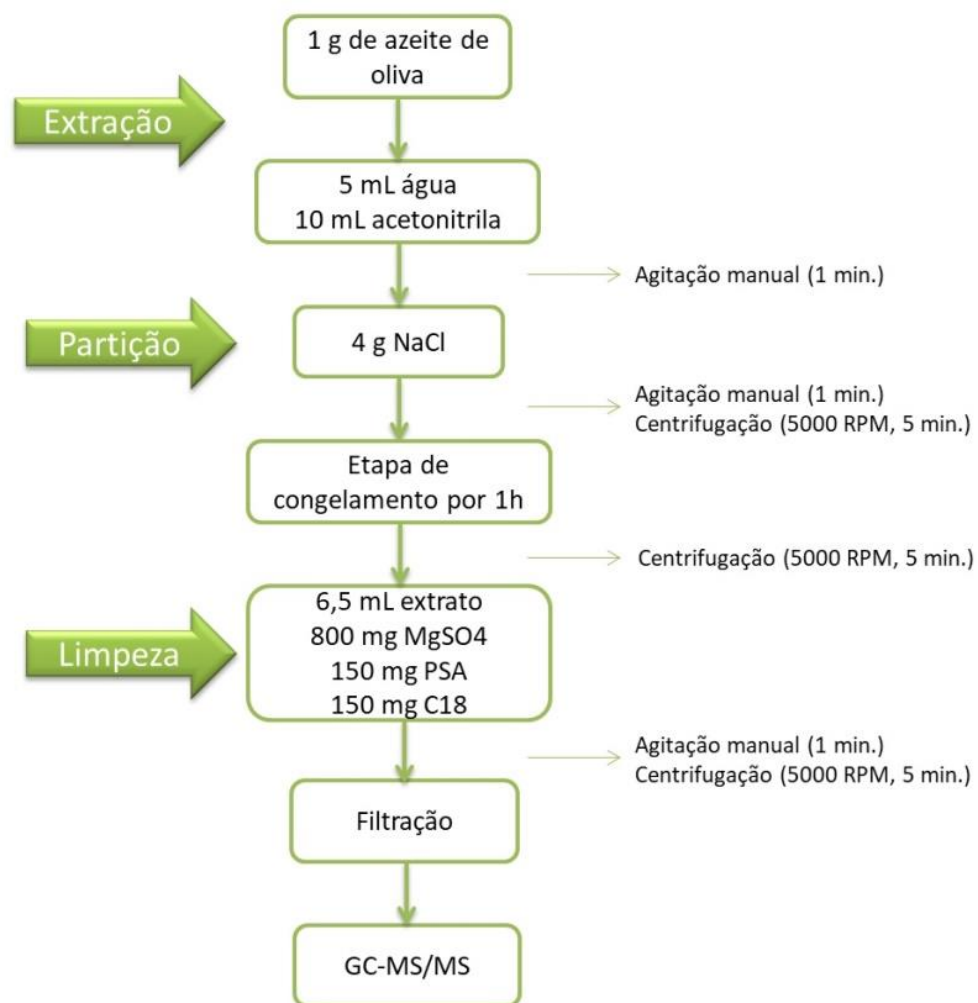
Em termos de número de compostos recuperados, não houve diferença significativa em comparação com os ensaios sem a etapa de LTP, com exceção ao ensaio com três horas de congelamento, que recuperou apenas 70 compostos (nível $25 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 36 compostos (nível $75 \mu\text{g kg}^{-1}$). Segundo FERRONATO, 2018 essa redução da quantidade de compostos recuperados pode ser devido aos analitos terem ficado retidos na fase aquosa, devido a sua hidrofiliicidade, visto que esta etapa é mais indicada quando se quer realizar a determinação de agrotóxicos hidrofóbicos ($\log K_{ow} > 1$). Por esse motivo, esse teste não foi o escolhido. Porém, em relação à quantidade de massa de coextrativos, houve uma diferença significativa, o que motivou a escolha dessa etapa (LTP) para a validação do método, utilizando a etapa de congelamento com uma hora. Segundo ANASTASSIADES (2007) e Lee (2011), a etapa de congelamento é utilizada no preparo de amostra para reduzir os coextrativos que apresentam baixa solubilidade no solvente extrator (acetoneitrila).

4.2.5 Método proposto para validação

O preparo de amostras escolhido foi desenvolvido com base no método QuEChERS proposto por Zeying He e colaboradores (2016), juntamente com a precipitação a baixa temperatura, pois foram os que apresentaram os melhores resultados nos testes de otimização.

A Figura 14 mostra o método desenvolvido, validado e aplicado no preparo das amostras de azeite de oliva deste estudo.

Figura 14 - Método otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em azeite de oliva por GC-MS/MS.



Fonte: o autor

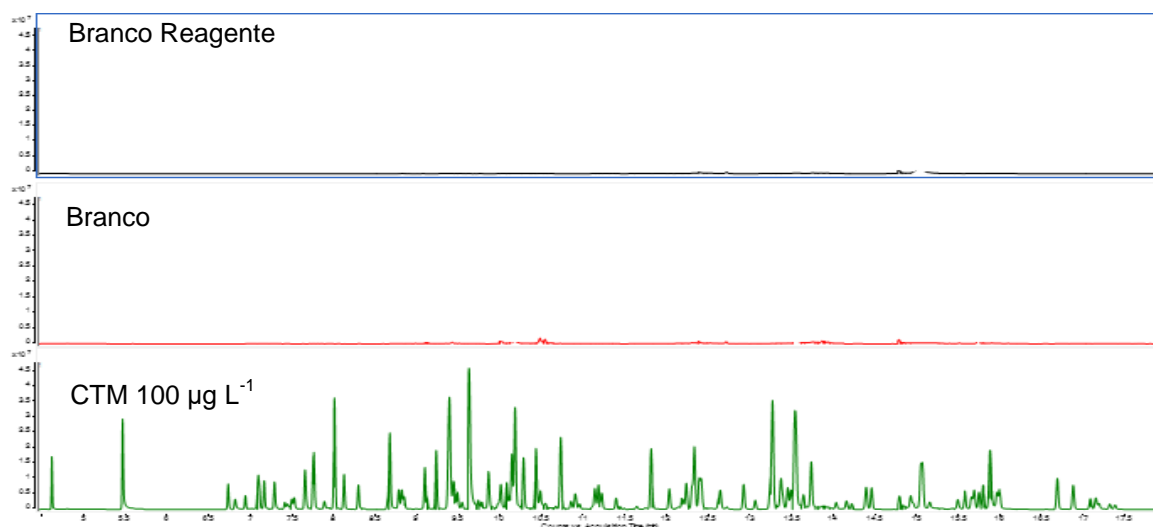
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA

O preparo de amostra para a validação do método seguiu o procedimento descrito na Figura 14. A análise cromatográfica foi realizada por GC-MS/MS nas condições descritas no item 3.7. As soluções utilizadas para avaliação da linearidade foram preparadas de maneira independente em solvente (acetonitrila) e na matriz (extrato branco).

4.3.1 Seletividade e Linearidade

A seletividade do método foi assegurada comparando os extratos do branco da matriz azeite de oliva, com o branco reagente (água ultra pura, com os reagentes do método, utilizado para determinar possíveis erros dos próprios reagentes) e o branco fortificado na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. A Figura 15 permite observar que o método proposto apresenta seletividade adequada, uma vez que não há interferentes na “amostra branco” com os mesmos íons de quantificação/identificação nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse.

Figura 15 – Cromatograma do branco reagente (a), branco da matriz em azeite de oliva (b) e branco fortificado na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (c) obtido no modo MRM por GC-MS/MS.



Fonte: o autor.

A linearidade do método proposto foi avaliada através do coeficiente de correlação (r^2) obtido através da regressão linear dos pontos da curva analítica preparada no extrato da “amostra branco”. Foram realizados 7 pontos em diferentes concentrações, $n=3$, obtendo-se uma faixa de concentração de 1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Todos os agrotóxicos avaliados apresentaram $r^2 \geq 0,990$, como mostrado na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados obtidos na etapa de validação do método proposto para os parâmetros de validação LOQ, LOD, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz.

№	Analitos	r ²	LOQ (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	Exatidão, Recuperação % (Precisão, RSD %)						Precisão Intermediária Recuperação % (Precisão, RSDpi %)						EM (%)
					25 µg kg ⁻¹		50 µg kg ⁻¹		100 µg kg ⁻¹		25 µg kg ⁻¹		50 µg kg ⁻¹		100 µg kg ⁻¹		
1	Alacloro	0,9998	25	7,5	109	3	118	4	101	8	120	5	111	3	105	4	63
2	Atrazina	0,9994	25	7,5	106	4	119	3	104	9	124	2	113	2	104	4	88
3	Benalaxil	0,9998	50	15	40	65	118	3	98	15	114	10	108	6	113	5	114
4	Boscalida	0,9977	25	7,5	117	13	106	3	90	11	116	12	120	1	116	3	333
5	Bromopropilato	0,9990	25	7,5	98	7	103	5	82	13	119	17	108	5	100	4	126
6	Bupurimato	0,9984	50	15	118	5	120	3	100	11	138	4	120	2	110	5	88
7	Buprofezina	0,9996	25	7,5	101	11	108	4	90	9	114	14	101	4	95	3	21
8	Cadusafós	0,9989	25	7,5	103	4	116	4	102	19	121	14	110	3	104	5	117
9	Carbofenotiona	0,9984	50	15	31	18	105	10	95	13	106	14	100	12	89	10	136
10	Clorofenapir	0,9995	25	7,5	112	8	109	3	91	9	108	13	105	5	105	4	46
11	Clorofenvinfós	0,9985	25	7,5	117	3	114	5	89	14	122	8	121	4	112	5	200
12	Cloroprofam	0,9989	25	7,5	97	7	114	5	103	13	110	13	108	3	106	5	185
13	Cloropirifós	0,9998	25	7,5	98	7	107	4	89	7	94	14	98	4	82	5	49
14	Cloropirifós-metil	0,9987	25	7,5	107	5	119	2	100	11	126	3	113	3	102	5	91
15	Cialotrina (lambda)	0,9986	50	15	177	6	123	6	76	18	116	9	119	8	117	7	306
16	Ciprodinil	0,9993	25	7,5	97	13	108	5	89	12	107	14	98	3	91	4	91
17	Cresoxim-metil	0,9993	25	7,5	76	19	93	13	100	19	108	8	105	5	101	9	187
18	Dicloran	0,9999	25	7,5	105	9	108	10	91	12	88	12	100	6	104	8	109
19	Diclorvós	0,9997	25	7,5	107	6	122	4	115	9	118	5	112	7	107	6	82
20	Dieldrin	0,9999	25	7,5	84	3	84	4	78	6	87	18	82	5	79	5	17

21	Difeconazol	0,9987	25	7,5	114	6	109	4	95	12	86	16	116	7	115	3	550
22	Dissulfutom	0,9977	25	7,5	100	2	115	5	97	12	125	4	109	3	98	4	66
23	Endosulfan	0,9999	25	7,5	92	6	97	4	87	12	92	16	91	4	88	4	22
24	Epoxiconazol	0,9976	25	7,5	117	11	104	5	93	10	117	8	115	3	110	4	123
25	Etiona	0,9992	50	15	119	9	106	8	87	16	135	7	119	3	111	5	101
26	Etoprofós	0,9995	25	7,5	106	2	113	4	98	10	119	12	113	3	107	5	115
27	Etrinfós	0,9996	25	7,5	104	5	115	4	100	10	119	2	110	2	102	3	69
28	Fenamidona	0,9995	50	15	115	2	125	1	101	12	132	3	120	3	115	5	98
29	Fenarimol	0,9997	25	7,5	120	3	110	6	85	18	116	8	117	4	110	4	161
30	Fenitrotiona	0,9989	25	7,5	120	2	119	2	104	12	128	3	118	1	112	6	107
31	Fenpropatrina	0,9975	25	7,5	104	7	113	4	93	16	113	3	109	3	101	5	109
32	Fempropimorfe	0,9985	25	7,5	101	9	112	3	94	9	112	7	102	3	92	3	57
33	Fentiona	0,9989	25	7,5	116	6	115	5	99	11	128	4	109	4	101	4	88
34	Fenvrelato	0,9997	25	7,5	103	4	107	3	93	6	67	12	104	5	100	2	473
35	Fentoato	0,9900	100	30	114	9	149	5	100	2	25	19	80	5	99	8	130
36	Forato	0,9977	25	7,5	97	1	119	4	103	13	118	5	109	2	100	3	75
37	Fosfomete	0,9983	50	15	113	8	123	1	99	14	145	5	117	1	104	6	767
38	Fipronil	0,9994	25	7,5	121	1	117	5	92	13	119	9	123	4	113	11	217
39	Fluazifope-p-butílico	0,9994	25	7,5	118	4	117	5	94	13	118	6	116	2	111	5	191
40	Fluquinconazol	0,9986	25	7,5	89	9	116	9	97	8	108	8	111	5	107	4	126
41	Flusilazol	0,9996	25	7,5	119	4	117	4	94	12	120	3	118	4	111	4	82
42	Flutriafol	0,9967	25	7,5	116	4	103	6	89	11	111	9	116	3	114	5	140
43	Fostiazato	0,9950	25	7,5	120	5	132	5	102	19	113	6	106	6	98	8	216
44	Hexaconazol	0,9994	25	7,5	102	16	99	4	86	13	106	8	106	4	104	4	188
45	HCH-alfa	1,0000	25	7,5	92	3	98	4	92	6	98	10	94	2	91	2	17
46	HCH-beta	0,9999	25	7,5	97	4	106	3	96	6	93	8	90	3	90	3	15

47	HCH-gama	0,9999	25	7,5	98	4	103	4	95	5	98	10	95	3	94	3	2
48	Indoxicarbe	0,9990	25	7,5	96	5	107	3	101	5	96	7	98	3	97	2	59
49	Malationa	0,9987	25	7,5	116	3	126	2	107	12	128	4	119	3	110	5	85
50	Metconazol	0,9996	25	7,5	115	4	106	5	89	11	88	18	106	2	104	4	214
51	Metidationa	0,9987	25	7,5	117	4	119	2	101	15	126	4	118	4	109	5	159
52	Metolacloro	0,9999	25	7,5	108	3	115	4	97	7	108	12	106	3	102	3	60
53	Mevinfós, E-	0,9973	25	7,5	111	5	128	1	116	14	119	0	114	6	108	8	175
54	Mevinfós, Z-	0,9973	25	7,5	111	5	128	1	115	14	119	0	114	6	108	8	173
55	Miclobutanil	0,9996	25	7,5	117	5	117	4	100	10	115	6	115	3	111	4	84
56	Nuarimol	0,9996	25	7,5	109	5	106	6	87	14	102	9	110	3	108	5	128
57	Oxadixil	0,9993	25	7,5	120	7	113	4	98	10	123	1	117	4	110	4	84
58	Parationa-metílca	0,9987	25	7,5	107	5	119	2	100	11	126	3	112	3	102	5	89
59	Penconazol	0,9999	25	7,5	113	10	108	4	91	9	93	14	105	3	103	4	90
60	Pendimetalina	0,9966	25	7,5	106	9	90	7	69	13	127	7	112	4	98	7	67
61	Picoxistrobina	0,9998	25	7,5	120	5	115	3	100	10	114	5	114	2	111	4	155
62	Pirimicarbe	0,9985	25	7,5	110	6	123	3	107	11	128	3	117	3	107	5	89
63	Pirimifós-metil	0,9987	25	7,5	108	5	119	3	101	10	120	4	109	4	100	5	86
64	Profenofós	0,9967	25	7,5	115	6	118	5	85	13	117	6	107	5	97	5	273
65	Prometrina	0,9996	25	7,5	103	4	114	5	95	9	119	5	107	4	98	5	67
66	Propiconazol	0,9998	25	7,5	82	14	91	10	90	16	104	6	103	8	97	7	181
67	Pirazofós	0,9949	100	30	133	2	138	4	97	18	128	6	123	4	115	5	455
68	Pirimetanil	0,9994	25	7,5	95	3	110	9	95	10	118	7	103	5	96	5	138
69	Quinalfós	0,9989	25	7,5	101	2	116	6	97	10	113	7	107	3	100	5	111
70	Tebuconazol	0,9992	25	7,5	108	10	115	4	93	14	126	2	120	4	110	5	182
71	Tebufenpirade	0,9990	25	7,5	105	5	112	4	86	16	108	16	105	5	101	5	177
72	Teflutrina	0,9986	25	7,5	94	2	111	4	94	10	120	4	106	3	96	3	33

73	Terbufós	0,9988	25	7,5	108	17	110	6	97	10	115	13	114	5	101	4	77
74	Tetraconazol	0,9996	25	7,5	124	4	126	2	103	9	117	9	116	4	111	4	53
75	Triadimefona	0,9997	50	15	116	5	120	2	99	9	135	4	121	2	111	5	60
76	Triazofós	0,9982	100	30	118	6	133	1	109	12	121	3	119	3	114	4	238
77	Trifloxistrobina	0,9993	25	7,5	81	19	89	13	99	19	116	5	108	5	102	9	194
78	Trifluralina	0,9998	50	15	103	2	111	5	88	9	134	6	115	3	101	5	41
79	Vinclozolina	0,9995	25	7,5	105	7	116	3	101	9	119	11	107	3	101	3	51

Fonte: o autor

RSDr – Desvio padrão relativo a repetibilidade; RSDpi - Desvio padrão relativo a precisão intermediária; r^2 – Coeficiente de correlação; LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação.

4.3.2 Efeito Matriz

O efeito matriz (EM) foi calculado levando-se em consideração a inclinação das curvas analíticas no extrato da matriz (azeite de oliva) e no solvente (acetoneitrila). A faixa de concentração avaliada foi de 1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Pode-se dizer que os analitos que apresentam resultados de efeito matriz superior a 20% sofrem efeito significativo da matriz sob sua resposta cromatográfica (SANTE, 2017). Os resultados da avaliação do efeito matriz estão apresentados na Tabela 14.

Dos 79 compostos avaliados, apenas quatro compostos apresentaram efeito matriz inferior a 20% (HCH-alfa, HCH-beta, HCH-gama e dieldrin). A presença de coextrativos na amostra pode ocasionar a supressão ou aumento de sinal analítico. Devido a maioria dos compostos avaliados nesse trabalho apresentarem efeito matriz superior a 20%, optou-se por fazer as curvas de calibração sendo preparadas no extrato da matriz da “amostra branco”, afim de, minimizar possíveis problemas causados por este desvio e obter resultados mais exatos (DEME & UPADHYAYULA, 2015).

4.3.3 Exatidão e Precisão

Para avaliar a exatidão do método foi levado em consideração a recuperação dos agrotóxicos três níveis de fortificação 25, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=6). Os valores de recuperação (%) foram calculados levando em conta a curva analítica preparada no extrato da “amostra branco”. Conforme é recomendado pela legislação, considerou-se o critério de recuperação entre 70 e 120% e $\text{RSD} \leq 20\%$ (SANTE, 2019). Os resultados de recuperação e RSD estão apresentados na Tabela 14.

No nível de fortificação de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ sete compostos obtiveram recuperações não satisfatórias (benalaxil, carbofenotiona, cialotrina-lambda, fipronil, pirazofós, piridabem e tetraconazol), e apenas o composto benalaxil apresentou um RSD superior a 20%. Já no nível de fortificação de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ treze compostos não obtiveram valores de recuperação aceitáveis (cialotrina-lambda, diclorvós, fenamidona, fostiazato, malationa, mevinfós, parationa, fentoad, fosfomete, pirimicarbe, pirazofós, tetraconazol e triazofós), porém, todos apresentaram valor de $\text{RSD} \leq 20\%$.

No nível de fortificação de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ todos os compostos tiveram valores aceitáveis de recuperação e RSD. Além da precisão, também foi avaliado a precisão intermediária. Para esse ensaio, realizou-se os mesmos testes da validação, com diferença de 7 dias, sendo realizado pelo mesmo analista, no mesmo local e com o mesmo equipamento. Na precisão intermediária, 24 compostos não apresentaram bons resultados de recuperação (70-120%), mas todos apresentaram valores de $\text{RSD} \leq 20\%$. As diretrizes sobre os critérios de desempenho para os métodos de análise para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (FAO, 2017) afirma que, em certos casos, recuperações abaixo da faixa podem ser aceitáveis, desde que sejam consistentes, ou seja, demonstrando boa precisão ($\text{RSD} \leq 20\%$).

Apenas dois compostos foram excluídos na etapa de validação, Piridabem que na etapa de precisão apresentou valores de recuperação muito baixos (9%) e de RSD muito alto (42%) no nível $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o Paration na etapa da precisão intermediária apresentou valores de recuperação fora da faixa aceitável (70-120%).

Deste modo, dos 109 compostos inicialmente selecionados, 81 foram avaliados, pois nos testes obtiveram bons resultados de recuperação e RSD (70-120% e $\leq 20\%$), porém, 79 compostos foram validados, pois apresentaram resultados considerados adequado, de recuperação e RSD, durante a etapa de validação do método.

4.3.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram obtidos de acordo com o item 3.7 e estão apresentados na Tabela 14. A variação para o LOQ foi de 25 a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto que o LOD variou de $7,5$ a $30 \mu\text{g kg}^{-1}$. Dos 79 agrotóxicos validados neste trabalho, mais de 84% apresentaram LOQ de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ e LOD de $7,5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os outros 16%, 9 agrotóxicos apresentaram LOQ de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e LOD de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 3 apresentaram LOQ de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e LOD de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Conforme descrito anteriormente, a ANVISA estabelece limite máximo de resíduos para poucos compostos na matriz de azeitona, dentre os validados neste trabalho, apenas o Difeconazol (LMR de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$) e Cresoxim-metil (LMR de $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$). Já o *Codex Alimentarius* estabelece LMR para outros agrotóxicos (Tabela 4). Todos os agrotóxicos estabelecidos na legislação vigente (ANVISA) foram

contemplados no método proposto e apresentam LOQ e LOD abaixo dos LMR estabelecidos.

5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE AZEITE DE OLIVA

O método validado foi aplicado em 18 amostras de azeite de oliva de marcas nacionais, produzidas no estado do Rio Grande do Sul nas cidades de Formigueiro, Bagé, São Sepé, Caçapava do Sul, Dom Feliciano, Pinheiro Machado e Bento Gonçalves. Das 18 amostras avaliadas, 13 apresentaram resíduos de agrotóxicos, como mostrado na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados em mg kg^{-1} das 13 amostras de azeite de oliva (que apresentaram resíduos de agrotóxicos) analisadas utilizando o método validade por GC/MS-MS.

Resíduo de Agrotóxico Encontrado (mg kg^{-1})					
Amostras	Cresoxim-metil	Picoxistrobina	Tebuconazol	Tetraconazol	Trifloxistrobina
A1	n.d.	<LOQ	0,961	0,159	n.d.
A2	n.d.	n.d.	0,128	n.d.	n.d.
A3	n.d.	n.d.	0,102	n.d.	n.d.
A4	n.d.	n.d.	0,033	n.d.	n.d.
A6	n.d.	n.d.	0,089	n.d.	n.d.
A7	n.d.	n.d.	0,069	n.d.	n.d.
A10	n.d.	n.d.	0,092	n.d.	n.d.
A11	n.d.	n.d.	0,139	n.d.	n.d.
A12	0,038	n.d.	0,260	n.d.	0,038
A13	n.d.	<LOQ	1,980	n.d.	n.d.
A15	<LOQ	n.d.	0,086	n.d.	<LOQ
A16	0,031	n.d.	0,233	n.d.	n.d.
A17	n.d.	<LOQ	0,156	n.d.	n.d.
<i>LMR (mg kg^{-1})</i>					
ANVISA	1,5	-	-	-	-
EU	0,20	0,01	0,5	0,02	0,30
CODEX	0,7* e 0,20	-	0,05	-	0,9* e 0,30

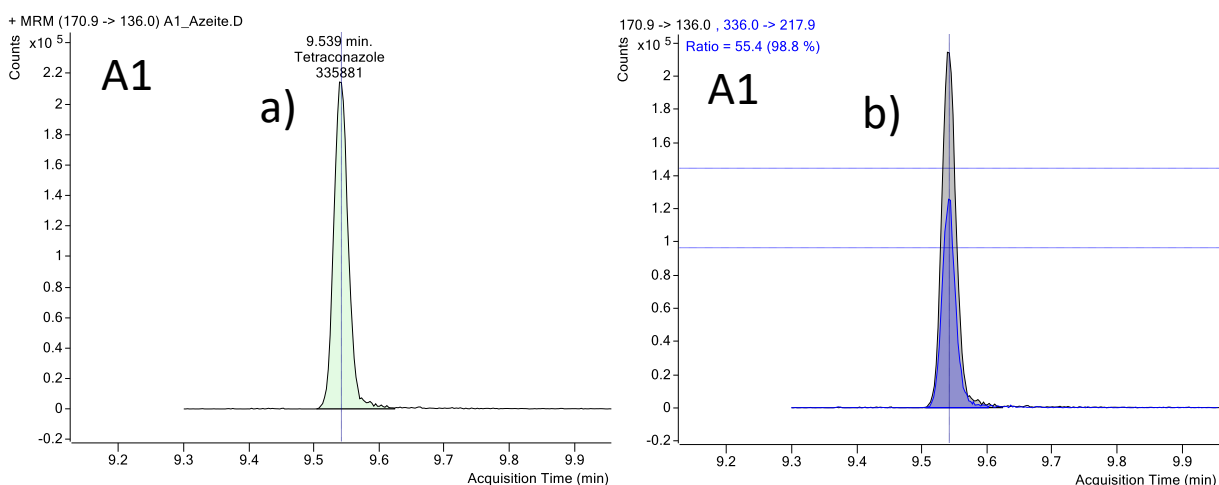
n.d. = não detectado.

*LMR estabelecido para azeite de oliva virgem

Dos 81 agrotóxicos avaliados neste estudo, apenas 5 (picoxistrobina, tetraconazol, cresoxim-metil, tebuconazol e trifloxistrobina) foram quantificados e/ou detectados nas amostras analisadas. A Figura 16 mostra o cromatograma do

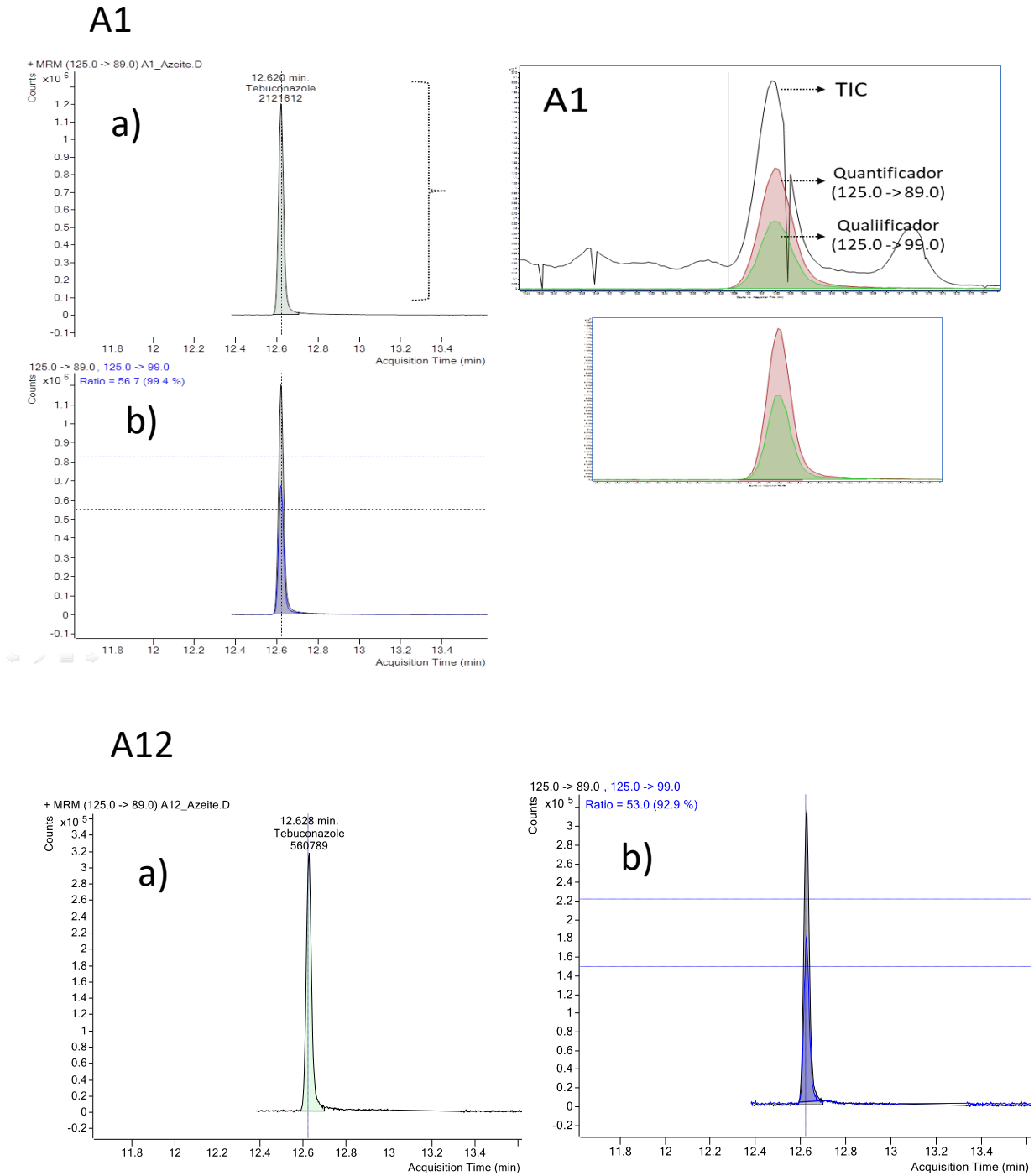
composto tetraconazole para a amostra 1 (0,159 mg kg⁻¹). Este é um fungicida que não possui seu uso autorizado para o cultivo de azeitonas no Brasil. Esse agrotóxico já foi encontrado em azeites de oliva em outros países como Grécia e Espanha, porém em concentrações menores (FERRONATO G. et al. 2018).

Figura 16 – Cromatogramas do composto tetraconazol (a) obtido por GC-MS/MS na amostra A1 de azeite de oliva, com sua transição de quantificação e identificação (b).

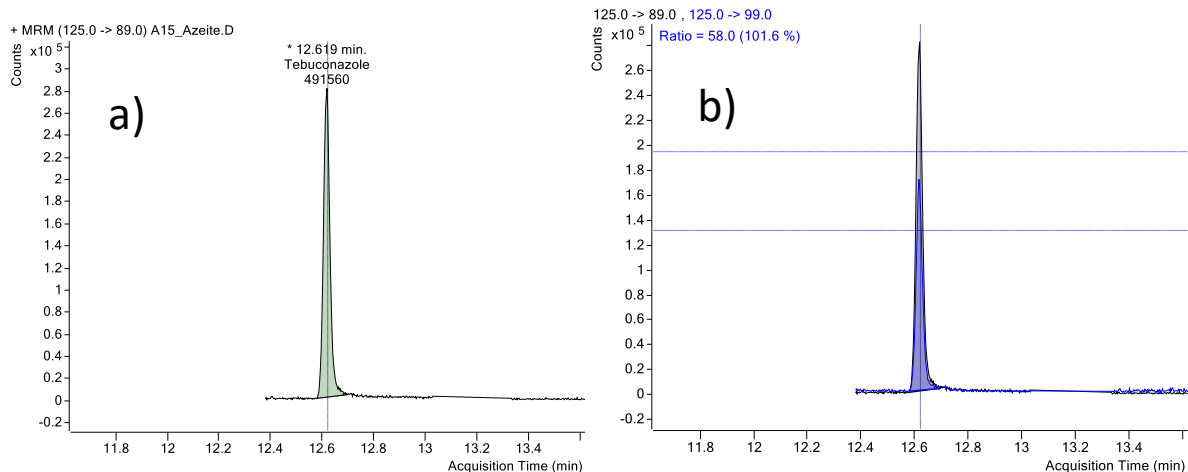


O agrotóxico tebuconazol foi detectado em 13 amostras (A1, A2, A3, A4, A6, A7, A10, A11, A12, A13, A15, A16 e A17). Esta substância é um fungicida sistêmico do grupo triazol, que controla eficientemente manchas de alternária e Cercosporiose (doença fungica da oliva) (EMBRAPA, 1999). Por esse motivo, é muito utilizado em plantações de oliveiras. Todas as amostras positivas com esse agrotóxico tiveram concentrações acima do LMR permitido pelo *Codex Alimentarius* (0,05 mg kg⁻¹), com exceção da amostra A4 (0,033 mg kg⁻¹). A Figura 17 apresenta cromatogramas do agrotóxico tebuconazol presente nas amostras A1, A12 e A15.

Figura 17 - Cromatogramas do composto tebuconazol (a) obtido por GC-MS/MS em amostras de azeite de oliva (A1, A12 e A15), com sua transição de quantificação e identificação (b).



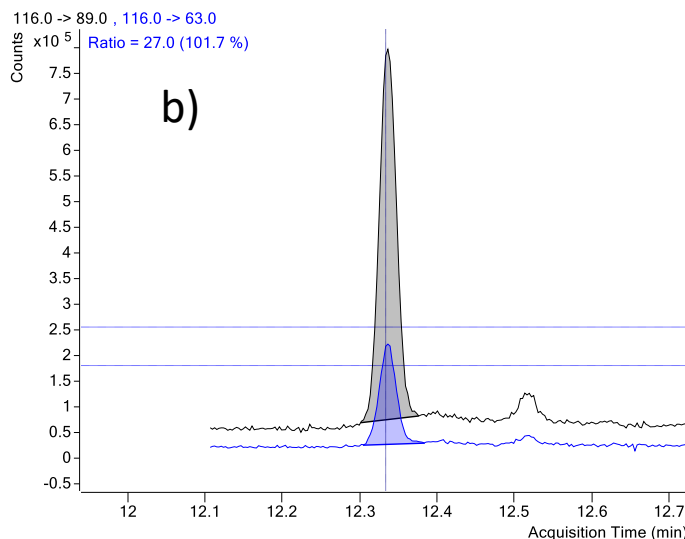
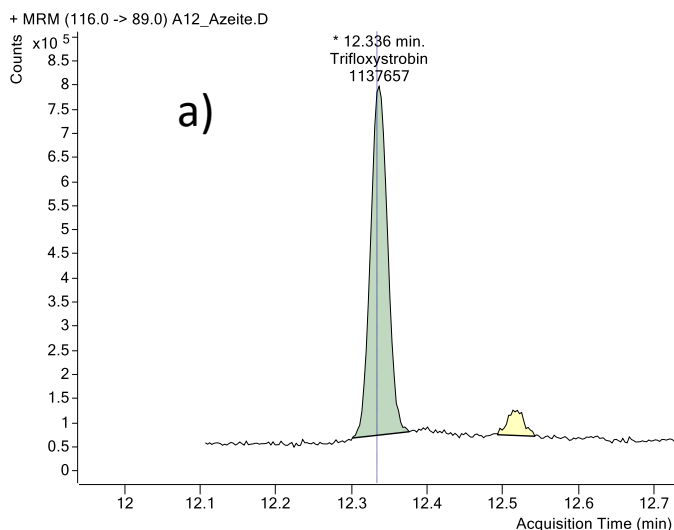
A15



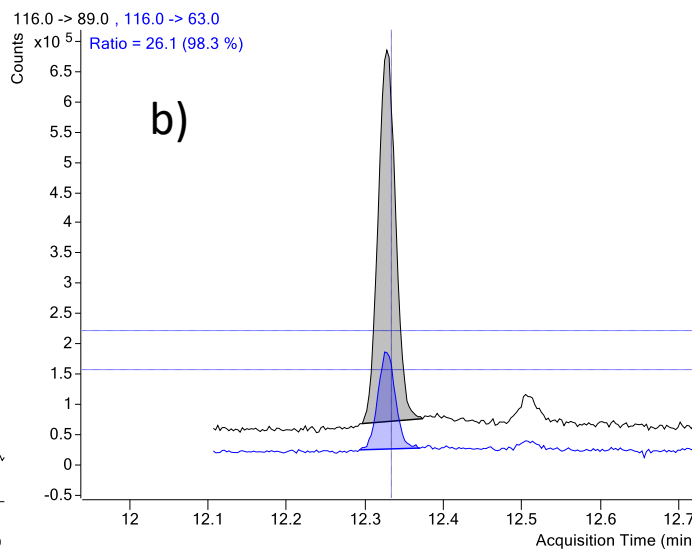
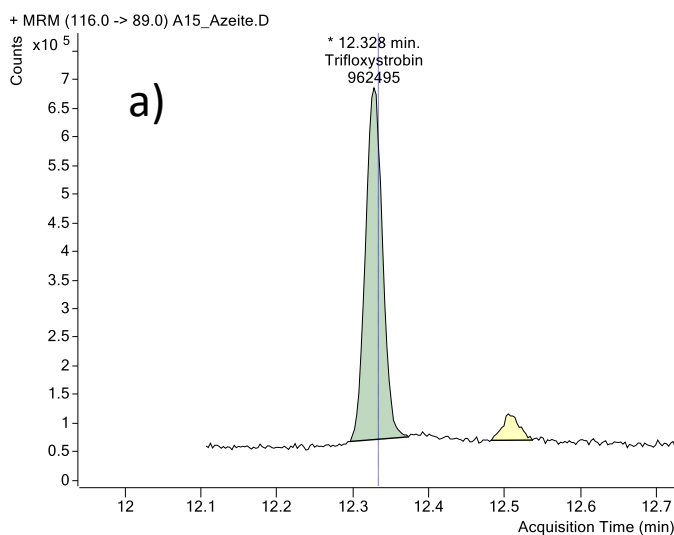
Outros compostos que foram detectados nas amostras de azeite de oliva, foram o cresoxim-metil (A12, A15 e A16) e trifloxistrobina (A12 e A15). A legislação brasileira (ANVISA) tem limite estabelecido para o cresoxim-metil com LMR de 1,5 mg kg⁻¹ (azeitona) e o *Codex Alimentarius* tem limite estabelecido para cresoxim-metil com LMR de 0,7 mg kg⁻¹ (azeite) e 0,20 mg kg⁻¹ (azeitona) e para o agrotóxico trifloxistrobina com LMR de 0,9 mg kg⁻¹ (azeite) e 0,30 mg kg⁻¹ (azeitona). Nas amostras analisadas, todas as concentrações destas duas substâncias estavam abaixo do LMR permitido, variando sua concentração de <LOQ a 0,038 mg kg⁻¹. A Figura 18 apresenta os cromatogramas do composto trifloxistrobina positivo nas amostras A12 e A15.

Figura 18 - Cromatogramas do composto trifloxistrobina (a) obtido por GC-MS/MS em amostras de azeite de oliva (A12 e A15), com sua transição de quantificação e identificação (b).

A12



A15



O agrotóxico picoxistrobina também foi detectado nas amostras A1, A13 e A17 com concentrações <LOQ, porém, este composto não é permitido pela legislação brasileira (ANVISA).

6 CONCLUSÕES

Este trabalho constituiu em desenvolver e validar um método analítico para determinação de diferentes classes de agrotóxicos em azeite de oliva. Foram avaliados diferentes métodos de preparo de amostra, utilizando o método QuEChERS. Os resultados demonstraram que o método QuEChERS proposto, seguido de uma etapa de precipitação a baixa temperatura (LTP), proporcionou uma maior remoção de coextrativos do extrato da matriz, uma vez, que isso poderia interferir na análise cromatográfica. E posteriormente, a etapa de limpeza com PSA e C18, e considerando que recuperou o maior número de compostos, foi o método mais adequado.

Devido a matriz da amostra azeite de oliva apresentar alta complexidade, utilizou-se a etapa de precipitação a baixa temperatura (LTP) que ajuda a reduzir os coextrativos que apresentam baixa solubilidade no solvente extrator e minimiza a presença de coextrativos provenientes de amostra com alto teor de gordura. Também a utilização da etapa de limpeza com PSA, que remove ácidos graxos da matriz e o C18 que diminui os coextrativos presentes na matriz, principalmente compostos lipofílicos. Portanto, isso, proporciona uma maior confiabilidade dos resultados.

A otimização das condições do sistema GC-MS/MS proporcionou a separação e determinação de 81 multirresíduo de agrotóxicos com seletividade e detectabilidade. O método proposto apresentou-se simples, rápido e eficaz para a determinação de 79 agrotóxicos de diferentes classes em azeite de oliva.

O método apresentou todos os parâmetros de validação de acordo com os parâmetros do Guia de Validação da SANTE (2019). Os limites de quantificação obtidos atendem valores de LMR estabelecidos pela ANVISA e *Codex Alimentarium*.

Os resultados de recuperação obtidos foram satisfatórios, na faixa entre 70 a 120% para 79 dos 81 compostos inicialmente avaliados, com valores de RSD $\leq 20\%$. Este método apresentou valores de LOD de $7,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQ de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a maioria dos compostos analisados.

Dentre os 79 agrotóxicos avaliados, 5 foram detectados em 13 diferentes amostras de azeite de oliva, mas apenas 4 destes são permitidos por legislação – ANVISA e *Codex Alimentarius* - (cresoxim-metil, tebuconazol, tetraconazol e

trifloxistrobina) estando dentro dos limites estabelecidos. Com exceção do tebuconazol que apresentou valores acima do LMR estabelecido pelo *Codex Alimentarius* ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$) para maioria das amostras. Os valores de concentração de resíduos de agrotóxicos encontrados nas amostras de azeite de oliva são considerados baixos, portanto, o risco de intoxicação crônica ou aguda é baixo.

Dessa forma, conclui-se que o método proposto validado, mostrou-se eficaz para a determinação de agrotóxicos em azeite de oliva, visto que todos os parâmetros de validação se encontram dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos. Assim, pode-se dizer que o método pode ser aplicado em análises de azeite de oliva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, M.P.; BELTRÁN, G.; ORTEGA, D.; FERNÁNDEZ, A.; JIMÉNEZ, A. Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: „Frantoio' and „Leccino', grown in Andalusia. **Food Chemistry**, v. 89, n. 3, p. 387-391, 2005.

ALBA, J. **Elaboracion del aceite de oliva virgen**. In: Barranco, D., FernandezEscobar, R., & Rallo, L. (Eds.). El cultivo del olivo. Córdoba: Mundi-prensa, 2004, p. 615 – 656.

ALBIN A.; VILLAMIL J. **Aceite de oliva: tradicional sabor mediterrâneo, rejuvenecido em terras Uruguayas**. Montevideo. Editora de Vecho, 2003. P, 25-28.

ALBIÑANA, L. I. **Guía completa del cultivo del olivo**. Barcelona: Editorial de Vecchi, 2002. 126 p.

ALMULLA, S. A. M. H. Determination of multiple pesticides residues in imported tea in UAE using liquid and gas chromatography and tandem mass spectrometry. **Dissertação de Mestrado**, Universidade dos Emirados Árabes Unidos. Disponível em: <https://scholarworks.uaeu.ac.ae/cgi/viewcontent.cgi?article=1328&context=all_theses>. Acessado em: 30 jan 2022.

ANGEROSA, F.; CAMPESTRE, C.; GIANSANTE, L. **Analysis and authentication**. In Olive oil: Chemistry and Technology. BOSKOU, D (ed) (second edition). AOCS Press, Champaign. Illinois, 2006.

ANTONIASSI, et al., Avaliação das características de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva. **Braz.J.FoodTechnology**.,Campinas,jan/dez.1998.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Ministério da Saúde. RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica

de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 31 jul. 2019.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Ministério da Saúde. RDC nº 166, de 24 de junho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 25 jul. 2017.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Monografias Autorizadas**. [s.d.]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimenta (PARA)**. Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. Brasília. 2019.

APARÍCIO, R.; HARWOOD, J. (2003). **Manual del aceite de oliva**. Ediciones MundiPrensa, Madrid.

BACCOURI, O.; GUERFEL, M.; BACCOURI, B.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; LERCKER, G.; ZARROUK, M.; DAOUD MILED, D.D.B. Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. **Food Chemistry**, v. 109, p. 743-754, 2008.

BANDEIRA, D. D.; MUNARETTO, J. S.; RIZZETTI, T. M.; FERRONATO, G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R.; ADAIME, M. B. Determinação de resíduos de agrotóxicos em leite bovino empregando método QuEChERS modificado e GC-MS/MS. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 900-907, 2014.

BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, n. 2, p. 151-162, 2007.

BOSKOU, D. **Olive oil: Chemistry and technology**. Champaign, IL:AOCS Press. 1996.

BRASIL b, 2017. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de julho de 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 02 de fev de 2022.

BRASIL PRÓXIMO. Experiências e Resultados. **Programa descentralizado de cooperação Brasil – Itália**, Brasília, p. 7-19, 2010.

BRASIL, 2002. Decreto n. 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamento a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 11 de julho de 1989. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumosagropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/lei7802-1989-lei-dos-agrotoxicos/view>. Acesso em: 26 de jan. de 2022.

BRASIL, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Relatório de Análise de Azeite de Oliva Extravirgem**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 1, 30 de janeiro de 2012. Regulamento técnico dos azeites de oliva e do óleo de bagaço de oliva. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 23, p. 5-8, 01 fev. 2012. Seção 1.

BRITO, N.M. et al. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão.

Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente, v. 13, p. 129-146. Curitiba, jan./dez. 2003.

BRUZZONITI, M.C. et al. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 406, p. 4089-4116. Itália, 2014.

CABRERA, L. C. **Estudo do efeito matriz na determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de arroz pelo método QuEChERS modificado e LC-MS/MS**. 2012. 138 p. Dissertação (Pós-graduação em Química – Química Analítica)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2012.

CAI, H. et al. Determination of 11 photoinitiators and their migration into tea and milk by gas chromatography-tandem mass spectrometry (MSPD-GC-MS/MS). **Analytical Methods**, v. 9, n. 20, p. 2957-2963, 2017.

CALDAS, S. S a. et al. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. **Talanta**, v. 112, p. 63-68, 2013.

CAO, Y. et al. A novel method based on MSPD for simultaneous determination of 16 pesticide residues in tea by LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 998, p. 72-79, 2015.

CARDOSO, Luiz Gustavo Vieira. **Características físico-químicas e avaliação do perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas em Minas Gerais – Brasil**. Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, 2006.

CERT, A.; MOREDA, W.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils (Review). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.881, p.131-148, 2000.

CHEN, J. et al. Vortex-homogenized matrix solid-phase dispersion coupled with gas

chromatography–electron-capture negative-ion mass spectrometry to determine halogenated phenolic compounds in seafood. **RSC Advances**, v. 6, n. 99, p. 96510-96517, 2016.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636. São Paulo, 2008.

CHUNG, S. W. C; CHEN, B. L. S. Development of a multiresidue method for the analysis of 33 organochlorine pesticide residues in fatty and high water content foods. **Chromatographia**, v. 78, n. 7-8, p. 565-577, 2015.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. 1995.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação CalousteGulbenkian, 1978. v. 1, p. 1031.

COSTA, L. T. **Desempenho competitivo da cadeia produtiva do azeite de oliva extravirgem no Rio Grande do Sul**. (Dissertação de Mestrado em Agronegócios). Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, 2019. 97 p.

COUTINHO, E. F. **A cultura da oli A cultura da oliveira**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 143 p.

COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO , T. H. **Cultivo de Oliveira (Olea europaea L.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 125 p. (Sistema de Produção, 16)

CRIADO, M. N.;ROMERO, M. P.; CASANOVAS, M.; MOTILVA, M. J. Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during

two consecutive crop seasons. **Food Chemistry**, v. 110, p. 873–880, 2008.

EMATER, Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Colheita de oliveiras no RS**, Bagé, 2015. Disponível em: . < [Emater/RS - Referência de Qualidade em Extensão Rural \(tche.br\)](#)>Acesso em: 25 jan. 2022.

EPAMIG. Azeite de oliva: conceitos, classificação, usos e benefícios para a saúde humana. **Circular técnica**, Belo Horizonte, n. 40, set. 2008.

FAKOURELIS, N.; LEE, E. C.; MINN, D. B. Effects of chlorophyll and b-carotene on the oxidation stability of olive oil. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 234–235, 1987.

FERNÁNDEZ, M. H.; OJEDA, M.; RODRÍGUEZ, A.; BERNARDINO, J.; RUIZ, L.; GARCÍA, A. (1991). **Elaboracion de aceite de oliva de calidad**. Junta de Andalucía, Dirección General de Investigación, Tecnología e Formación Agroalimentaria y Pesquera, 5/91 Apuntes. Sevilla.

FERRONATO, G. et al. Determination of organochlorine pesticides (OCPs) in breast milk from Rio Grande do Sul, Brazil, using a modified QuEChERS method and gas chromatography-negative chemical ionisation-mass spectrometry. **International journal of environmental analytical chemistry**, v. 98, n. 11, p. 1005-1016, 2018.

FIGUEIREDO, E.C.; BORGES, K.B.; QUEIROZ, M.E.C.. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1ª ed. LTC, Rio de Janeiro, 2015.

FIGUERES, F. G.; MONILLAÓ, J. J. D.; SANZ, V. M.; TENA, E. P. Influencia de los ataques fúngicos en la pérdida de calidad del aceite de oliva. **Fruticultura Profesional**: (Barcelona), v. 2, n. 88, p. 131-135, 1997.

GRANADOS, J. A. (2000). **Enciclopèdia del aceite de oliva**. Editorial Planeta S. A., Barcelona.

GUCCI, R. Ecofisiologia. In: FIORINO, P. **Olea**: tratat Olea: to di olivicoltura. Bologna: Edagricole, 2007. p. 77-111.

GUIDE FOR THE DETERMINATION OF THE CHARACTERISTICS OF OIOLIVES.
COI/OH/Doc. No 1, Espanha, n. 1, nov. 2011.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Programa de Análises de Produtos. **Relatório de Análises de Azeite de Oliva Extra Virgem**. Rio de Janeiro, 2015. 21 p. Disponível em: Acesso em: 16 de jan. 2021

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Azeite de Oliva: Normas e documentos de referência**. Resolução nº. 22/77 – CNPA, Ministério da Saúde, 2000. Disponível em: .< Orientações para o consumidor — Português (Brasil) (www.gov.br)> Acesso em: 20 jan. 2022.

INMETRO. Norma nº **DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos**. rev. 09. Rio de Janeiro. Jun. 2020.

ISSAOUI, M.; DABBOU, S.; BRAHMI, F.; HASSINE, K. B.; ELLOUZE, M. H.; HAMMAMI, M. Effect of extraction systems and cultivar on the quality of virgin olive oils. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 44, p. 1713-1720, 2009.

JADHAV, M. R. et al. A unified approach for high-throughput quantitative analysis of the residues of multi-class veterinary drugs and pesticides in bovine milk using LCMS/MS and GC–MS/MS. **Food chemistry**, v. 272, p. 292-305, 2019.

JORGE, R. O. **Caracterização de azeites virgen extra "Gourmet" varietais e "Blends" comercializados nomercado do Rio Grande do Sul**. 2010. 103f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Programa de PósGraduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas.

LAMBROPOULOU, D.A.; ALBANIS, T.A. **Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review**. Anal Bioanal Chem, p. 1663-1683,

Grécia, 2007.

LAMBROPOULOU, D.A.; ALBANIS, T.A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. **Anal Bioanal Chem**, p. 1663-1683, Grécia, 2007.

LANÇAS, F. M.; PELISSON, L. Extração por fluído supercrítico (SFE). In: BORGES, K. B. et al. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro, LTC, 2015. cap. 22.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). PNCRC/Vegetal, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/copy_of_pncrc-vegetal>. Acesso em: 30 jan. 2022.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Olivas**. Instrução Normativa nº 1, de 30 de Janeiro de 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. **Lipídeos**. In: Química de Alimentos de Fennema. Eds. DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p., p. 131 – 178.

MEIRA, A. P. G. Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 22, n. 2, p. 766-777. Campinas, 2015.

MÉNDEZ, A. I.; FALQUÉ, E. Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. **Food Control**, v. 18, p. 521–529, 2007.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria**

de alimentos. São Paulo:Varela, 1998. 150p.

MOYANO, M. J.; MELENDEZ-MARTINEZ, A. J.; ALBA, J.; HEREDIA, F. J. A comprehensive study on the colour of virgin olive oils and its relationship with their chlorophylls and carotenoids indexes (I): CIEXYZ non-uniform colour space. **Food Research International**, v. 41, p. 505–512, 2008.

NELSON, DAVID L.; M. COX, MICHAEL. **Princípios de Bioquímica de Lehninger** - 6ª Ed. 2014. Artmed.

NUNES, S. P. 2007. **Produção e consumo de óleos vegetais no Brasil.** Deser, nº159, jun/2007.

OLIVA, Associação Brasileira de produtores, importadores e comerciantes de azeite de oliva. **A história de um dos alimentos mais antigos do mundo**, São Paulo, 2016. Disponível em: < <http://www.oliva.org.br/azeite>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

OLIVAS DO SUL. **Azeite de Oliva**, Cachoeira do Sul, 2016. Disponível em: < [Olivas do Sul](#)> Acesso em: 25 jan. 2022.

OLIVOPAMPA. **Quem somos**, Santana do Livramento, 2016. Disponível em: < http://olivopampa.com.br/?page_id=18>. Acesso em: 25 jan. 2022

ORDÓÑEZ , J. A. et al. **Tecnologia de alimentos:** componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294p.

OSKOU, D. **Química y tecnología del aceite de oliva.** AMV Ediciones, MundiPrensa. Madrid, 1998.

PAN, X. L. et al. Progress of the discovery, application, and control technologies of chemical pesticides in China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 4, p. 840-853, 2019.

PARDO, J. E.; CUESTA, M. A.; ALVARRUIZ, A. Evaluation of potential and real quality of virgin olive oil from the designation of origin "Aceite Campo de Montiel" (Ciudad Real, Spain). **Food Chemistry**, v. 100, p. 977-984, 2007.

PEIXOTO, E. R. M.; SANTANA, D. M. N.; ABRANTES, S. Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva: Proposta para atualização da legislação brasileira. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, (Campinas), v.18, n. 4, p. 363-470, out./dez. 1998.

POULIAREKOU, E.; BADEKA, A.; TASIOULA-MARGARI, M.; KONTAKOS, S.; LONGOBARDI, F.; KONTOMINAS, M.G. Characterization and classification of Western Greek olive oils according to cultivar and geographical origin based on volatile compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7534 – 7542, 2011.

PRESTES, O.D. et al. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634. Brasil, 2009.

PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidade e tendências no preparo de amostras para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**. v. 3, n. 1, p. 51-64. Brasil, 2011.

RAINA, R. Chemical Analysis of Pesticides Using GC/MS, GC/MS/MS, and LC/MS/MS. In: **Pesticides-Strategies for Pesticides Analysis**. IntechOpen, 2011.

ROCA, M.; MINGUEZ-MOSQUERA, M. I. Change in the natural ratio between chlorophylls and carotenoids in olive fruit during processing for virgin olive oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, n. 2, p. 133–138, 2001.

RODRIGUES, Jéssica. **Azeites de Oliva da Região da Serra da Mantiqueira: Estudo Químico e Sensorial para Caracterização da Qualidade**. Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, 2015.

ROSA, Rosilene. **Crêterios de harmoniza o de azeites: uma proposta metodológica**. Brasília: Universidade de Brasília, 2009. ROZENFELD, Henrique et al. Gestão de desenvolvimento de produtos. São Paulo: Saraiva, 2006.

SANTANA-MAYOR, A. et al. Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 214-235, 2019.

SANTE, EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Document n  SANTE/12682/2019**. 01 jan. 2020.

SANTOS J. F. **El contexto de la olivicultura, la producción y el consumo de aceite de oliva en el mundo**. Tesis Doutoral, 2002. p. 295-319. Disponível em: <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/8871/Tjfs04de23.pdf?sequence=4>. Acesso em: 16 jan. 2022.

SANTOS, R. D.; GAGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T.; CASELLA FILHO, A.; ARAÚJO, D. B.; CESENA, F. Y.; ALVES, R. J. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 9, n.2 (Supl. 2), p. 1-28, 2012.

SEAPI, Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irriga o. **Plantio de oliveira expande produ o de azeite no Pampa gaúcho**, Piratini, 2013. Disponível em: .< [Plantio de oliveira expande produ o de azeite no Pampa gaúcho - Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural](#)> Acesso em: 25 jan. 2022.

SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, **Pr  Oliva**. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/pro-oliva>>. Acesso em: 16 jan. 2022.

SOARES, K. L. et al. Evaluation of alternative environmentally friendly matrix solid

phase dispersion solid supports for the simultaneous extraction of 15 pesticides of different chemical classes from drinking water treatment sludge. **Chemosphere**, v. 182, p. 547-554, 2017.

T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de Espectrometria de Massas em Língua Portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

TAPIA et al. **Manual del cultivo del olivo**. La Cerena: INIA, o. 2003. 128 p. (INIA. Boletín, 101).

TECNOPLANTA, produção de mudas e serviços. **Produção de Azeite Tecnoplanta**, Barra do Ribeiro, 2012. Disponível em: .< [.:: Tecnoplanta Ltda ::.](#)> Acesso em: 25 jan. 2022.

TOUS, J.; ROMERO, A.; PLANA, J.; GUERRERO, L.; DÍAZ, I.; HERMOSO, F. Características de los aceites de oliva virgen de la variedad „Arbequina“. **Fruticultura Profesional**:(Barcelona), v. 2, n. 88, p. 57-58, 1997.

UCEDA, M.; HERMOSO, M.; AGUILERA, M. P. La calidad Del aceite de oliva. In: **El cultivo del olivo**. BARRANCO, D.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (Eds.). 5. ed. Córdoba: Mundi-prensa, 2004, 800p.

UCEDA, M.; JIMÉNEZ, A.; BELTRÁN, G.; GARCIA-ORTIZ, C.;AGUILERA, M. P. Elaboração de azeite de oliva de qualidade. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 231, p. 90-96, mar./abr. 2006.

VESSECCHI, R.; LOPES,N. P.; GOZZO,F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. VILLALTA, L. **Obtención del aceite de oliva virgen**.2 ed. Editorial Agrícola Española, S.A: Madrid. 1999.

WONG, M. Y-M.;SO, P-K.; YAO, Z-P. Direct analysis of traditional Chinese medicines by mass spectrometry. *Journal os Chromatography B*, v. 1026, p. 2-14,

2016.

World Health Organization. Disponível em: <http://who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/>. Acessado em: 30 jan. 2022.

WREGGE, M. S; et al. **Zoneamento Agroclimático para Oliveira no Estado do Rio Grande do Sul**. Pelotas. EMBRAPA, 2009.

YADAV, I.C.; DEVI, N.L. Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. **Environmental science and engineering: Toxicology**. Cap. 7, v. 6, p. 140-158. 2017. Disponível em: . Acesso em: 26 jan. 2020.

ZANELLA, R. et al. High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis, editado por Tomasz Tuzimski e Joseph Sherma. CRC Press Taylor & Francis Group 2015 (582 Hal). Chapter 13 – **Quantitative Analysis and Method Validation**, p. 303-324, 2015.

NUP: 23081.088180/2022-18

Prioridade: Normal

Ato de entrega de dissertação/tese

134.334 - Dissertação e tese

COMPONENTE

Ordem	Descrição	Nome do arquivo
3	Dissertação de mestrado (134.334)	Juliana .pdf

Assinaturas

22/08/2022 16:02:05

OSMAR DAMIAN PRESTES (PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR)
02.35.00.00.0.0 - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQMC



Código Verificador: 1750189

Código CRC: da9bd80d

Consulte em: <https://portal.ufsm.br/documentos/publico/autenticacao/assinaturas.html>

