

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

Estéfani Michele Czyzeski de Matos

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM AVEIA
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE**

MESTRADO

Santa Maria, RS

2019

Estéfani Michele Czyzeski de Matos

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM AVEIA
EMPREGANDO CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria - RS

2019

de Matos, Estéfani Michele Czyzeski
DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM AVEIA
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE / Estéfani Michele
Czyzeski de Matos.- 2019.
91 p.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella
Coorientadores: Martha Bohrer Adaime, José Antônio
Gonzalez da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

1. Aveia 2. Multirresíduos 3. Agrotóxico 4. QuEChERS
5. LC-MS/MS I. Zanella , Renato II. Bohrer Adaime,
Martha III. Gonzalez da Silva. José Antônio IV. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Estéfani Michele Czyzeski de Matos

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM AVEIA
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE**

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

Aprovada em 27 de fevereiro de 2019



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



Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)



Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)

Santa Maria, RS

2019

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, pois o agir de Deus é lindo na vida de quem é fiel.

Gratidão a minha família, minha base, meu forte. Sem vocês nada disso seria possível.

Gratidão à minha mãe Sandra, e o meu pai João, meus principais motivadores para que este sonho se tornasse realidade e meus irmãos Arthur e Miguel pelo carinho de vocês. Amo vocês!

Gratidão ao meu esposo Henrique Siede, pelo apoio durante esta jornada, que sempre me apoiou na realização desta etapa. Amo você meu bem!

Gratidão aos meus colegas da família Central Analítica, Ivanice, Fernanda, Lidi, Junior e Luci.

Gratidão a minha grande amiga Lediane que sempre esteve ao meu lado me apoiando para que este sonho se tornasse realidade.

Gratidão aos meus tios Josse e Giovani, por todos os momentos que dedicaram e sempre dispostos a me ajudar.

Gratidão ao professor Dr. Renato Zanella, por ter me dado a oportunidade de participar do Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas – LARP. Pelos ensinamentos, pela compreensão e pela receptividade.

Gratidão pela orientação, colaboração e amizade da colega Lucila, que me deu suporte necessário para que esta pesquisa fosse desenvolvida da melhor maneira possível. Gratidão imensa!

Gratidão a todos os colegas do LARP, que me acolheram durante estes anos principalmente aos amigos Rômulo, Fernanda e Giovana. Gratidão a todos os mestres que de uma forma ou outra colaboraram, os professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) da UFSM.

Gratidão a minha banca de defesa, Dr. Renato Zanella, Dr. Osmar D. Prestes e Dr. Fábio Ferreira Gonçalves pelas contribuições e sugestões a fim de engrandecer esta pesquisa.

Gratidão!

RESUMO

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM AVEIA EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE

AUTORA: Estéfani Michele Czyzeski de Matos

ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Zanella

Muitos agrotóxicos são usados para controle de pragas durante a produção e armazenamento de aveia, tornando necessário empregar métodos multiclasse para determinação de resíduos de agrotóxicos. Para este propósito, o método QuEChERS possibilita um preparo de amostra adequado e, associado à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS), permite a determinação multirresíduo de um grande número de pesticidas em níveis baixos. Neste trabalho, diferentes sorventes, como quitosana, Forisil®, C18, PSA, Supel QuE Z-Sep⁺ e EMR-Lipid foram avaliados quanto a eficiência na limpeza do extrato por extração em fase sólida dispersiva. O método QuEChERS original teve o melhor desempenho e o biossorvente quitosana apresentou resultados semelhantes aos outros sorventes convencionais avaliados e por ser um sorvente biodegradável eficiente e de baixo custo, esse sorvente foi escolhido para a etapa de limpeza do extrato. O método proposto apresentou exatidão e precisão adequadas, com recuperação entre 70 e 120% e RSD < 20%, para a determinação de resíduos de 60 agrotóxicos em aveia por LC-MS/MS. Os limites de quantificação do método variaram entre 5 e 100 µg kg⁻¹. O método foi aplicado com sucesso em amostras reais e é uma opção adequada para análises de rotina.

Palavras chave: aveia, multirresíduos, agrotóxico, QuEChERS, LC-MS/MS.

ABSTRACT

MULTIRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN OAT BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY

AUTHOR: Estéfani Michele Czyzeski de Matos

ADVISOR: Prof. Dr. Renato Zanella

Many pesticides are used for pest control during oat production and storage, making necessary to employ multi-class methods for pesticide residues determination. For this purpose, the QuEChERS method allows adequate sample preparation and, coupled with liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), allows the multiresidue determination of a large number of pesticides at low levels. In this work, different sorbents, such as chitosan, Forisil[®], C18, PSA, Supel QuE Z-Sep+ and EMR-Lipid were evaluated for clean-up efficiency of the extract by dispersive solid phase extraction. The original QuEChERS method had the best performance and the biosorbent chitosan presented similar results to the other conventional sorbents evaluated and being an efficient and low cost biodegradable sorbent was chosen for the clean-up step. The proposed method presented adequate accuracy and precision, with recovery between 70 and 120 % and RSD <20%, for the determination of residues of 60 pesticides in oats by LC-MS/MS. The method limits of quantification ranged from 5 to 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The method was successfully applied in real samples and is an appropriate option for routine analysis.

Keywords: oats, multiresidue, pesticides, QuEChERS, LC-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grão de aveia e detalhes das suas seções longitudinal e transversal	18
Figura 2 - Etapas do processamento do grão de aveia	19
Figura 3 - Representação das principais versões do método QuEChERS original, acetato e citrato.	29
Figura 4 - Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS, para alguns compostos, no modo SRM para uma solução analítica 100 µg L ⁻¹ preparada no extrato branco de aveia.	57
Figura 5- Número de compostos obtido com recuperação e RSD aceitáveis nos testes T1, T2 e T3.....	58
Figura 6 - Testes de hidratação utilizando 5g de amostra + 10 mL de água (1:2) (m/v) e 5 g amostra +10 mLde água (1:1) (m/v).	61
Figura 7 - Fluxograma do procedimento de extração para avaliação da etapa de limpeza do extrato	62
Figura 8- Número de compostos recuperados na faixa de 70-120% com RSD ≤ 20% para cada teste realizado no nível de fortificação de 50 µg L ⁻¹ (n=3) analisados por LC-MS/MS	62
Figura 9 - Cromatograma no modo <i>fullscan</i> obtido por GC-MS/MS do extrato de aveia após a etapa de limpeza com a utilização de a) PSA (verde), b) quitosana (vermelho) e c) florisil + C18 (preto)	65
Figura 10 - Resultados em porcentagem do número de compostos com recuperação satisfatória (70-120%, RSD ≤20%) nos ensaios realizados para o planejamento fatorial	66
Figura 11 - Fluxograma do procedimento de extração validado para a aveia utilizando o método QuEChERS modificado.	68
Figura 12 - Cromatogramas obtidos pelo método QuEChERS desenvolvido e LC-MS/MS para (A) padrão na matriz “branco” de aveia na concentração de 100 µg L ⁻¹ , (B) amostra “branco” de aveia.....	69
Figura 13 – Cromatograma comparativo entre a amostra 1 contaminada com resíduo de azoxistrobina e o LOQ obtido no método QuEChERS desenvolvido e LC-MS/MS.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Técnicas de preparo de amostras para análise em cromatografia líquida ou gasosa	26
Tabela 2 - Parâmetros avaliados na validação de um método analítico	39
Tabela 3 - Informações sobre os agrotóxicos estudados e Limites Máximos de Resíduos para grãos de aveia.....	43
Tabela 4 - Gradiente de fase móvel utilizado para a eluição dos analitos	45
Tabela 5 - Sorventes testados durante a etapa de limpeza.	48
Tabela 6 - Condições dos ensaios realizados no planejamento experimental para otimização das condições de limpeza.	49
Tabela 7 - Condições no sistema LC-MS/MS.....	54
Tabela 8 - Agrotóxicos e respectivos tempos de retenção, íons precursores, íons produto, energias de colisão e voltagem do cone.	55
Tabela 9 - Equação da reta e coeficientes de determinação (r^2) e efeito matriz para cada agrotóxico estudado..	70
Tabela 10 – Percentuais de recuperação e RSD para repetitividade e precisão intermediária do método	73
Tabela 11 – Resultados da análise das amostras de aveia empregando método QuEChERS modificado e LC-MS/MS	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASE: Extração acelerada por solvente, do inglês
- APCI: Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- C18: Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano
- CI: Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*
- CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento
- CV: Coeficiente de variação
- DLLME: Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*
- d-SPE; Extração em fase sólida dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*
- EI: Ionização por elétrons, do inglês *Electron Ionization*
- EMR: Lipid Enhanced matrix removal
- ESI: Ionização por Eletrobulização, do inglês *Electrospray Ionization*
- Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EU: União europeia, do inglês *European Union*
- EUA: Estados Unidos
- GC: Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*
- GCB: Carbono Grafitizado, do inglês *Graphitized Carbon Black*
- FID: Detector por ionização em chama, do inglês *Flame Ionization Detector*
- GC-MS/MS: Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*
- GC-TOFMS: Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas por Tempo de Voo, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry time-of-flight*
- HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- HPLC-MS/MS: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*
- INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- LARP: Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
- LC-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série, *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*
- LMR: Limite Máximo de Resíduos

LOD: Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LODi: Limite de Detecção do instrumento, do inglês *Limit of Detection of the Instrument*

LODm: Limite de Detecção do método, do inglês *Limit of Detection of the Method*

LOQ: Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

LOQi: Limite de Quantificação do Instrumento, do inglês *Limit of Quantification of the Instrument*

LOQm: Limite de Quantificação do método, do inglês *Limit of Quantification of the Method*

M. M.: Massa Molecular

m/z: Razão massa/carga

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeCN: Acetonitrila

MRM: Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PC: Padrão de controle

PI: Padrão Interno

PLE: Extração com Líquido Pressurizado, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*

PSA: Amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*

QuEChERS: Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

r²: Coeficiente de determinação

RSD: Desvio

RSDpi: Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

RSDr: Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

S/R: Sinal/ruído

SANTE: Guia de Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et Protection des Consommateurs*.

SIM: Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SPE: Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SRM: Monitoramento de Reação Selecionada, do inglês *Selected Reaction Monitoring*.

TPP: Trifenilfosfato, do inglês *triphenylphosphate*

tR: Tempo de retenção

UHPLC-MS/MS: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry*

v/v: Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 GRÃO DE AVEIA	16
2.2. PROCESSAMENTO E DERIVADOS DA AVEIA.....	18
2.3 A CADEIA PRODUTIVA DA AVEIA NO BRASIL	20
2.4 PESTICIDAS E SEU USO NA PRODUÇÃO DE AVEIA.....	21
2.5. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS	23
2.5.1. Método QuEChERS	27
2.5.1.1 Modificações do método QuEChERS.....	29
2.5.1.2 Modificações na etapa de limpeza no método QuEChERS	30
2.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE (LC-MS MS)	33
2.6.1 Aplicação do método QuEChERS e LC-MS/MS na análise de agrotóxicos em aveia e seus derivados.....	35
2.7 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	37
2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Instrumentalização	40
3.2 Materiais e reagentes utilizados	40
3.3 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	41
3.4 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE	42
3.5 AGROTÓXICOS SELECIONADOS	42
3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	44
3.7 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA LC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AVEIA	45
3.7.1 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS.....	45
3.8 TESTES PRELIMINARES.....	46
3.8.1 Avaliação do método QuEChERS.....	46
3.8.2 Avaliação da hidratação da amostra de aveia	47
3.8.3 Otimização da etapa de limpeza no método QuEChERS	47
3.8.4 Planejamento Fatorial 3 ²	49
3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AVEIA POR LC-MS/MS	49

3.9.1 Seletividade.....	50
3.9.2 Curva Analítica e Linearidade	50
3.9.3 Exatidão e Recuperação	51
3.9.4 Precisão (repetitividade) e precisão intermediária.....	52
3.9.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	52
3.9.6 Efeito matriz	53
3.10 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS.....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM AVEIA	54
4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM AVEIA	57
4.2.1 Avaliação do melhor método QuEChERS	57
4.2.2 Hidratação da amostra	59
4.2.3 Efeito de diferentes materiais sorventes na etapa de limpeza	61
4.2.4 Planejamento fatorial 3 ²	65
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO	67
4.3.1 Seletividade.....	69
4.3.2 Curva analítica, faixa linear e efeito matriz.....	70
4.3.3 Limite de detecção (LOD), Limite de quantificação (LOQ) do método	72
4.3.4 Exatidão (ensaios de recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	72
4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS.....	74
5 CONCLUSÕES	77
6. DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS	78
7. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS.....	79
8. REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

A aveia é um cereal da família Poaceae, cujos relatos históricos mostram que sua produção teve origem na Idade Média. A aveia caracteriza-se como uma cultura de expansão, com uma produção que aumenta com o passar dos anos. Este aumento decorre principalmente da diversidade potencial de usos dessa cultura, podendo ser utilizada de diversas maneiras. De acordo com DE MORI *et al.*, (2012) a aveia possui diversas utilidades para o consumo humano e animal, sendo respectivamente na forma de grãos para matéria prima industrial em produção de flocos e cereais, consumo animal de grãos ou para formação de pastagens de inverno para pastejo e/ou elaboração de feno e de silagem. Os mesmos autores apontam que a maior parte das áreas cultivadas com aveia se destina ao uso na alimentação animal, tanto no Brasil quanto em outros países. O cultivo de aveia é principalmente centralizado no Centro-Sul do Brasil, sendo uma cultura de inverno, pois é capaz de suportar baixas temperaturas.

Em termos de produtividade de uma cultura, o que se deseja é o aumento da quantidade de grãos, porém isso é difícil sem o uso de agrotóxicos. A utilização de agrotóxicos é praticamente imprescindível no cultivo de aveia, para o controle de doenças e insetos. Para alcançar o máximo de produtividade e qualidade, sem causar impactos significativos ao meio ambiente e oferecer um produto com alta segurança ao consumo, é necessária a combinação de vários métodos de manejo das pragas, sendo eles físicos, mecânicos, culturais, genéticos, legislativos, químicos e biológicos.

Para um sistema de produção agrícola ser produtivo e rentável é preciso que as doenças das culturas sejam mantidas em níveis baixos, e isso por vezes tem demandado uma alta carga de agrotóxicos. É necessário que o produto final, no caso, a aveia pronta ao consumo, seja seguro para o consumidor, e para que isto ocorra as aplicações dos agrotóxicos devem obedecer rigorosamente às boas práticas agrícolas. Como medida de segurança aos consumidores, o monitoramento dos resíduos dos agrotóxicos nos cereais é uma ferramenta importante para a garantia da qualidade alimentar (ANAGNOSTOPOULOS; MILIADIS, 2013).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*) é

uma das técnicas utilizadas para determinação de resíduos de agrotóxicos, em diferentes matrizes, por ter uma elevada detectabilidade e seletividade (PRESTES *et al.*, 2009). Para uma análise cromatográfica resultar em dados de elevada exatidão, é necessário que os extratos provenientes de amostras complexas passem por uma etapa de preparo e limpeza eficientes. Na etapa de preparo de amostra pode-se diminuir os interferentes da matriz e garantir resultados mais confiáveis; exemplo de uma prática nesse sentido é o método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) que pode ser utilizado para uma diversidade de preparo de amostras em alimentos. Este método de extração proporciona exatidão e precisão aceitáveis de agrotóxicos ácidos, neutros e básicos, possibilitando a análise de um grande número de compostos (PRESTES *et al.*, 2011). Os excelentes resultados fornecidos pelo método QuEChERS e sua praticidade, ajudaram na popularização deste método e dos seus conceitos (PRESTES *et al.*, 2011).

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em aveia utilizando um método QuEChERS modificado e análise por LC-MS/MS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GRÃO DE AVEIA

A produção de aveia, segundo relatos históricos, teve origem na Idade Média. Os principais cereais cultivados no inverno eram o centeio, cevada e o trigo, porém a aveia começou a ganhar espaço no plantio devido ao fato de ser capaz de suportar baixas temperaturas. A aveia pertence à família Poaceae (antiga família das gramíneas), subfamília *Pooideae*, tribo *Aveneae* e gênero *Avena*. As principais espécies cultivadas são a aveia branca (*Avena sativa*) e a aveia amarela (*Avena byzantina*), ambas apresentam folhas largas e colmos grossos. Já a aveia preta (*Avena strigosa*), possui folhas estreitas e colmos finos (BRASIL, 2012).

A aveia é um cereal que apresenta múltiplos propósitos. É utilizada na sucessão e rotação de culturas, pois o cultivo desta espécie proporciona grandes benefícios ao sistema de produção, como melhorias das condições físico-químicas do solo, e a supressão biológica de algumas plantas daninhas e também uma redução significativa da reprodução de doenças de outras espécies hibernais (MACHADO, 2000). O maior uso mundialmente da aveia constitui-se na alimentação animal, e quando empregada em forma de ração, a maior demanda é para uso na alimentação de cavalos de corrida (DE MORI *et al.*, 2012). Seu uso é menos popular na alimentação de aves e suínos por causa da relação entre o alto teor de fibra e baixo valor energético (MCDONALD *et al.*, 1981).

CAMPLING (1991), e GOI *et al.*, (1998) em estudo dos tratamentos físicos do grão de aveia para alimentação de bovinos, concluíram que o grão de aveia pode ser usado eficientemente na formulação de dietas de vacas leiteiras e bovinos de corte, e seu uso pode ser na forma natural (grão inteiro seco, grão moído e grão inteiro umedecido). A aveia, segundo (PEIXOTO *et al.*, 1985 e RESTLE *et al.*, 2009), a aveia na alimentação de ruminantes, comporta-se como um "concentrado-volumoso", pois é o cereal de mais alto teor de fibra bruta, com valor em torno de 10%, enquanto que os demais cereais atingem não mais de 3%. AGULHON *et al.*, (2005), ainda observaram que o grão de aveia representa boa opção para alimentação de bovinos, uma vez que seu valor comercial em determinadas épocas do ano é bem menor que outros alimentos nobres.

O valor nutritivo da aveia depende, em grande parte, da proporção de núcleo (endosperma, farelo e germe) e casca, sendo que a proporção da casca depende da variedade, ambiente e da estação, e pode variar de 23% para 35% (média 27%). Sua função é a proteção do grão contra fatores do ambiente e ataque de patógenos (KUREK *et al.*, 2002). A casca da aveia tem sido descartada durante o processamento do grão, tornando-se por vezes um poluente do meio ambiente (STEPHEN *et al.*, 1997). Mas as pentosanas presentes na casca podem ser utilizadas na produção comercial de furfural (DESHPAND *et al.*, 1991) e também na produção de pães, de biscoitos e de massas alimentícias (GALDEANO, 2001).

Na alimentação humana, a aveia se destaca pelo alto teor de proteínas e fibras solúveis, caracterizando um alimento de alta qualidade nutricional e funcional. Os grãos possuem um bom balanceamento dos aminoácidos, o teor de lipídios é elevado em relação aos demais cereais, bem como os minerais. Possui fibras solúveis, o que favorece o seu uso na alimentação humana por reduzir os níveis de colesterol e regular os teores de glicose no sangue (CECCON *et al.*, 2004). O consumo moderado de aveia pode reduzir os níveis de colesterol total em torno de 5% na maioria das pessoas, sendo que esta porcentagem pode ser ainda maior em pessoas com altos níveis de colesterol sérico (WHITE, 2000).

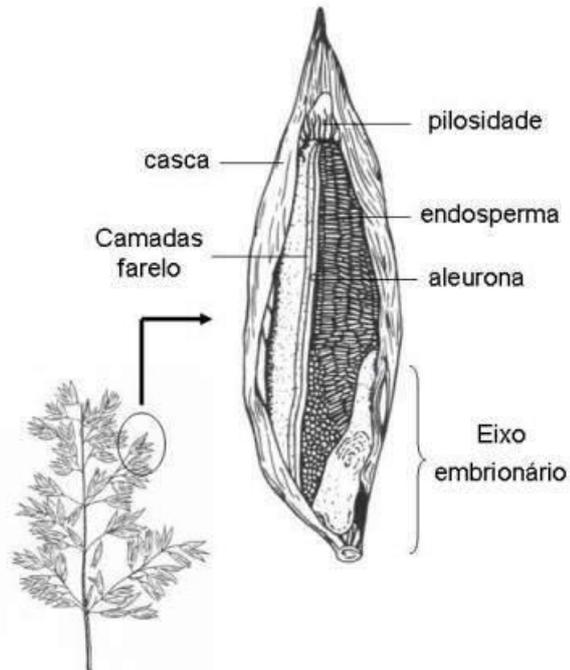
O grão de aveia tem diferentes constituintes químicos, possui formato cilíndrico e uma extremidade pontiaguda na porção do gérmen. O grão é uma cariopse, definida como fruto-semente, onde parte do fruto está junto à semente, a qual é constituída pelo germe e pelo endosperma, encobertos pela camada de aleurona e revestimentos epidérmicos e casca

O farelo da aveia possui camadas que consistem em uma parte externa com a presença do pericarpo e do tegumento, que são remanescentes do tecido do desenvolvimento embrionário. As camadas são formadas por carboidratos complexos, por fibras e também compostos fenólicos. A segunda região é uma camada única de células chamada aleurona, que contém β -glucanas e compostos fenólicos. Esta camada é rica em corpos protéicos contendo depósitos de fitina, niacina, compostos fenólicos e carboidratos.

A semente da aveia é composta por amido, proteínas, lipídios, enzimas lipolíticas e amilases, mas a região que predomina na semente da aveia é o endosperma

amiláceo, representando de 55 a 80% da mesma (SERNA-SALDIVAR, 2010). A estrutura do grão de aveia pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Grão de aveia e detalhes das suas seções longitudinal e transversal



Fonte: DOEHLERT; McMULLEN (2000).

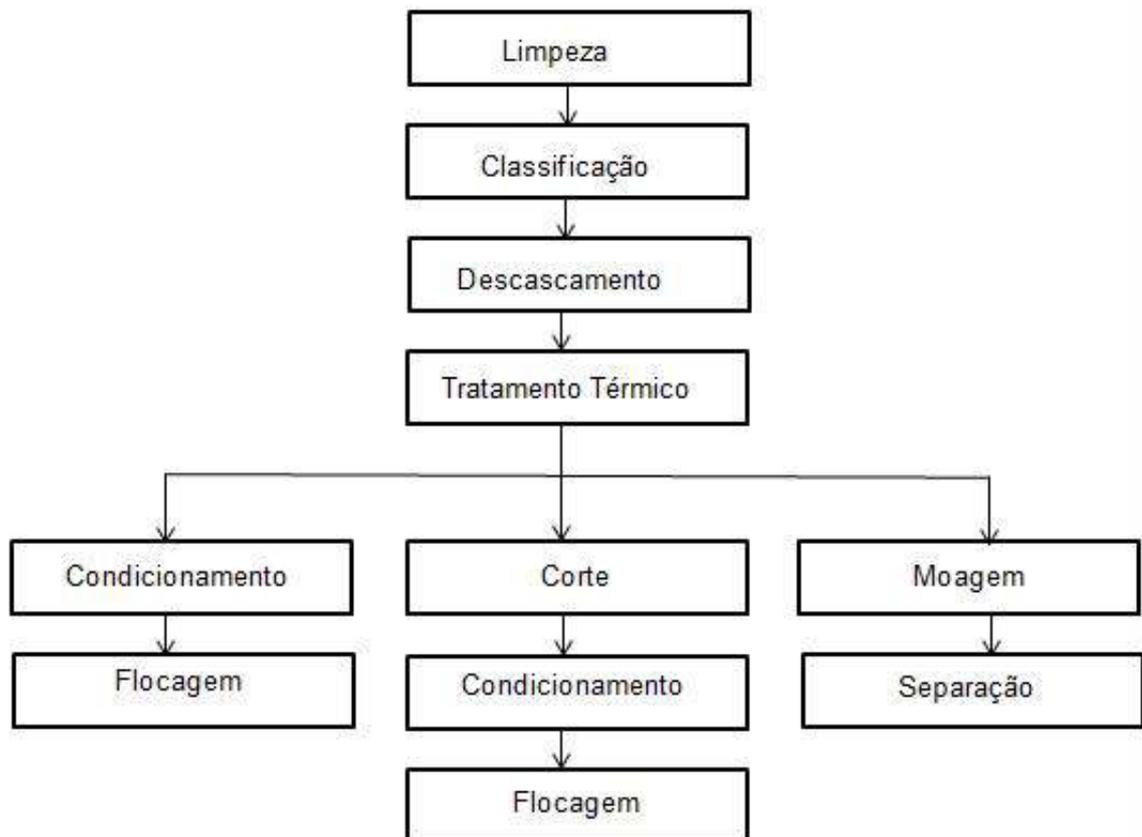
2.2. PROCESSAMENTO E DERIVADOS DA AVEIA

Os grãos de aveia geralmente passam por alguns processos de transformação industrial para que possam ser consumidos pelo ser humano e animais. A Figura 2 exibe as etapas do processamento do grão de aveia para obtenção de produtos na forma de farinha, farelo e flocos.

Os grãos de aveia, ao chegarem na indústria, devem ser classificados e limpos, pois possuem impurezas oriundas do campo. A casca da aveia tem como característica uma textura firme, e necessita que seja removida na sequência do processo. Após a limpeza, classificação e descascamento, os grãos são submetidos ao tratamento térmico, que tem como objetivo reduzir a água livre presente no grão, de 14% para aproximadamente 6%, e também para inativar as enzimas lipases e lipoxigenases. Esta inativação é necessária para evitar o processo da rancidez oxidativa, que causa o odor de ranço desagradável. Para a produção dos derivados de aveia, como farelo, farinha e flocos, as enzimas são responsáveis por hidrolisar os

ácidos graxos, contribuindo para o processo de oxidação lipídica; por esta razão, são inativadas durante o tratamento hidrotérmico. Neste processo é necessário utilizar altas temperaturas, podendo atingir até cerca de 90°C, conferindo ao grão um aroma “amendoado” e garantindo produtos com maior vida útil (YAN *et al.*, 2014).

Figura 2 - Etapas do processamento do grão de aveia



Fonte: SANDRIN (2013).

Os derivados da aveia podem ser consumidos em três segmentos distintos, uma vez que o processo final de processamento é que determina o produto ‘comercial’ a ser oferecido. Por exemplo, os flocos de tamanho maior são utilizados na produção de granola, na fabricação de pães e em barras de cereais. Os flocos médios e finos são destinados à produção de sopas e mingaus, ou vendidos para consumo direto, sendo geralmente misturados com iogurtes (pelo consumidor). Se esses mesmos flocos forem submetidos ao processo de moagem obtém-se a farinha, que pode ser utilizada em produtos de panificação e alimentos infantis. Já o farelo de aveia é empregado na fabricação de pães e biscoitos, ou mesmo vendido in natura para processamento doméstico em receitas ou matinais; pelo fato de que apresenta β -

glucanas, o farelo é recomendado para pessoas que apresentam altos níveis de colesterol.

2.3 A CADEIA PRODUTIVA DE AVEIA NO BRASIL

No Brasil a produção de aveia se concentra com maior expressão na região Sul, devido às características favoráveis para seu desenvolvimento e pelo uso nos sistemas de produção adotados nesta região. A produção nacional da safra 2017/2018, apresenta como os principais estados produtores o Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul, com 609, 179 e 33 mil toneladas produzidas, respectivamente. Na safra de 2018 a produtividade média da aveia foi 2.193 kg/ha e a produção alcançou 819 mil toneladas (CONAB, 2018).

A aveia branca (*Avena sativa*) é cultivada desde 1940, embora até 1970 a área de plantio foi pequena devido às dificuldades de adaptação das cultivares frente às condições climáticas. Antes dos anos 70, os cultivares de aveia branca eram provenientes do Uruguai e da Argentina, no entanto, eles também apresentavam produções com baixo rendimento e baixa qualidade (PRIMAVESI *et al.*, 2006).

Na década de 80, devido aos problemas recorrentes enfrentados pela cultura no sul do país, a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a Universidade de Passo Fundo (UPF) deram início às pesquisas de melhoramento genético dessa cultura por meio de introdução de linhagens e populações segregantes provenientes de Wisconsin, Estados Unidos (BARBOSA NETO *et al.*, 2000). Atualmente a aveia branca, juntamente do trigo e da cevada, é uma das principais culturas para produção de grãos no período de inverno no Sul do Brasil. A diversificação na exploração agrícola favorece o aumento na área de cultivo de forma expressiva, devido à cultura ser uma excelente alternativa para o inverno no sistema de rotação de culturas, encaixando-se conforme a necessidade dos produtores (EMBRAPA, 2012). Durante a produção dos cereais são utilizadas grandes quantidade de agrotóxicos para evitar doenças foliares, pragas, plantas daninhas invasoras, entre outras, com o intuito de garantir a qualidade e a produtividade (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2012). Normalmente, o modo de aplicação de agrotóxicos como inseticidas, fungicidas, herbicidas e reguladores de crescimento ocorre por pulverização sobre os cereais (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2012).

2.4 PESTICIDAS E SEU USO NA PRODUÇÃO DE AVEIA

Os agrotóxicos, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), que utiliza a nomenclatura 'pesticidas' para estes produtos, são compostos químicos usados para eliminar pragas, roedores, fungos, insetos e ervas daninhas. A OMS afirma ainda que, pela sua natureza, os pesticidas podem ser extremamente tóxicos para os seres humanos, assim estes devem ser usados com segurança e descartados corretamente (WHO, 2015).

De acordo com PERES *et al.*, (2005), existem três tipos de classificação de agrotóxicos: função, grupo químico e grau de toxicidade. Segundo a sua função, os agrotóxicos são classificados de forma bastante simples, como inseticidas (combatem insetos), herbicidas (combatem plantas daninhas), fungicidas (combatem fungos), fumigantes (combatem bactérias e outras pragas do solo), raticidas (combatem roedores), dentre outras classes.

Os agrotóxicos são também classificados de acordo com o grupo (tipo) químico que pertencem, podendo ser inorgânicos, orgânicos ou biológicos. A toxicidade dos agrotóxicos é dada em quatro categorias, sendo atribuída uma cor distinta, no rótulo e nas embalagens dos produtos, para cada uma delas. A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) tem a competência de avaliar o grau de toxicidade por meio de testes, pesquisas e estudos realizados em laboratórios, no qual um dos principais objetivos é verificar a dosagem letal desses ingredientes ativos.

Os valores de Limite Máximo de Resíduos (LMR) são estabelecidos por cada país, através de medidas que calculam os riscos dietéticos e exposição durante a fase de registro do produto. No Brasil, a ANVISA é o órgão regulamentador que estabelece os limites máximos de resíduos (LMR) para agrotóxicos em diversas matrizes (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2016). A ANVISA também é responsável pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) (criado em 2002) com o objetivo de realização de um monitoramento quanto aos tipos e quantidades de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal comercializados no varejo.

Na cultura da aveia, as doenças foliares são as mais frequentes, e dentre elas, a ferrugem da folha (*Puccinia coronata* Cda. f.sp. *avenae*) e a helmintosporiose [*Drechslera avenae* (Eidam) El Sharif] têm recebido especial atenção, uma vez que

podem comprometer até 100% da produção (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Embora alguns cultivares possam apresentar certa tolerância, a forma mais rápida e eficiente de conter estas doenças é pelo uso de fungicidas. Porém, o maior consumo de aveia está no produto “in natura”, que após descascado é direcionado à produção de farelo, farinha ou flocos. Assim, são necessários cuidados quanto ao uso destes fungicidas, tendo em vista que o uso dos mesmos de forma indiscriminada eleva o nível de contaminação dos produtos (SILVA *et al.*, 2015; VIERO *et al.* 2016). Desta forma, existe, cada vez mais, a necessidade de alguma forma de controle (seja pelo governo, pelas empresas e/ou mesmo pelos consumidores), em relação aos resíduos nos alimentos comercializados no mercado. O controle quanto a esses resíduos é feito pelo monitoramento, por meio de uma seleção dos principais alimentos comercializados durante um dado período, e que tem como objetivo avaliar o grau de risco oferecido aos consumidores e seus prováveis riscos à saúde (GERAGE, 2016).

O uso intenso de agrotóxicos está relacionado ao modelo de produção agrícola convencional e intensiva, onde geralmente predominam monoculturas e cultivos bastante dependentes desse tipo de produto químico no combate às pragas. Para a cultura de aveia existe um grande número de cultivares recomendada ao cultivo, e estas diferem entre si quanto ao ciclo, estatura, resposta frente as alterações climáticas e resistência às doenças (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Neste sentido é importante a identificação e uso das cultivares mais estáveis e adaptadas às condições de cada região, uma vez que as condições climáticas refletem diretamente sobre o desenvolvimento dos fungos que causam as doenças. Dessa forma, utilizando-se cultivares com mais tolerância às doenças, e regionalmente bem adaptadas (produtivas), pode-se reduzir o uso de fungicida sobre a aveia, reduzindo, conseqüentemente, o risco de contaminação dos produtos dela derivados.

Para o controle de plantas daninhas nas culturas de inverno é ideal estabelecer um manejo, considerando diversos fatores, dentre eles a rotação de culturas, manejo físico, redução do banco de sementes, controle cultural, manejo preventivo e por fim utilizar-se o controle químico. Entretanto, a alternativa mais utilizada sem dúvida pelos produtores em grandes áreas é controle químico de plantas daninhas, destacando-se pela rapidez, baixo custo e eficiência dos produtos de controle (SILVA *et al.*, 2011)

O controle químico de plantas daninhas em lavouras de aveia é realizado em duas etapas. A primeira etapa consiste na dessecação total da vegetação presente na área

de cultivo com herbicidas de ação total (glifosato, amônio-glufosinato, paraquat e paraquat+diuron) antes da semeadura das culturas. A segunda etapa é caracterizada pela aplicação de herbicidas pós-emergentes seletivos à cultura (KARPINSKI, 2016).

O aumento de casos de resistência de plantas daninhas a determinados herbicidas, ocorre especialmente devido a pressão de seleção que também resulta da aplicação constante e abusiva de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação. A fim de evitar o surgimento de novas espécies de plantas daninhas resistentes e contornar o problema já existente, nota-se a necessidade da busca por novos herbicidas com mecanismos de ação diferenciados, mas que sejam eficientes no controle dessas espécies de plantas daninhas (UIZURRUN *et al.*, 2012) e que também apresentem seletividade a cultura da aveia. Entretanto o controle químico mesmo seletivo as culturas e eficiente no controle de plantas daninhas deve ser utilizado com critérios rígidos, considerando seus custos, eficiência e segurança ao meio ambiente e ao homem.

2.5 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

O preparo de amostra é uma etapa necessária na determinação de agrotóxicos, pois os analitos presentes nas matrizes secas, como os cereais, geralmente encontram-se em concentrações a níveis de traços e ultratraços. Sendo assim, o preparo de amostra tem como objetivo promover o enriquecimento e a extração dos compostos de interesse e a remoção dos interferentes. Esta etapa de preparo normalmente pode apresentar problemas, como perda de compostos e contaminação, levando a erros e aumentando o custo do procedimento (WANG *et al.*, 2016). O processo de preparo da amostra é fundamental para reduzir os interferentes da própria matriz, favorecer a extração dos analitos e diminuir a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2009; WALORCZYK; DROZDYNSKI, 2012). No sentido de melhorar a análise quantitativa, o desenvolvimento de procedimentos para preparo de amostras vem sendo constantemente estudado, pois o desenvolvimento de um método para determinar resíduo de agrotóxicos não é simples, devido às diferentes propriedades químicas, à solubilidade, volatilidade e polaridade dos mesmos. Novas técnicas estão sendo

utilizadas, pois existe uma grande variedade de agrotóxicos utilizados na agricultura e o monitoramento destes se torna cada vez mais necessário.

A determinação de agrotóxicos em cereais é considerada uma tarefa difícil, pois estas matrizes secas contêm grande quantidade de ácidos graxos, os quais podem interferir na análise. No caso da análise da aveia, os grãos devem ser moídos para facilitar o acesso do solvente às partículas da aveia moída. Herrmann e colaboradores (2017) avaliaram efeitos do tamanho de partícula e da temperatura de moagem nas eficiências de extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de grãos de cereais (cevada, aveia, centeio e trigo). Os autores consideraram mais favorável a moagem com tamanho médio e os cereais que foram moídos na temperatura ambiente produziram menores eficiências de extração de agrotóxicos em comparação com os cereais moídos quando ainda congelados. Amostras com baixo teor de umidade (<80%) requerem adição de água antes de iniciar a etapa de extração, objetivando melhorar a capacidade de extração dos compostos. A água hidrata as partículas da aveia, e, com isso, facilita o acesso do solvente na extração dos agrotóxicos a serem analisados. As extrações com solventes orgânicos estão presentes nas análises de rotina devido à simplicidade, rapidez e recuperações adequadas para uma grande faixa de polaridades.

Vários cuidados devem ser tomados com este tipo de matriz para se obter bons resultados analíticos, pois as matrizes possuem coprodutos extraíveis que tornam a detecção, identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos mais complicada se comparada com as matrizes com elevado teor de água, tais como frutas e legumes. Neste sentido algumas variáveis, como a adição de água, a proporção de solvente, o tempo de extração, a combinação e a quantidade de solvente na etapa de limpeza dispersiva são fatores que podem afetar a eficiência do preparo de amostra (MASTOVSKA *et al.*, 2010).

Com o objetivo de garantir a segurança alimentar é necessário monitorar os resíduos de agrotóxicos em cereais, seus co-produtos e derivados. Para isto, cada vez mais surgem novos métodos analíticos multirresíduo, que podem avaliar uma grande quantidade de agrotóxicos numa mesma análise. Entretanto, os laboratórios enfrentam alguns problemas quanto aos métodos multirresíduo, como o alto custo e a demanda de tempo nas etapas envolvidas. As matrizes para a determinação de agrotóxicos são complexas e na determinação de multirresíduo o pré-tratamento deve

ser feito de modo que interferentes como o alto teor de lipídios presentes nos cereais não interfiram na análise (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

Para a determinação de resíduos de agrotóxicos, novos métodos analíticos surgiram nos últimos anos, tendo como objetivo reduzir as interferências e o efeito matriz das amostras complexas. Na escolha pelo método analítico a ser utilizado para a análise é preciso considerar fatores como: presença de matrizes complexas, visto que os alimentos possuem teores variáveis de lipídios, carboidratos, proteínas, pigmentos e umidade, o que pode exigir múltiplas etapas na fase de limpeza do extrato (clean-up) da amostra, a exigência de alta sensibilidade, ou seja, a necessidade de se isolar e medir exatamente quantidades muito pequenas dos compostos (caso dos resíduos de agrotóxicos), o que acarreta no uso de solventes e reagentes com alto grau de pureza, bem como cuidados especiais para evitar a contaminação do material utilizado.

Um método multirresíduos para análise de agrotóxicos consiste em homogeneizar a amostra com solvente orgânico, empregando agitação manual ou por equipamentos. Os solventes mais indicados ao uso são a acetonitrila, metanol, acetona, acetato de etila, dentre outros. A escolha do solvente está relacionada à compatibilidade com os analitos, para evitar interferências da matriz ao extrato final, eficácia na etapa de limpeza, volatilidade e segurança para o analista (FUKUI *et al.*, 2013). O método de preparo de amostra deve apresentar algumas características para que possa ser eficiente: incluir o maior número de agrotóxicos possíveis, apresentar recuperações próximas a 100%, remover os interferentes da amostra, ter boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança, além da redução dos volumes de solventes de baixa toxicidade (HERCEGOVÁ *et al.*, 2007).

Com o objetivo de superar as limitações dos métodos multirresíduo de preparo de amostra disponíveis na época (em 2003), ANASTASSIADES e colaboradores propuseram o método de extração denominado QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) que inicialmente foi proposto para extração de agrotóxicos em amostras de vegetais e frutas, logo se expandindo para uma grande variedade de analitos e distintas matrizes (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

A Tabela 1 apresenta diferentes técnicas e métodos de preparo de amostra, que são utilizadas na etapa de extração e limpeza da matriz de cereais, principalmente a aveia, para a análise por cromatografia líquida ou gasosa.

Tabela 1. Técnicas de preparo de amostras para análise de agrotóxicos em cereais.

MATRIZ	PREPARO	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	LIMPEZA	AGROTÓXICOS ANALISADOS	TÉCNICA	REFERÊNCIA
Milho, trigo, aveia, arroz e cevada	10 g amostra + 10 g Celite 545 foram extraídas com ACN por 3 min com 2 ciclos a 1500 psig e 80 °C	Extração acelerada com solvente (ASE)	SPE Envi-18, Envi-Carb e Sep-Pak NH2 em série (GC-MS/MS) -Sep-Pak Alumina N e Envi-Carb e Sep-Pak NH2 (LC-MS/MS)	405	GC-MS/MS e LC-MS/MS	Pang et al. (2006)
Comida para bebês à base de aveia e arroz	10 g amostra +10 mL de ACN	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	1 mL extrato+ 50 mg PSA + 150 mg MgSO ₄	16	LC-MS/MS, UHPLC-MS/MS	Leandro et al. (2006)
Milho, aveia, arroz e trigo	2,5 g amostra + 10 mL água + 10 mL ACN agita por 1 h	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	1 mL extrato + 50 mg C18 + 150 mg PSA + 150 mg MgSO ₄	199	GC-MS, UHPLC-MS/MS	Mastovska et al. (2010)
Trigo e aveia	5,0 g amostra + 10 mL água + 10 mL ACN	4 g de MgSO ₄ , 1 g de NaCl , 1 g de C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O e 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O	1 mL extrato + 0,85 g de MgSO ₄ + 0,125 g de PSA	Pirimifós-metílico	LC-MS/MS.	Lucini (2011)
Trigo, centeio, cevada, aveia e trigo	5 g e 10 mL de agua e 15 mL de ACN	0,5 g de C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O , 1 g de C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O, 4 g MgSO ₄ e 1 g de NaCl	7,5 mL extrato + 125 mg de PSA, 500 mg de C18 e 750 mg de MgSO ₄ seguido de evaporação e redissolução em Tolueno	167	GC-MS/MS	Walorczyk (2012)
Arroz integral, milho, milheto e aveia	10 g amostra + 20 mL ACN	10 mL do sobrenadante foi evaporado a 40 °C e redissolvido com 2 mL de ACN	2 mL de extrato + 125 mg de PSA, 125 mg C18 e 25 mg GCB agita por 2 min e centrifuga por 5 min a 4000 rpm + DLLME com 1 mL de extrato, evaporação e redissolução com 1,0 mL de ACN:água (20:80, v/v).	7	HPLC	Wang (2012)

Fonte: A autora

2.5.1. Método QuEChERS

Um método comumente utilizado no preparo de amostras para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos é o, QuEChERS. A análise de resíduos de agrotóxicos em matrizes de alimentos engloba algumas etapas que tem por finalidade isolar os compostos de interesse e a determinação dos analitos, que inclui a identificação e a quantificação dos agrotóxicos. Este método resume-se nas etapas de extração, partição e *clean-up*. A primeira etapa do método usa um solvente orgânico, que possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra. Na segunda etapa do método é empregado o uso de sais secantes. Após temos a última etapa (*clean-up*), a qual tem como o objetivo reduzir as interferências da matriz e os limites de detecção.

O método QuEChERS original tem como procedimento utilizar 10 gramas de amostra, com a adição de 10 mL do solvente acetonitrila. Este solvente extrator é utilizado porque abrange uma ampla faixa de polaridade, quando comparada com acetato de etila e acetona, além de extrair menos compostos lipofílicos, gordura e pigmentos (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*; 2015; BORGES *et al.*, 2015). A acetonitrila, juntamente com os sais, oferece outra vantagem como a separação da fase orgânica e aquosa, tornando-a rápida, de baixo custo e permite, se necessário, a diluição do extrato final (PRESTES *et al.*, 2011). Para amostras com um teor de água reduzido é necessário a adição de água na amostra antes do início da extração, pois inicialmente o método foi desenvolvido para amostras contendo um teor de água superior a 75% (LEHOTAY *et al.*, 2005).

Após a adição do solvente, ocorre a agitação que pode ser em vortex ou manual. Essa extração em um único frasco fechado traz vantagens como possibilitar a extração em campo, quando for necessário (PRESTES *et al.*, 2011). A etapa de partição por adição de sais promove o efeito *salting-out*, este efeito é possibilitado pela interação entre água e cloreto de sódio, ocorrendo solvatação de íons e impedindo que a água esteja livre para fazer ligações com outras substâncias. Isso possibilita melhores percentuais de recuperações para analitos polares, pela diminuição da solubilidade desses compostos em fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica (STAHN, 2000; PRESTES *et al.*, 2011). As substâncias apolares são favorecidas na etapa de extração quando junto com o NaCl é adicionado ao MgSO₄

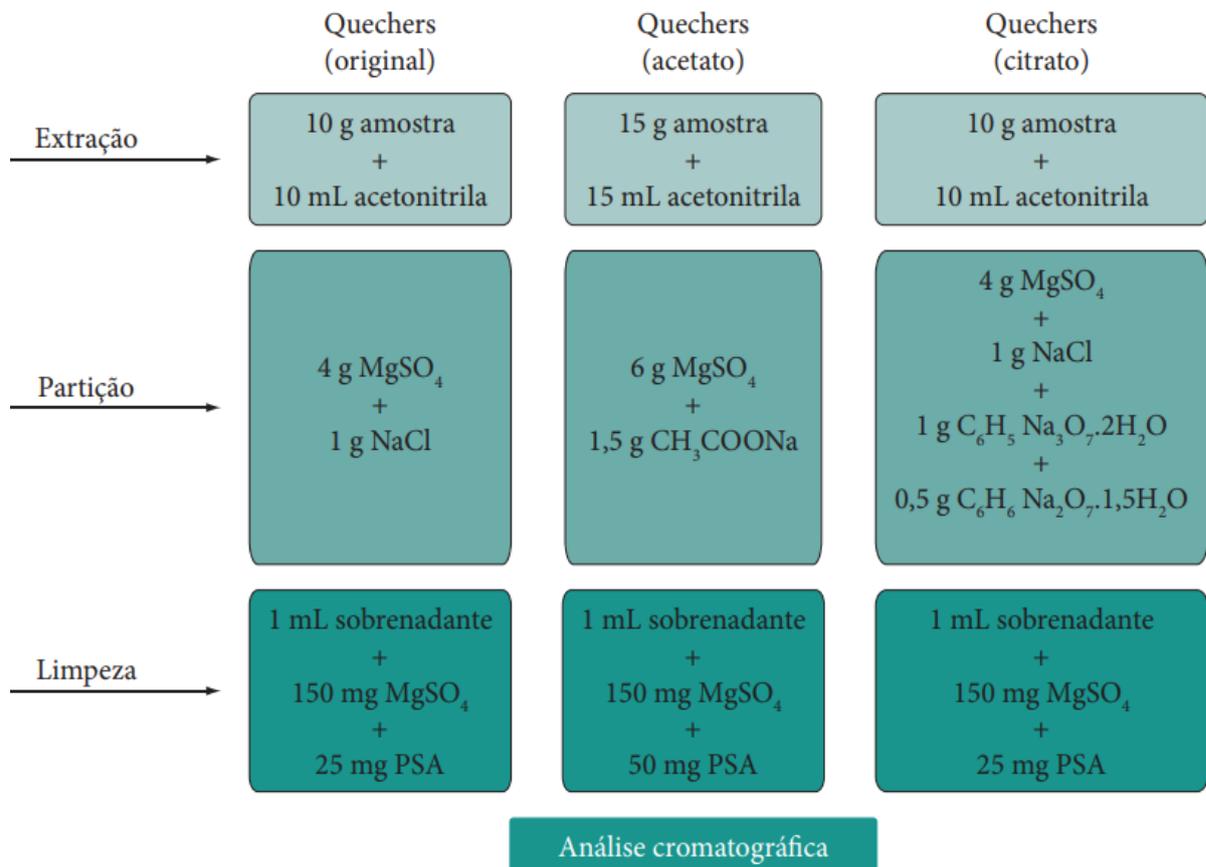
que além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento da amostra durante essa etapa de extração/partição (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; REYNOLDS, 2005; PRESTES *et al.*, 2009).

A etapa de limpeza é realizada para garantir uma melhor eficiência e confiança dos resultados, pois tem como objetivo evitar que componentes da matriz possam afetar a confiabilidade dos resultados. Além de diminuir as manutenções técnicas no equipamento, pois componentes não voláteis da matriz podem aderir ao sistema de injeção e também a coluna cromatográfica causando danos (LEHOTAY, 2007; PRESTES *et al.*, 2009). Os co-extrativos da matriz são retidos na d-SPE, da seguinte maneira: uma alíquota do extrato é adicionada à pequena quantidade de sorvente, o qual funciona como filtro químico. A quantidade e o tipo de sorvente utilizado varia de acordo com a necessidade de remoção de interferentes (BORGES *et al.*, 2015; PRESTES *et al.*, 2011). O sorvente retém as interferências da matriz, sendo que, após agitação manual e centrifugação, o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico.

MASTOVSKA *et al.*, (2010) desenvolveram um método QuEChERS para determinação de 180 agrotóxicos em amostras de grãos de cereais (milho, aveia, arroz e trigo), seguido de quantificação por GC-TOFMS e UPLC-MS / MS. O método QuEChERS para extração dos agrotóxicos em aveia consistiu em 3,5 g de amostra moída, 10 ml de água e 20 mL de acetonitrila, seguido pela adição de 4,0 g de MgSO₄, 1,0 g de NaCl, agitação por 1 min e centrifugação. A etapa de *clean-up* foi realizada com 150 mg de PSA, 150 mg de MgSO₄ e 50 mg de C18, agitação com vortex por 1 min e centrifugação por 5 min. Após, foi realizada a filtração e análise por GC-TOFMS e UPLC-MS/MS. Os agrotóxicos analisados apresentaram recuperação média entre 93-97%, com RSD <20%.

O método QuEChERS é amplamente empregado para diversas matrizes, principalmente de alimentos. Inicialmente o método foi proposto para matrizes com baixo teor de gordura, porém o método passou por algumas modificações e melhorias ao longo dos anos desde o método original. Assim, matrizes com elevado teor de gordura, bem como de pigmentos, carotenoides e clorofila podem ser analisadas pelo método. Ao longo dos anos o método foi sofrendo adaptações e evoluindo, como apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Representação das principais versões do método QuEChERS original, acetato e citrato.



Fonte: PRESTES *et al.*, 2011

2.5.1.1 Modificações do método QuEChERS

Apesar da versão original proposta ter fornecido bons resultados para diferentes tipos de amostra (LEHOTAY *et al.*, 2005; PAYA *et al.*, 2007), algumas aplicações mostraram que certos compostos não tinham recuperações satisfatórias, devido ao pH da matriz. Para solucionar este problema, durante o período de otimização foram utilizados tampões, que promoveram recuperações satisfatórias para os compostos dependentes do pH.

LEHOTAY *et al.* (2005) desenvolveram o QuEChERS acetato, que teve como principais mudanças a substituição do cloreto de sódio pelo acetato de sódio para formação de um tampão com o objetivo de garantir recuperações acima de 70%. Para obter estes resultados foi empregada uma quantidade um pouco maior de amostra e de solvente que o QuEChERS original, e a acetonitrila foi acidificada com ácido

acético, para permitir recuperações satisfatórias de agrotóxicos que geralmente apresentam problemas de estabilidade, além de ser adequada para LC-MS/MS E GC-MS/MS.

Em seguida, ANASTASSIADES *et al.*, (2007) desenvolveram o método QUECHERS citrato, o qual, com a utilização de citrato de sódio di e sesquiidratados, provocam efeito tamponante (pH 5,0-5,5). Já LEHOTAY *et al.*, (2010) desenvolveram um método QuEChERS modificado para determinação de 14 agrotóxicos em amostras de aveia e outros, seguido de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*, HPLC). O método QuEChERS para extração dos agrotóxicos em aveia consistiu em 2 g de amostra mais 13 mL de água, 15 mL de acetonitrila, seguido pela adição de 6,0 g de MgSO₄, 2,5 g de acetato de sódio trihidratado. A etapa de limpeza (*clean-up*) foi realizada com 50 mg de PSA, 150 mg de MgSO₄ e 50 mg de C18, seguido de filtração e análise por HPLC-MS/MS. O cyprodinil foi usado como padrão interno e fortificado antes da extração para alcançar uma concentração de 0,2 µg/mL no extrato final. Os agrotóxicos analisados apresentaram recuperação média de 95% e RSD <20% para as amostras.

RASCHE *et al.* (2015) determinaram 120 agrotóxicos em amostras de frutas secas, farinha de trigo e aveia empregando o método QuEChERS seguido de quantificação por GC-MS/MS. O método QuEChERS para extração dos agrotóxicos em aveia consistiu em 5 g de amostra, 10 mL de água, adição do padrão interno, adição da mistura de 9 mL de acetonitrila e 1 mL de acetona, agitação por 5 min, adição de 0,5 g de hidrogenocitrato dissódico 1,5-hidrato, 1 g de citrato trissódico dihidratado, 4,0 g de MgSO₄, 1,0 g de NaCl, agitação por 5 min e centrifugação. A etapa de *clean-up* foi realizada com 900 mg de MgSO₄, 150 mg de PSA e 150 mg de sílica-octadecil, agitação com vortex por 2 min e centrifugação. Após foi realizada a filtração e análise por GC-MS/MS. A maioria dos agrotóxicos analisados tiveram uma recuperação entre 70 e 120% e com precisão de <20%.

2.5.1.2 Modificações na etapa de limpeza no método QuEChERS

Após a adição dos sais e do tampão, é realizada a etapa de limpeza (*clean-up*). Os sorventes mais utilizados são a PSA, o C18 e o carbono grafitizado (GCB). A escolha do sorvente ideal é avaliada através da remoção de interferentes co-extraídos

da matriz. Neste sentido, a limpeza do extrato é muito importante na etapa de d-SPE (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015). A etapa de d-SPE utilizada no método QuEChERS original empregava amina primária-secundária (*primary secondary amine*, PSA) como sorvente e sulfato de magnésio para remoção de água residual. O PSA é utilizado para remoção de vários interferentes devido este sorvente ser um trocador aniônico, com forte interação com compostos ácidos. Entretanto não é um sorvente tão eficiente para remoção de gorduras. Assim, a limpeza dos extratos foi modificada ao longo dos anos com o surgimento de sorventes mais eficazes. Uma modificação importante foi a adição do sorvente octadecilsilano (C18) (LEHOTAY *et al.*, 2005c). Este sorvente é utilizado para matrizes com teor de gordura maior que 2%, pois remove com boa eficiência os interferentes apolares, como gorduras (CABRERA *et al.*, 2012). Pode ser utilizado juntamente com PSA na etapa de d-SPE, para promover uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes.

HERRMANN; POULSEN, (2015) determinaram resíduos de 21 agrotóxicos em amostras de trigo e aveia, utilizando o método QuEChERS modificado, seguido de quantificação por GC-MS/MS. O método QuEChERS para extração de resíduos de agrotóxicos em aveia consistiu em pesar 5 g de amostra moída, seguido da adição de 10 mL de água e 15 mL de acetonitrila, no qual realizou-se agitação por 1 min. Após, adicionou-se 6,0 g de MgSO₄, 1,5 g de NaCl, 1,5 g de di-hidrato de citrato de sódio e 0,75 g de sesquihidrato de citrato de sódio seguido de agitação no vortex por 1 min e centrifugação durante 10 min. O sobrenadante foi armazenado a -80 °C durante um mínimo de 1 h. Os extratos foram descongelados e, quando ainda muito frios, centrifugados durante 5 min. A etapa de limpeza foi realizada com 25 mg de PSA, seguido de agitação por 30s, centrifugação por 5 min, filtração e análise por GC-MS/MS.

Yao e colaboradores (2018) testaram a extração de quatro agrotóxicos em amostra de solo, por QuEChERS modificado, utilizando como sorvente na d-SPE alumina ativada neutra combinada com C18. A alumina ou óxido de alumínio, pode apresentar característica alcalina, ácida ou neutra dependendo do preparo deste sorvente, e é geralmente empregada na separação de compostos lipofílicos. Já para compostos com baixa polaridade emprega-se o florisil (BORGES *et al.*, 2015).

ARIAS e colaboradores (2018) utilizaram a quitosana do resíduo de casca de camarão na etapa de limpeza. Este sorvente foi avaliado no método QuEChERS, a

fim de determinar múltiplos resíduos de drogas veterinárias em diferentes tipos de leite. Os autores destacam que a quitosana mostrou-se eficaz, pois reduziu tanto o efeito matriz, quanto a turbidez do extrato.

A quitosana é um polissacarídeo catiônico, obtido através de reações de desacetilação da quitina, um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos, através de um processo de alcalinização sob altas temperaturas, e também tem diversas aplicações como na agricultura, medicina, meio ambiente e alimentos (Crini, 2005). A quitina e a quitosana são biopolímeros renováveis, de baixo custo e suscetíveis a alterações químicas para aumentar sua capacidade de adsorção (DOTTO *et al.*, 2011).

HRYNKO e colaboradores (2018) testaram a extração de resíduos de inseticidas em plantas daninhas e culturas agrícolas, utilizando o método QuEChERS, e na etapa de limpeza foram avaliadas duas combinações de sorventes de limpeza, dentre deles o Z-Sep+ e quitosana. O sorvente Z-Sep+ apresentou recuperações satisfatórias dentro da faixa de 70 a 120% para a maioria dos compostos analisados. Este é um sorvente comercial a base de zircônia, desenvolvido recentemente pela Sigma Aldrich a partir de uma mistura de C18 e sílica revestida com dióxido de zircônio, na proporção 2/5 de $ZrO_2/C18$. Este sorvente visa melhorar a limpeza de amostras de matrizes complexas, removendo gordura (<15%) e pigmentos.

Recentemente, um novo material para limpeza de extrato foi lançado no mercado, Bond Elut EMR-Lipid, desenvolvido pela Agilent. É um produto exclusivo para amostras com alto teor de gordura para a remoção de lipídios. O procedimento de análise empregando EMR-Lipid envolve uma primeira etapa de limpeza do extrato com sorvente, que consiste em 1 g de EMR-Lipid em um tubo de polipropileno de 15 mL, seguida ou não de uma etapa de partição, com de $MgSO_4/NaCl$ na proporção 4:1 (m/m) em outro tubo de polipropileno de 15 mL; esta segunda etapa é denominada polish (ZHAO; LUCAS 2015; HAN *et al.*, 2016). Inicialmente, o material EMR-Lipid é ativado com água e sua eficiência na remoção de lipídios ocorre através das interações hidrofóbicas e exclusão por tamanho. Assim, os lipídios são retidos pelas partículas devido sua grande cadeia de hidrocarbonetos, enquanto os demais analitos não interagem devido ao tamanho da partícula (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015).

2.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM SÉRIE (LC-MS/MS)

Em virtude da crescente preocupação com relação à presença de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais e em alimentos, existem diferentes metodologias para a determinação desses resíduos. Dentre as técnicas para determinação de resíduos de agrotóxicos destacam-se a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida.

A cromatografia líquida tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala e tempo de poucos minutos com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS *et al.*, 2009). Na cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, a amostra é introduzida e separada na coluna cromatográfica, através da eluição com fase móvel, e submetida a ionização e posterior determinação em espectrômetro de massas (STACHNIUK; FORNAL, 2016).

Para a cromatografia é o espectrômetro de massas, tanto para análises qualitativas quanto quantitativas de uma gama enorme de constituintes. Na espectrometria de massas, as moléculas são ionizadas, aceleradas por um campo elétrico e então separadas de acordo com sua massa. O processo de ionização geralmente confere energia suficiente para quebrar as moléculas numa variedade de fragmentos, originando seu espectro de massas. A espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial em fornecer informações de massa molar, bem como sobre a estrutura do analito. Por isso o uso do espectrômetro de massas está se tornando cada vez mais comum, apesar de seu alto custo e necessidade de capacitação técnica para operação. O espectrômetro de massas é um instrumento sofisticado constituído de três partes: fontes de ionização, muitas vezes denominada interface, analisador de massas e detector de íons com aquisição e processamento de dados. As diferenças nestes três componentes diferenciam o tipo de espectrometria de massas empregado (COLLINS *et al.*, 2009).

As fontes de ionização mais utilizadas em cromatografia líquida são ionização por eletronebulização ESI (do inglês *electrospray ionization*) e ionização química à pressão atmosférica, APCI (do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*)

(LANÇAS, 2009). Mais comumente utiliza-se a ionização por eletronebulização (ESI), onde a amostra é dissolvida e pressurizada em tubo capilar de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. À medida que ocorre a dessolvatação, assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂), o tamanho das gotas é reduzido até que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Assim ocorre a chamada “explosão coulombica”. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, que são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização. Neste processo, a ionização ocorre à pressão atmosférica, enquanto o espectrômetro de massas se encontra sob “vácuo” (LANÇAS, 2009).

O acoplamento da cromatografia em fase líquida com a espectrometria de massas (EM) caracterizou-se pelas tentativas de resolver as três incompatibilidades fundamentais geradas. A primeira, refere-se à quantidade do efluente da coluna que pode ser introduzida no sistema de vácuo ao espectrômetro de massas. A segunda, refere-se à composição do efluente da coluna - para o acoplamento é proibido o uso de fase móvel contendo aditivos não voláteis, como tampão fosfato, EDTA e reagente par iônico. Já a terceira, refere-se ao tipo de analito analisado que compreende compostos altamente polares, instáveis termicamente, iônicos e de massa molar alta, que são difíceis de serem ionizados. Atualmente estes problemas foram contornados e a espectrometria de massas é amplamente utilizada em cromatografia líquida.

O acoplamento da cromatografia líquida com o espectrômetro de massas em série permite uma alta seletividade, eficiência na separação, informação estrutural, massa molar e aumentar a detectabilidade em uma única ferramenta de análise (OSHITA; JARDIM, 2015). Um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo é formado pela junção de três quadrupolos em sequência, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, pois o íon sofre nova fragmentação por colisão com íons de N₂ ou Ar. Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Para obtenção do espectro de massas em MS/MS, uma das técnicas é a varredura completa (FS, do inglês *full scan*), monitoramento de íon selecionado (SIM, do inglês *selected ion monitoring*), varredura do íon produto e a varredura do íon precursor e monitoramento seletivo de reações (SRM, do inglês *Selected Ion Monitoring*). Quando os componentes da amostra não são conhecidos o tipo de varredura *full scan* é muito comum, pois se pode realizar um screening em uma ampla faixa de m/z . O cromatograma nestas condições é conhecido como cromatograma de íon total (TIC, do inglês *Total ion chromatogram*) (STASHENKO; MARTINEZ, 2010; STACHNIUK; FORNAL, 2016). O modo SIM é muito utilizado quando se tem apenas um quadrupolo, mas também pode ser utilizado no sistema triplo quadrupolo. Quando operado no modo SIM, pode aumentar a sensibilidade, pois pode escolher um único íon a ser monitorado ou vários íons característicos dos analitos alvo de interesse presentes em uma mistura complexa (STACHNIUK; FORNAL, 2016).

2.6.1 Aplicação do método QuEChERS e LC-MS/MS na análise de agrotóxicos em aveia e seus derivados

Na literatura tem sido relatado o uso do método QuEChERS e suas variações na determinação de diferentes compostos em amostras de aveia e derivados utilizando a Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas em série.

LUCILINI e colaboradores (2011) determinaram resíduos de pirimifós metílico em aveia e trigo com método de QuEChERS citrato e determinação por LC-MS/MS. Para o preparo da amostra de grãos pesou-se 5,0 g amostra em tubos de 50 mL, e adicionou-se 10 mL de água seguido de 10 mL de ACN. A partição foi feita com 0,5 g de sesqui-hidrato de hidrogenocarbonato dissódico, 4 g de sulfato de magnésio, 1 g de cloreto de sódio, 1 g de citrato trissódico desidratado e seguido de agitação e centrifugação por 5 min. Na etapa de limpeza, considerando 5 mL de extrato, utilizou-se 0,85 g de sulfato de magnésio e 0,125 g de PSA, seguida de agitação e centrifugação por 5 min e após filtração a injeção do extrato no sistema LC MS/MS. O sistema cromatográfico utilizou a coluna de separação Kinetex C18 com 50 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 2,6 μm de tamanho de partícula. A fase móvel empregada foi fase A, que consistia em 0,05% de formiato de amônio em água, enquanto a fase móvel B era 0,05% de formiato de amônio e metanol, a separação foi

realizada pelo modo isocrática e a percentagem de solvente B foi de 80%. O tempo de análise foi de 5 min com a coluna mantida a 35 °C e o volume de injeção de 10 µL. O método proposto apresentou resultados de recuperação e RSD variando entre 73 a 92% e RSD variou de 11 a 16%, respectivamente.

SANTILIO e colaboradores (2011) determinaram resíduos de herbicidas ácidos (2,4-D, diclorprop, diclorprop-p, fluazifop, fluroxipir, MCPA, mecoprop e mecoprop-p) em cereais (farinha de centeio, farinha de aveia, flocos de aveia e aveia descascada) utilizando LC-MS/MS. O método envolve uma hidrólise alcalina com hidróxido de sódio para liberar compostos ligados covalentemente, antes da extração com QuEChERS, seguida de neutralização. Foi estudado o desempenho do método com ou sem hidrólise alcalina em termos de taxas de recuperação e limite de quantificação (LOQ). O método não teve a etapa de limpeza. Para o preparo da amostra de grãos pesou-se 5,0 g amostra em tubos de 50 mL, e adicionou-se 10 mL de água seguido de agitação, após foi adicionado 300 µL de solução de NaOH 5 N, seguido de agitação durante 1 min e deixado em repouso por 30 min. Após 30 min, 300 µL de uma solução de 5 N H₂SO₄ foi adicionada ao tubo. Em seguida, 10 mL de ACN foram adicionados, seguido da adição de 100 µL de solução de padrão interno (nicarbazina) e agitação em vortex por 1 min. A partição foi feita com 4 g de sulfato de magnésio anidro, 1 g de cloreto de sódio, 1 g de citrato trissódico desidratado, 0,5 g de citrato dissódico sesquihidratado, após agitação em vortex por 1 min, seguida de centrifugação por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm para um tubo de 15 mL. Após, foi adicionado mais 10 mL de ACN e levado ao freezer por uma noite a -20 °C. Em seguida, uma alíquota de 1 mL foi transferida para um frasco para análise por sistema LC-MS/MS. Foi realizado também o mesmo procedimento de extração, porém sem a hidrólise alcalina para comparação dos resultados.

Para esta determinação o modo de ionização utilizado foi ESI negativo. A coluna de separação foi a Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm, 2,1 mm i.d., 3,5 mm de tamanho de partícula. Como fase móvel ACN:água a uma vazão de 0,3 mL/min e 5 µL como volume de injeção. O desempenho do método com ou sem hidrólise alcalina foi estudado em termos de taxas de recuperação e limite de quantificação (LOQ). Em ambos os casos, as recuperações foram determinadas em quatro níveis de pico (0,02, 0,05, 0,1 e 0,5 mg/kg) com 5 repetições para cada nível. As recuperações médias variaram de 90 a 120%, enquanto que os desvios padrão relativos (RSD%)

mostraram-se inferiores a 20%. Os autores relatam que as recuperações dos testes realizados com o procedimento de hidrólise alcalina e sem hidrólise dos níveis de 0,02 e 0,5 mg/kg foram satisfatórias. O método desenvolvido foi aplicado para a análise de vários cereais comercialmente disponíveis, como farinha de centeio, farinha de aveia, flocos de aveia e aveia descascada. Não foram encontrados níveis de resíduos acima do limite de quantificação (LOQ) do método. Sendo assim, os autores concluíram que o método é adequado para o monitoramento de rotina de herbicidas em amostras de cereais, dentre estes a aveia.

2.7 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O planejamento fatorial tem como objetivo ajudar a identificar as variáveis que apresentam maior influência nos efeitos de resposta. Segundo CUNICO *et al.*, (2008) o planejamento fatorial permite avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais. Atualmente, os métodos empregados para análise de resíduos e contaminantes permitem a obtenção de grande quantidade de dados e informações, estas sendo geradas cada vez mais rápidas devido ao avanço das técnicas que permitem a rapidez das respostas analíticas. Neste sentido, faz-se necessário o uso de ferramentas estatísticas, que auxiliam na exploração e entendimento da gama crescente de dados gerados (PEREIRA-FILHO *et al.*, 2002).

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística importante e simples, mas ao iniciar o planejamento experimental devem ser definidos os fatores e as respostas de interesse. Além de conhecer alguns conceitos básicos, o fator é definido como cada variável do sistema. Os níveis são as condições de operação dos fatores investigadas nos experimentos. O efeito é a mudança ocorrida na resposta quando se modificam os níveis. Quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, o planejamento fatorial é o mais indicado, sendo que em cada réplica, todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável são investigadas. Normalmente, esse tipo de planejamento é representado por b_k , sendo k o número de fatores e b o número de níveis escolhidos (CUNICO *et al.*, 2008).

Para obtenção de um resultado mais confiável principalmente quando se trata de variáveis quantitativas, utilizam-se planejamentos fatoriais com ponto central, onde

um experimento é incluído no centro do planejamento, no qual o valor médio dos níveis de todas as variáveis é empregado. Esse tipo de planejamento varre três níveis de cada fator, permitindo assim, verificar se há ou não falta de ajuste para um modelo linear (TEÓFILO; FERREIRA, 2006; CUNICO *et al.*, 2008). Esta metodologia pode ser aplicada quando se usa somente variáveis quantitativas. Deve-se ressaltar que em um planejamento fatorial as réplicas ou repetições tem grande importância para a determinação do erro experimental do resultado. A partir das repetições é possível obter a média e a variância das replicatas (TEÓFILO; FERREIRA, 2006; CUNICO *et al.*, 2008). O planejamento fatorial vem cada vez mais sendo utilizado, pois as suas vantagens incluem a redução dos custos, a diminuição de resíduos gerados e uma melhor interpretação dos resultados.

2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A validação determina a adequação de uma análise no sentido de fornecer a informação desejada. Pode ser aplicada a amostras, métodos e dados. Neste sentido existem documentos orientativos para a validação (INMETRO, 2017).

A norma internacional ISO/IEC 17025:2017, que é uma norma específica para laboratórios de ensaio e de calibração, apresenta a “validação de métodos” como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, bem como a documentação do trabalho de validação. Para o INMETRO (2017), a validação vem do objetivo de confirmar se os métodos são apropriados para o uso pretendido, sendo que os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente. Segundo a ANVISA (2017), as verificações precisam ser realizadas para garantir que as características de desempenho de um método sejam entendidas e para demonstrar que o método seja cientificamente coerente, sob as condições nas quais ele deve ser aplicado.

Segundo a SANTE (2017), a validação de métodos analíticos tem como objetivos a uniformização dos sistemas de controle de qualidade, a garantia da qualidade e a comparabilidade de resultados analíticos, a garantia de exatidão aceitável e de que resultados falsos negativos ou positivos sejam evitados. Este documento é importante em nível internacional para controle de qualidade analítica e procedimentos de

validação para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, e é denominado "Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues and analysis in food and feed", elaborado pela UE.

As principais características de desempenho podem abordar: Seletividade; Linearidade; Efeito Matriz; Exatidão; Precisão; Recuperação; Limite de detecção e Limite de quantificação (INMETRO, 2017), conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros avaliados na validação de um método analítico.

Parâmetro	Definição	Aplicação	Referência
Seletividade	Capacidade de um método em determinar exatamente um analito em uma amostra sem a interferência de analitos de interesse e outras substâncias presentes na matriz	Extração da matriz "branco"	INMETRO, 2017; SANTE, 2017
Limite de Quantificação	Menor quantidade do analito em análise que pode ser medida, com um grau aceitável de confiança	S/R = 10	INMETRO, 2017; SANTE, 2017
Limite de Detecção	Menor quantidade da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada	S/R = 3	INMETRO, 2017
Faixa Linear	Capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado como curva analítica	Curva Analítica ($y = ax + b$)	INMETRO, 2017; SANTE, 2017
Exatidão	Grau de concordância entre os resultados individuais de um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro	Ensaio de recuperação	INMETRO, 2017; SANTE, 2017
Precisão	Descreve a proximidade entre os resultados que foram obtidos exatamente da mesma forma	Repetibilidade e Reprodutibilidade	INMETRO, 2017; SANTE, 2017
Efeito Matriz	Aumento ou diminuição na resposta do detector na presença do analito no extrato da matriz em relação ao solvente	Varição aceita de +20 a -20	INMETRO, 2017; SANTE, 2017

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho foram os seguintes:

- Sistema LC-MS/MS Varian (USA) equipado com: Cromatógrafo Líquido com bomba binária 212-LC, forno para coluna e sistema de desgaseificação; Amostrador automático ProStar 410; Detector MS 320, triplo quadrupolo (TQ) *Mass Spectrometer*, utilizando o modo de ionização por eletronebulização e sistema de aquisição de dados através do software MS Workstation versão 6.9.2; Sistema gerador de nitrogênio LC/MS 12/2 (Domnick Hunter, Inglaterra). Os cromatogramas full scan foram obtidos no sistema GC-MS/MS triplo quadrupolo, modelo Intuvo (Agilent Technologies, EUA).
- Agitador vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Balança analítica de precisão, modelo SV-200 (AND, Japão), UW-220D e UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Centrífuga Centribio, modelo 80-2B (Centribio, Brasil);
- Centrífuga refrigerada, modelo NT 825 (Nova técnica, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Moinho IKA® Modelo A11 BS32 (Alemanha);
- Freezer vertical, Consul de capacidade de 100 L (Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3® (Millipore, EUA).

3.2 Materiais e reagentes utilizados

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3® (18,2 MΩ cm);
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, Brasil);

- ✓ Acetato de sódio anidro (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil C18 com diâmetro de partícula (d.p.) 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil PSA com d.p. de 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Bond Elut EMR-lipid (Agilent, EUA);
- ✓ Florisil® 60-120 mesh (J. T. Baker, EUA);
- ✓ SupelTM QuE Z-Sep+ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Quitosana (obtida e caracterizada no Laboratório de Operações Unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, a partir de resíduos de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*) com d.p. de 62-76 µm (Rio Grande, Brasil);
- ✓ Extran® neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Filtros de PTFE de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ✓ Gás de colisão: argônio 99,9992% de pureza (Air Products, Brasil);
- ✓ Padrões sólidos dos agrotóxicos estudados, conforme Tabela 3;
- ✓ Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas, 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha)

3.3 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

As amostras "branco" de grãos de aveia foram adquiridas no interior da cidade de Ijuí, no Estado do Rio Grande do Sul. Para o processamento, coletou-se uma porção de 1000 g de amostra, sendo em seguida processada utilizando o moinho a fim de reduzir a granulometria para que este adquirisse um aspecto de farelo. As amostras processadas foram armazenadas em potes com capacidade de 200 g e em temperatura de -20 °C. Para o desenvolvimento do método utilizou-se a amostra a temperatura ambiente.

3.4 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE

A utilização do padrão interno e do padrão de controle tem como objetivo verificar fontes de erros, pois corrige alguns fatores do método analítico que pode ter um impacto sobre os resultados do procedimento.

Para este trabalho selecionou-se como padrão interno, para avaliação do instrumento LC-MS/MS, o composto trifenilfosfato (TPP, do inglês *triphenylphosphate*). A solução de trifenilfosfato foi preparada em acetonitrila e uma alíquota foi adicionada ao final da etapa de preparo de amostra, diretamente no extrato final e antes da injeção cromatográfica, obtendo-se uma concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ no equipamento.

O padrão de controle é definido como um composto puro adicionado ao material de análise, a fim de verificar a eficiência do procedimento de extração e de limpeza do extrato, portanto o mesmo foi adicionado no momento da fortificação das amostras. O padrão de controle selecionado foi atrazina deuterada d-5 com a concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.5 AGROTÓXICOS SELECIONADOS

Os agrotóxicos utilizados no desenvolvimento deste trabalho são de uso autorizado pela ANVISA, juntamente com compostos que não tem autorização e estão apresentados na Tabela 3, com seu grupo químico, classe e seu limite máximo permitido na União Europeia e no Brasil. Os compostos selecionados para este estudo foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemanha).

Tabela 3- Informações sobre os agrotóxicos estudados e Limites Máximos de Resíduos para grãos de aveia.

Analitos	Grupo Químico	Classe	Brasil (mg/kg)	EU (mg/kg)
Atrazina	Triazina	H	-	0,05
Azoxistrobina	Estrobilurina	F	1,0	1,5
Bispiribaque sódico	Ác.pirimidinil-oxibenzóico	H e RC	-	-
Bitertanol	Triazol	F	-	0,01
Boscalida	Anilida	F	-	4,0
Carbaril	N-Metilcarbamato	I	-	0,5
Carbendazina	Benzimidazol	F	-	-
Carbofurano	N-Metilcarbamato	I	-	-
Ciproconazol	Triazol	F	0,1	0,2
Cianizina	Triazina	H	-	-
Clomazone	Isoxazolidinona	H	-	-
Clorprofam	Carbanilato	RC e H	-	-
Deltametrina	Piretróide	I	-	2,0
Diazinona	Organofosforado	I	-	-
Difenoconazole	Triazol	F	0,3	0,05
Dimetoato	Organofosforado	I	-	0,02
Fempropatrina	Piretróide	I	0,06	0,01
Fempropimorfe	Morfolina	F	-	-
Fenarimol	Pirimidinilcarbinol	F	-	0,02
Fipronil	Pirazol	I	-	0,005
Flutalonil	Carboxamida	F	-	0,01
Imidacloprido	Neonicotinóide	I	0,05	0,1
Iprovalicarbe	Carbamato	F	-	0,01
Malationa	Organofosforado	I e A	-	8,0
Mecarbam	Organofosforado	I	-	0,01
Mepronil	Carboxamida	F	-	0,01
Metaconazole	Triazol	F	-	0,4
Metalaxil	Acilalaninato	F	-	0,01
Metsulfurom metílico	Sulfoniluréia	H	0,05	0,01
Mevinfós	Organofosforado	I	-	0,01
Miclobutanil	Triazol	F	-	-
Monocrotofos	Organofosforado	I	-	0,02
Monolinurom	Uréia	H	-	0,01
Oxamil	Carbamato	I	-	0,01
Piraclostrobina	Estrobilurina	F	1,0	1,0
Pirazofos	Organofosforado	F e I	-	0,01
Piridaben	Piridazinona	I	-	0,05
Piridafetiona	Organofosforado	I	-	-

Analitos	Grupo Químico	Classe	Brasil (mg/kg)	EU (mg/kg)
Pirimicarbe	Dimetilcarbamato	I	-	0,05
Pirimifos metílico	Organofosforado	I e A	-	5,0
Procloraz	Imidazol	F	-	1,0
Profenofós	Organofosforado	I	-	0,01
Propargito	Sulfito de alquila	A	-	0,01
Propiconazole	Triazol	F	0,02	0,7
Propizamida	Benzimidazol	H	-	0,01
Propoxur	Carbamato	I	-	0,05
Simazina	Triazina	H	-	0,01
Tebuconazole	Triazol	F	0,1	2,0
Terbutilazina	Triazina	H	-	0,05
Tetraconazole	Triazol	F	0,02	0,1
Tiacloprido	Neonicotinóide	I	-	0,9
Tiametoxam	Neonicotinóide	I	0,2	0,02
Tolclofos metílico	-	F	-	-
Terbufos	Organofosforado	I e N	-	0,01
Triadimefom	Triazol	F	-	0,01
Triazofos	Organofosforado	I, A e N	-	0,02
Triclorfom	Organofosforado	I	-	0,01
Trifloxistrobina	Estrobilurina	F	0,05	0,4
Triflumizole	Imidazol	F	-	0,1
Vamidationa	Organofosforadol	I e A	-	-

A: Acaricida; F: Fungicida; I: inseticida; N: Nematicida; RC: Regulador de crescimento

3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Preparou-se inicialmente as soluções analíticas na concentração de 1000 mg/L em acetonitrila; cada agrotóxico foi preparado a partir da pesagem da massa do padrão sólido, onde levou-se em consideração o grau de pureza do padrão sólido. As soluções foram preparadas em balão volumétrico e foram agitadas em vortex por 1 min para a completa dissolução. A partir da solução de 1000 mg/L de cada composto, preparou-se as misturas dos agrotóxicos em solvente na concentração de 10 mg/L. A solução de atrazina deuterada foi preparada em um frasco individual, assim como a solução de trifenilfosfato, sendo ambos em acetonitrila.

Com a mistura de 10 mg/L⁻¹ realizou-se as fortificações das amostras e também preparou-se uma mistura na concentração de 1 mg/L⁻¹ para realizar as curvas de trabalho na matriz e no solvente. Todas as soluções analíticas foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura -5 °C.

3.7 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA LC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AVEIA

O método foi construído após a infusão de cada analito desejado, no LC-MS/MS, através de soluções analíticas na concentração de 1 mg/L^{-1} , onde as informações como: íon precursor, íon produto, energia de colisão de cada agrotóxico de interesse foram adquiridas. Os parâmetros como temperatura da fonte, voltagem do capilar e o modo de ionização (ESI+/-), temperatura e pressão do gás de dessolvatação para secagem do solvente foram previamente estabelecidos pelo LARP.

3.7.1 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS

A escolha da fase móvel levou em consideração as condições utilizadas frequentemente no LARP, onde foi desenvolvido este trabalho. A Fase móvel utilizada foi: (A) solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol/L e (B) metanol.

Tabela 4 - Gradiente de fase móvel utilizado para a eluição dos analitos.

Tempo (min)	%A	%B
0,0	90	10
2	90	10
4	55	45
16	10	90
25	5	95
33	90	10

A vazão da fase móvel foi $150 \mu\text{L min}^{-1}$; a fonte de ionização empregada foi ESI operando no modo SRM, positivo e negativo; o analisador de massas do tipo Triplo Quadrupolo, operando no modo MS/MS; a temperatura da coluna foi $30 \text{ }^\circ\text{C}$; a pressão do gás de nebulização foi de 20 psi ; o volume de injeção foi $10 \mu\text{L}$; a temperatura de dessolvatação utilizada foi $250 \text{ }^\circ\text{C}$; com vazão do gás de dessolvatação (N_2) de 40 psi ; temperatura da fonte foi $50 \text{ }^\circ\text{C}$; a pressão do gás de colisão ficou em $1,8 \text{ mTorr}$ e o tempo da análise cromatográfica foi de 30 min .

3.8 TESTES PRELIMINARES

3.8.1 Avaliação do método QuEChERS

Os métodos de preparo de amostra propostos neste trabalho foram desenvolvidos com base em trabalhos da literatura para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos: QuEChERS original (ANASTASSIADES et al., 2003), QuEChERS acetato (LEHOTAY et al., 2005), QuEChERS citrato (ANASTASSIADES et al., 2007) Para garantir a eficiência da extração algumas modificações destes métodos foram realizadas, devido às características das amostras em estudo. Conforme Herrmann e colaboradores (2017), cereais com baixo teor de umidade, como a aveia, requerem adição de água antes da etapa de extração, visando melhorar a extração dos compostos. A proporção de amostra:água (m/v) utilizada por Hermann (2015), foi 5 g de amostra moída, seguido da adição de 10 mL de água. Ainda, RASCHE *et al.* (2015) utilizou 5 g de farinha de trigo e aveia e 10 mL de água. Os ensaios foram avaliados no nível $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ em triplicata.

No teste realizado com o método QuEChERS-original. A extração foi realizada pesando 5 g de amostra, adição de 10 mL de água e 5 mL de acetonitrila. Após agitação de 1 min com o auxílio do vortex, foi adicionado 2 g de sulfato de magnésio e 0,5 g de cloreto de sódio, e novamente agitado e centrifugado (6000 rpm, 10 min, 10°C). Em 1 mL do sobrenadante foi adicionado 150 mg de sulfato de magnésio e 25 mg de PSA, seguido de agitação e centrifugação (6000 rpm, 10 min, 10°C). Após este procedimento, 1 mL do sobrenadante foi filtrado e o extrato foi diluído em uma mistura da fase móvel 1:1 (v/v).

Outro teste foi realizado com o método QuEChERS-acetato. A extração foi realizada da seguinte forma: foram pesadas 5 g de amostra com adição de 10 mL de água e 5 mL de uma solução de acetonitrila com 1% de ácido acético. Após agitação de 1 min em vortex, foi adicionado 2 g de sulfato de magnésio anidro e 0,5 g de acetato de sódio e novamente agitado seguido de uma centrifugação (6000 rpm, 10 min, 10°C). Em uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi adicionado 150 mg de sulfato de magnésio e 25 mg de PSA sendo promovidas uma nova agitação e centrifugação (6000 rpm, 10 min, 10°C). Após este procedimento, 1 mL do sobrenadante foi filtrado em filtro de nylon $0,22 \mu\text{m}$. O extrato final foi diluído em mistura de fase móvel 1:1 (v/v).

Um último teste de extração empregou o método QuEChERS citrato. A extração foi realizada da seguinte forma: foram pesadas 5 g de amostra com adição de 10 mL de água e 5 mL de uma solução de acetonitrila. Após agitação de 1 min com o auxílio do vortex, foi adicionado 2 g de sulfato de magnésio, 0,5 g de cloreto de sódio 0,25 g de citrato de sódio e 0,5 citrato de sódio tribásico e novamente agitado seguido de uma centrifugação (6000 rpm, 10 min, 10 °C). Em uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi adicionado 150 mg de sulfato de magnésio e 25 mg de PSA, seguido de agitação e centrifugação. Após, 1 mL do sobrenadante foi filtrado em filtro de nylon 0,22 µm e o extrato final foi diluído 1:1 (v/v) com a fase móvel para análise.

3.8.2 Avaliação da hidratação da amostra de aveia

A segunda etapa dos testes preliminares foi realizada para otimizar o volume de água utilizado na hidratação da amostra com o objetivo de tornar mais acessível a extração dos compostos pelo solvente. Foram realizados dois testes, o primeiro com 5 gramas de amostra e adição de 10 ml de água e 5 mL de acetonitrila, o segundo com 5 gramas de amostra e adição de 5 ml de água. As misturas dos testes foram homogeneizadas em vortex por 1 min, foi adicionado 2 g de sulfato de magnésio anidro e 0,5 g de cloreto de sódio, e novamente agitado seguido de uma centrifugação (6000 rpm, 10 min, 10 °C). Em uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi adicionado 150 mg de sulfato de magnésio anidro e 25 mg de PSA sendo promovidas uma nova agitação e centrifugação (6000 rpm, 10 min, 10 °C). Após este procedimento, 1 mL do sobrenadante foi filtrado em filtro de nylon com tamanho de partícula 0,22 µm. O extrato final foi diluído em uma mistura da fase móvel 1:1 (v/v). O nível de fortificação avaliado foi de 100 µg kg⁻¹ com 3 repetições para cada ensaio.

3.8.3 Otimização da etapa de limpeza no método QuEChERS

Após a realização dos testes anteriores, foi realizada a otimização da etapa de limpeza usando os sorventes descritos na Tabela 5. Todos sorventes foram testados no nível de fortificação de 50 µg kg⁻¹ em triplicata. A etapa de extração foi realizada da seguinte forma para ambos os testes: 5 g de amostra, com adição de 5 mL de água e 5 mL de acetonitrila. Após agitação de 1 minuto com o auxílio do vortex, foi adicionado

2 g de sulfato de magnésio anidro e 0,5 g de cloreto de sódio, e novamente agitado seguido de uma centrifugação (6000 rpm, 10 minutos, 10°C). A escolha do melhor sorvente para limpeza foi realizada através da avaliação dos resultados de recuperação (R) e desvio padrão relativo (RSD). Como análise complementar foi realizada análise de varredura dos extratos “branco” em GC-MS/MS, com o objetivo de observar quais sorventes promoveram melhor limpeza do extrato.

Tabela 5 - Sorventes testados durante a etapa de limpeza.

Teste	Etapa de limpeza
T1	1 mL extrato + 0,05 g de C18
T2	1 mL extrato + 0,0625 g de quitosana
T3	1 mL extrato + 0,03 g de PSA
T4	1 mL extrato + 0,03 g de PSA + 0,05 g DE C18
T5	1 mL extrato + 0,0625 g de quitosana + 0,05 g DE C18
T6	1 mL extrato + 0,0625 g de Florisil + 0,05 g DE C18
T7	1 mL extrato + 0,150 g de MgSO ₄ + 0,03 g de PSA + 0,05 C18
T8	1 mL extrato + 0,150 g MgSO ₄ + 0,05 g Z-Sep ⁺
T9	1 mL H ₂ O → 1 mL extrato + 0,2g EMR-Lipid → agitação vortex 1min → centrifugação 6000 rpm/10 min/10 °C → 1 mL extrato + 0,4 g EMR-Polish*
T10	1 mL extrato + 0,0625 g de Florisil

3.8.4 Planejamento Fatorial 3²

Com a escolha do melhor método de extração e melhor sorvente de limpeza, realizou-se um planejamento fatorial com duas variáveis, a fim de otimizar o processo de limpeza dos extratos. Portanto, foram testadas variações nas quantidades dos sorventes para avaliar a influência na recuperação dos agrotóxicos em estudo. Aplicou-se um planejamento fatorial 3², com uso de repetição em triplicata do ponto central e extrapolação dos níveis das variáveis. Assim, conforme Tabela 6, a etapa de planejamento experimental consistiu na avaliação do uso de dois sorventes.

Tabela 6 - Condições dos ensaios realizados no planejamento experimental para otimização das condições de limpeza.

Ensaio	Sulfato de Magnésio (mg)	Quitosana (mg)
1	50	20
2	50	60
3	50	100
4	150	20
5	150	60
6	150	100
7	250	20
8	250	60
9	250	100

3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AVEIA POR LC-MS/MS

O método QuEChERS proposto neste trabalho visando a determinação de resíduos de agrotóxicos em aveia foi validado conforme os parâmetros já descritos de seletividade, curva analítica e faixa linear, limites de detecção e quantificação, exatidão através de ensaio de recuperação, precisão (repetitividade) e precisão intermediária (reprodutibilidade), além da avaliação do efeito matriz.

3.9.1 Seletividade

Avaliar a seletividade é necessário, pois a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2017). A seletividade foi avaliada pela comparação da injeção de extratos da matriz "branco" e matriz branco com a solução dos analitos no sistema LC-MS/MS.

3.9.2 Curva Analítica e Linearidade

A partir da solução de trabalho, foram preparadas curvas no solvente em acetonitrila grau LC e as curvas preparadas na matriz nas concentrações de 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$. As curvas na matriz e no solvente foram injetadas em triplicatas e conforme o INMETRO (2017) determinadas de acordo com a equação 1:

$$y = ax + b \quad \text{Equação (1)}$$

sendo:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y , quando $x = 0$;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação. Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicadas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório (INMETRO, 2017).

Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

3.9.3 Exatidão e Recuperação

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2017). Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI *et al.*, 2004). Geralmente a recuperação é expressa em percentagem da quantidade obtida do analito em relação à quantidade do mesmo que foi adicionado à matriz (RIBANI *et al.*, 2004).

Uma das formas de avaliação da exatidão do método analítico, pode ser feita através do uso de padrões de substituição, do inglês *surrogate*, que são substâncias de concentração conhecida adicionadas as amostras com o objetivo de monitorar diferenças nos valores de recuperação, possibilitando inclusive a detecção de problemas no sistema de extração. Os níveis avaliados foram de 2,5, 5,0, 10, 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com sete replicatas para cada nível de concentração.

A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada.

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. Conforme INMETRO, o cálculo de recuperação é realizado de acordo com a Equação 2.

$$\text{recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Equação 2

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2004).

3.9.4 Precisão (repetitividade) e precisão intermediária

A precisão de um método é a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes e é normalmente expressa em termos de desvio-padrão. Ela é dada ou expressa geralmente em função da concentração de analito (INMETRO, 2017).

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório (INMETRO 2017). A precisão do método foi avaliada, em termos de repetitividade (RSDr) através da extração de análise das amostras fortificadas, sendo realizadas em replicatas (n=7) para cada nível de concentração. A precisão intermediária (RSDpi) foi avaliada realizando o procedimento analítico em dias diferentes, através da injeção da curva analítica e das amostras branco fortificadas nos níveis de 20 e 50 µg kg⁻¹.

A precisão pode ser avaliada através do desvio padrão relativo, de acordo com a equação 3.

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2/n-1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais;

\bar{X} = média das medidas em replicatas;

n = número de medidas.

3.9.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção LOD (do inglês, *Limit of Detection*) para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção. Para a validação de um método analítico, é

normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído (INMETRO, 2017).

O limite de quantificação LOQ (do inglês, *Limit Of Quantification*) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2017). O método mais utilizado para a determinação do LOD e do LOQ é com base na relação sinal ruído do analito.

Os valores de LOQm e o LODm são expressos em $\mu\text{g kg}^{-1}$. O LOQm foi adotado como o menor nível de fortificação que apresentou recuperações entre 70 e 120%, com $\text{RSD} \leq 20\%$. O LODm foi determinado através do LOQm dividido por 3,33 (INMETRO, 2017; SANTE, 2017).

3.9.6 Efeito matriz

O efeito matriz é possível observar quando existe uma diferença considerável na resposta obtida utilizando padrões preparados no solvente e padrões preparados no extrato da matriz, com boa precisão. De acordo com a SANTE (2017) sua determinação se faz pela comparação entre as inclinações das curvas analíticas dos padrões no solvente e as preparadas na matriz.

3.10 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

O método desenvolvido foi aplicado para determinação de resíduos dos agrotóxicos em estudo em 24 amostras de aveia provenientes do estado do Rio Grande do Sul.

Os grãos de aveia processados foram armazenados em frascos de polipropileno sob refrigeração (temperatura abaixo de -20°C).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA LC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM AVEIA.

A Tabela 7 apresenta as condições empregadas no sistema LC-MS/MS para determinação dos agrotóxicos avaliados neste estudo.

Tabela 7 - Condições no sistema LC-MS/MS.

Parâmetros	Condições selecionadas
Coluna analítica	Pursuit XRs Ultra C ₁₈ 100 × 2.0 mm (d. i.) e 2.8 µm tamanho de partícula
Fase móvel	(A) Solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L ⁻¹ e (B) metanol
Gradiente	10% B de 0 a 2 min; alterando até 45% B em 4 min; 90% B até 16 min; 95% B em 19 min, mantido até 23 min e 09% B em 23,5 min, mantido até 27 min
Vazão	0,15 mL min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Detector	Espectrômetro de massas, triplo quadrupolo, operando no modo SRM

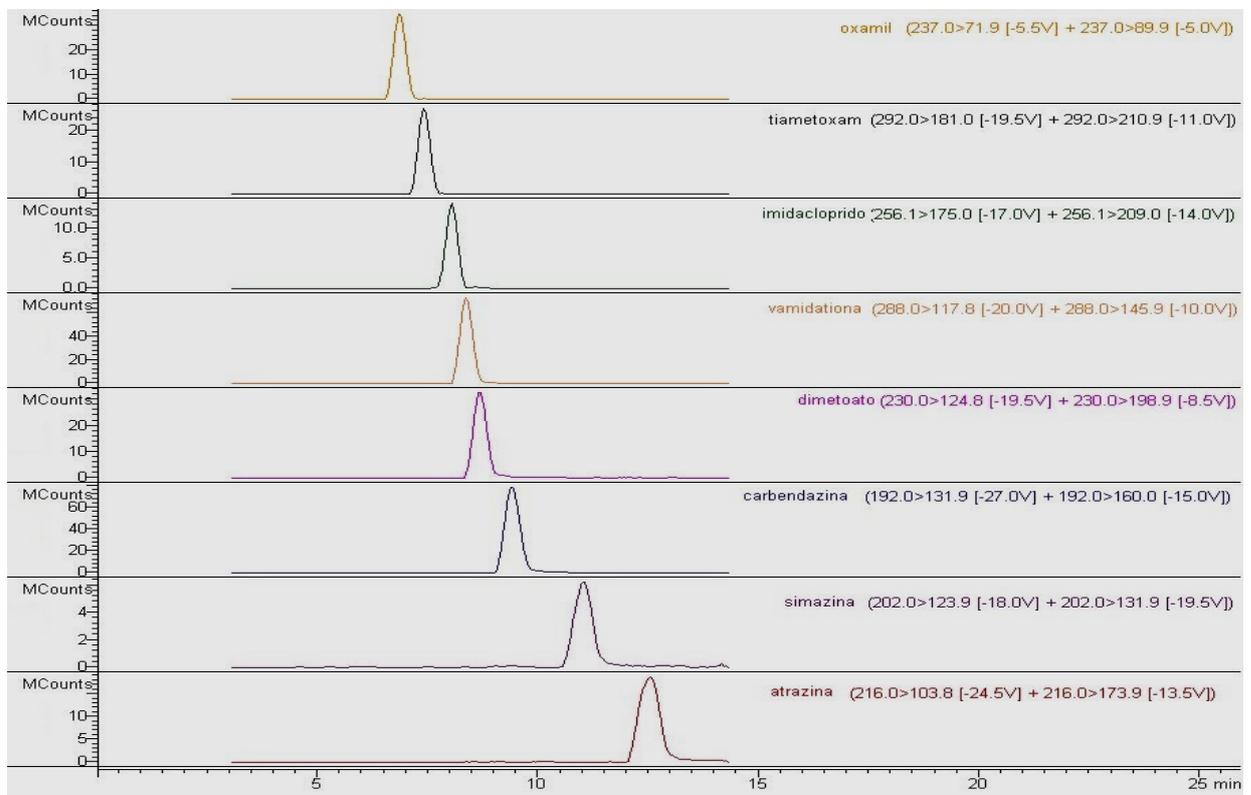
A ionização dos compostos foi em modo positivo e negativo. As informações de tempo de retenção, parâmetros de energia de colisão e transições relativas ao SRM utilizado para cada agrotóxico são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Agrotóxicos e respectivos tempos de retenção, íons precursores, íons produto, energias de colisão e voltagem do cone.

Compostos	t _R (min)	ESI (+/-)	Íon	Íon	Energia de colisão (eV)	Íon	Íon	Energia de colisão (eV)
			Precursor	Produto		Precursor	Produto	
			Transição Quantificação		Transição Confirmação			
Atrazina	12,38	+	216	173,9	13,5	216	103,8	24,5
Azoxistrobina	13,23	+	404	372	14,5	404	328,9	30
Bispirique sódico	16,84	+	453	296,6	17	453	179	18,5
Bitertanol	13,99	+	338	269,1	8	338	251	9,5
Boscalida	14,77	+	343	306,9	17,5	343	270,9	30,5
Carbaril	9,32	+	202	144,9	8	202	126,9	26,5
Carbendazim	10,85	+	192	160	15	192	131,9	27
Carbofurano	10,17	+	222	165	7,5	222	122,9	16,5
Cianizina	13,31	+	241	214,9	14	241	131,9	21,5
Ciproconazol	14,62	+	289,1	69,9	11,5	289,1	124,9	25
Clomazone	20,10	+	240	124,9	18	240	88,9	39,5
Clorprofam	16,52	+	214	171,9	6	214	153,9	14
Deltametrina	14,90	+	523	280,8	15	523	505,9	9
Diazinona	17,20	+	305,1	169	17,5	305,1	153	17
Diclofluanida	8,60	+	350	223,8	14	350	332,8	7,5
Difenoconazol	19,57	+	406	250,9	24	406	336,9	15,5
Dimetoato	21,96	+	230	198,9	8,5	230	124,8	19,5
Fempropatrina	16,52	+	367,2	124,9	12,5	367,2	350,7	7
Fempropimorfe	15,63	+	304,6	147	24,5	304,6	129,9	20,5
Fenarimol	14,16	+	331	267,9	22,5	331	258,9	24,5
Fipronil	14,86	-	435	329,7	15,5	435	249,6	26,5
Flutalonil	14,50	+	324,2	261,9	16,5	324,2	241,9	23
Imidacloprido	14,40	+	256,1	209	14	256,1	175	17
Iprovalicarbe	15,14	+	321	203	8	321	118,9	14
Mataliona	16,80	+	331	126,9	9	331	284,9	8
Mepronil	12428	+	270	228	15	270	118,9	20,5
Mercarbam	7,63	+	330	226,9	7	330	198,9	13
Metaconazol	13,31	+	320,1	69,9	15,5	320,1	124,9	31,5
Metalaxil	14,66	+	280	220	12	280	248	9
Metssulfuron metílico	6,74	+	382	167,5	12	382	198,9	19,5
Mevinfós	16,64	+	242,1	126,8	14,5	242,1	192,9	7,5
Miclobutanil	16,96	+	289,1	69,9	11,5	289,1	124,9	25
Monocrotofós	20,54	+	224	192,9	7	224	126,9	13,5
Monolinurom	14,54	+	215	125,8	15	215	147,9	12
Oxamil	12,38	+	237	71,9	5,5	237	89,9	5

Compostos	t _R (min)	ESI (+/-)	Íon	Íon	Energia de colisão (eV)	Íon	Íon	Energia de colisão (eV)
			Precursor	Produto		Precursor	Produto	
			Transição Quantificação		Transição Confirmação			
Piraclostrobina	21,40	+	388	194	9	388	163	22
Pirazofós	11,97	+	374	222	19	374	194	30
Piridabem	17,08	+	365	309	11,5	365	147	21
Piridafentiona	16,84	+	341	189	20	341	204,9	20
Pirimicarbe	19,43	+	239	182	12,5	-	-	-
Pirimifós metílico	16,56	+	306	164	19,5	-	-	-
Procloraz	14,62	+	376	307,8	11	376	265,8	16,5
Profenofós	12,18	+	375	304,7	19,5	375	346,7	12
Propargito	7,59	+	368	231,1	9,5	368	175,1	12
Propiconazol	10,93	+	342	158,9	25,5	342	69	14
Propizamida	16,36	+	255,9	189,9	10,5	255,9	172,9	18
Propoxur	18,58	+	210	110,9	10	210	168	5
Simazina	8,96	+	202	131,9	19,5	202	123,9	18
Tebuconazol	7,31	+	308	69,9	14	308	124,9	33
Terbufós	17,04	+	288,9	102,9	5	288,9	232,9	5
Terbutilazina	14,54	+	230	174	12	230	131,9	20,5
Tetraconazol	15,07	+	372	158,9	24	-	-	-
Tiacloprido	14,70	+	252,9	125,8	18	252,9	185,9	12,5
Tiametoxam	8,60	+	292	210,9	11	292	181	19,5
Tolclofós	17,77	+	300,9	268,7	15,5	300,9	124,8	13,5
Triadimefom	8,27	+	294	224,9	12	294	197	14,5
Triazofos	11,97	+	314	162	16	314	118,9	32
Triclorfom	17,08	+	257	108,8	15,5	257	220,8	11
Trifloxistrobina	16,84	+	409	186	14	409	206	11
Triflumizol	18,09	+	346	278	10,5	346	220,2	13,5
Vamidationa	19,43	+	288	145,9	10	288	117,8	20

Figura 4 – Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS, para alguns compostos, no modo SRM para uma solução analítica 100 µg L⁻¹ preparada no extrato branco de aveia.

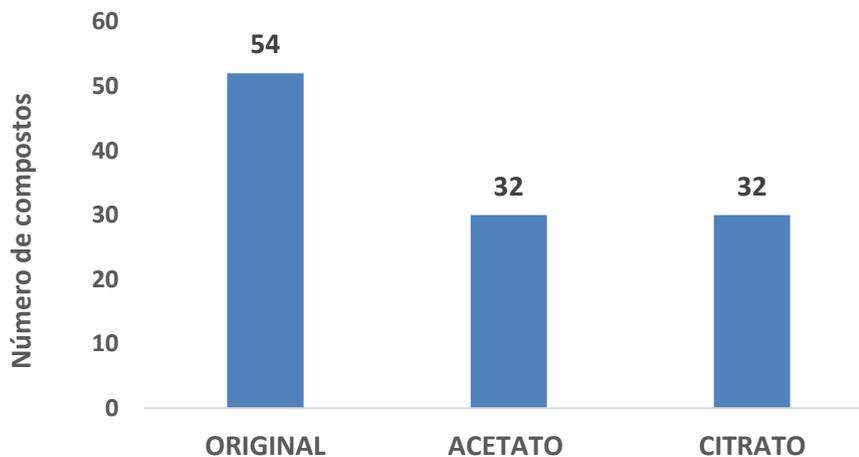


4. 2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA ANÁLISE DE AGROTÓXICOS EM AVEIA

4.2.1 Avaliação do melhor método QuEChERS

As amostras de aveia são matrizes complexas, portanto requerem atenção especial na etapa de preparo de amostra. Conforme descrito no item 3.8 testes preliminares foram realizados visando obter o método mais adequado para a determinação dos compostos em estudo. As diferentes versões dos métodos QuEChERS foram avaliadas conforme o item 3.8.1 em termos de capacidade de fornecer boa extração dos analitos com o mínimo de componentes indesejáveis que possam interferir na análise. Os extratos provenientes destes experimentos foram avaliados através de ensaios de fortificação no nível de 200 µg kg⁻¹ e posterior injeção no sistema LC-MS/MS. Com a comparação dos testes QuEChERS avaliou-se as diferentes respostas dos métodos original, acetato e citrato em termos de R e RSD aceitáveis dos compostos. Os resultados estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Número de compostos obtido com recuperação e RSD aceitáveis nos testes.



Ao compararmos os resultados foi possível observar que o número de compostos dentro dos parâmetros de recuperação e RSD estabelecidos, apresentou grande variação entre os diferentes testes realizados. O método QuEChERS original modificado demonstrou os melhores resultados. O método QuEChERS original na etapa de partição utiliza os sais $MgSO_4$ e $NaCl$. Essa etapa favorece a transferência de compostos mais polares da fase aquosa para a orgânica, reduzindo sua solubilidade na fase aquosa, aumentando a recuperação (PRESTES *et al.*, 2009). A adição de $NaCl$ é responsável pelo efeito de *salting-out*, que melhora a recuperação de compostos mais polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). O uso de $MgSO_4$ é essencial no método QuEChERS, visto que sem ele, não ocorre a separação entre as fases orgânica (ACN) e aquosa. O teste QuEChERS original possibilitou um maior número de compostos recuperados (54), seguido dos testes QuEChERS citrato (32) e QuEChERS acetato (32). Os compostos que apresentaram resultados de recuperação fora da faixa aceitável empregando o método QuEChERS original foram bispiribaque, carbendazina, metsulfurom metílico, procloraz, propargito e triclorfom.

Os compostos carbendazina, procloraz, triclorfom apresentaram resultados satisfatórios no método QuEChERS original. Os autores FACCO (2017) e CABRERA e colaboradores (2012) obtiveram resultados satisfatórios para estes compostos quando utilizando o método QuEChERS acetado modificado para a etapa de partição nas amostras de cereais. O método QuEChERS acetado tem uma etapa de extração com acetonitrila acidificada, seguida de uma etapa de partição com os sais sulfato de

magnésio e acetato de sódio. O pH é importante tanto para compostos sensíveis à degradação em meio alcalino, como para aquelas sensíveis em meio ácido. Uma faixa de pH entre 4 e 5, proporciona boas recuperações (> 70%) para agrotóxicos sensíveis em meio ácido, além de garantir estabilidade para aqueles agrotóxicos sensíveis em meio alcalino (PRESTES *et al.*, 2009). O composto propargito obteve resultado satisfatório no método QuEChERS citrato, neste método quando utilizado a mistura de sais de partição citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado ocorre o efeito tamponante (pH 5,0 a 5,5) (PRESTES *et al.*, 2011). Os compostos bispiribaque e metsulfurom metílico não obtiveram resultados satisfatórios em nenhum dos métodos.

Kaczyński (2017) utilizou quitosana na etapa de limpeza após extração pelo método QuPPE modificado para a determinação de 11 herbicidas altamente polares em diferentes matrizes (trigo, batata, pera e cebola) apresentando recuperações de 73 a 95%.

Ao comparar os testes de extração observou-se que o QuEChERS original apresentou o melhor resultado, com o maior número de compostos extraídos. O método QuEChERS original, foi escolhido para dar prosseguimento ao estudo do método.

4.2.2 Hidratação da amostra

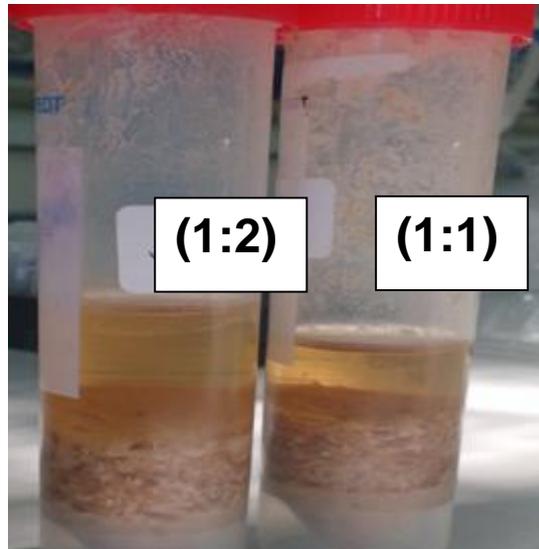
A fim de melhorar a eficiência do método de extração avaliou-se a utilização de uma etapa de hidratação da amostra (mistura da amostra com água). A adição de água na etapa anterior à extração em amostras de cereais é justificada pelo baixo teor de umidade (<80%) pois de acordo com WALORCZYK; DROŹDŹYŃSKI (2012) a adição de água em cereais é realizada devido ao baixo percentual da mesma e também para promover a extração dos compostos desejados pelo solvente. Assim, a adição de água tem como objetivo melhorar a homogeneidade da amostra (ZANELLA *et al.*, 2015a) e também melhorar a capacidade de extração dos compostos, hidratando as partículas e facilitando o acesso do solvente de extração aos agrotóxicos a serem analisados (DORS *et al.*, 2011).

O volume de água a ser adicionado foi avaliado nos testes (5 g de amostra e 5 mL de água), e o segundo teste (5 g de amostra e 10 mL de água). Estes testes têm por

finalidade avaliar se o volume de água adicionado exerce influência na recuperação, sendo que um total de 60 agrotóxicos foram avaliados. Para o teste com adição de 10 mL de água 54 compostos e o teste com adição de 10 mL de água 32 compostos tiveram recuperações e RSD aceitáveis pela SANTE (2017). Os compostos que não apresentaram resultados de recuperação aceitáveis no teste com adição de 5 mL de água foram: bispiribaque, carbendazina, fempropatrina, imidacloprido, piridaben, triclorfom. Porém estes compostos tiveram resultados de recuperação aceitáveis no teste com adição de 10 mL, de água com exceção do composto triclorfom que não teve recuperação aceitável em nenhum dos testes.

Avaliando-se o número de compostos recuperados em cada teste, observa-se que ocorreu uma variação significativa e a relação amostra/água, na proporção 1:1 (m/v) foi considerada adequada para uma determinação quantitativa para extração. Como pode ser observado na Figura 6. KACZYŃSK (2017) e FACCO (2017) também utilizaram em seu método 5 g de amostra e 5 ml de água para hidratação. O tempo de hidratação adotado foi de 30 min. WANG *et al.*, (2012) e FACCO (2017) também propuseram este tempo de hidratação para amostras de cereais. A massa foi reduzida conforme MASTOVSKA *et al.*, (2010) que ressalta que a quantidade de amostra a ser utilizada se baseia na quantidade de co-extrativos extraídos da matriz, ou seja, uma análise onde a menor porção de interferentes é gerada. Visando a manutenção do sistema cromatográfico a quantidade de amostra foi reduzida pela metade (5,0 g) não deixando de ser representativa, pois outros autores como LUCINI; MOLINARI (2011), WALORCZYK; DROZDYNSKI (2012), RASCHE *et al.*, (2015) e HERRMANN; POULSEN (2015) também utilizaram a mesma quantidade de amostra.

Figura 6 - Testes de hidratação utilizando 5g de amostra + 10 mL de água (1:2) (m/v) e 5 g amostra +10 mL de água (1:1) (m/v).



4.2.3 Efeito de diferentes materiais sorventes na etapa de limpeza

A etapa de limpeza dos extratos de um método de extração é uma das mais importantes neste sentido e visando a obtenção de um método com o maior número possível de compostos. Na etapa de limpeza da amostra foram testados diversos sorventes e suas combinações. A Figura 7 apresenta o procedimento executado para avaliação dos diferentes sorventes da etapa de limpeza do extrato. Os resultados (Figura 8) foram avaliados em termos de número de compostos com recuperação e RSD aceitáveis pela SANTE (2017).

Figura 7 – Fluxograma do procedimento de extração para avaliação da etapa de limpeza do extrato.

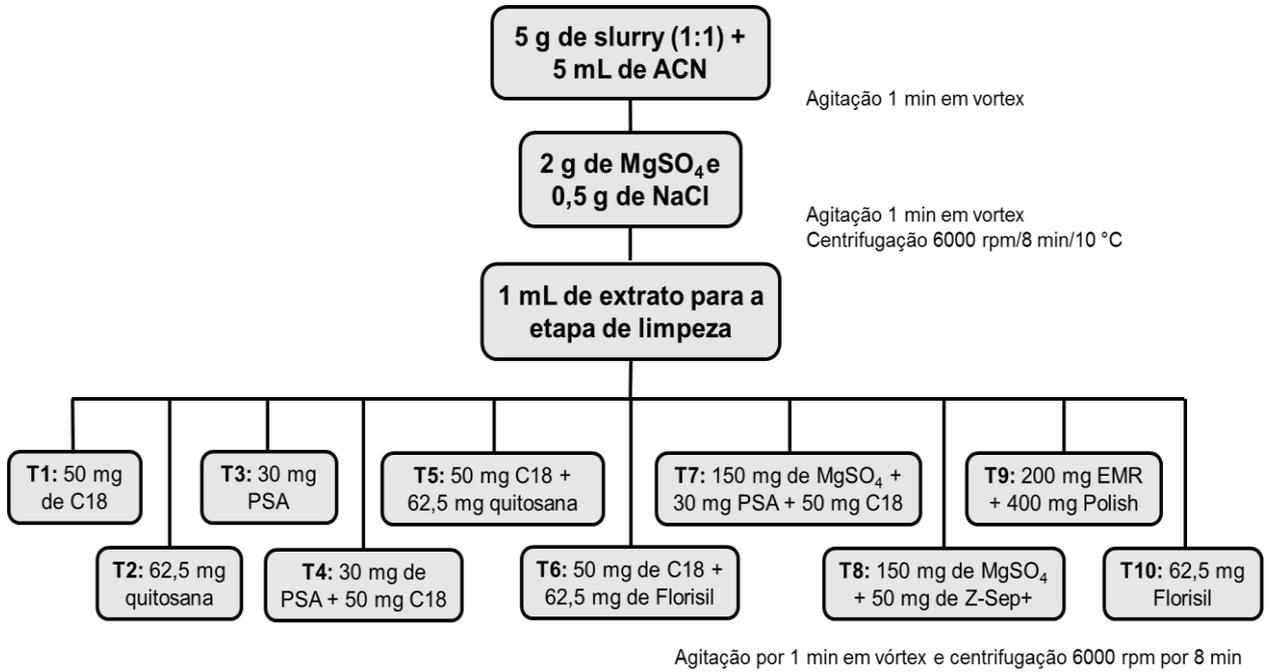
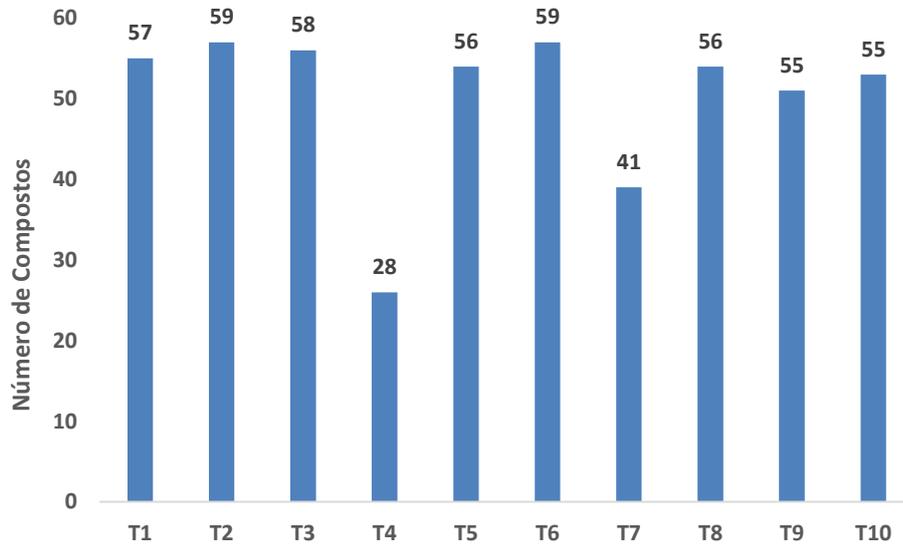


Figura 8 - Número de compostos recuperados na faixa de 70-120% com RSD ≤ 20% para cada teste realizado no nível de fortificação de 50 µg kg⁻¹ (n= 3).



Entre os sorventes testados, os que apresentaram melhores resultados foram a combinação dos sorventes C18 e florisil (T6) e a quitosana (T2). O teste com os dois sorventes C18 e florisil (T6) apresentou recuperações de 67,1 a 118,3% e 59 compostos dos 60 analisados com recuperação na faixa de 70 a 120%. O sorvente C18 é bastante utilizado para extratos provenientes de amostras com teor de gordura maior que 2%, pois remove com boa eficiência interferentes apolares, tais como substâncias graxas e lipídios. Outros sorventes e misturas também apresentaram resultados similares como por exemplo o PSA, apresentou recuperações de 77,9 a 133,5% e 58 compostos dentro da faixa ótima. A combinação de PSA e C18 remove mais co-extrativos devido à retenção dos ácidos graxos livres e outros compostos polares da matriz por PSA, que possui elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário na sua estrutura. Porém neste trabalho a mistura dos sorventes PSA e C18 apresentou o maior número de compostos com recuperação fora da faixa de 70 a 120% (Figura 8). HERRMANN; POULSEN (2015) otimizaram o método ajustando a quantidade de PSA empregada e introduzindo C18 no procedimento. Os autores reportam que o C18 não aumenta a eficiência da limpeza e, na pior das hipóteses, compromete a recuperação dos agrotóxicos.

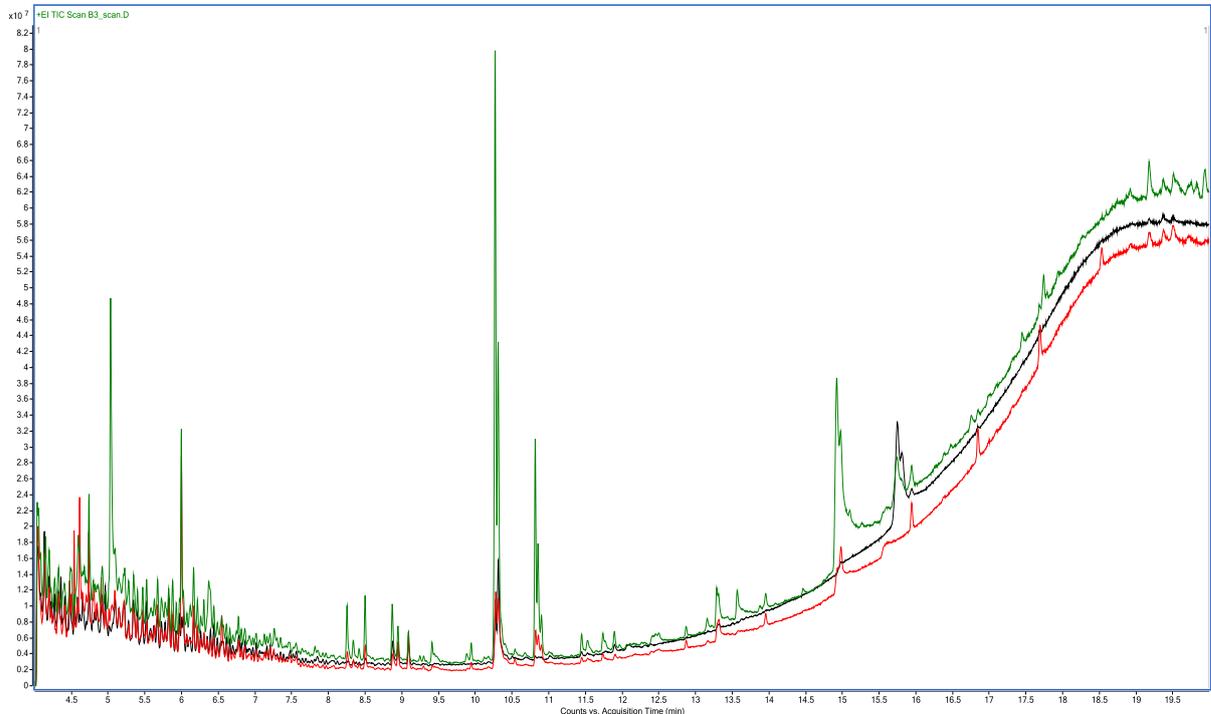
Por outro lado, a quitosana é um sorvente barato e eficaz originado de polímeros naturais, e seu uso tem atraído a atenção de pesquisadores. A quitosana representa uma alternativa interessante como sorvente devido à sua estrutura particular, pela presença de grupos reativos químicos (funções hidroxila, acetamida ou amino) em cadeias poliméricas. O uso de sorventes como florisil e quitosana justifica-se pelo menor custo de aquisição dos mesmos e pelo seu emprego na etapa de limpeza em diferentes matrizes (ARIAS *et al.*, 2014). Neste trabalho, quando estes sorventes foram utilizados os resultados obtidos tanto em termos de recuperação foram considerados satisfatórios, pois o florisil apresentou recuperações de 76,3 a 134,7%. A quitosana apresentou recuperações de 69,0 a 112,8%, com 59 compostos dentro da faixa ótima. O composto malationa foi o único que não apresentou resultado de recuperação aceitável tanto para os sorventes florisil e quitosana que possuem estruturas com características apolares. Porém com a combinação dos sorventes C18, PSA e sulfato de magnésio, malationa apresentou recuperação de 98,3%.

De maneira geral, os sorventes quitosana, PSA e florisil + C18 demonstraram boa eficiência de remoção dos co-extrativos do extrato. Desta forma, os testes que

utilizaram somente quitosana, PSA e florisil + C18 tiveram seus extratos injetados no sistema GC-MS/MS no modo *full scan*. A partir da avaliação dos cromatogramas da Figura 9 foi possível observar que a utilização da quitosana promoveu uma redução no sinal cromatográfico em comparação ao uso do sorvente PSA e florisil + C18.

A utilização de quitosana na etapa de clean-up apresenta vantagens pois este sorvente é produzido a partir de polímeros naturais, abundantes e biodegradáveis; possui baixo custo e características biossorbentes que tornam o método mais barato e mais 'ecológico' quando comparado a outros sorventes como PSA (ARIAS *et al.*, 2014, ARIAS *et al.*, 2017). Tendo em vista essas vantagens apresentadas pela quitosana, além dos bons resultados obtidos quando ela foi utilizada, foi confirmada a sua escolha como sorvente na etapa de limpeza no método QuEChERS. Outras pesquisas também relatam o uso de quitosana para d-SPE. ARIAS e colaboradores (2014) e Cabrera e colaboradores (2016) utilizaram quitosana na etapa de d-SPE para limpeza de extratos de solo e arroz obtidos pelo método QuEChERS. KACZYŃSKI (2017) utilizou quitosana na etapa de limpeza após extração pelo método QuPPE modificado para a determinação de 11 herbicidas altamente polares em diferentes matrizes (trigo, batata, pera e cebola) apresentando recuperações de 73 a 95%.

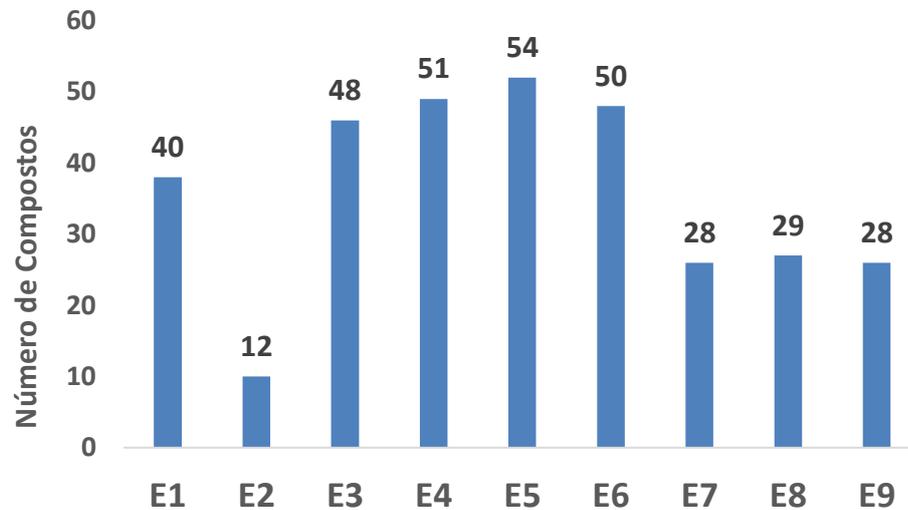
Figura 9 - Cromatograma no modo *full scan* obtido por GC-MS/MS do extrato de aveia após a etapa de limpeza com a utilização de PSA (verde), quitosana (vermelho) e florisil +C18 (preto).



4.2.4 Planejamento fatorial 3²

De acordo com as superfícies de resposta obtidas experimentalmente a partir do planejamento experimental proposto foi possível verificar a influência da quantidade dos sorventes quitosana e sulfato de magnésio na etapa de limpeza. Após a escolha do melhor método de extração, foi realizada a otimização da etapa de limpeza através de planejamento fatorial 3², com uso de repetição em triplicata do ponto central. A realização dos 9 ensaios ocorreu conforme descrito no item 3.8.4. Os percentuais de compostos que apresentaram valores de recuperação e RSD aceitáveis nos ensaios realizados estão representados na Figura 10.

Figura 10 - Resultados em porcentagem do número de compostos com recuperação satisfatória (70-120%, RSD \leq 20%) nos ensaios do planejamento fatorial.



A etapa de limpeza mais eficiente foi o ensaio 5, que utilizou 150 mg de MgSO_4 e 60 mg de quitosana para limpeza dos extratos. ARIAS (2016) utilizou 150 mg de MgSO_4 e 50 mg de quitosana na etapa de limpeza para a determinação de medicamentos veterinários em amostras de leite. Através da análise individual das respostas dos compostos foi possível visualizar a melhor condição de limpeza para cada agrotóxico. Dos compostos em estudo, 27 demonstraram necessidade de condições específicas para determinação multiresíduo de agrotóxico em aveia utilizando QuEChERS modificado e LC-MS/MS.

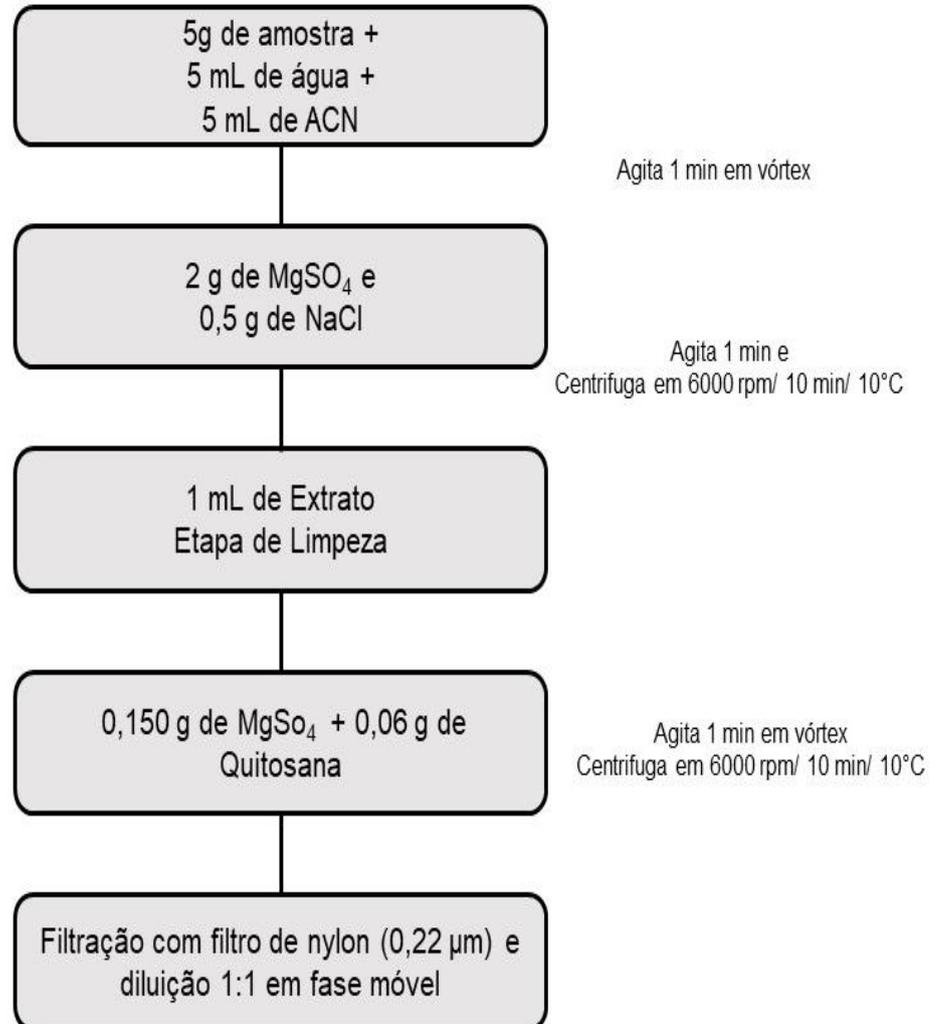
Para os compostos azoxistrobina, clorprofam, deltametrina, diazinona, fempropatrina, fenarimol, iprovalicarbe, mepronil, piraclostrobina, piridabem, piridafentiona, procloraz, profenofos, tetraconazol, tiacloprido, tiametoxam, triadimefom, triclorfom, trifloxistrobina, triflumizol a melhor condição de limpeza foi utilizando 150 mg de MgSO_4 e 60 mg de quitosana. O composto melationa não obteve resultado satisfatório na etapa de limpeza quando utilizado somente o sorvente quitosana, mas apresentou resultado satisfatório no ensaio 5 (150 mg de MgSO_4 e 60 mg de quitosana), pois obteve uma recuperação de 101,0%. Entretanto, alguns compostos obtiveram respostas diferenciadas. Para imidacloprido e oxamil a melhor resposta foi empregando 150 mg de MgSO_4 e 100 mg de quitosana, para metsulfurom metílico 250 mg de MgSO_4 e 100 mg de quitosana, para simazina 250 mg de MgSO_4 e 60 mg de quitosana e ainda para tebuconazol 50 mg de MgSO_4 e 60 mg de quitosana.

Melhores resultados poderiam ser obtidos se as condições favoráveis para cada composto fossem utilizadas. Porém isso seria útil em caso de análise dos agrotóxicos isolados. Entretanto, como se trata de um método multirresíduo, as condições foram escolhidas conforme o maior número de compostos recuperados com parâmetros satisfatórios. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, a melhor condição obtida para a limpeza dos extratos foi o uso da quantidade de 150 mg $MgSO_4$ e 60 mg de quitosana.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO

Com os dados obtidos pode-se definir um método de extração. A Figura 11 demonstra o procedimento de extração e limpeza definidos. No método de preparo de amostra utilizou-se 5 g de amostra e 5 mL de água, seguida de fortificação desta matriz de acordo com os níveis desejados, e extração com 5 mL de acetonitrila. A partição foi realizada com sulfato de magnésio (2 g) e cloreto de sódio (0,5 g) seguida de agitação e centrifugação. Após esta etapa, 1 mL deste extrato é transferido para um tubo contendo quitosana (60 mg) e sulfato de magnésio (150 mg), seguindo para agitação e centrifugação. Após, o sobrenadante (a fase orgânica) é recolhido e filtrado com filtros de 0,22 μm com posterior diluição 1:1 em fase móvel.

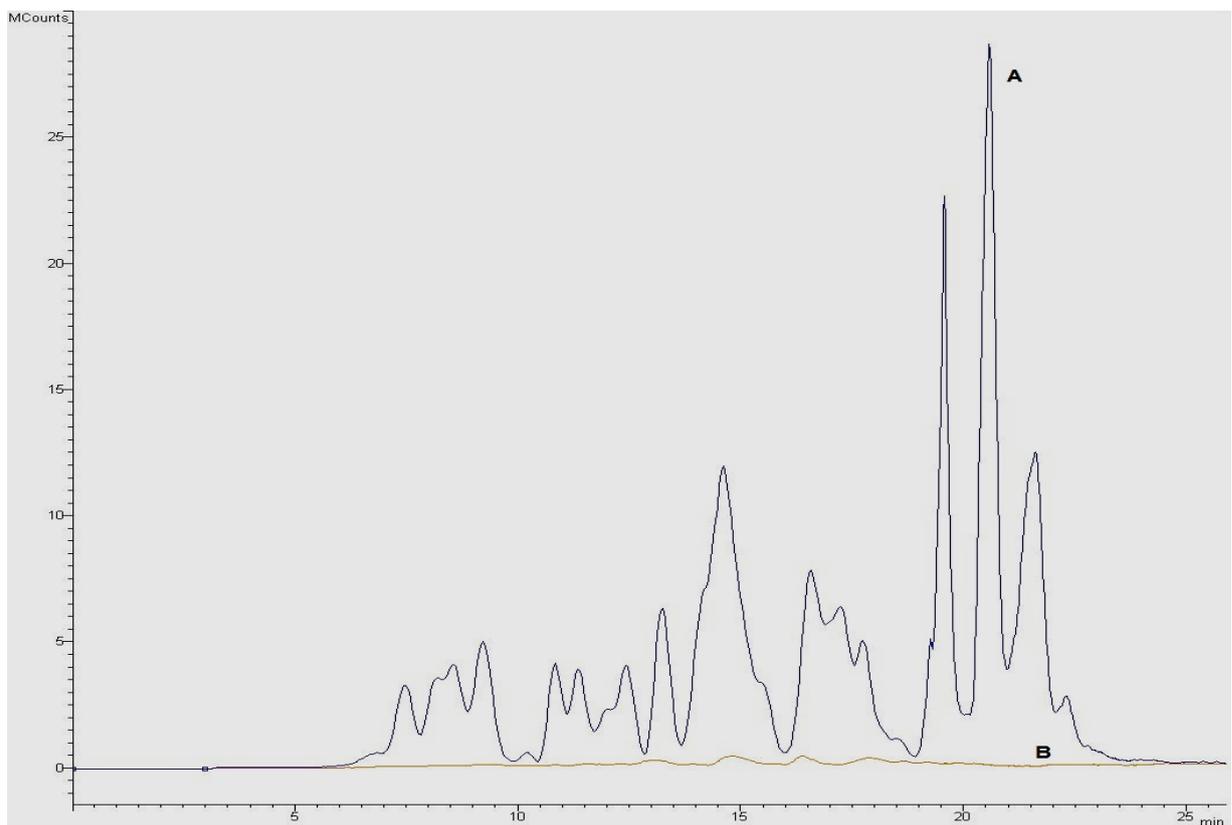
Figura 11 - Fluxograma do procedimento de extração validado para a aveia utilizando o método QuEChERS modificado.



4.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da análise de uma amostra branco e de uma amostra fortificada na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. A análise pelo método QuEChERS original e LC-MS/MS foi considerada seletiva, uma vez que não apresentou interferentes com os mesmos íons de quantificação e confirmação nos tempos de retenção dos agrotóxicos. Como não se observaram os agrotóxicos de interesse, a amostra “branco” foi utilizada para confecções das curvas analíticas e ensaios de fortificação.

Figura 12 – Cromatogramas obtidos pelo método QuEChERS desenvolvido e LC-MS/MS para (A) padrão na matriz “branco” de aveia na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, (B) amostra “branco” de aveia.



4.3.2 Curva analítica, faixa linear e efeito matriz

A Tabela 9 apresenta os coeficientes de determinação (r^2) para a curva analítica preparada na matriz de aveia, a equação da reta e o efeito matriz para cada agrotóxico.

Tabela 9 - Equação da reta e coeficientes de determinação (r^2) e efeito matriz para cada agrotóxico estudado.

Compostos	r^2	Equação da reta	EM
Atrazina	0,9996	$y = 3745251,72x + 3431145,976$	-72
Azoxistrobina	0,9996	$y = 17333723,3x - 3737078,06$	-58
Bispiribaque sódico	0,9989	$y = 791423,757x + 833667,003$	-61
Bitertanol	0,9991	$y = 1602152,63x + 1976925,824$	-50
Boscalida	0,9995	$y = 2158268,03x + 6067557,818$	-67
Carbaril	0,9996	$y = 5812250,39x + 4482719,844$	-63
Carbendazina	0,9993	$y = 11903326,1x - 2348084,26$	-71
Carbofurano	0,9998	$y = 6571119,27x + 3375048,985$	-64
Cianizina	0,9989	$y = 2263476,34x + 1617466,115$	-63
Ciproconazol	0,9991	$y = 2197867,28x + 4887508,661$	-59
Clomazone	0,9993	$y = 8911350,3x + 33298903,32$	-70
Clorprofam	0,9979	$y = 1732200,78x + 6081666,584$	-61
Deltametrina	0,9985	$y = 571806,173x + 1098789,735$	-50
Diazinona	0,9996	$y = 9622569,74x - 3461874,47$	-67
Difenoconazole	0,9998	$y = 3103058,89x + 948492,8355$	-63
Dimetoato	0,9979	$y = 4771765,83x + 7297049,709$	-64
Fempropatrina	0,9989	$y = 4471852,42x - 2895194,61$	-66
Fempropimorfe	0,9991	$y = 9836943,29x + 12684909,79$	-77
Fenarimol	0,9971	$y = 429381,544x + 2404632,374$	-61
Fipronil	0,9990	$y = 18801312,4x + 9938880,383$	-27
Flutalonil	0,9994	$y = 9933857,77x + 12193746,59$	-63
Imidacloprido	0,9980	$y = 1623288,03x + 5594681,141$	-56
Iprovalicarbe	0,9992	$y = 11697161,3x + 7505268,386$	-63
Malationa	0,9986	$y = 2123512,54x + 5741143,578$	-52
Mecarbam	0,9991	$y = 10247524,5x + 9931086,689$	-62
Mepronil	0,9993	$y = 12891006,7x + 26333764,1$	-63
Metaconazole	0,9974	$y = 1217958,58x + 2079685,327$	-53
Metalaxil	0,9994	$y = 11786220,1x + 5340488,989$	-61
Metsulfurom metílico	0,9964	$y = 2549443,98x - 5124759,79$	-61
Mevinfos	0,9998	$y = 2406970,48x + 4830677,119$	-69
Miclobutanil	0,9991	$y = 2199298,85x + 4874320,875$	-59
Monocrotofos	0,9994	$y = 10710236,7x + 21264972,16$	-56
Monolinurom	0,9991	$y = 2365634,91x + 3816987,878$	-64
Oxamil	0,9991	$y = 4638101,67x + 4509549,846$	-53
Piraclostrobina	0,9992	$y = 8580258,97x + 4024182,994$	-64
Pirazofos	0,9987	$y = 5464814,01x + 5876128,173$	-53
Piridaben	0,9992	$y = 17662736,9x - 18496770,3$	-60
Piridafetiona	0,9996	$y = 7017116,03x + 7934127,752$	-61

Compostos	r ²	Equação da reta	EM
Pirimicarbe	0,9991	y= 10772300,4x+ 11721282,88	-64
Pirimifos metílico	0,9994	y= 14588892,3x-2681747,61	-69
Procloraz	0,9995	y= 5371245,86x-680075,264	-66
Profenofos	0,9992	y= 1846619,46x-362928,494	-79
Propargito	0,9993	y= 11678874,2x-2498055,46	-69
Propiconazole	0,9992	y= 1191455,62x+4517820,68	-66
Propizamida	0,9993	y= 2871467,66x+3834587,503	-62
Propoxur	0,9994	y= 6463632,67x+6491249,096	-62
Simazina	0,9989	y= 1201207,09x+2336880,149	-71
Tebuconazole	0,9998	y= 1829074,29x+16745638,2	-66
Terbutilazina	0,9996	y= 7700592,91x-592828,008	-71
Tetraconazole	0,9994	y= 1952081,37x+11604251,24	-68
Tiacloprido	0,9995	y= 6519391,73x+15990904,29	-66
Tiametoxam	0,9992	y= 2857141,45x+4659267,236	-53
Toscofós	0,9998	y= 2857141,45x+4659267,236	-66
Trebufos	0,9997	y=7590218,3x -18656007,13	-71
Triadimefom	0,9998	y= 2394214,49x+5081463,373	-57
Triazofos	0,9996	y= 19439181,1x+15359913,12	-64
Triclorfom	0,9995	y= 1289708,61x+10643228,16	-37
Trifloxistrobina	0,9989	y= 32996708,4x- -100151760,5	-67
Triflumizole	0,9992	y= 11169680,2x-9354582,13	-80
Vamidationa	0,9986	y= 8691613,04x+5851886,026	-61

Os resultados indicam que o método analítico é adequado para o estudo, pois a maioria dos agrotóxicos apresentou coeficiente de determinação (r^2) maiores que 0,990 e faixa de linearidade da maior parte dos compostos ficou entre 2 a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo assim, este parâmetro enquadra-se nos critérios de aceitação.

O efeito matriz é uma grande preocupação na análise de compostos a níveis de traços em alimentos pois podem comprometer seriamente os resultados e a reprodutibilidade do método (FERRER *et al.*, 2011). De acordo com OSHITA; JARDIM (2015) o EM é utilizado para verificar a eficiência de ionização do analito no detector, que pode causar alterações negativas ou positivas no sinal cromatográfico, devido à supressão iônica ou acréscimo de sinal, respectivamente.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para compensar o efeito de matriz quando não se pode eliminá-la; dentre estas se têm a extração de curvas de calibração, adição de padrão utilizando isótopos estáveis, padrões internos, etc (FERRER *et al.*, 2011). Para SANTE (2017) o efeito matriz aceitável deve variar entre $\pm 20\%$ e geralmente é calculado levando em consideração a curva no solvente e na matriz. Neste trabalho, o efeito matriz (EM) foi calculado através da comparação da

inclinação das curvas analíticas obtidas no solvente e no extrato da matriz (aveia) para os compostos selecionados, conforme a Tabela 9.

4.3.3 Limite de detecção (LOD), Limite de quantificação (LOQ) do método

O LOQ e o LOD foram determinados conforme o item 3.9.5. O LOQ do método, estabelecido pelo menor nível fortificado que forneceu resultados adequados na validação de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os compostos, exceto para o triflumizole que apresentou um LOQ de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto os valores de LOD_m foram 1,5 para todos os compostos, exceto para o triflumizole que apresentou um LOD_m de $3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esses valores atendem aos LMRs estabelecidos pela ANVISA e EU para todos os agrotóxicos em estudo.

4.3.4 Exatidão (ensaios de recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método

Para avaliar a exatidão do método foram realizados ensaios de fortificação conforme descrito no item 3.9.3, utilizando os níveis de 5, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esses níveis foram escolhidos tendo em conta os LMRs estabelecidos pela União Europeia (EU) para aveia. A repetitividade foi avaliada pela análise das réplicas de fortificações da matriz branco, com $n=7$ para cada nível de concentração.

A precisão intermediária do método foi realizada em dias diferentes, utilizando a fortificação nos níveis de 20 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores de recuperação e RSD para a precisão intermediária podem ser observados na Tabela 10. Verificou-se que ao método QuEChERS modificado desenvolvido e análise por LC-MS/MS apresentou recuperações entre 70 a 120%, com o $\text{RSD} \leq 20\%$, sendo considerado satisfatório. Com exceção do triflumizole que no nível de fortificação $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ obteve recuperação de 149%.

Tabela 10 – Recuperação e RSD para os ensaios de repetitividade e precisão intermediária (PI) do método

Compostos	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	5,0	10,0	20	50	100	20	50
	Rec e RSD (%)					Rec e RSD (%) PI	
Atrazina	120 (4)	101 (11)	92 (7)	87(5)	85(4)	103(15)	84(3)
Azoxistrobina	120 (14)	98 (4)	99 (8)	93(6)	87(4)	120(20)	97(4)
Bispiribaque sódico	90 (15)	70 (3)	70 (7)	73(8)	70(1)	117(20)	106(8)
Bitertanol	70 (8)	74 (9)	86 (5)	90(10)	87(3)	81(15)	81(8)
Boscalida	120 (8)	110 (16)	101 (7)	93(9)	85(7)	116(18)	88(10)
Carbaril	106 (20)	87 (5)	88 (10)	89(4)	83(3)	87(15)	70(4)
Carbendazina	119 (7)	87 (7)	83 (3)	76(4)	70(4)	91(14)	74(4)
Carbofurano	103 (9)	89 (9)	92 (6)	89(9)	86(4)	80(19)	70(7)
Cianizina	98 (17)	79 (10)	90 (5)	88(3)	83(4)	90(11)	72(12)
Ciproconazol	77 (13)	79 (10)	95 (7)	105(5)	93(5)	91(19)	88(9)
Clomazone	118 (8)	111 (5)	94 (7)	90(4)	88(4)	102(18)	83(2)
Clorprofam	73 (8)	73 (4)	86 (8)	91(6)	85(4)	85(17)	77(6)
Deltametrina	106 (12)	97 (12)	90 (8)	82(6)	71(9)	87(15)	81(9)
Diazinona	117 (11)	92 (6)	95 (8)	93(5)	90(6)	91(9)	83(6)
Difenoconazole	106 (80)	100 (5)	100 (9)	101(2)	96(6)	72(12)	71(5)
Dimetoato	77 (14)	71 (8)	84 (8)	89(6)	86(4)	73(8)	71(4)
Fempropatrina	119 (2)	103 (8)	105 (11)	92(6)	89(8)	102(16)	88(8)
Fempropimorfe	70 (2)	70 (7)	77 (6)	102(6)	92(4)	89(10)	92(2)
Fenarimol	85 (2)	104 (13)	111 (19)	97(12)	85(9)	99(20)	86(15)
Fipronil	118 (2)	102 (2)	102 (6)	112(6)	112(6)	104(4)	114(6)
Flutalonil	76 (13)	79 (8)	90 (9)	95(5)	90(1)	92(12)	87(4)
Imidacloprido	76 (7)	77 (12)	71 (15)	76(7)	73(5)	89(17)	73(4)
Iprovalicarbe	101 (9)	94 (6)	98 (4)	108(4)	98(3)	92(8)	84(4)
Malationa	114 (11)	93 (16)	85 (13)	78(15)	79(9)	119(6)	103(9)
Mecarbam	87 (6)	81 (5)	98 (5)	101(6)	94(4)	84(15)	78(4)
Mepronil	78 (7)	82 (5)	96 (4)	101(4)	90(4)	100(20)	85(4)
Metaconazole	118 (8)	99 (16)	98 (10)	100(5)	90(7)	99(14)	72(7)
Metalaxil	98 (6)	82 (11)	90 (6)	90(5)	85(3)	90(11)	82(5)
Metsulfurom met.	120 (5)	88 (13)	90 (10)	84(15)	70(19)	88(20)	88(17)
Mevinfos	101 (14)	109 (8)	101 (12)	92(9)	89(3)	112(20)	86(5)
Miclobutanil	72 (12)	81 (10)	94 (7)	105(5)	93(5)	92(19)	88(10)
Monocrotofos	94 (18)	73 (2)	78(5)	80(7)	81(2)	80(12)	71(3)
Monolinurom	83 (10)	78 (10)	91(10)	93(9)	90(3)	80(18)	70(2)
Oxamil	74 (3)	76 (3)	84(14)	89(7)	86(6)	83(11)	71(8)
Piraclostrobina	90 (1)	87 (3)	93(1)	97(5)	9(0)	88(20)	82(3)
Pirazofos	75 (6)	82 (7)	92(7)	104(4)	99(3)	78(16)	71(4)
Piridaben	120 (5)	99 (6)	92(4)	84(4)	76(5)	86(15)	74(10)
Piridafetiona	87 (12)	87 (13)	100(7)	102(5)	91(3)	94(7)	86(7)
Pirimicarbe	98 (20)	77 (9)	83(8)	77(5)	75(2)	83(18)	70(5)
Pirimifos metílico	119 (9)	110 (8)	103(7)	99(3)	96(4)	71(18)	89(2)

Compostos	Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	5,0	10,0	20	50	100	20	50
	Rec e RSD (%)					Rec e RSD (%) PI	
Procloraz	77 (14)	81 (16)	86(9)	75(8)	71(7)	72(17)	70(4)
Profenofos	118 (4)	118 (1)	102(8)	92(7)	102(10)	119(13)	107(7)
Propargito	112 (1)	97 (5)	98(4)	96(6)	90(5)	93(13)	84(6)
Propiconazole	84 (10)	90 (8)	80(10)	90(10)	85(5)	107(20)	86(7)
Propizamida	87 (16)	84 (14)	96(3)	101(7)	90(5)	88(16)	81(4)
Propoxur	101 (15)	91 (7)	90(10)	92(4)	87(2)	81(18)	70(3)
Simazina	115 (17)	95 (17)	90(10)	90(8)	80(6)	89(13)	79(7)
Tebuconazole	72 (6)	70 (10)	73(6)	79(9)	77(8)	110(19)	94(6)
Terbutilazina	118 (15)	96 (5)	102(10)	91(4)	84(4)	101(16)	88(4)
Tetraconazole	83 (20)	105 (13)	90(12)	107(5)	94(5)	74(9)	75(7)
Tiacloprido	109 (10)	86 (8)	82(7)	85(9)	82(4)	96(14)	76(3)
Tiametoxam	72 (5)	75 (4)	94(11)	83(6)	82(3)	80(10)	75(6)
Tolcofós	116 (10)	80 (14)	99 (15)	89 (9)	87 (6)	88 (17)	70 (11)
Trebufos	119 (8)	109 (14)	110(5)	91(7)	89(5)	100(18)	93(7)
Triadimefom	78 (14)	75 (8)	94(15)	99(5)	92(3)	91(7)	95(5)
Triazofos	99 (4)	90 (2)	100(6)	104(7)	95(4)	88(7)	81(4)
Triclorfom	85 (10)	81 (17)	85(13)	87(5)	80(8)	83(16)	70(11)
Trifloxistrobina	120 (5)	114 (6)	108 (1)	103 (3)	102 (4)	96 (12)	79 (6)
Triflumizole	149 (8)	119 (2)	102(6)	85(7)	96(6)	118(10)	106(3)
Vamidationa	82 (16)	71 (7)	87(6)	88(7)	85(4)	101(20)	83(4)

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

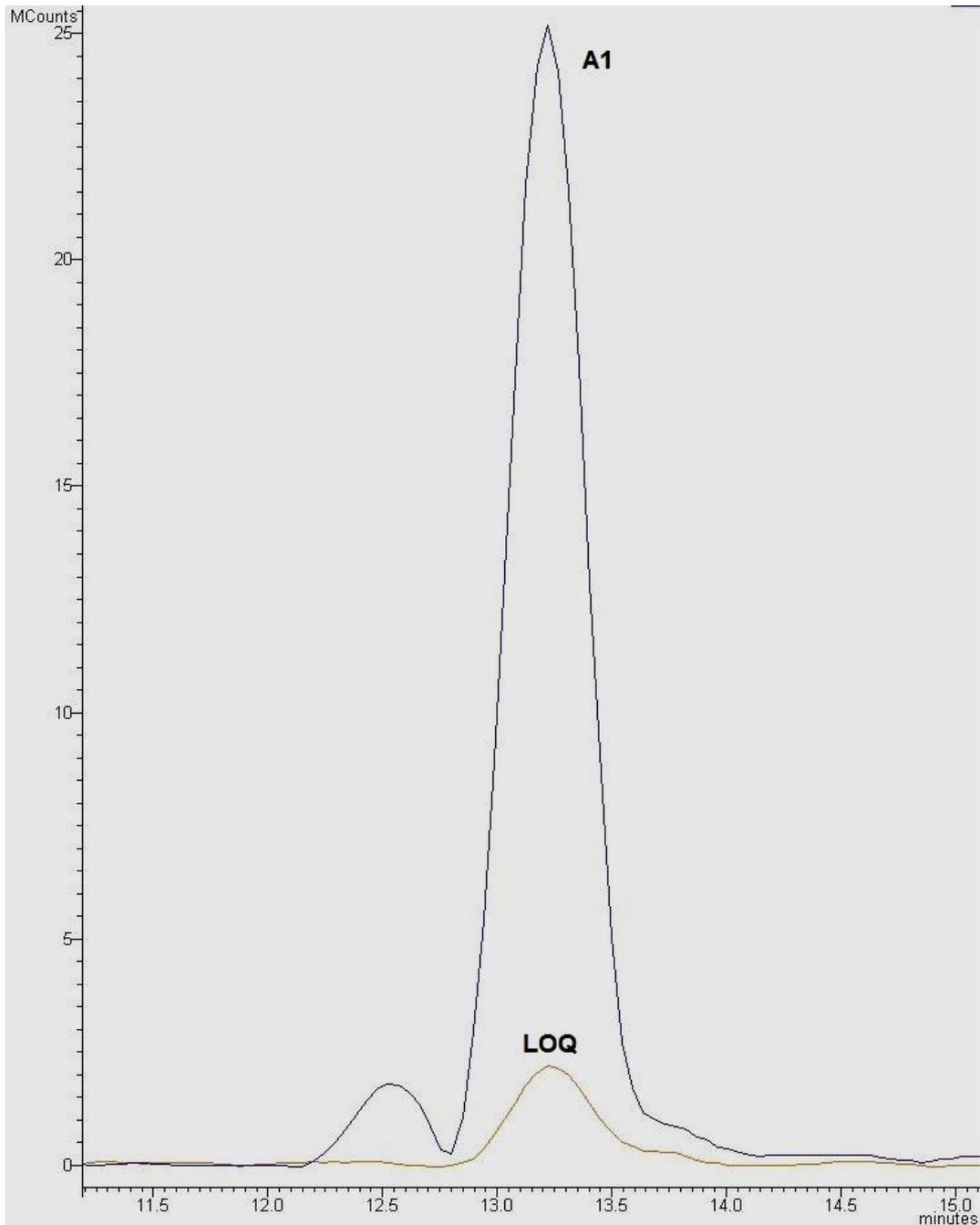
O método QuEChERS desenvolvido, utilizando quitosana e sulfato de magnésio na etapa de limpeza, foi aplicado à determinação de resíduos de agrotóxicos em 24 amostras de aveia provenientes do estado do Rio Grande do Sul. Os compostos encontrados nas amostras foram azoxistrobina, metalaxil e tiametoxam, conforme a Tabela 11. A azoxistrobina e o metalaxil são fungicidas, utilizados para controle de doenças foliares. O inseticida tiametoxam é utilizado no tratamento das sementes de aveia, com o objetivo de controlar as pragas incidentes durante os estádios iniciais do desenvolvimento das plantas, podendo evitar possíveis perdas decorrentes da ação de pragas de solo. (MARTINS et al., 2009).

Tabela 11 – Resultados da análise das amostras de aveia empregando método QuEChERS modificado e LC-MS/MS.

Amostra	Azoxistrobina	Metalaxil	Tiametoxam
1	74,3	n.d.	n.d.
2	<LOQ	n.d.	n.d.
4	82,5	n.d.	n.d.
5	n.d.	<LOQ	202,0
7	n.d.	n.d.	27,0
8	9,63	n.d.	n.d.
10	<LOQ	n.d.	n.d.
16	n.d.	n.d.	<LOQ
17	36,1	n.d.	n.d.
18	5,7	n.d.	n.d.
19	23,9	n.d.	n.d.
20	<LOQ	n.d.	n.d.
21	<LOQ	n.d.	n.d.
22	n.d.	n.d.	<LOQ
23	<LOQ	n.d.	5,1
24	n.d.	n.d.	16,1
LMR EU/ BRASIL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
1500/1000		10/-	20/200

Das 24 amostras analisadas, 16 apresentaram contaminação com pelo menos um agrotóxico. Resíduos de azoxistrobina apareceram em 11 amostras, sendo que em 5 amostras abaixo do LOQ. Entretanto nenhuma amostra apresentou concentração maior que o LMR estabelecido pela legislação estabelecida pela EU. Da mesma forma, a amostra 5 apresentou resíduo de metalaxil < LOQ. Por outro lado, 6 amostras apresentaram resíduos de tiametoxam, com destaque para as amostras 5 e 7 que apresentaram resíduos acima do LMR permitido pela legislação.

Figura 13 – Cromatograma comparativo entre a amostra 1 contaminada com resíduo de azoxistrobina ($74,3 \mu\text{g kg}^{-1}$) e o LOQ ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) obtido no método QuEChERS desenvolvido e LC-MS/MS.



5 CONCLUSÕES

O método QuEChERS original otimizado neste estudo mostrou-se eficaz para a determinação de 60 agrotóxicos em aveia. A detecção dos compostos utilizando o equipamento LC-MS/MS com fonte de ionização por eletronebulização nos modos positivo e negativo, operando no modo SRM, proporcionou satisfatória detectabilidade, seletividade e precisão na etapa de validação do método. Na etapa de limpeza a combinação dos sorventes quitosana e sulfato de magnésio foi considerada eficiente para a determinação dos agrotóxicos estudados.

O método foi avaliado em termos de linearidade e faixa de trabalho, através da fortificação das curvas analíticas preparadas na matriz de aveia, nos níveis 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$. A exatidão do método, avaliada através da fortificação de cinco níveis, apresentou recuperação na faixa de 70 a 120%. A precisão do método foi adequada em termos de repetitividade sendo que o RSD ficou menor que 20%. O coeficiente de determinação foi maior ou igual a 0,99 para todos os compostos. Os valores de LOD e LOQ do método foram de 1,5 a 3 e 5 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Os LMRs foram atendidos para todos os agrotóxicos, sendo assim método atinge os limites estabelecidos pela Anvisa e EU.

O método proposto foi aplicado em 24 amostras de aveia para avaliar a eficiência na determinação de resíduos de agrotóxicos. Os resultados das análises demonstram que o método foi eficaz e que 16 amostras apresentaram contaminação com pelo menos um agrotóxico. Dessa forma, conclui-se que o método proposto, empregando QuEChERS original e LC-MS/MS é adequado para a determinação de agrotóxicos em aveia, podendo ser aplicado em análises de rotina.

6. DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados no desenvolvimento desta pesquisa, tanto líquidos como sólidos, foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da UFSM para posterior tratamento e descarte. Os resíduos sólidos foram colocados em sacos plásticos. Já os resíduos líquidos foram acondicionados em frascos e separados nas seguintes classes: halogenados, não-halogenados, além dos resíduos de álcool e acetona utilizados na limpeza do material de laboratório. Todos os resíduos foram devidamente identificados e encaminhados para descarte e remediação.

7. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

As sugestões propostas para trabalhos futuros seguindo a mesma linha de pesquisa são as seguintes:

- Realizar um monitoramento para amostras de aveia disponíveis para comercialização no país;
- Avaliar a aplicação do método proposto para outras culturas, como arroz, milho, soja e cevada;
- Avaliar a aplicação do método para amostras de aveia industrializada;
- Avaliar a aplicação do método proposto para análise destes agrotóxicos em amostras de aveia sem a casca.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGILENT TECHNOLOGIES. Bond Elut Enhanced Matrix Removal -Lipid. A sorbent that selectively removes lipids for efficient, reproducible sample clean-up. **The Analytical Scientist**, ISSUE 35 (ISSN 2051-4077), p. 30, December 2015.

AGULHON, R. A.; JOBIM, C. C.; BRANCO, A. F.; JÚNIOR, M. C. Fontes Energéticas e Níveis de Suplementação para Vacas em Pastagem de Capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* Hochst ex. A. Rich Stapf) no Inverno. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 151-158, 2005.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, 2003.

ANAGNOSTOPOULOS, C.; MILIADIS, G. E. Development and validation of easy multiresidue method for the determination of multiclass pesticide residues using GC-MS/MS and LC-MS/MS in oil and olives. **Talanta**, v. 112, p. 1-10, 2013.

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

ARIAS, J. L. O.; ROMBALDI, C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 66–75, 2014.

ARIAS, J. Emprego da quitosana no método QuEChERS para análise multirresíduo de medicamentos veterinários em leite. 2016, 74 p. **Dissertação (Mestrado em química)** – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

ARIAS, J.; SCHNEIDER, A.; ANDRADE, J.; VIEIRA, A.; CALDAS, S.; PRIMEL, E. Chitosan from shrimp shells: a renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk. **Food Chemistry**. 2017.

ARIAS, J. L. O.; SCHNEIDER, A.; BATISTA-ANDRADE, J. A.; VIEIRA, A. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk. **Food Chemistry**, v. 240, n. 1, p. 1243-1253, 2018.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**, 2017a. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Monografias de agrotóxicos**, 2018. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registroseautorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>>. Acesso em 15 jun. 2018.

AZANIA, C.A.M.; AZANIA, A.A.P.M. Seletividade de Herbicidas. In: MONQUEIRO, P. A. (Org.). **Aspectos da biologia e manejo de plantas daninhas**. Editora Rima, São Carlos, 1ªed. 2014, p. 217-234.

BARBOSA NETO, J. F.; MATIELLO, R. R.; CARVALHO, F. C.; OLIVEIRA, J. M. S.; PEGORARO, D. C.; SCHNEIDER, F.; SORDI, M. E. B.; VACARO, E. Progresso genético no melhoramento da aveia-branca no sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.35, n.8, p.1605-1612, 2000.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. (Org.) **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, Capítulo 24, 1ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

BRASIL - Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012. **Portaria nº 325**, de 6 de dezembro de 2012. Disponível em <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=200909848>>. Acesso em: 13 de Abril de 2018.

BRASIL - Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012. **Portaria nº 325**, de 6 de dezembro de 1978. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78_cereais.htm>. Acesso em: 13 abril de 2018.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Dispersive Solid Phase Extraction in the determination of residues and contaminants in food. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012.

CABRERA, L. C.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R. Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 39, p.1945–1954, 2016.

CAMPLING, R. C. Processing of cereal grains for cattle - a review. **Livestock Production Science**, v. 28, p. 223-234, 1991.

CASTRO, G. S. A.; COSTA, C. H. M. DA; NETO, J. F. Ecofisiologia da aveia branca. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. 3, p. 1–15, 2012.

CECCON, G.; FILHO, H. G.; BICUDO, S. J. Rendimento de grãos de aveia branca (*Avena sativa* L.) em densidades de plantas e doses de nitrogênio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.6, p.1723-1729, 2004.

CEN (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION), **CEN/TC 275 15662:2008**: Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERSmethod, European Union, 2008.

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

CHU, Y. Oats nutrition and technology. In: YAN, W.; FRÉGEAU- REID, FETCH, J. M. **Food Oat Quality Throughout the Value Chain**. Wiley Blackwell, p.9-32, 2014.

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science**, v.30, n.1, p. 38-70, 2005.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide residues in food and feed**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/perstres/pesticides>>. Acesso em: 23 dez 2018.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**, 2a ed., Unicamp: Campinas, 2009, cap: 8 e 9.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra Brasileira de grãos**, v. 5, safra 2017-2018, n. 9, 2018.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.9, n.1, 2008. ISSN 1518-5192.

DE MORI, C.; FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P. Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da aveia. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012. 26 p. **Documentos Online**, 136. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/ do/p_do136.pdf > Acesso em: 15 fev 2019.

DESHPAND, S. S.; SALUNKHE, D. K. (Ed.) Foods and plant origin: production, technology and human nutrition. New York: **Van Nostrand Reinhold**, 1991, cap 1, p. 1-125.

DOEHLERT, D. C.; McMULLEN, M. S. Genotypic and environmental effects on oat milling characteristics and groat hardness. **Cereal Chemistry**, v.77, p.148– 154, 2010.

DORS, G. C.; PRIMEL E. G.; FAGUNDES, C. A. A.; MARIOT, C. H. P.; BADIALEFURLONGA, E. Distribution of Pesticide Residues in Rice Grain and in its Coproducts. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1921-1930, 2011.

DOTTO, G. L.; VIEIRA, M. L. G.; GONÇALVES, J. V.; E PINTO, L. A. A. Remoção dos corantes azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina de soluções aquosas utilizando carvão ativado, terra ativada, terra diatomácea, quitina e quitosana: estudos de equilíbrio e termodinâmica. **Química Nova**, v. 34, 2011. p.1193-1199.

DROGUÉ, S.; DEMARIA, F. Pesticides residues and trade: the apple of discord? In: Congress Change and Uncertainty Challenges for Agriculture, **Food and Natural**, Zurich. Paper: European Association of Agricultural Economist set, 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **EMBRAPA Trigo - Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da aveia**, 2012. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/91354/1/2013documentosonline-136.pdf>> Acesso em 21 jun. 2018.

FACCO, J. F. Determinação multirresíduo de agrotóxicos em milho empregando método quechers modificado e LC-MS/MS 2017, 96 p. **Tese (Doutorado em química)** – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017.

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGÜERA, A.; GIRÓN, A. J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 7634–7639, 2011.

FERREIRA, L.C.; CATANEO, A.C. Aspectos bioquímicos da ação “de safeners”. **Boletim informativo da SBPCD**. São Paulo: SBPCD, v. 8, n. 2, p. 5-6, 2001.

FUKUI, N.; TAKATORI, S.; KITAGAWA, Y.; OKIHASHI, M.; KAJIMURA, K.; OBANA, H. Study of multi-residue method for determining pesticide residues in processed foods manufactured from agricultural products by LC-MS/MS. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**. V.54, n.6, p.426-433, 2013.

GALDEANO, M. C. Caracterização e aplicação de casca de aveia modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associado à extrusão. **Dissertação (Mestrado) – Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos**, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.

GERAGE, M. J. Exposição aos resíduos de agrotóxicos por meio do consumo alimentar da população brasileira. 102f. **Dissertação (Mestrado)**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2016.

GOI, L. J.; SANCHEZ, L. M. B.; GONCALVES, M. B. F.; OLIVO, C. J. Tratamentos físicos do grão de aveia branca (*Avena sativa*) na alimentação de bovinos. **Ciência Rural**, v. 28, n. 2, p. 303-307, 1998.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERRERA-HERRERA, A. V.; GONZÁLEZ-SALAMO, J.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZDELGADO, M. A. Evolution and applications of the QuEChERS method. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169–185, 2015

HAN, L.; MATARRITA, J.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1449, p.17–29, 2016.

HE, Z., WANG, L., PENG, Y., LUO, M., WANG, W., LIU, X. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography tandem mass spectrometry-based method. **Food Chemistry**. v. 169, p. 372-380, 2015.

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

HERRMANN, S. S.; POULSEN, M. E. Clean-up of cereal extracts for gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry pesticide residues analysis using primary secondary amine and C18. **Journal of Chromatography A**, v. 1423, p. 47-53, 2015.

HERRMANN, S. S.; HAJEB, P.; Andersen, G.; POULSEN, M. E. Effects of milling on the extraction efficiency of incurred pesticides in cereals. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 34, p. 1948-1958, 2017.

HRYNKO, I.; OZOWICKA, B.; KACZYŃSKI, P. Comprehensive analysis of insecticides in melliferous weeds and agricultural crops using a modified QuEChERS/LC-MS/MS protocol and of their potential risk to honey bees (*Apis mellifera* L.) **Science of the Total Environment** v.657, p.16–27, 2019.

LÂNGARO, N.C.; CARVALHO, I.Q. Indicações técnicas para cultura da aveia: **XXXIV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia**. Passo Fundo: Fundação ABC, Universidade de Passo Fundo. 136p. 2014.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZACAO E QUALIDADE INDUSTRIAL). **Orientação sobre validação de métodos analíticos** (DOQ-CGCRE-08). Rev. 06, 2017.

KACZYŃSKI, P. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. **Food Chemistry**, v. 230, p. 524–531, 2017.

KARPINSKI, R. A. K. Seletividade e eficiência da associação dos herbicidas iodosulfuron-methyl e fenoxaprop-p-ethyl em cereais de inverno. **Dissertação (mestrado). Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro, Programa De Pós-Graduação em Agronomia – PPGA**, Paraná, 2016. 62 f.

KOESUKWIWAT, U.; LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K. J.; LEEPIPATPIBOON, N. Extension of the QuEChERS method for pesticide residues in cereals to flaxseeds, peanuts and doughs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 5950-5958, 2010.

KUREK, A. J.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; MARCHIORO, V. S.; CRUZ, P. J. Fatores genéticos relacionados com a expressão do caráter percentual de cariopse em aveia branca. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 751-756, 2002.

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

LÂNGARO, N.C.; CARVALHO, I.Q. **Indicações técnicas para cultura da aveia: XXXIV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia**: Fundação ABC. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo. 136p. 2014.

LEANDRO, C. C.; HANCOCK, P.; FUSSELL, R. J.; KEELY, B. J. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. **J Chromatogr A**. v.1103, n.1, p. 94-101, 2006.

LEHOTAY, S. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v.90, p. 485-520, 2007.

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

LEHOTAY, S. J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2548-2560, 2010.

LUCINI, L.; MOLINARI, G. P. Residues of pirimiphos-methyl in cereals and processed fractions following post-harvest spray application. **Journal of Environmental Science and Health, Part B** (2011) 46, 518–524.

MACHADO, L. A. Z. Aveia: Forragem e cobertura do solo. Seriema, Dourados: **Embrapa Agropecuária Oeste**, 2000.

MANAHAN, E. S. **Química Ambiental**. ed. 9. Porto Alegre: Bookman, 912 p. 2013.

MCDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A.; SINCLAIR, L. A.; WILKINSON, R. G. **Animal Nutrition**. Longman, London, 1981.

MARTINS, G. M.; TOSCANO, L. C.; TOMQUELSKI, G. V.; MARUYAMA, W. I. Inseticidas químicos e microbianos no controle da lagarta-do-cartucho na fase inicial da cultura do milho. **Revista Caatinga**, v.22, p.170-174, 2009.

MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K. J.; LEHOTAY, S. J.; WEGSCHEID, J. S.; SZPYLKA, K. A. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. **J. Agric. Food Chem.** 2010, 58 (10), p 5959–5972.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **BRASIL PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO 2015/2016 a 2025/2026**, Projeções de longo prazo. 7ª Edição, Brasília, julho de 2016.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **Histórias da agricultura no mundo do neolítico até à crise contemporânea**. Editora UNESP. 568p. 2010.

MOURA, C.; PATRÍCIA, M.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, Rio Grande, 16(1/2): 37-45, 2006.

NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4ª ed., Bookman, 2010, cap. 6.

OLIVEIRA, E. A. de P.; ZUCARELI, C.; FONSECA, I. C. B.; OLIVEIRA, J. C.; BARROS, A. S. R. Foliar fungicide and environments on the physiological quality of oat seeds. **Journal of Seed Science**, p. 15–24, 2014.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparação de Métodos por Cromatografia Líquida na Determinação de Multirresíduos de Agrotóxicos em Morangos. **Química Nova**, v. 38, p. 1273-1281, 2015.

PANG, G. F.; LIU, Y. M.; FAN, C. L.; ZHANG, J. J.; CAO, Y. Z.; LI, X. M.; LI, Z. Y.; WU, Y. P.; GUO, T. T. Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.** 2006. v. 384, p. 1366-1408.

PAYÁ P.; ANASTASSIADES, M.; MACK D.; SIGALOVA I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p.1697 - 1714, 2007.

PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. Tecnologia da Produção Leiteira. In: **Congresso Brasileiro de Gado Leiteiro**. Piracicaba, 1985, p. 175.

PAREJA, L.; CESIO, V.; HEINZEN, H.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. **Talanta**, v. 83, p. 1613-1622, 2011b.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro. Ed. FIOCRUZ, 372p. 2005.

PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo E Pb por ETAAS. **Química Nova**, v. 25, p. 246-253, 2002.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS- Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

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

PRIMAVESI, O.; GODOY, R.; SOUZA, F. H. D. Avaliação de genótipos e recomendação de cultivares de aveia para cobertura de solo, na região Sudeste, para o ano de 2007. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, comunicado técnico, 66, 4p. 2006.

RASCHE, C.; FOURNES, B.; DIRKS, U.; SPEER, K. N. Multi-residue pesticide analysis (gas chromatography-tandem mass spectrometry detection)-Improvement of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for dried fruits and fat-rich cereals-Benefit and limit of a standardized apple purée calibration (screening). **Journal of Chromatography A**, v. 1403, p. 21-31, 2015

RESTLE, J.; FATURI, C.; PASCOAL, L. L.; ROSA, J. R. P.; BRONDANI, I. L.; ALVES-FILHO, D. C. Processamento do grão de aveia para alimentação de vacas de descarte terminadas em confinamento. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 496-503, abr./jun. 2009.

REYNOLDS, S.L. Sample handing and clean-up procedures I. in: FERNANDEZ-ALBA, A. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues**. In. Comprehensive analytical chemistry. The Netherlands: Elsevier. 2005, 287 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.C.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

SANDRIN, R. Caracterização Físico-química de diferentes frações da aveia (*Avena sativa L*) e atividade antioxidante de seus extratos. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)**, 167p. 2013.

SANTE (EUROPEAN COMMISSION) Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Documento N° SANTE/11813/2017**.

SANTILIO, A.; STEFANELLI, P.; GIROLIMETTI, S.; DOMMARCO, R. Determination of acidic herbicides in cereals by QuEChERS extraction and LC/MS/MS. **Journal of Environmental Science and Health, Part B** (2011) 46, 535–543.

SERNA-SALDIVAR, S. O. Cereal Grains Properties, Processing and Nutritional Atributes. **CRC Press**. 796p. 2010.

SILVA, J. A. G.; WOHLBERG, M. D.; ARENHARDT, E. G.; OLIVEIRA, A. C.; MAZURKIEVICZ, G.; MÜLLER, M.; ARENHARDT, L. G.; BINELO, M. O.; ARNOLD, G.; PRETTO, R. Adaptability and stability of yield and industrial grain quality with and without fungicide in Brazilian oat cultivars, **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 9, p. 1560–1569, 2015.

SILVA, J. R. V.; MARTINS, D.; CATANEO, A.C. Uso de fluxofenim em trigo como protetor ao herbicida s-metolachlor. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 3, p.401-407, 2011.

STACHNIUK, A.; FORNAL, E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. **Food Analytical Methods**. v. 9, p. 1654– 1665, 2016.

STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R. GC-MS: Mas de un Analizador de Masas, para que? **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 4. p. 25-48, 2010.

STEPHEN, A. M.; DAHL, W. J; JOHNS, D. M.; ENGLYST, H. N. Effect of oat hull fiber on human colonic function and serum lipids. **Cereal Chem**. Saint Paul, v. 74, n. 4, p. 379-383, 1997.

STHAN, H. J. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection: State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. **Journal of Chromatography A**, 2000. v.892, p.347 – 377.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

UIZURRUN, P.D.; LEADEN, M.I. Análisis de la sensibilidad de biotipos de Lolium multiflorum a herbicidas inhibidores de la enzima ALS, ACCasa y glifosato. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 30, n. 3, p. 667-673, 2012.

VIERO, C. M.; CAMPONOGARA, S.; CEZAR-VAZ, M. R.; COSTA, V. Z.; BECK, C. L. C. Sociedade de risco: o uso dos agrotóxicos e implicações na saúde do trabalhador rural. **Escola Anna Nery**, v. 20, n. 1, 2016.

YAN, W.; FRÉGEAU, R.; FETCH, J. M. **Food Oat Quality Throughout the Value Chain**. Wiley Blackwell, p.9-32, 2014.

YAO, X.; YANG, F.; LIU, W.; SHIWEI, J. Determination of Four Chiral Pesticides in Soil by QuEChERS-Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Universidade de Wuhan, **Journal of Natural Sciences**. Outubro de 2018, Volume 23, edição 5 , p. 369-375.

WALORCZYK, S.; DROZDZYNSKI, D. Improvement and extension to new analytes of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry revisited. **Journal of Chromatography A**, 1251 (2012) 219–231.

WANG, H.; DING, J.; REN, N. Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 75, p. 197-208, 2016.

WANG, P.; YANG, X.; WANG, J.; CUI, J.; DONG, A. J.; ZHAO, H. T.; JING, J. Multi-residue method for determination of seven neonicotinoid insecticides in grains using dispersive solid-phase extraction and dispersive liquid–liquid micro-extraction by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, 134 (3), 2012. 1691-1698.

WHITE, E. M.; MCGAREL, A. S. L.; RUDDLE, O. The influence of variety, year, disease control and plant growth regulator application on crop damage, yield and quality of winter oats (*Avena sativa*). **Journal of agricultural Science**. v. 140, p. 31-42. 2000.

WHO (World Health Organization). Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues: prepared by the Global Environment Monitoring System – **Food Contamination Monitoring and Assessment Programme, in collaboration with the Codex Committee on Pesticide Residues**, German p. 40, 2015. Disponível em: <https://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/pesticide_en.pdf>. Acesso em 03 fev. 2019.

ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; MARTINS, M. L. QuEChERS. In: BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C (Org.). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**, 1ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2015a, p. 230-244.

ZHAO, L.; LUCAS, D. Multiresidue analysis of pesticides in avocado with agilent bond elut EMR-Lipid by LC-MS/MS. **Agilent Technologies**, Inc. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-6098EN.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2019.