

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

Giovana Ferronato

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE
OLIVA E AZEITONAS EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS e
UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, 03 de agosto de 2018.

Giovana Ferronato

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA E
AZEITONAS EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS e UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título DE **DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

Prof. Dra. Martha Bohrer Adaime

Santa Maria, RS
2018

Ferronato, Giovana

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA E AZEITONAS EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS e UHPLC MS/MS / Giovana Ferronato.- 2018.

157 p.; 30 cm

Orientadora: Martha Bohrer Adaime

Coorientador: Renato Zanella

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2018

1. Azeitona 2. Azeite de oliva 3. QuEChERS 4. UHPLC MS/MS 5. Agrotóxicos I. Bohrer Adaime, Martha II. Zanella, Renato III. Título.

Giovana Ferronato

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA E AZEITONAS EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS e UHPLC-MS/MS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências.**

Aprovado em 03 de agosto de 2018:



Prof. Dra. Martha Bohrer Adaime – UFSM
(Presidente/Orientador)



Prof. Dra. Liziara Da Costa Cabrera - UFFS



Prof. Dra. Débora Orso - URI



Pror. Dr. Cristiano Augusto Ballus - UFSM



Prof. Dr. Osmar Damian Prestes - UFSM

Santa Maria, RS
2018

“A oliveira é certamente a mais preciosa dádiva dos céus”

Thomas Jefferson

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que perto ou longe sempre torceram pelo meu futuro e acreditaram que isso seria possível.

Aos meus pais, Sergio e Araci, que nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar e realizar nosso sonho. Aos meus irmãos, Renan e Samuel, que sempre me apoiaram e ajudaram o quanto puderam, principalmente na época que moramos todos juntos. Obrigada pelo carinho família!

Aos meus amigos, vocês são como uma família, meu apoio longe de casa!

Aos professores do LARP, Renato, Martha e Osmar, com os quais convivi durante boa parte do período de estudo na UFSM. Muito obrigada pelas oportunidades, orientações e incentivo. Em especial a professora Martha que me orientou durante o período do Doutorado, mesmo estando cheia de atribuições na UFSM.

Aos colegas do grupo LARP, tanto os que conheci lá no início quanto os novos. Cada um de vocês foi importante à sua maneira para que pudéssemos crescer juntos. Obrigada pelo companheirismo, pelas risadas e suporte.

A minha banca de qualificação que sugeriu alterações significativas no rumo dessa pesquisa professores Dr. Roger, Dr Manoel, Dr. Fábio, Dr. Osmar. A minha banca de defesa, Dra. Liziana, Dra. Débora, Dr. Cristiano e Dr. Osmar agradeço pelas considerações e sugestões que melhoraram significativamente esse estudo.

Aos demais professores do PPGQ que contribuíram para minha formação durante os anos da pós-graduação.

Ao Ademir e a Valéria, da coordenação do PPGQ que não medem esforços para que os alunos concluam suas atividades nos prazos.

Muito Obrigada!

RESUMO

Tese de doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA E AZEITONAS EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS

Autora: Giovana Ferronato
Orientador: Martha Bohrer Adaime
Santa Maria, 03 de Agosto de 2018

Muito usados na dieta mediterrânea os azeites de oliva e azeitonas de mesa têm se tornado cada dia mais frequentes na mesa do consumidor brasileiro. Apesar do consumo per capita ainda ser pequeno, o país já se configura no cenário internacional como o segundo maior importador do azeite. O principal fornecedor de azeite de oliva é a Espanha e de azeitona é a Argentina, seguida por Espanha, Portugal e Chile. Nos últimos anos a olivicultura vem crescendo no Brasil, principalmente no estado do Rio Grande do Sul. No entanto, ainda não há uma legislação bem estabelecida para o cultivo das oliveiras e apenas um inseticida apresenta LMR para azeitonas. Assim, agrotóxicos não permitidos acabam sendo utilizados para o combate de pragas. Por isso, desenvolver um método analítico que permita determinar agrotóxicos de diferentes classes em azeites de oliva e azeitonas de mesa é fundamental para garantir que os produtos levados à mesa do consumidor não estejam contaminados. Portanto, essa pesquisa desenvolveu e validou um método analítico para determinação de 80 diferentes agrotóxicos em azeite de oliva e azeitonas de mesa empregando o método QuEChERS e a Cromatografia Líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria sequencial (UHPLC-MS/MS). Os extratos foram submetidos à análise cromatográfica por UHPLC-MS/MS obedecendo aos critérios de validação estabelecidos pela SANTE (2017). O método proposto mostrou-se adequado para a determinação de 80 agrotóxicos de diferentes classes em azeite de oliva e azeitonas. O LOQ variou de 0,5 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o LOD de 0,15 a 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ dentro da faixa de aceitação utilizada que foi de 70 a 120% com RSD <20%. Aplicou-se o método proposto para 23 amostras de azeites de oliva e 11 de azeitonas nacionais e importadas. Dessas, seis azeites de oliva e todas as azeitonas de mesa apresentaram pelo menos um dos agrotóxicos avaliados acima do LOQ. Os compostos permitidos pela legislação brasileira não foram detectados nas amostras. Já o fungicida difenoconazol, permitido para a cultura pelo Codex Alimentarius, apresentou concentração abaixo do limite máximo de resíduos.

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

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program in Chemistry
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINATION OF PESTICIDES RESIDUOES IN OLIVE AND OLIVE OIL USING QuEChERS METHOD AND UHPLC-MS/MS

Author: Giovana Ferronato
Advisor: Prof. Dr. Martha Bohrer Adaime
Santa Maria, August 3rd, 2018

Commonly used in the Mediterranean diet, olive oils and table olives have become more frequent in the everyday meals of the Brazilian consumer. Despite the small consumption per capita, the country is already the second biggest importer of the fruit. The main provider is Argentina, followed by Spain, Portugal and Chile. In the last years, Brazil has been increasing olive growing, mainly in the Rio Grande do Sul state. However, there is not established law for olive trees cultivation and only one insecticide is permitted for olives. Therefore, many producers have to apply restricted pesticides, in the need to fight pests, like the olive fly, olive tree moth, rust and others. Therefore, the need to develop an analytical method to determine pesticide residues from different classes in olive oils and table olives, to guarantee that the produce brought to the consumer are not contaminated. This research developed and validated an analytical method for the determination of 80 different pesticides in olive oil and table olives employing QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The extracts were analysed by UHPLC-MS/MS according to the validation criteria established by SANTE. The proposed method showed adequate for the determination of 80 pesticides in olive oil and table olives. LOQ ranged from 0.5 to 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ and the LOD from 0.15 to 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ with adequate accuracy (70 to 120%) and precision (RSD \leq 20%). The proposed method was applied in 23 samples of olive oils and 11 table olives from national and imported brands. From those, six samples of olive oils and all samples of table olives showed at least one pesticide above the LOQ. The compounds allowed by the Brazilian law were not detected in the samples. However, the fungicide difenoconazole, allowed for olive growing by Codex Alimentarius, showed concentration below the maximum residues limit.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore antiga de oliveira, com tronco nodoso e copa expandida e flores e folhas da oliveira (<i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i> var. <i>europaea</i>).....	21
Figura 2 - Partes da azeitona.	22
Figura 3-Estágios de maturação das azeitonas.	24
Figura 4 -Principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras: a) ácido palmítico, b) ácido esteárico, c) ácido oleico (ômega 9), d) ácido linoleico (ômega 6) e e) ácido linolênico (ômega 3).	30
Figura 5 - Planejamento fatorial de composto central em estrela.....	40
Figura 6 - Comparação entre os métodos QuEChERS de extração para azeite de oliva.....	56
Figura 7–Agitadores utilizados durante a etapa de extração: a) vortex comum, b) Multitube Vortex Fisher Scientific®, c) Heidolph Overhead Shaker Reax®	57
Figura 8 - Gráficos de Pareto obtidos pelo planejamento experimental para os agrotóxicos: a) aldicarbe, b) dimetoato, c) fempropimorfe e d) metsulfurom metílico.....	66
Figura 9 - Superfícies de resposta obtidas pelo planejamento experimental para os agrotóxicos: a) aldicarbe, b) dimetoato, c) fempropimorfe e d) metsulfurom metílico.....	67
Figura 10 - Cromatograma de ions totais (TIC) obtido por UHPLC-MS/MS para os analitos quantificados em uma solução de 20 µg L ⁻¹ no extrato da matriz azeite de oliva.....	71
Figura 11 - Óleos vegetais congelados (a) e após etapa de congelamento (b).	72
Figura 12 - Resíduo de gordura (g) para as extrações com diferentes tipos de solvente sem congelamento, excluindo-se a extração com hexano para melhor visualização dos resultados obtidos.	73
Figura 13 - Resíduo de gordura (g) para as extrações com diferentes tipos de solvente com congelamento, excluindo-se a extração com hexano para melhor visualização dos resultados obtidos.....	73
Figura 14 - Resultado da adição de água e NaCl às matrizes de óleo vegetal.	75

Figura 15 - Demonstração da eficácia da CCD para análise qualitativa da presença de ácidos graxos nos extratos da matriz: a) controle + sem limpeza, b) controle + limpeza com C18, c) controle + limpeza com EMR.....	77
Figura 16 - Comparação visual entre os três métodos QuEChERS avaliados: a) original, b) acetato e c) citrato.	78
Figura 17- Determinação no modo SRM por UHPLC-MS/MS para comparação do teor de coextrativos nos diferentes métodos QuEChERS avaliados: a) acetato, b) citrato e c) original. Em destaque a intensidade máxima de cada ensaio.....	79
Figura 18 - Varredura no modo <i>full scan</i> por GC-MS para comparação do teor de coextrativos nos diferentes métodos QuEChERS avaliados (obtidos por deconvolução através do software Agilent MassHunter Unknowns Analysis [®]): a) acetato, b) citrato e c) original.	80
Figura 19 - Variação na faixa de recuperação para o composto Espinetoram durante os ensaios de agitação.....	82
Figura 20 - Variação na faixa de recuperação para o composto Espinosade A durante os ensaios de agitação.	82
Figura 21 - Variação na faixa de recuperação para o composto diclorvós durante os ensaios de agitação.	83
Figura 22- Cromatogramas no modo varredura obtido por GC-MS comparando os ensaios sem congelamento e os ensaios com congelamento utilizando banho de gelo em diferentes tempos.	84
Figura 23 - Cromatogramas no modo varredura obtido por GC-MS comparando os ensaios sem congelamento com o ensaio utilizando congelamento em banho de gelo seco + álcool por 1 minuto.....	85
Figura 24 – Cromatogramas no modo varredura obtido por GC-MS comparando os ensaios sem congelamento com os ensaios utilizando congelamento em freezer por diferentes períodos.	85
Figura 25 - Análise no modo varredura por GC-MS indicando a presença de coextrativos que não estavam presentes anteriormente no extrato da matriz. ..	86
Figura 26 - Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz com os cartuchos de SPE: a) Carvão+ PSA, b) STRATA SDB-L c) EMR Captiva [®] e d) Amino.	88
Figura 27–Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz comparando: a) EMR SPE e b) EMR d-SPE...	89

Figura 28 - Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz comparando: a) Ensaio 4 SPE e b) Ensaio 7. .	90
Figura 29 - Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz da figura 29, sobrepondo os cromatogramas dos ensaios 4 (preto) e 7(vermelho).	91
Figura 30 - Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz comparando: a) Florisil [®] , b) Sílica e c) Alumina.	92
Figura 31 - Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz comparando: a) alumina e b) C18+PSA.....	93
Figura 32 - Comparação em número de compostos recuperados entre os sorventes de limpeza avaliados.....	93
Figura 33 - Fluxograma do preparo de amostra para azeite de oliva.....	94
Figura 34–Cromatogramas do branco da matriz em azeite de oliva, branco reagente e ponto 20 µg L ⁻¹ na matriz para o composto atrazina mostrando a seletividade e sensibilidade do método proposto obtidos no modo SRM por UHPLC-MS/MS. .	95
Figura 35 - Efeito matriz para o composto difenoconazol	106
Figura 36 - Efeito matriz para o composto tiabendazol.	106
Figura 37 - Fluxograma do preparo de amostra para azeitona.	107
Figura 38 - Cromatogramas do agrotóxico tebuconazol. Em azul o cromatograma no LOQ do método, e em verde o cromatograma correspondente à amostra positiva.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal, teor de sódio e ácidos graxos principais para azeitonas e azeite de oliva.	25
Tabela 2 - Acidez dos azeites de oliva.	28
Tabela 3 - Índice de peróxido para os azeites de oliva.	28
Tabela 4- Extinção específica para os azeites de oliva.	28
Tabela 5 - Limites máximos de resíduos de agrotóxicos estabelecidos pelo Codex Alimentarius para azeites de oliva e azeitonas.	31
Tabela 6 - Informações sobre os resíduos de agrotóxicos de amostras em azeitonas e azeites de oliva nos últimos anos para Portugal, Espanha, Grécia e Itália.	32
Tabela 7 - Parâmetros de validação utilizados para o método analítico proposto para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em azeites de oliva e azeitonas por UHPLC-MS/MS.	41
Tabela 8 - Analitos, pureza, grupo químico, classe, fórmula molecular, massa molecular, pKa, ponto de ebulição e solubilidade em água.	45
Tabela 9 - Condições cromatográficas avaliadas pelo planejamento fatorial 2 ³	50
Tabela 10-Tipos e tempo de agitação (A) avaliados na etapa de extração.	58
Tabela 11 - Ensaio para estudo da influência da etapa de congelamento (C) na extração de agrotóxicos em azeite de oliva.	59
Tabela 12 - Ensaio variando-se os sorventes (S) de limpeza no método QuEChERS.	60
Tabela 13 - Analitos caracterizados pelo tempo de retenção, ions precursor e produto para duas transições (quantificação e confirmação) e energia de colisão.	68
Tabela 14 - Comparação dos testes gravimétricos para os três diferentes métodos QuEChERS.	78
Tabela 15 - Principais parâmetros de validação avaliados para o método proposto para a matriz azeite de oliva.	97
Tabela 16 - Principais parâmetros de validação avaliados para ampliação do método proposto para a matriz azeitona.	108
Tabela 17 - Resultados positivos para as 23 amostras de azeite de oliva e 11 amostras de azeitonas avaliados pelo método validado.	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- a – coeficiente linear;
- ACN – acetonitrila;
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
- b – Coeficiente linear;
- C18 - Sílica modificada com hidrocarboneto linear (octadecilsilano);
- d-SPE – extração em fase sólida dispersiva;
- EUA – Estados Unidos da América;
- FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês Food and Agriculture Organization of the United Nations;
- IN – Instrução Normativa;
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial;
- ISO – Organização Internacional para Padronização;
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry;
- Kow – Coeficiente de partição octanol água;
- k_{ps} – Produto de solubilidade;
- LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas;
- LOD – Limite de detecção, do inglês “Limit of detection”;
- LOQ – Limite de quantificação, do inglês “Limit of Quantification”;
- LMR – Limite Máximo de Resíduo;
- m/z – Razão massa carga;
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
- MRM – Monitoramento de reações múltiplas, do inglês Multiple Reaction Monitoring;
- MS – Espectrometria de Massas, do inglês Mass Spectrometry;
- MS/MS - Espectrometria de Massas em serie, do inglês Tandem Mass Spectrometry;
- PC – Padrão de Controle;
- PI – Padrão Interno;
- QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe;
- r^2 - coeficiente de determinação;
- RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Deviation;
- SANTE – Saúde e Proteção do Consumidor, do francês Santé et protection des consommateurs;
- SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês Solid Phase Extraction;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Gerais.....	18
1.1.2	Específicos	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	OLIVEIRAS.....	20
2.1.1	Azeitonas.....	22
2.1.2	Azeite de oliva	26
2.1.2.1	Parâmetros físico-químicosde controle de qualidade do azeite	27
2.2	LIPÍDIOS	29
2.2.1	Ácidos graxos	29
2.3	LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITONAS E AZEITE DE OLIVA.....	30
2.4	MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS E OUTROS CONTAMINANTES EM ÓLEOS COMESTÍVEIS.....	36
2.5	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	39
2.6	VALIDAÇÃO	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	43
3.1.1	Materiais e reagentes.....	43
3.2	COMPOSTOS SELECIONADOS	44
3.3	PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS	48
3.3.1	Análise de solventes e reagentes.....	48
3.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	48
3.4.1	Escolha das amostras branco	49
3.4.2	Coleta de amostras reais e aplicação do método desenvolvido	49
3.5	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	50
3.5.1	Ajuste das condições de detecção por UHPLC-MS/MS	51
3.6	TESTES PRELIMINARES.....	52
3.7	ESTUDO DE DIFERENTES TÉCNICAS PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE COEXTRATIVOS NO EXTRATO DA AMOSTRA.....	53
3.7.1	Placas de sílicautilizando a Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	53

3.7.2	Testes gravimétricos	53
3.7.3	Avaliação no modo SRM por UHPLC-MS/MS	54
3.7.4	Varredura por GC-MS	54
3.8	PREPARO DE AMOSTRA	55
3.8.1	Variações na etapa de agitação para extração dos agrotóxicos na matriz azeite de oliva	57
3.8.2	Avaliação da influência da etapa de congelamento na remoção dos coextrativos do extrato da matriz azeite de oliva.....	58
3.8.3	Precipitação de coextrativos por agitação ultrassônica	59
3.8.4	Utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza.....	60
3.9	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA.....	61
3.9.1	Seletividade e sensibilidade	61
3.9.2	Linearidade e curva analítica.....	62
3.9.3	Limites de detecção e quantificação.....	62
3.9.4	Exatidão	63
3.9.5	Precisão	63
3.9.6	Robustez	63
3.9.7	Efeito matriz	64
3.10	–AMPLIAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A MATRIZ AZEITONA.....	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4.1	CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO	65
4.1.1	Ajuste das condições de determinação dos agrotóxicos por UHPLC-MS/MS	68
4.2	TESTES PRELIMINARES.....	71
4.3	AVALIAÇÃO DE DIFERENTES técnicas para VERIFICAR A PRESENÇA DE COEXTRATIVOS NOS EXTRATOS DAS AMOSTRAS	76
4.3.1	Placas de sílica utilizando a CCD.....	76
4.3.2	Testes gravimétricos	77
4.3.3	Avaliação no modo SRM por UHPLC-MS/MS.....	78
4.3.4	Avaliação dos extratos das amostras através da varredura por GC-MS.....	79
4.4	PREPARO DE AMOSTRA	80

4.4.1	Variações na etapa de agitação para extração dos agrotóxicos na matriz azeite de oliva	81
4.4.2	Avaliação da influência da etapa de congelamento na remoção dos coextrativos da amostra no extrato da matriz azeite de oliva	83
4.4.3	Precipitação de coextrativos por agitação ultrassônica	86
4.4.4	Utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza.....	86
4.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA.....	94
4.5.1	Seletividade e sensibilidade	95
4.5.2	Linearidade e curva analítica.....	96
4.5.3	Limites de detecção e quantificação.....	102
4.5.4	Exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	102
4.5.5	Efeito matriz	104
4.5.6	Robustez	104
4.6	AMPLIAÇÃO DO ESCOPO PARA A MATRIZ AZEITONA.....	104
4.7	APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO	112
5	CONCLUSÕES	114
6	DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	115
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	116
8	REFERÊNCIAS.....	117
	APÊNDICES.....	130
	ANEXOS	156

1 INTRODUÇÃO

Os azeites são produtos ricos em ácidos graxos essenciais e fazem parte da dieta de um indivíduo saudável (PEREIRA e JUNIOR, 2017). Esses são produzidos a partir de frutos com alto teor de gordura, as azeitonas. Atualmente tem-se percebido um aumento no consumo desses alimentos não só no Brasil, mas no mundo (NUNES, 2007). Isso implica na expansão da produtividade que pode ser conseguida pelo incremento das áreas cultivadas ou pela melhora no rendimento das colheitas.

O Rio Grande do Sul é o estado que mais produz azeitonas no país (GLOBO, 2018). No caso do cultivo em larga escala, visando a melhor qualidade dos produtos, costuma-se realizar o manejo agrícola com o uso de agrotóxicos, pois esses compostos quimicamente sintetizados são em sua maioria benéficos ao controle de pragas e ervas daninhas. No entanto, quando utilizados sem controle, fora do intervalo de segurança (BRASIL, 1992) ou quando não indicados para a cultura na qual foram aplicados podem causar danos a quem os consuma, pois é possível que haja resíduos desses remanescentes nas plantas, grãos e frutos. Nesse sentido, é fundamental que sejam seguidas as boas práticas agrícolas para o uso de agrotóxicos (AGRICULTURA, 2018).

Uma das principais características dos azeites é o alto teor de gordura monoinsaturada. O Brasil estabelece um regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal a fim de que sejam mantidos os padrões de identidade e características mínimas de qualidade para óleos vegetais e azeites de oliva (MAPA, 2012). No ano de 2018 foram reprovadas aproximadamente 60% das marcas de azeites comercializadas no país por não atenderem aos requisitos de qualidade (AGRICULTURA, 2018).

Os quesitos atuais de controle de qualidade, no entanto, não incluem o monitoramento da existência de agrotóxicos presentes nos azeites de oliva e nem nas azeitonas. Por isso, métodos analíticos que sejam capazes de detectar a presença de resíduos de agrotóxicos nessas matrizes são fundamentais para que se possa garantir a segurança dos alimentos ofertados ao consumidor. Nesse sentido, métodos de extração de agrotóxicos em azeites

de oliva e azeitonas que sejam de fácil execução, rápidos e baratos são cada vez mais requisitados para que se possa realizar o monitoramento adequado dessas amostras. Ainda, a detecção por UHPLC-MS/MS permite a identificação unívoca de cada analito, mesmo num método multirresíduo em um tempo de análise cromatográfica relativamente curto, cerca de 10 minutos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Gerais

Levando em consideração a inexistência de uma legislação mais rigorosa para o controle e monitoramento da presença de agrotóxicos em azeites de oliva e azeitonas essa pesquisa procurou desenvolver e validar um método analítico rápido e fácil para a determinação de diferentes classes de agrotóxicos em azeite de oliva e azeitonas empregando o método QuEChERS e a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS) bem como aplicar o método desenvolvido para amostras de azeite de oliva e azeitonas nacionais e importados.

1.1.2 Específicos

- Desenvolver e validar o método analítico proposto para a determinação de resíduos de agrotóxicos comumente utilizados nas oliveiras levando-se em consideração principalmente os dois compostos permitidos para aplicação no país;
- Otimizar as condições cromatográficas a partir do uso de planejamento composto central a fim de melhorar a intensidade do sinal analítico e a separação cromatográfica dos compostos em estudo;
- Avaliar os procedimentos de extração baseados no método QuEChERS;

- Estudar a aplicação de diferentes sorventes levando-se em consideração o teor de recuperação dos analitos e a qualidade de limpeza promovida no extrato da matriz;
- Avaliar qual tipo de limpeza (dispersiva ou em fase sólida) é adequada para as matrizes estudadas;
- Propor alternativas para a verificação qualitativa da presença de gorduras no extrato da matriz;
- Utilizar a UHPLC-MS/MS para avaliar a presença de lipídios nos extratos da matriz;
- Utilizar a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série (GC-MS/MS) como alternativa para verificação da qualidade dos extratos da matriz quanto à presença de coextrativos;
- Ampliar a validação para a matriz azeitona;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras reais de azeite de oliva e azeitonas de mesa de diferentes regiões do país e do mundo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OLIVEIRAS

Segundo a mitologia grega, nos tempos em que os Deuses governavam a Terra houve uma disputa para ver quem iria ficar com uma grande cidade. O prêmio seria dado ao Deus que apresentasse o melhor presente à cidade. Há controvérsias sobre o presente ofertado por Poseidon, Deus dos mares. No entanto, diz-se que Atena plantou uma semente na cidade e dessa nasceu uma oliveira, que produzia não só comida, mas óleo que poderia ser usado na iluminação e madeira para aquecimento e construção. A essa cidade foi dado o nome de Atenas (OLIVEGROVEOUNDLE, 2017).

Não se sabe ao certo a origem das oliveiras, mas há evidências de que as primeiras árvores surgiram no Mediterrâneo e de lá se espalharam para o resto do mundo (QUEST-RITSON, 2011). Há duas variedades (subespécies) da espécie *Olea europaeae* de oliveiras. A primeira é *europaea* que é amplamente cultivada e usada comumente na alimentação e produção de azeites e a segunda é uma variação selvagem de porte menor com espinho denominada *sylvestris* (GREEN, 2002).

Devido aos anos de evolução, se imagina que as oliveiras se espalharam bem pelo mediterrâneo e demais terras por sua capacidade de se desenvolverem tanto em solos férteis quanto em pedregosos ou até mesmo estéreis (BRETON *et al.*, 2009). A árvore de oliveira independente do tipo de cultivar apresenta folhas estreitas verde escuras na parte da frente e cinzentas na parte de trás que crescem aos pares, em ângulo reto com os galhos. Esses são normalmente arqueados devido ao peso dos frutos (Figura 1).

Figura 1 - Árvore antiga de oliveira, com tronco nodoso e copa expandida e flores e folhas da oliveira (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*).



Fonte: plantsrescue.com

São árvores hermafroditas e florescem na primavera. Suas flores são brancas e minúsculas (Figura 1). Cada flor dá origem a uma azeitona, porém, para evitar que se sobrecarreguem, as árvores descartam grande parte dos frutos antes mesmo que esses se desenvolvam. A produção de azeitonas é bienal (a cada dois anos). Assim, se há uma colheita boa em um ano, o seguinte apresentará uma colheita fraca, já o terceiro alcançará a mesma produtividade do primeiro (QUEST-RITSON, 2011).

A época de colheita costumava ser um empecilho para geração de azeites e azeitonas de boa qualidade nos pomares mais antigos, pois não era possível que essa fosse mecanizada devido ao espaçamento entre as árvores e a altura das mesmas. Assim, colhiam-se os frutos com hastes denominadas ancinhos. Além de prejudicar as propriedades do azeite, pois a haste bate nos frutos, fragilizando-os, essa prática acaba aumentando o custo da produção. Atualmente, com pomares melhor planejados é possível realizar a colheita mecanizada em menos tempo e com maior eficácia. Assim, uma boa colheita pode desempenhar um papel importante na melhora da rentabilidade do olival (BERNARDI *et al.*, 2018; CICEK, 2011).

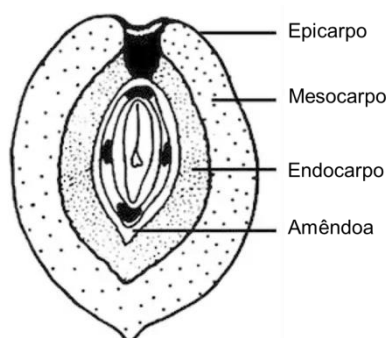
Outro fator importante na produção das oliveiras é a polinização. Algumas cultivares são autoestéreis e necessitam de outras variedades próximas para que ocorra a polinização cruzada. Conforme o Programa Estadual de Desenvolvimento da Olivicultura (PRÓ-OLIVA, 2018) recomenda-se usar sempre variedades polinizadoras: pomares com duas ou três variedades e ainda plantar filas completas de uma variedade (pares).

Apesar de tudo isso, as oliveiras ainda são pouco estudadas, de acordo com QUEST-RISTON (2011) o conhecimento que se tem atualmente sobre azeites é o que se tinha há mais de trinta anos sobre vinhos. Já é sabido que existe mais de 2000 cultivares diferentes de oliveiras somente no mediterrâneo. Além disso, estima-se que exista o dobro de variedades de azeitonas do que de uvas.

2.1.1 Azeitonas

As azeitonas são frutos comestíveis oriundos das árvores de oliveira (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*), de forma oval, compostos de três partes (Figura 2): a parte externa fina chamada de pele, epicarpo ou exocarpo, a parte média carnosa chamada mesocarpo ou polpa e a parte interna chamada endocarpo ou caroço. Ainda, dentro do endocarpo fica localizada a amêndoa, mais conhecida como semente (COI, 2004).

Figura 2 - Partes da azeitona.



Adaptado de: Braadbaart, Marinova e Sarpaki, 2016.

Como suas sementes são dispersas pelas aves, essas aprenderam a engolir os frutos inteiros evitando sentir seu amargor (RUPP, 2016). O amargor natural do fruto deve-se a um composto fenólico chamado oleuropeína. Ele é encontrado principalmente nas folhas das oliveiras, mas também está presente no fruto cru. O amargor é mecanismo de proteção nas azeitonas, capaz de afastar microrganismos invasivos e animais mastigadores de sementes.

Segundo ZOIDOU *et al.* (2014) após a ingestão a oleuropeína é metabolizada para hidroxitirosol, um importante antioxidante. Alguns estudos

sugerem que ela tem propriedades antimicrobianas, antivirais e anti-inflamatórias (TRIPOLLI *et al.*, 2005, VISIOLI, POLI e GALLI, 2002, VISIOLI, BELLOSTA e GALLI, 1998). Além disso, a presença de ácidos graxos monoinsaturados e compostos como tocoferóis, carotenoides, fosfolípidios e fenóis caracteriza esses frutos como altamente benéficos à saúde (BENAVENTE-GARCÍA *et al.*, 2000; GHANBARI *et al.*, 2012).

O Conselho Oleícola Internacional (COI, 2004) define azeitona de mesa, ou azeitona em conserva como aquela que é preparada a partir de frutos não danificados, submetidos a processos de eliminação do amargor natural do fruto e conservados através da fermentação natural ou tratamento térmico. A preservação dos frutos pode ser realizada com ou sem conservantes, em recipientes com ou sem líquido de cobertura.

Para remoção do amargor alguns métodos de cura são empregados. Os processos de cura mais comuns usam tratamentos com salmoura, sal seco, água ou soda cáustica. São três os estilos de tratamento mais comuns. O estilo espanhol costuma ser aplicado em azeitonas verdes e utiliza soluções de hidróxido de sódio (1,8 - 2,5%, m/v) nas quais se imergem os frutos. Após, os mesmos são lavados para remover o excesso da base (DE CASTRO *et al.*, 2002). O estilo grego usa uma salmoura de cloreto de sódio (NaCl) (8 a 10% m/v) de NaCl para remover o amargor dos frutos maduros, sem a necessidade da utilização do hidróxido. O que acontece é uma fermentação natural do fruto que pode levar de oito a doze meses (CARDOSO *et al.*, 2010). A fermentação é conduzida por leveduras, majoritariamente, mas também por bactérias ácido lácticas e bactérias Gram-negativas (PANAGOU *et al.*, 2011). Esse processo costuma ser mais lento. O último estilo é o Californiano que é aplicado em frutos que estão iniciando a mudança de coloração. Esses são colocados sob imersão em uma solução de NaOH, porém, em uma concentração menor que no estilo espanhol (1 a 2%, m/v). A técnica é repetida por vários períodos até que o NaOH penetre na polpa, sem atingir o caroço (MARSILIO *et al.*, 2001).

Os frutos são classificados de acordo com seu grau de maturação em três tipos: verdes, mistos e pretos (Figura 4). O tipo verde é obtido de frutos não maduros ou levemente maduros, tendo atingido o tamanho definitivo, apresentam cor verde, com variação até amarelo-palha. O tipo preto é obtido a partir de frutos

completamente maduros ou imediatamente antes da maturação completa. Já o tipo misto é colhido na fase intermediária entre os dois extremos, na fase de mudança de cor, costumam ser de cor rosada, rosa-avermelhada e/ou acastanhada (YADA e HARRIS, 2007).

Figura 3-Estágios de maturação das azeitonas.



Fonte: YADA e HARRIS, 2007.

A composição das azeitonas pretas e verdes não é a mesma, devido a fatores como época de colheita e grau de maturação. Nesse sentido, as azeitonas pretas apresentam maior quantidade de proteínas, lipídios, carboidratos e fibras alimentares que as verdes. Elas também contêm mais ácidos graxos, só perdendo para os azeites. A Tabela 1 diferencia a composição centesimal, teor de sódio e ácidos graxos principais de cada uma (em conserva) segundo a Taco (2011). A mesma tabela também apresenta a composição do azeite de oliva.

Tabela 1 - Composição centesimal, teor de sódio e ácidos graxos principais para azeitonas e azeite de oliva.

Alimento (100g)	Umidade (%)	Energia (kcal)	Proteína (g)	Lipídios (g)	Colesterol (g)	Carboidratos (g)	Fibras (g)	Sódio (mg)	Ácidos graxos		
									Saturados	Monoinsaturados	Poli- insaturados
Azeitona preta	68,5	194	1,2	20,3	NA	5,5	4,6	1567	3,5	11,0	3,0
Azeitona verde	76,3	137	0,9	14,2	NA	4,1	3,8	1347	2,3	8,3	1,0
Azeite de oliva	NA	884	NA	100	NA	NA	NA	-	14,9	75,5	9,5

NA – não se aplica;

FONTE: TACO (2011).

Segundo CAPPATO (2015), o Brasil não importa azeitonas frescas *in natura*. Todas as azeitonas que chegam ao país no estágio transitório são lavadas, processadas industrialmente e envasadas como um produto nacional. O maior fornecedor de azeitonas do país é a Argentina.

Mesmo não importando azeitonas *in natura* o país não está livre da presença de doenças que possam estar associadas às azeitonas, principalmente devido a problemas de conservação. Em 2011 a Anvisa publicou uma nota técnica para que a população não consumisse a azeitona orgânica com amêndoas da marca Bio Gaudian, pois essa poderia estar relacionada à uma contaminação com botulismo (ANVISA, 2011).

2.1.2 Azeite de oliva

Segundo a IN nº01 (MAPA, 2012), para ser considerado azeite de oliva o óleo comestível deve ser oriundo do fruto da *Olea europea* L. (oliveira). Excluem-se dessa definição os óleos que sejam obtidos por extração com solventes, processos de reesterificação e ainda misturas de outros óleos.

Para ser considerado azeite de oliva virgem o óleo não deve ter sido submetido a nenhum processo além de lavagem, decantação, centrifugação e filtração. Atualmente, para se produzir um litro de azeite é necessário utilizar de 5 a 6 quilos de azeitonas, já que o teor de óleo dos frutos é de aproximadamente 30% (BELAJ, 2011). O azeite de oliva apresenta a mais alta porcentagem de gorduras monoinsaturadas (70%) em relação aos demais óleos (YADA e HARRIS, 2007).

A União Europeia (UE) continua sendo o principal produtor, consumidor e exportador de azeite. De 2012 a 2017, a UE produziu 67%, consumiu 55% e exportou 67% do azeite mundial (EC.EUROPA.EU, 2018). Apesar de o Brasil ser o segundo maior importador de azeitona e de azeite de oliva, o consumo ainda é pequeno, quando comparado a países europeus e do mediterrâneo (IOOC, 2018).

A produção de azeite envolve muitas etapas: inicia-se na colheita das azeitonas e é finalizada no envase e armazenamento do azeite pronto. No entanto, entre esses dois extremos diferentes técnicas podem ser utilizadas para a extração do azeite das azeitonas. O método tradicional consiste em selecionar os frutos, lavá-los e esmagá-los com grandes rodas de granito formando uma pasta a temperatura

ambiente (preservando sabores e aromas). O próximo passo é a *gramolatura*, que é a mistura da pasta, fundamental para que as gotículas de óleo se unam em gotas maiores. Normalmente o misturador é do tipo calha com um eixo sem fim. A seguir a pasta é disposta em discos porosos (diafragmas) (*fiescoli*) que são empilhados formando uma torre de diafragmas e pasta. A torre é pressionada e inicia-se a separação da parte sólida da líquida. Na parte sólida fica o bagaço das azeitonas, também chamado de *sansa*. No líquido está contido o azeite e um pouco de água oriunda do fruto. Eles são separados por decantação (MACINEDELTRASIMENO.IT, 2018, FINDINGREECE, 2017). Outros tipos de moinhos podem ser usados, como moedores dentados de metal ou moinhos de martelo. Outra maneira de extrair o azeite das azeitonas é submeter a pasta ao processo de centrifugação (OLIVEOILSOURCE, 2018).

O azeite de oliva é um dos principais componentes da dieta mediterrânea. Além disso, é crescente seu uso, ou de seus subprodutos na indústria cosmética, principalmente devido às suas reconhecidas propriedades hidratantes e antioxidantes (RODRIGUES, PIMENTEL e OLIVEIRA, 2015).

2.1.2.1 *Parâmetros físico-químicos de controle de qualidade do azeite*

Atualmente os órgãos regulamentadores, Anvisa e Mapa, estabelecem parâmetros físico-químicos para o controle da qualidade dos azeites vendidos no país. São eles: acidez, índice de peróxido e extinção específica no ultravioleta (UV). Além disso, características sensoriais são utilizadas para caracterizar azeites de boa qualidade, no entanto, esses testes são mais difíceis de serem realizados e moldam parâmetros como odor e sabor (MAPA, 2012).

O teor ou índice de acidez determina os ácidos graxos livres que existem na amostra. É definido como o número de miligramas de KOH necessários para neutralizar 1g da amostra. Pode variar conforme o tipo e qualidade do azeite, conforme consta na Tabela 2.

Tabela 2 - Acidez dos azeites de oliva.

Tipo de azeite	Teor de acidez em ácido oleico (g/100 g)
Azeite de oliva extra virgem	máximo 0,8
Azeite de oliva virgem	máximo 2,0
Azeite de oliva	máximo 1,0
Azeite de oliva refinado	máximo 0,3

Fonte: MAPA, IN nº01, 2012.

Já o índice de peróxido expressa a oxidação lipídica do azeite, ou seja, a reação espontânea dos lipídios presentes com o oxigênio do ar. Essa reação também pode ser chamada de auto-oxidação e é o fenômeno que produz a rancidez nos alimentos (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). A luz é o principal catalisador desse tipo de reação (FERRARI, 1998). Por isso, os azeites costumam ser armazenados em frascos do tipo âmbar. Esse índice é calculado em miliequivalentes de peróxido por 1000 g por amostra. Os valores esperados para azeites, segundo a Anvisa, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Índice de peróxido para os azeites de oliva.

Tipo de azeite	Teor de peróxido (meq/kg)
Azeite de oliva virgem	máximo 20
Azeite de oliva	máximo 15
Azeite de oliva refinado	máximo 5

Fonte: MAPA, IN nº01, 2012.

A extinção específica no UV mede a absorção da radiação ultravioleta a 232nm (duzentos e trinta e dois nanômetros) e 270nm (duzentos e setenta nanômetros) em condições de análise, auxiliando na classificação dos azeites conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4- Extinção específica para os azeites de oliva.

Tipo de azeite	Extinção específica no UV		
	270 nm	Delta K	232 nm
Azeite de oliva virgem	Extra virgem	≤0,22	≤2,5
	Virgem	≤0,25	≤2,6
	Lampante	-	-
Azeite de oliva	≤0,90	≤0,15	-
Azeite de oliva refinado	≤1,1	≤0,16	-

Ainda, o MAPA (2012) sugere a avaliação de outros parâmetros para confirmar a qualidade dos azeites, incluindo a medida do teor de alguns metais como arsênio, chumbo, ferro e cobre. No entanto, nada é especificado sobre resíduos de agrotóxicos nessa matriz.

2.2 LIPÍDIOS

Os lipídios são uma classe de substâncias químicas altamente hidrofóbicas. Os exemplos mais conhecidos são os ácidos graxos e derivados (ceras, esteróis e carotenoides). Como característica principal, possuem cadeias carbônicas longas. Essas cadeias podem ser funcionalizadas com álcoois, fenóis, ácidos carboxílicos e ésteres (NELSON e COX, 2014).

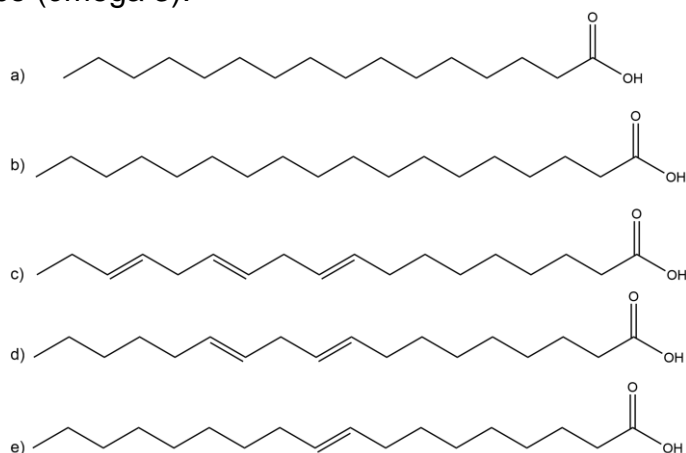
Um dos grupos de lipídios mais importantes para a vida humana são os óleos e graxas (ROCCISANO, 2016). Esses têm em sua composição ácidos graxos e derivados. Apresentam função alimentar e também são usados como combustíveis e lubrificantes. Ainda, podem ser empregados na fabricação de sabões e tintas.

Quimicamente, os lipídios são sintetizados pela união de três ácidos graxos a uma molécula de glicerol, formando um triéster ou triacilglicerol. São chamados de triglicerídeos. Podem ser sólidos ou líquidos em temperatura ambiente, dependendo da sua estrutura e composição. Usualmente, o termo “gordura” se refere aos triglicerídeos em seu estado sólido a temperatura ambiente (25 °C), já o termo óleo aos no estado líquido, também nessa mesma temperatura (ADITIVOS e INGREDIENTES, 2016).

2.2.1 Ácidos graxos

Os ácidos graxos possuem cadeias carbônicas longas, normalmente sem ramificação com um grupo funcional de ácido carboxílico em uma das extremidades. Usualmente apresentam número par de carbonos devido à rota bioquímica de síntese. Entre si, diferem pelo número de carbonos e pela quantidade de insaturações da cadeia carbônica (Figura 4). (Nelson e Cox, 2014).

Figura 4 -Principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras: a) ácido palmítico, b) ácido esteárico, c) ácido oleico (ômega 9), d) ácido linoleico (ômega 6) e e) ácido linolênico (ômega 3).



Fonte: o autor

Nos azeites os ácidos graxos podem ser encontrados livres ou combinados. Quando combinados podem estar como monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos ou triacilglicerídeos. Ácidos graxos saturados possuem ponto de fusão mais alto, devido a facilidade que as moléculas tem de interagirem umas com as outras rotacionalmente. Quando ocorrem insaturações do tipo *cis* essa rotação se torna dificultada, diminuindo a interação entre as cadeias carbônicas e, por consequência, o ponto de ebulição. No caso da insaturação do tipo *trans* a rotação não é afetada (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

2.3 LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITONAS E AZEITE DE OLIVA

No Brasil são estabelecidos Limites Máximos de Resíduos (LMR) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para diversas culturas visando o controle em alimentos através de programas de monitoramento. No entanto, ainda não há legislação abrangente que estabeleça LMRs para azeitonas cultivadas no país e nem seus subprodutos. Fato esse que se deve à recente implantação efetiva da cultura no país. Atualmente apenas dois compostos são permitidos para a cultura, o inseticida espinetoram e o acaricida fenpiroximato. No caso de contaminantes inorgânicos, a legislação já se aplica às azeitonas estabelecendo limites máximos para arsênio ($0,3 \text{ mg kg}^{-1}$) e chumbo ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$).

Para fins de exportação é recomendado que os países sigam as orientações do Codex Alimentarius (2018), um programa conjunto entre a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) que estabelece normas internacionais na área de alimentos. Assim, o Codex Alimentarius estabelece alguns LMRs para azeitonas e azeites de oliva conforme é indicado na Tabela 5. Percebe-se que os LMRs estabelecidos são bem distintos e dependem do tipo de alimento que está sendo avaliado.

Tabela 5 - Limites máximos de resíduos de agrotóxicos estabelecidos pelo Codex Alimentarius para azeites de oliva e azeitonas.

Alimento	Composto	LMR (mg kg ⁻¹)
Azeitonas para produção de óleo	Imidacloprido	2
	Buprofezina	5
	Carbaril	30
	Cialotrina total (gama + lambda)	1
	Cipermetrina total (cis + trans)	0,5
	Deltametrina	1
	Difenoconazol	2
	Dimetoato	0,5
	Etefom	7
	Azeitonas	Fentiona
Flumioxazin		0,02
Imidacloprido		2
Cresoxim metílico		0,2
Metidationa		1
Paraquat		0,1
Permetrina		1
Tebuconazol		0,05
Trifloxistrobina		0,3
		Carbaril
Azeite de oliva, virgem	Cipermetrina total (cis + trans)	0,5
	Fentiona	1

Alimento	Composto	LMR (mg kg ⁻¹)
	Cresoxim metílico	0,7
	Trifloxistrobina	0,9
Azeite de oliva, refinado	Cipermetrina total (cis + trans)	0,5
	Trifloxistrobina	1,2

Fonte: Codex Alimentarius, 2018.

O estabelecimento de LMRs e o cuidado com o tempo de carência na aplicação dos agrotóxicos são de extrema importância para garantir a qualidade dos alimentos que são entregues à mesa do consumidor. Por isso, desenvolver métodos analíticos capazes de determinar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos é fundamental para que se assegure que o mesmo é adequado para a comercialização e o consumo.

Atualmente a preocupação com a alimentação saudável é tema frequente de revistas e jornais. Muitas dessas pesquisas avaliam a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos. No entanto, nos últimos anos, apesar dos cuidados e das boas práticas agrícolas, o uso de agrotóxicos nas lavouras tem se intensificado devido à produção em larga escala e isso tem sido evidenciado nos resultados das análises. A Tabela 6 exemplifica alguns desses casos em países como Portugal, Espanha, Grécia e Itália.

Tabela 6 - Informações sobre os resíduos de agrotóxicos de amostras em azeitonas e azeites de oliva nos últimos anos para Portugal, Espanha, Grécia e Itália.

Agrotóxico	Nº de amostras Analisadas	Nº de amostras Positivas	Resíduos (µg kg ⁻¹)	Local	Referência
Acefato	19	1	2,9	Espanha	Yagüe et al., 2005
Azinfós etil	65	2	90	Italia	Rastrelli et al., 2002
Azinfós metil	70	2	36,7	Grécia	Likudis et al., 2014
Benalaxil	89	1	11	Grecia	Anagnostopoulos & Miliadis, 2013
Carbaril	10	8	3,9		
	15	5	2,9	Espanha	Ballesteros et al., 2006
	15	15	4,5		
Clorpirifós	48	4	42,7	Grecia	Hiskia et al., 1998
	20	7	0,0187	Grecia	Amvrazi And Albinis, 2006
	22	n.i.	1017,4		Sanchez et al., 2006
	10	3	8,8	Espanha	Ballesteros et al., 2006

Agrotóxico	Nº de amostras Analisadas	Nº de amostras Positivas	Resíduos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Local	Referência
	15	1	6,9		
	15	4	10,7		
	70	2	32,9	Grecia	Likudis et al., 2014
	89	6	23-60	Grecia	Anagnostopoulos & Miliadis, 2013
	21	2	11,8	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
	700	9	10 a 80	Espanha	Díaz-Plaza et al., 2007
	11	5	7,4 a 32,7	Espanha	Parrilla Vazquez et al., 2016
	65	4	80	Italia	Rastrelli et al., 2002
	10	5	1,5		
Clorpirifós metil	15	3	1,7	Espanha	Ballesteros et al., 2006
	15	8	3,4		
	11	2	3,4 a 21,2	Espanha	Parrilla Vazquez et al., 2016
Clorprofam	11	2	4,3 a 6,3	Espanha	Parrilla Vazquez et al., 2016
	20	3	19,5	Italia	Rastrelli et al., 2002
	10	8	2,6		
Cialotrina	15	11	1,2	Espanha	Ballesteros et al., 2006
	15	14	1,4		
	21	2	18,1	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
	20	1	48,9	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2006
	10	8	2,6		
Cipermetrina	15	10	2	Espanha	Ballesteros et al., 2006
	15	12	2,3		
	21	1	48,9	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
	11	3	1,5 a 6	Espanha	Parrilla Vazquez et al., 2016
DDE pp	19	4	1,8	Espanha	Yagüe et al., 2005
DDT pp	19	8	5,2	Espanha	Yagüe et al., 2005
	20	3	45,2	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2006
Deltametrina	10	3	1,6	Espanha	Ballesteros et al., 2006
	21	3	45,2	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
	65	3	83	Itália	Rastrelli et al., 2002
	20	2	3,3	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2006
Diazinona	89	1	21	Grecia	Anagnostopoulos & Miliadis, 2013
	21	2	4	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
	700	3	10 a 30	Espanha	Díaz-Plaza et al., 2007
	10	7	1,9		
Diflufenicam	15	12	3,2	Espanha	Ballesteros et al., 2006
	15	13	4,5		
	25	1	6	Espanha	Gómez-Almenar & Garcia-Mesa, 2015
	48	29	65	Grecia	Hiskia et al., 1998
Dimetoato	14	6	10,2	Italia	Rastrelli et al., 2002
	65	29	61		
	53	n.i.	4,9	Grecia	Tsatsakis Et Al, 2003

Agrotóxico	Nº de amostras Analisadas	Nº de amostras Positivas	Resíduos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Local	Referência
	50	n.i.	25,4		
	20	16	6,6	Grécia	Amvrazi e Albinis, 2006
	10	2	1,3		
	15	2	1,3	Espanha	Ballesteros Et Al, 2006
	89	2	11 a 184	Grecia	Anagnostopoulos & Miliadis, 2013
	21	17	3,5	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
	25	2	3,5 a 7	Espanha	Gómez-Almenar & Garcia-Mesa, 2015
	10	9	68,8		Guardia-Rubio et al., 2006
	5	3	22,6		
Diurom	9	4	14		
	10	4	2,3	Espanha	Ballesteros et al., 2006
	15	9	1,4		
	15	15	20,1		
Endossulfan alfa	70	18	14,2	Grecia	Likudis et al., 2014
	21	2	6,7	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
Endossulfan beta	70	16	12,3	Grecia	Likudis et al., 2014
	21	2	7,2	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
Endossulfan sulfato	70	3	29	Grecia	Likudis et al., 2014
	89	1	97	Grecia	Anagnostopoulos & Miliadis, 2013
	21	6	28,1	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
Etiona	89	1	7	Grecia	Anagnostopoulos & Miliadis, 2013
	21	1	2,4	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
	48	21	36,7		Botitsi et al., 2004
	70	3	20,3	Grecia	Likudis et al., 2014
Fentiona	89	1	23	Grecia	Anagnostopoulos & Miliadis, 2013
	21	19	24,2	Grecia	
	21	19	33,7	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
Fenvalerato	20	2	20		
	21	2	<LOQ	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009
Flufenoxurom	70	12	22,5	Grecia	Likudis et al., 2014
Fluopiram	11	1	21	Espanha	Parrilla Vazquez et al., 2016
Formotiona	65	1	82	Italia	Rastrelli et al., 2002
Hexaclorociclo exano	19	5	1,5	Espanha	Yagüe et al., 2005
Hexaclorociclo exano	19	1	2,3	Espanha	Yagüe et al., 2005
Lindano	19	9	3,1	Espanha	Yagüe et al., 2005
Malationa	48	1	19,7	Grecia	Hiskia et al., 1998
	48	2	63	Grecia	Hiskia et al., 1998
	65	3	63	Italia	Rastrelli et al., 2002
Metidationa	20	4	6,6	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2006
	22	n.i.	3064,7	Espanha	Sanchez et al., 2006
	21	4	6,7	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009

Agrotóxico	Nº de amostras Analisadas	Nº de amostras Positivas	Resíduos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Local	Referência	
Ometoato	48	5	23	Grecia	Hiskia et al., 1998	
	89	1	2 a 458	Grecia	Anagnostopoulos & Miliadis, 2013	
	21	1	45,5	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009	
Oxifluorfem	10	5	3,4	Espanha	Ballesteros et al., 2006	
	15	7	2,1			
	15	14	8,8			
Parationa	48	3	69,9	Grecia	Hiskia et al., 1998	
	14	3	7			
	65	2	80	Italia	Rastrelli et al., 2002	
	70	1	44,8	Grecia	Likudis et al., 2014	
Parationa metílico	48	3	33,5	Grecia	Hiskia et al., 1998	
	14	2	5,5			
	65	1	56	Italia	Rastrelli et al., 2002	
	20	4	10	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2006	
	70	1	35,1	Grecia	Likudis et al., 2014	
	21	2	11,1	Grecia	Amvrazi e Albinis, 2009	
Fosmete	10	3	1,5	Espanha	Ballesteros et al., 2006	
	15	1	1			
	11	2	26,7 a 156	Espanha	Parrilla Vazquez et al., 2016	
Pirimifós metílico	15	2	1,2	Espanha	Ballesteros et al., 2006	
	15	1	2,6			
	89	1	8	Grecia	Anagnostopoulos & Miliadis, 2013	
Penconazol	70	20	13,4	Grecia	Likudis et al., 2014	
Quinalfós	70	1	23,6	Grecia	Likudis et al., 2014	
Tebuconazol	11	1	2,2	Espanha	Parrilla Vazquez et al., 2016	
Tetraconazol	89	1	15	Grecia	Anagnostopoulos & Miliadis, 2013	
	11	1	31	Espanha	Parrilla Vazquez et al., 2016	
Terbutilazina	10	9	127,5	Espanha	Guardia-Rubio et al., 2006	
	5	5	83,4			
	9	7	45,5			
	10	5	7,5			
	15	6	4,4			Ballesteros et al., 2006
	15	15	56,5			
	25	3	8 a 15			Gómez-Almenar & Garcia-Mesa, 2015
Terbutrina	10	2	1,7	Espanha	Ballesteros et al., 2006	
Tiacloprido	89	1	38	Grecia	Anagnostopoulos & Miliadis, 2013	
Triclorfom	15	1	5,2	Espanha	Ballesteros et al., 2006	

n.i. – não identificado.

Ao comparar os agrotóxicos permitidos pelo Codex Alimentarius (2018) com os encontrados pelas avaliações dos últimos anos percebe-se que a maioria dos

resíduos de agrotóxicos encontrados nas amostras de azeitona ou azeite de oliva não são permitidos para a cultura. Por isso, faz-se necessário um estudo mais aprofundado de como as oliveiras são cultivadas em cada país e quais os melhores agrotóxicos para protegê-las de pragas e assegurar sua qualidade para o mercado.

No Brasil há somente dois produtos comerciais de agrotóxicos registrados para uso em oliveiras, são eles o Delegate[®] e Ortus 50 SC[®], que possuem como ingredientes ativos um inseticida (espinoteram) e o outro acaricida (fempiroximato), respectivamente. No entanto, essas mudanças de legislação são recentes, pois até junho de 2016, não havia inseticida registrado no Brasil para uso na oliveira (VARGAS CASTILHOS, 2017). Com a inclusão do Delegate[®], que passou a cobrir culturas com aporte fitossanitário insuficiente, dentre as quais a oliveira, atualmente é possível combater/controlar a traça *Palpita spp* com alguma segurança. No entanto, existem outras espécies de pragas que assolam as oliveiras, e para isso são aplicados agrotóxicos não permitidos para a cultura.

No Rio Grande do Sul, segundo o programa PRÓ-OLIVA (2018) o único agrotóxico indicado é o Delegate[®]. No entanto, nas recomendações técnicas emitidas em julho de 2017 para o controle de *antracnose spp* pelo grupo técnico da olivicultura no Estado é sugerida a pulverização com fungicidas para proteção de tecidos novos e ainda aplicação preventiva (contato e sistêmica).

2.4 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS E OUTROS CONTAMINANTES EM ÓLEOS COMESTÍVEIS

Por apresentarem em sua composição praticamente 100% de gordura, os azeites de oliva apresentam elevada dificuldade de remoção de interferentes sem perdas dos analitos. Portanto, etapas adicionais costumam ser empregadas para melhorar a qualidade do extrato final a ser injetado no cromatógrafo.

Patel e colaboradores (2005) fizeram uso de cromatografia por permeação em gel (GPC) para determinar 19 agrotóxicos organoclorados em azeites e gorduras (gordura de porco, óleo de peixe, gordura hidrogenada vegetal e azeite de oliva) com detecção por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). GPC tem sido comumente empregada para a remoção de lipídios antes da

análise cromatográfica. Os limites de detecção (LOD) foram da ordem de 0,1 a 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Utilizando GC-MS Ballesteros, García Sánchez Ramos Martos (2006) desenvolveram um método multirresíduo para determinação de 26 agrotóxicos em azeite de oliva. Na etapa de extração utilizou-se uma mistura de hexano/acetoneitrila e para a limpeza do extrato GPC foi empregada. Alguns compostos foram determinados nas amostras de azeite de oliva comum, porém nos azeites refinados apenas endossulfam sulfato foi detectado.

GILBERT-LÓPEZ et al. (2010) compararam dois tratamentos de amostra para a determinação de uma gama de agrotóxicos por cromatografia líquida em azeite de oliva. Primeiramente testaram uma extração líquido-líquido com acetoneitrila, seguida pela etapa de limpeza com carbono grafitizado (GCB), PSA e C18. O segundo tratamento consistiu em realizar a extração líquido-líquido de acetoneitrila saturada com éter de petróleo. A etapa de limpeza foi executada aplicando-se dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), com sorvente aminopropil. Para limpeza final a amostra ainda passou por um cartucho de Florisil[®]. Ambos os tratamentos se mostraram adequados para a determinação de mais de 100 agrotóxicos em azeite de oliva, com LOD inferiores a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Liu e colaboradores (2013) também utilizaram da extração líquido-líquido seguida de uma microextração de fase reversa líquido-líquido dispersiva para determinar bisfenol A em azeites de oliva. Utilizando-se apenas 1 g de amostra extraída com 4 mL de n-hexano. A detecção se deu por cromatografia líquida acoplada a um detector por arranjo de diodos.

Numa tentativa de abranger diversas classes de compostos orgânicos, Martini et al. (2015) propuseram um método para determinar organofosforados, herbicidas e triazinas em azeite de oliva e resíduos oriundos do processo de fabricação desse. O uso de imunossensores como fase orgânica possibilitou extrair esses compostos da matriz hidrofóbica. A determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foi efetuada por GC-MS.

Purcaro e colaboradores (2013) estabeleceram uma etapa de purificação usando microextração em fase sólida por imersão direta em azeite de oliva. Assim, conseguiram minimizar o uso de solventes e reduzir a manipulação das amostras.

Moreno-Gonzales e colaboradores (2014) utilizaram zircônia na etapa de limpeza com o método QuEChERS para a extração de carbamatos em azeites de

oliva com determinação por UHPLC-MS/MS. Reafirmando o potencial em diminuir o efeito matriz quando se utiliza esse sorvente. Os LOQs ficaram na faixa de 0,09 a 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ atendendo aos limites estabelecidos pela legislação europeia.

Polímeros molecularmente impressos foram testados para determinar deltametrina em azeite de oliva através da extração em fase sólida (SPE). Esse método apresentou boas recuperações e alta seletividade (Martins *et al.*, 2015).

Visando desenvolver um método para a determinação de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em óleos comestíveis Wang e Guo (2010) propuseram a utilização de GC-MS. Para a extração, 4 g da amostra eram extraídas com 10 mL de acetonitrila. O sobrenadante foi retirado e a amostra extraída mais duas vezes. Todos os extratos coletados foram evaporados e redissolvidos em 4 mL de uma mistura de acetato de etila:ciclohexano (1:1, v/v) para a limpeza do extrato por GPC.

Tuzimski e Rejczak (2016) propuseram um método de extração de óleos comestíveis baseado na partição líquido-líquido com acetonitrila seguida de d-SPE com zircônia (z-SEP). Eles conseguiram bons resultados para 21 agrotóxicos de diferentes classes determinados por HPLC-FD. Eles também perceberam que esse sorvente consegue reduzir o efeito matriz para amostras com alto teor de gordura.

Piretroides em óleo vegetal também foram determinados por cromatografia a gás com detecção por chama (FID). Realizou-se uma microextração líquido-líquido dispersiva após a extração líquido-líquido convencional com 0,5 mL de óleo e 4,5 mL de uma mistura de dimetilformamida (DMF) e hexano. O DMF foi removido na etapa subsequente. Os LOD variaram entre 0,02 e 0,16 mg kg^{-1} (FARAJZADEH, KHOSH MARAM e NABIL, 2014).

Como inovação na extração do herbicida triazina em óleo vegetal WANG *et al* (2014) propuseram uma microextração líquido-líquido dispersiva com íons magnéticos em solução. A técnica somada à separação por cromatografia líquida levou a limites de detecção da ordem de 1,31 a 1,49 ng mL^{-1} .

A técnica de MSPD também foi utilizada por Li e colaboradores (2014) para determinar 14 agrotóxicos organoclorados e 7 bifenilas policloradas (PCBs) em óleos vegetais comestíveis. Nesse caso somente 0,5 g de óleo foram misturados à sílica impregnada de ácido sulfúrico. A eluição dos compostos foi feita com 10 mL de n-hexano/diclorometano (70:30, v/v) e determinada por cromatografia a gás com detector por captura de elétrons (GC-ECD). Os LODs ficaram na faixa de 0,04 a 0,7 ng g^{-1} .

Um método multirresíduo baseado na precipitação à baixa temperatura seguido de MSPD com sonicação foi desenvolvido para a determinação multirresíduos de agrotóxicos utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com detecção por tempo-de-voou (LC-TOF-MS) em óleo de palma. A extração líquido-líquido foi seguida de uma etapa de congelamento. O extrato pós-congelamento passou pela etapa de MSPD com PSA e GCB. O extrato final foi evaporado até *secura* e redissolvido em 500 µL de uma mistura de ACN:H₂O (1:1, v/v) para posterior análise cromatográfica. Os limites de quantificação (LOQ) variaram entre 2,5 e 9 µg kg⁻¹ (SOBHANZADEH *et al.*, 2011).

Nguyen, Lee e Lee (2010) desenvolveram um método para a determinação de 95 agrotóxicos em óleo de soja utilizando extração líquido-líquido (LLE), seguida de uma etapa de centrifugação, congelamento e extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). As amostras foram analisadas por GC-MS. Nesse trabalho foram avaliados diferentes solventes extratores para remoção dos coextrativos da matriz. Sendo que a proporção ideal encontrada foi de 5 g de óleo de soja dissolvidos em 5 mL de n-hexano extraído duas vezes com 5 mL de acetonitrila (ACN) cada vez.

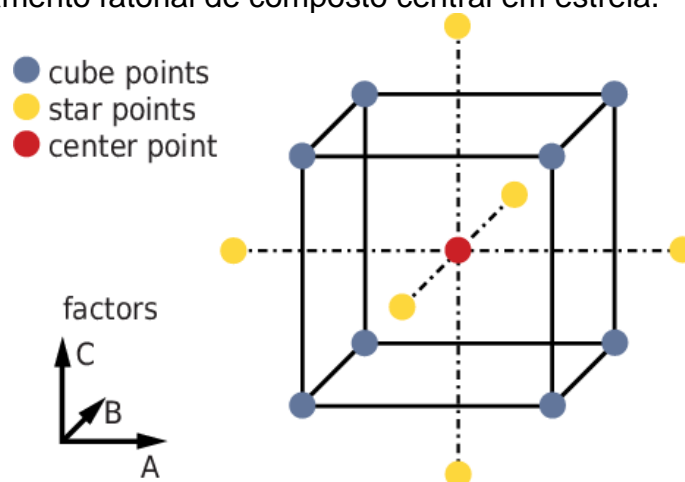
2.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Rotineiramente, nas práticas de laboratório se avaliam as variáveis experimentais (pH, temperatura, viscosidade etc.) individualmente (procedimento univariado). Isso costuma ser uma desvantagem, pois implica em empregar um tempo maior na verificação dos melhores resultados, bem como não se tem uma visão global das interações entre as variáveis que podem afetar todo o processo (CUNICO *et al.*, 2008). Como alternativa ao processo dispendioso de analisar variável por variável, surgiu o planejamento experimental. Esse procedimento consiste em realizar experimentos com a combinação de níveis para mais de uma variável. Dessa maneira é possível avaliar se e quais as variáveis tem influência significativa sobre o processo (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

Planejamentos fatoriais são comumente denotados com a notação exponencial 2^k, que expressa que k fatores com dois níveis cada um são cruzados, resultando em 2^k condições experimentais. Ou seja, em um planejamento 2³, tem-se 2x2x2 = 8 condições experimentais diferentes (COLLINS, DZIAK, e LI, 2009).

Para melhorar os resultados obtidos uma variação utilizada é o “Box-Wilson Central Composite Design” conhecido como planejamento de composto central, ou CCD. Esse contém um planejamento fatorial comum e nele são embutidos pontos centrais que são aumentados com um grupo de “pontos estrela” que permitem a estimativa da curvatura que fornece a chamada superfície de resposta. Se a distância do centro do espaço de design a um ponto fatorial for ± 1 unidade para cada fator, a distância do centro do espaço de design até um ponto em estrela será $|\alpha| > 1$. O valor preciso de α depende de certas propriedades desejadas para o projeto e do número de fatores envolvidos (NIST, 2018). Ainda, as repetições no ponto central fornecem uma medida do erro puro e estabilizam a variância da resposta prevista (NETO *et al.*, 2010). Os valores de α podem ser calculados ou obtidos automaticamente através do uso de softwares como Statística[®] (STATSOFT, 2018). A Figura 5 exemplifica um esquema de CCD com três fatores.

Figura 5 - Planejamento fatorial de composto central em estrela.



Fonte: Hetzner *et al.*, 2014.

2.6 VALIDAÇÃO

A validação de um método é o processo que envolve uma série de experimentos planejados que irão caracterizar o método desenvolvido, fornecendo evidências da adequação da análise garantindo resultados confiáveis (ZANELLA *et al.*, 2015). Existe uma série de normas nacionais e internacionais que auxiliam e regulamentam a validação dos métodos analíticos.

No Brasil a Anvisa estabelece critérios para a validação de métodos analíticos através da Resolução 166 (ANVISA, 2017). Anteriormente, era usado o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (ANVISA, 2003). Já o Inmetro apresenta documentos orientativos (DOC-CGCRE-008, 2016) para auxiliar os laboratórios a mostrarem que os métodos desenvolvidos apresentam as características necessárias para atingir aos quesitos da qualidade. Ainda, a fim de padronizar as unidades de medidas outro guia comumente utilizado é o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) que busca a harmonização internacional das terminologias e definições nos campos da metrologia e da instrumentação (VIM, 2012).

A União Europeia (UE) utiliza um documento guia sobre procedimentos analíticos de validação de métodos e validação de métodos para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos e rações. Esse guia foi atualizado em 2017 e descreve como proceder com a validação de métodos e realizar o controle analítico de qualidade para agrotóxicos. O documento também serve de apoio para a implementação do sistema ISO/IEC 17025 (SANTE, 2017).

Os parâmetros de validação avaliados no desenvolvimento do método analítico proposto estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros de validação utilizados para o método analítico proposto para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em azeites de oliva e azeitonas por UHPLC-MS/MS.

Parâmetro	Definição	Aplicação
Seletividade e Especificidade	Medir exatamente um composto em presença de outros tais como componentes da matriz, impurezas e produtos de degradação.	Comparação da matriz isenta dos analitos (matriz branco) com a matriz adicionada dos analitos de interesse.
Linearidade e curva analítica	Correlação entre resposta analítica e concentração	Método dos mínimos quadrados – caso linear
Limite de quantificação (LOQ)	Menor nível em que o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitável em um método validado.	S/N>10 Ensaio de fortificação no nível pretendido
Limite de detecção (LOD)	A menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não quantificada	Para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LOD 3,33 vezes menor que o valor de LOQ.
Exatidão	Grau de concordância entre os	Ensaio de fortificação

Parâmetro	Definição	Aplicação
	resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro.	
Precisão	Dispersão dos resultados entre ensaios diferentes, repetidos de uma mesma amostra.	Repetitividade e Reprodutibilidade
Efeito matriz	Alterações na resposta analítica em função dos componentes da matriz	Comparação entre curvas preparadas em solvente e em extrato branco
Robustez	Capacidade do método de fornecer resultados similares apesar de pequenas variações.	Alteração de lotes de solventes e reagentes, mudança de analistas executando o preparo de amostra.

Fonte: ANVISA (2003), ANVISA (2017); DOQ-CGCRE-008 (2016); SANTE (2017); ZANELLA *et al.* (2015)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para os ensaios deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Agitador Overhead Shaker Reax® (Heidolph Instruments, Alemanha);
- Agitador Multitube Vortex (Fisher Scientific, EUA)
- Balança analítica de precisão AUW-220D e UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Centrífuga 80-2B (Centribio, Brasil);
- Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Evaporador Turbovap® LV (Biotage, Alemanha);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3® (Millipore, EUA);
- Sistema GC-MS/MS Agilent Intuvo 9000 GC equipado com autosampler 7693 B e Triplo Quadrupolo 7010 B Series;
- Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Waters, EUA), equipado com bomba binária Acquity, detector MS do tipo triplo quadrupolo; interface/fonte de ionização por eletronebulização (ESI); sistema gerador de nitrogênio, modelo NM30L-MS (PEAK Scientific, Escócia); sistema de aquisição de dados MassLynx V 4.1 (EUA) e coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm x 1,7 µm) Waters (EUA);

3.1.1 Materiais e reagentes

Os seguintes solventes, reagentes e gases foram utilizados: acetona grau HPLC (J. T. Baker, EUA); acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, EUA); ácido

acético glacial, grau HPLC (J.T. Baker, EUA); éter de petróleo (Dinâmica, Brasil); éter etílico (Vetec, Brasil). Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R (resistividade de 18,2 MΩ cm); hexano (95% n-hexano) (J.T. Baker, EUA); metanol, grau HPLC (J. T. Baker, EUA); cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, Alemanha); formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA); alumina básica, ácida e neutra com d.p. 100 μm (Sigma-Aldrich, EUA); sorvente Bondesil C18 com d.p. de 40 μm (Agilent, EUA); sorvente Bondesil PSA com d.p. de 40 μm (Agilent, EUA); sorvente EMR Lipid (Bond Elut Polish Tube-NaCl/MgSO₄) (Agilent, EUA); sílica (Merck, Alemanha); amina (Varian, EUA); cloreto de sódio (J.T. Baker, EUA); adsorvente Supel QuE Z-Sep+ (Sigma Aldrich, EUA); sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão); gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS.

Também foram utilizados: Extran[®] neutro (Merck, Brasil); filtros de nylon de 13 mm e porosidade de 0,2 μm (Analítica, Brasil); frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Agilent, EUA); padrões sólidos dos agrotóxicos em estudo (Dr. Ehrenstorfer, Darmstadt; Alemanha); placas de sílica gel (Merck, Alemanha); tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha); tubos eppendorf, capacidade de 2 mL (Eppendorf, Brasil); vidraria comum de laboratório.

3.2 COMPOSTOS SELECIONADOS

No Brasil apenas dois agrotóxicos são registrados para a olivicultura: espinoteram e fempiroximato, um inseticida e um acaricida, respectivamente. O Codex Alimentarius estabelece LMR para azeitonas destinadas a produção de azeite, azeitonas de mesa, azeites de oliva virgem e refinado conforme indicado na Tabela 5. Então, a partir dessa lista de compostos e baseado nos padrões de agrotóxicos disponíveis no LARP-UFSM, preparou-se a mistura de agrotóxicos apresentada na Tabela 8. A tabela informa a pureza, grupo químico, classe, fórmula molecular, massa molecular, pKa, ponto de ebulição e solubilidade em água dos compostos em estudo.

Tabela 8 - Analitos, pureza, grupo químico, classe, fórmula molecular, massa molecular, pKa, ponto de ebulição e solubilidade em água.

Analitos	Pureza (%)	Grupo Químico	Classe	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	pKa	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)
2,4-D	99,5	alquilclorofenoxi	Herbicida	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221,0	3,40	273,0	24300
Acefato	99,0	organofosforado	Inseticida	C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS	183,2	8,35	d.a.e	790000
Acetamiprido	99,0	neonicotinoide	Inseticida	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	222,7	0,7	d.a.e	2950
Aldicarbe	99,0	carbamato	Inseticida	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	190,3	n.d.	d.a.e	4930
Atrazina	99,5	triazina	Herbicida	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,7	1,7	d.a.e	35
Azinfós etílico	99,0	organofosforado	Inseticida	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	345,4	n.d.	111	4,5
Azinfós metílico	99,0	organofosforado	Inseticida	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	317,3	5	d.a.e	28
Azoxistrobina	99,0	estrobilurina	Fungicida	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,4	n.d.	360	6,7
Bentazona	98,0	benzotiazinona	Herbicida	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	240,3	3,51	d.a.e	7112
Bifentrina	99,5	piretroide	Inseticida	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	422,9	n.d.	d.a.e	0,001
Bitertanol	98,5	triazol	Fungicida	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂	337,4	n.d.	d.a.e	3,8
Boscalida	99,5	carboxamida	Fungicida	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343,2	n.d.	d.a.e	4,6
Buprofezina	99,0	não classificado	Inseticida	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	305,4	n.d.	252	0,46
Carbaril	98,5	carbamato	Inseticida	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201,2	10,4	210	9,1
Carbendazim	99,0	benzimidazol	Fungicida	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191,2	4,2	d.a.e	8,0
Carbofuran-3-OH	97,0	carbamato	Inseticida	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221,3	n.d.	254	322
Carbosulfano	98,0	carbamato	Inseticida	C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₃ S	380,5	n.d.	219,3	0,11
Carboxina	99,0	oxatina	Fungicida	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S	235,3	n.d.	d.a.e	134
Cialotrina-lambda	98,5	piretroide	Inseticida	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃	449,9	n.d.	d.a.e	0,005
Ciflutrina	98,0	piretroide	Inseticida	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃	434,3	n.d.	d.a.e	0,0012
Cipermetrina	92,0	piretroide	Inseticida	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	416,3	n.d.	d.a.e	0,009
Ciproconazol	99,0	triazol	Fungicida	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	291,8	n.d.	d.a.e	93
Clomazona	95,5	isoxazolidinona	Herbicida	C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂	239,7	n.d.	281,7	1102
Clorpirifos	98,5	organofosforado	Inseticida	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350,6	n.d.	d.a.e	1,05
Clorpirifós metílico	97,0	organofosforado	Inseticida	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	322,5	n.d.	d.a.e	2,74
Clorpirifós oxom	98,0	organofosforado	Inseticida	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₄ P	334,5	n.d.	d.a.e	-
Deltametrina	99,0	piretroide	Inseticida	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	505,2	n.d.	d.a.e	0,0002
Diclorvós	97,0	organofosforado	Inseticida	C ₄ H ₇ C ₁₂ O ₄ P	221	n.d.	d.a.e	18000
Difenoconazol	99,0	triazol	Fungicida	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	406,3	1,07	101	15,0
Diflubenzuron	99,4	benzotiazureia	Inseticida	C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂	310,7	n.d.	257	0,08
Dimetoato	98,5	organofosforado	Inseticida	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	229,3	n.d.	d.a.e	25900
Disulfoton	93,5	organofosforado	Inseticida	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₃	274,4	n.d.	d.a.e	25
Diuron	97,5	fenilamida	Herbicida	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233,1	n.d.	d.a.e	35,6
Epoxiconazol	99,0	triazol	Fungicida	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	329,8	n.d.	d.a.e	7,1
Espinetoram	97,9	espinosina	Inseticida	C ₄₂ H ₆₉ NO ₁₀	754,0	7,7	d.a.e	29,0

Analitos	Pureza (%)	Grupo Químico	Classe	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	pKa	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)
Espinosade	91,0	derivado de micro-organismo	Inseticida	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀ (A) + C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₀ (D)	732 + 746	8,0	225	7,6
Etefon	98,5	gerador de etileno	Regulador de crescimento	C ₂ H ₆ ClO ₃ P	144,5	2,82	d.a.e	Insolúvel
Etiona	96,5	organofosforado	Inseticida	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	384,5	n.d.	165	2
Etofenprox	98,0	piretroide	Inseticida	C ₂₅ H ₂₈ O ₃	376,5	n.d.	d.a.e	0,0225
Famoxadone	99,0	oxazol	Fungicida	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₄	374,4	n.d.	d.a.e	0,059
Fenoxicarbe	99,5	carbamato	Inseticida	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301,3	n.d.	100,4	7,9
Fenpiroximato	99,4	pirazolium	Inseticida	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄	421,5	n.d.	d.a.e	0,023
Fenpropimorfe	97,0	morfolino	Fungicida	C ₂₀ H ₃₃ NO	303,5	6,98	d.a.e	4,32
Fentiona	97,0	organofosforado	Inseticida	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278,3	n.d.	90	4,2
Fenvalerato	98,0	piretroide	Inseticida	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	419,9	n.d.	d.a.e	0,001
Fipronil	97,5	fenilpirazol	Inseticida	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	437,2	n.d.	d.a.e	3,78
Flumioxazin	98,5	n-fenilftalamida	Herbicida	C ₁₉ H ₁₅ FN ₂ O ₄	354,3	n.d.	d.a.e	0,786
Fluquinconazol	98,5	triazol	Fungicida	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	376,2	0,9	d.a.e	1,15
Flutriafol	99,5	triazol	Fungicida	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O	301,3	2,3	d.a.e	95,0
Fosmete	98,5	organotiofosfato	Inseticida	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	317,3	n.d.	208	15,2
Imazalil	97,5	imidazol	Fungicida	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	297,2	n.d.	260	184
Imidacloprid	98,5	neonicotinoide	Inseticida	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255,7	n.d.	230	610
Cresoxim-metílico	98,5	estrobilurinas	Fungicida	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313,4	n.d.	310	2,0
Lufenuron	98,7	benzoilureia	Inseticida	C ₁₇ H ₈ Cl ₂ F ₈ N ₂ O ₃	511,2	10,2	242	0,046
Malathion	99,0	organofosforado	Inseticida	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,4	n.d.	174	148
Metamidofós	99,0	inseticida	Inseticida	C ₂ H ₈ NO ₂ PS	141,1	n.d.	160	200000
Metidationa	99,0	organofosforado	Inseticida	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	302,3	n.d.	d.a.e	240
Metiocarbe	99,5	carbamato	Inseticida	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	225,3	n.d.	311	27
Metomil	99,5	carbamato	Inseticida	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	162,2	n.d.	192	55000
Metiocarbe sulfona	99,0	Carbamato	Inseticida	C ₁₁ H ₁₅ NO ₄ S	257,3	n.d.	d.a.e	-
Metiocarbe sulfóxido	95,0	carbamato	Inseticida	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃ S	241,3	n.d.	d.a.e	-
Metsulfuron metílico	99,0	sulfonilureia	Herbicida	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S	381,3	3,75	164	2790
Pendimetalin	98,8	dinitroanilina	Herbicida	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	281,3	2,8	246	0,33
Forato	94,5	organofosforado	Inseticida	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃	260,4	n.d.	d.a.e	50
Picoxistrobina	98,5	estrobilurinas	Fungicida	C ₁₈ H ₁₆ F ₃ NO ₄	367,3	n.d.	342	31
Pirimicarbe	99,0	carbamatos	Inseticida	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238,4	4,4	d.a.e	3100
Pirimifós-metílico	99,0	organofosforado	Inseticida	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305,3	4,3	120	11

Analitos	Pureza (%)	Grupo Químico	Classe	Fórmula molecular	Massa molecular (g/mol)	pKa	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)
Piriproxifem			Herbicida	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	192,2	n.d.	d.a.e	500
Procloraz	98,0	dicarboximida	Fungicida	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	284,1	n.d.	478	2,46
Profenofos	97,0	imidazol	Fungicida	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	376,7	3,8	220	26,5
Propargito	98,0	organofosforado	Inseticida	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	373,6	n.d.	124	28
Propiconazol	91,5	ester sulfito	Acaricida	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	350,5	n.d.	210	0,215
Propizamida	97,5	triazol	Fungicida	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	342,2	1,09	355	150
Piraclostrobina	99,0	benzamida	Herbicida	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO	256,1	10,38	283	9,0
Pirazofós	97,5	estrobilurinas	Fungicida	C ₁₄ H ₂₀ ClN ₃ O ₄	387,8	n.d.	200	1,9
Simazina	97,0	fosforotiolato	Fungicida	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	373,4	4,2	160	1,35
Tebuconazol	98,0	triazinas	Herbicida	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201,7	1,62	227	5
Terbutilazina	98,0	triazol	Fungicida	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	307,4	5,0	350	36
Tetraconazol	99,0	triazinas	Herbicida	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229,7	1,9	224	6,6
Tiabendazol	97,5	triazol	Fungicida	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	372,2	0,65	235	156,6
Tiacloprido	99,0	benzimidazol	Fungicida	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	201,3	n.d.	d.a.e	30
Tiametoxam	98,0	neonicotinoides	Inseticida	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	252,7	n.d.	270	184
Tiodicarbe	99,7	neonicotinoides	Inseticida	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	297,7	n.d.	147,9	-
Tiofanato metílico	99,5	carbamatos	Inseticida	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ S ₃	354,5	n.d.	184,7	22,2
Triadimefon	99,0	benzimidazol	Fungicida	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	342,4	7,28	165	18,2
Triadimenol	99,0	triazol	Fungicida	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	293,8	n.d.	82	72
Trifloxistrobina	98,0	triazol	Fungicida	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	295,8	n.d.	270	72
	99,0	estrobilurinas	Fungicida	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	408,4	n.d.	285	Insolúvel

n.d. – não dissociável

d.a.e – decompõe antes do ponto de ebulição.

Fonte: IUPAC database pesticides (2018).

3.3 PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Os padrões analíticos desse estudo foram preparados a partir de padrões sólidos de alta pureza (91 – 99,5%). Inicialmente preparou-se uma solução estoque na concentração aproximada de 1000 mg L⁻¹ em acetonitrila para cada analito avaliado. A partir dessas soluções individuais, fez-se uma mistura contendo todos os compostos selecionados na concentração de 10 mg L⁻¹ para o desenvolvimento do método analítico. A solução foi armazenada em frasco âmbar a temperatura menor que -5 °C. Essa solução foi utilizada para o preparo de uma solução de 1 mg L⁻¹ dos analitos e a partir dessa foram realizados os ensaios de fortificação e o preparo das curvas de calibração nas concentrações 0,5; 1;2;5; 10, 20, 30, 40e 50 µg L⁻¹, tanto no extrato da matriz quanto no solvente.

3.3.1 Análise de solventes e reagentes

A fim de verificar a presença de contaminantes nos solventes e reagentes fez-se uma avaliação dos mesmos a partir do processo de extração utilizado para validação do método, porém sem a presença da amostra azeite de oliva ou azeitonas. Em substituição a amostra fez-se a utilização de água ultrapura nas mesmas proporções. Esse procedimento foi chamado de extração branco de solventes e reagentes.

3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de azeitona *in natura* chegaram ao laboratório inteiras e em temperatura ambiente. Elas foram pesadas e a polpa foi separada do caroço e homogeneizada com um processador de alimentos do tipo Varimix®. Após o processamento as amostras de azeitona foram congeladas em freezer até a realização da análise.

As amostras de azeite não foram processadas. Foi retirada uma alíquota de 10 mL de cada frasco e armazenada em frascos âmbar a temperatura ambiente até a análise.

3.4.1 Escolha das amostras branco

Para serem utilizadas como amostras branco foram escolhidas as azeitonas verdes que foram colhidas com produtores da região em áreas isoladas de plantações na cidade de Cachoeira do Sul, RS. Nessas foi garantido que não houve a aplicação de nenhum dos agrotóxicos em estudo. Delas foi removido somente o caroço e fez-se a homogeneização com o auxílio de um multiprocessador de alimentos. A partir do homogeneizado preparou-se os extratos brancos na matriz. Para o azeite de oliva houve a necessidade de testar várias marcas a fim de encontrar a que melhor se adequasse como branco para o desenvolvimento o método, ou seja, sem a presença dos agrotóxicos pesquisados.

3.4.2 Coleta de amostras reais e aplicação do método desenvolvido

Amostras de azeitona também foram coletadas em propriedades que produzem o fruto para a elaboração de azeites de oliva. Ainda, as amostras de azeitona em conserva foram adquiridas em mercados da cidade de Santa Maria. A fim de remover a salmoura das mesmas, essas foram lavadas por três vezes com água corrente. Algumas marcas chegaram ao laboratório sem caroço, sendo diretamente processadas no processador de alimentos após a lavagem. Outras, no entanto, tiveram que ser separadas do caroço antes do processamento. O Codex alimentarius não cita a necessidade de lavagem dos frutos, porém essa foi realizada a fim de remover resíduos da salmoura na amostra.

As amostras de azeite de oliva foram adquiridas de mercados da cidade de Santa Maria, RS, sendo as marcas avaliadas nacionais e de países como Itália, Argentina, Chile, Portugal e Espanha.

3.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A fim de melhorar a intensidade do sinal analítico no sistema UHPLC-MS/MS foi realizado um planejamento fatorial 2^3 variando-se a vazão da fase móvel, a temperatura da coluna cromatográfica e a proporção de formiato de amônio adicionada à fase móvel como é apresentado na Tabela 9. Analisou-se a resposta como sendo a área de cada analito avaliado. Para esse estudo considerou-se a faixa de operação da coluna cromatográfica ACQUITY UPLC® BEH tanto em relação ao pH, como temperatura e vazão.

Tabela 9 - Condições cromatográficas avaliadas pelo planejamento fatorial 2^3 .

Ensaio	Vazão (mL/min)	Formiato de amônio (mmol L ⁻¹)	T (°C)
1	0,125	3,0	20
2	0,125	3,0	60
3	0,125	7,0	20
4	0,125	7,0	60
5	0,325	3,0	20
6	0,325	3,0	60
7	0,325	7,0	20
8	0,325	7,0	60
9	0,100	5,0	40
10	0,390	5,0	40
11	0,225	1,6	40
12	0,225	8,3	40
13	0,225	5,0	20
14	0,225	5,0	70
15	0,225	5,0	40
16	0,225	5,0	40

Fonte: Software Statistica 8.0.

Pelos resultados obtidos em relação a intensidade do sinal analítico para o planejamento da Tabela 9 foi gerada uma equação que melhor descrevia o comportamento de cada analito estudado em relação à área/sinal analítico do mesmo (APÊNDICE B). A partir desse foram geradas superfícies de resposta e

diagramas de pareto que exemplificam as melhores condições do sistema. Assim, foram escolhidas as melhores condições para operação do cromatógrafo bem como da fase móvel utilizada.

3.5.1 Ajuste das condições de detecção por UHPLC-MS/MS

Os métodos de rotina (KEMMERICH *et al.*, 2017) foram otimizados com o uso da biblioteca Quanpedia do UHPLC-MS/MS, na qual estão disponíveis diversos tipos de analitos, íons precursores, íons produtos e energias aplicadas no cone e energias de colisão.

Para verificação da intensidade do sinal e tempos de retenção dos compostos foi avaliada uma solução contendo a mistura dos agrotóxicos, na concentração $20 \mu\text{g L}^{-1}$, preparada em ACN. O composto atrazina deuterada foi utilizado como padrão de controle (PC) em todas as análises cromatográficas a fim de verificar eventuais flutuações no sinal analítico.

A fase móvel (FM) foi previamente otimizada através do planejamento experimental descrito no item anterior. Além do aditivo formiato de amônio foi utilizado ácido fórmico, pois alguns compostos da biblioteca “Quanpedia” foram previamente infundidos com a adição desses dois reagentes com a finalidade de formar adutos.

Foram avaliadas as transições escolhidas para a etapa de quantificação e identificação dos compostos em estudo. A transição de maior intensidade foi escolhida para quantificação do analito e a de segunda maior intensidade foi utilizada para identificação do mesmo.

A curva analítica foi preparada a partir da solução contendo a mistura dos agrotóxicos no extrato da matriz e no solvente (acetonitrila) nas concentrações 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 e $250 \mu\text{g L}^{-1}$. Essas curvas foram diluídas cinco vezes em água ultra-pura para análise cromatográfica a fim de melhorar a separação cromatográfica.

3.6 TESTES PRELIMINARES

Testes iniciais foram realizados com óleos vegetais comestíveis (soja, milho, arroz, canola e girassol), tanto por esses serem mais baratos e mais consumidos, quanto para fins de comparação. Esses testes serviram como referência para nortear os estudos com azeite de oliva, visto que também apresentam em sua composição praticamente 100% de gordura. Os diferentes óleos foram congelados durante 12 h a fim de observar a formação de precipitado ou separação de fases. Após o teste de congelamento foi avaliada a extração com os solventes acetonitrila, hexano e acetonitrila saturada de hexano.

Seguinte à extração com os três tipos de solventes foram coletados 5 mL do sobrenadante em tubos de vidro de 15 mL para realização de teste gravimétrico (OSHITA e JARDIM, 2014). O restante dos extratos foi colocado sob-refrigeração por pelo menos duas horas e desse foi retirado o sobrenadante antes do óleo descongelar. O solvente de todos os tubos foi evaporado até a secura, resultando apenas o residual de gordura nos frascos.

Outro teste que foi realizado na etapa de extração foi a adição de água às amostras de óleos vegetais. Segundo Hernando e colaboradores (2007), a adição de água à etapa de extração facilita a remoção de compostos polares da matriz. Além disso, ela é indicada para amostras com teor de água inferior a 80% (STOCKA *et al.*, 2011). Assim, foram testados diferentes volumes de adição de água (1, 3 e 7 mL), correspondente a 25, 50 e 70% de água na amostra. Ainda, foi testada adição de cloreto de sódio (0,5, 1, 1,5 e 2 g) na etapa de extração, pois se um analito possui um coeficiente de distribuição baixo entre um solvente orgânico e a água, a extração sem adição de sais torna-se dificultada.

3.7 ESTUDO DE DIFERENTES TÉCNICAS PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE COEXTRATIVOS NO EXTRATO DA AMOSTRA

Pensando em testes alternativos para verificar a presença de coextrativos, principalmente gordura (aproximadamente 100% da matriz azeite de oliva) nos extratos obtidos pelos métodos testados avaliou-se algumas alternativas que se mostraram úteis durante a pesquisa.

3.7.1 Placas de sílicautilizando a Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A caracterização de ácidos graxos empregando CCD é uma técnica comumente empregada na indústria alimentícia (FROEHNER, LEITHOLD e JÚNIOR, 2007). Nessa parte da pesquisa optou-se pela realização de testes com cromatografia em camada delgada (CCD) anteriormente à análise das amostras no sistema UHPLC-MS/MS. Essa ação teve por objetivo evitar possíveis danos ao equipamento ocasionados pelos coextrativos provenientes da matriz.

Utilizou-se uma placa de sílica gel (Merck TLC). Preparou-se a solução eluente com éter de petróleo:éter etílico:ácido acético na proporção de 80:20:2 (v/v/v). Para a revelação foi usado iodo sublimado (FROEHNERI, LEITHOLDI; JÚNIOR, 2007). A verificação da presença de ácidos graxos foi realizada diluindo-se 3:10 (m/v) as amostras de azeite de oliva em acetonitrila (controle) e comparando com o extrato da matriz sem limpeza e com limpeza por dois diferentes sorventes.

3.7.2 Testes gravimétricos

Os testes gravimétricos são uma ferramenta muito útil na quantificação de coextrativos provenientes da matriz estudada. No entanto, são testes dispendiosos e muitas vezes geram resultados sem diferença significativa entre

os ensaios por se tratarem de massas remanescentes muito pequenas. A quantificação da remoção dos coextrativos na etapa de limpeza é realizada comparando-se os ensaios antes e depois da etapa limpeza (SAPOZHNIKOVA e LEHOTAY, 2013).

Nesse estudo foram pesados tubos de vidro antes da adição dos extratos e adicionou-se 5 mL dos extratos de interesse em triplicata. Os tubos de vidro foram colocados no evaporador Turbovap LV[®] com temperatura controlada (levando-se em consideração o solvente utilizado na extração) e iniciou-se a secagem do solvente com fluxo suave de nitrogênio. O tempo pode variar dependendo da matriz e do volume de extrato utilizado.

3.7.3 Avaliação no modo SRM por UHPLC-MS/MS

Para a verificação da presença de coextrativos no extrato da matriz, costuma-se realizar análises no modo varredura em cromatógrafos a gás acoplados à espectrometria de massas. Porém, alguns laboratórios não possuem esse equipamento. Assim, uma alternativa por LC-MS/MS é possível. Stevens e Zhao (2017) propuseram avaliar a remoção de lipídios nos extratos da matriz monitorando 11 transições comuns de lipídios no modo monitoramento de reações selecionadas (SRM). Os íons precursores monitorados foram 808, 806, 786, 784, 760, 758, 704, 524, 522 e 520 m/z, sendo que para todos foi monitorado o íon produto 184 m/z com energia de colisão de 30 eV.

3.7.4 Varredura por GC-MS

Quando uma maior quantidade de informação de uma determinada amostra é desejada costuma-se analisar a mesma por GC-MS no modo *full scan*. Assim, os dados das razões massa/carga (m/z) são coletados num amplo espectro de varredura, normalmente de 20 a 1000 (MELLON, STARTIN e SELF, 2000). Segundo o artigo "GC/MS SIM vs. Scan Mode" da Eurofins

(2018) o modo de varredura completa registra todo o espectro de massas, e é o modo padrão de aquisição utilizado para análise da maioria das amostras ambientais utilizando métodos de GC-MS como EPA 8260, 8270 e TO-15. Esse modo foi utilizado para comparar os extratos das matrizes após realização de testes com diferentes sorventes de limpeza.

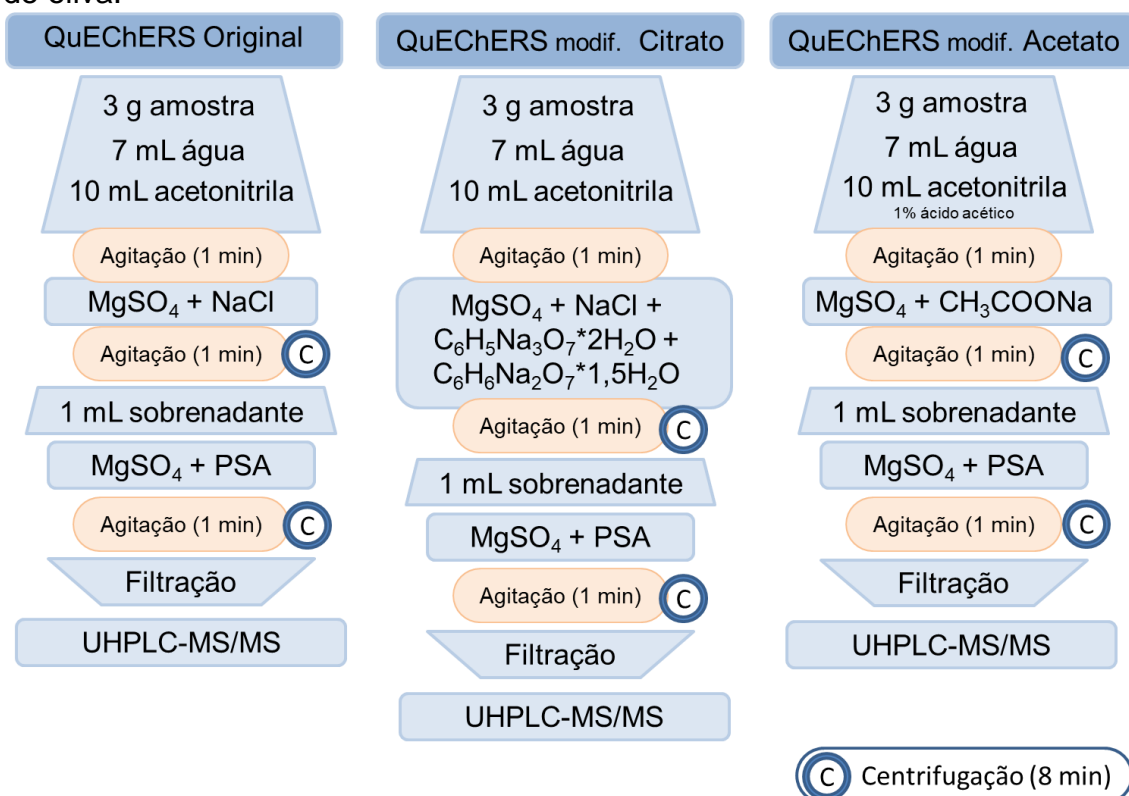
O modo de análise utilizado foi do tipo varredura completa, também chamado, *full scan*. As condições cromatográficas são descritas a seguir. Coluna HP 5 MS UI (30 m x 250 μm x 0,25 μm). Tempo total de análise: 20 min. Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min^{-1} . Volume de injeção: 1 μL . Temperatura do injetor: 280 $^{\circ}\text{C}$. Pressão: 12,5 psi. Temperatura da fonte: 300 $^{\circ}\text{C}$. Temperatura do forno: 60 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) \rightarrow (40 $^{\circ}\text{C}$ min^{-1}) \rightarrow 170 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow (10 $^{\circ}\text{C}$ min^{-1}) \rightarrow 310 $^{\circ}\text{C}$.

3.8 PREPARO DE AMOSTRA

Para os ensaios de extração iniciou-se comparando os três métodos QuEChERS: original, citrato e acetato (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Levou-se em consideração a proporção amostra:água:solvente orgânico escolhida pelos testes preliminares com óleos comestíveis. Os ensaios de extração estão apresentados na Figura 6.

Para o método QuEChERS Original foram utilizados 4 g de MgSO_4 e 1 g de NaCl na etapa de extração e 150 mg de MgSO_4 + 25 mg de PSA na etapa de limpeza. Já para os métodos QuEChERS modificados citrato e acetato, o sulfato de magnésio e PSA utilizados na etapa de limpeza consideraram a mesma proporção do método Original. Já os sais de extração para o método modificado Citrato foram 4 g de MgSO_4 + 1 g de NaCl + 1 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0,5 g $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$. E os sais de extração usados para o método modificado acetato foram 4 g de MgSO_4 + 1 g de CH_3COONa , todos considerando a extração com 10 mL de fase orgânica.

Figura 6 - Comparação entre os métodos QuEChERS de extração para azeite de oliva.



Fonte: o autor.

Os extratos obtidos para os diferentes métodos QuEChERS foram submetidos à análise cromatográfica por UHPLC-MS/MS para o estudo da recuperação dos analitos. Além disso, I) fez-se a análise gravimétrica dos extratos para verificar qual deles retia mais componentes da matriz. Ainda; II) os extratos foram submetidos a uma análise das principais transições para gorduras no UHPLC-MS/MS; III) análise no modo varredura por GC-MS para confirmar os resultados anteriores.

Após a verificação dos resultados dos testes anteriormente descritos o método QuEChERS original foi escolhido para a matriz azeite de oliva. A partir disso avaliaram-se os fatores: interferência do modo de agitação durante a extração e a recuperação das amostras, bem como a etapa de congelamento.

3.8.1 Variações na etapa de agitação para extração dos agrotóxicos na matriz azeite de oliva

Sabe-se que a agitação é fundamental no procedimento QuEChERS. Na presença de sais secantes, como o sulfato de magnésio ela facilita a homogeneização da temperatura do meio (que fica aquecido entre 40 e 45°C) possibilitando a migração dos analitos da matriz para o solvente extrator e principalmente favorecendo a extração dos compostos apolares (PRESTES *et al.*, 2009).

A fim de testar qual agitação seria mais eficiente na extração dos agrotóxicos das amostras de azeite de oliva foram avaliadas quatro formas distintas: agitação manual, agitação com vortex (Figura 7a), agitação com agitador Multitube Vortex Fisher Scientific® (Figura 7b) e agitação com agitador Heidolph Overhead Shaker Reax® (Figura 7c). Os tempos de agitação e ensaios estão descritos na Tabela 10.

Figura 7–Agitadores utilizados durante a etapa de extração: a) vortex comum, b) Multitube Vortex Fisher Scientific®, c) Heidolph Overhead Shaker Reax®



Os tempos de agitação avaliados foram baseados em pesquisas já publicadas na literatura. Para a agitação manual no método QuEChERS costuma-se variar o tempo de agitação de 30 s a 1 min, podendo essa ser manual ou com vortex comum (LEHOTAY *et al.*, 2010, OSHITA E JARDIM, 2014, PRESTES *et al.*, 2009). O tempo de agitação comumente utilizada para o agitador Fisher Scientific® é de 10 min (ZAVITZANOS *et al.*, 1999), no entanto não há muitas referências sobre o uso do mesmo nesse tipo de extração. Já com o agitador Heidolph Overhead Shaker Reax® não há um tempo de

agitação bem definido e autores sugerem desde 30 min até 48 h de agitação (ZAMAN *et al.*, 2016, CZECH *et al.*, 2016, STORM, ASCHENBRENNER e SMIRNOVA, 2014, KLEES, BOGATZKI e HIESTER, 2016). No caso dos testes para azeite de oliva, considerou-se a utilização de 48h impraticável para análises de rotina.

Tabela 10-Tipos e tempo de agitação (A) avaliados na etapa de extração.

Ensaio	Modo de agitação	Tempo
A1	Manual	1 min
A2	Vortex	1 min
A3	Agitador Fisher Scientific®	10 min
A4	Agitador orbital REAX®	30 min
A5	Agitador orbital REAX®	1 h
A6	Agitador orbital REAX®	2 h
A7	Agitador orbital REAX®	12 h
A8	Agitador orbital REAX®	24 h

Os percentuais de recuperação e RSD no nível $20 \mu\text{g L}^{-1}$ foram avaliados em triplicata para cada ensaio. Os resultados foram comparados com a curva de calibração na matriz para cada tipo de agitação.

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

Muitos autores citam a etapa de congelamento como significativa para minimizar a presença de coextrativos no solvente extrator para matrizes como peixe, páprica, coco, entre outros (SHAO, AGAR e GIESE, 2017, LEE *et al.*, 2011, FERREIRA *et al.*, 2016, WANG, 2017). Nessa etapa da pesquisa optou-se por testar a influência do congelamento sob as extrações de agrotóxicos em azeite de oliva. Foram realizados 10 ensaios conforme descrito na Tabela 11.

O ensaio C1 foi considerado o ensaio controle, no qual o extrato não foi congelado. O ensaio C2, C3, C4 e C5 consistiram na aplicação de banho de

gelo picado no extrato da amostra por 1, 5, 10 e 30 min respectivamente. O ensaio C6 aplicou banho de gelo seco adicionado de álcool para diminuição da temperatura durante 1 minuto. Os ensaios C7, C8, C9 e C10 envolveram a utilização de freezer para congelamento dos extratos das amostras por 30 min, 1, 12 e 24 h, respectivamente.

Tabela 11 - Ensaio para estudo da influência da etapa de congelamento (C) na extração de agrotóxicos em azeite de oliva.

Ensaio	Procedimento	Tempo
C1	Sem congelamento	-
C2	Banho de gelo	1 min
C3	Banho de gelo	5 min
C4	Banho de gelo	10 min
C5	Banho de gelo	30 min
C6	Banho de gelo seco + álcool	1 min
C7	Freezer	30 min
C8	Freezer	1 h
C9	Freezer	12 h
C10	Freezer	24 h

Assim como nos ensaios de agitação, os percentuais de recuperação e RSD foram avaliados em triplicata no nível $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Também foram comparadas as análises das amostras fortificadas com a curva de calibração na matriz para cada procedimento.

3.8.3 Precipitação de coextrativos por agitação ultrassônica

Foi proposta a eliminação da etapa de limpeza do método QuEChERS substituindo a mesma pela sonicação do extrato da matriz com sulfato de alumínio. Essa alternativa surgiu devido ao fato de que o sulfato de alumínio costuma ser usado no tratamento de resíduos, pois é capaz de complexar com as moléculas de gordura levando a sedimentação dessas (Panda, 2011, Hoffmann, 2013).

Pesou-se 1 mg de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ para cada mL de extrato que se desejava limpar. A mistura foi submetida a agitação em banho ultrassônico por 10 min seguido de centrifugação a 3400 rpm por 8 min. O sobrenadante foi filtrado e analisado no modo varredura por GC-MS.

3.8.4 Utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza

No método QuEChERS original utiliza-se amina primária e secundária (PSA) e sulfato de magnésio (MgSO_4) na etapa de limpeza. No entanto, percebeu-se que a utilização desses sorventes não era eficaz na remoção dos coextrativos da matriz. Assim, levando-se em consideração os sorventes disponíveis no laboratório, fez-se uma avaliação em termos de recuperação e redução dos coextrativos da matriz para doze diferentes combinações de limpeza conforme descrito na Tabela 12. Nos testes também foi comparada a utilização dos sorventes na forma dispersiva (d-SPE) e em cartucho (SPE).

Tabela 12 - Ensaios variando-se os sorventes (S) de limpeza no método QuEChERS.

Ensaio	Sorventes	Forma de limpeza
S1	250 mg Bond Elut Carbon 250 mg PSA	SPE
S2	500 mg Strata SDB-L	SPE
S3	600 mg Captiva EMR	SPE
S4	50 mg C18 + 50 mg PSA + 50 mg MgSO_4	d-SPE
S5	50 mg Zsep+ + 150 mg MgSO_4	d-SPE
S6	200 mg EMR - Lipid + 400 mg Polish	d-SPE
S7	125 mg C18 + 25 mg PSA + 150 mg MgSO_4	d-SPE
S8	200 mg Florisil + 600 mg MgSO_4	d-SPE
S9	Amino	SPE
S10	100 mg Silica + 100 mg MgSO_4	d-SPE
S11	100 mg Alumina + 100 mg MgSO_4	d-SPE
S12	100 mg Terra diatomácea + 100 mg MgSO_4	d-SPE

Foi realizada a varredura por GC-MS para todos os ensaios de sorventes. Além disso, foi realizada a avaliação no modo SIM para os mesmos

ensaios por UHPLC-MS/MS. Ainda, os ensaios foram avaliados em termos de percentuais de recuperação e RSD comparando-se cada um com sua respectiva curva de calibração. Para o melhor resultado em termos de recuperação dos analitos em estudo e remoção de coextrativos avaliou-se a quantidade de sorvente utilizado variando-se a proporção por mL de extrato de 100 200 e 300 mg, respectivamente. Porém, esses ensaios não mostraram melhoras na recuperação dos analitos do método e foram descartados. A avaliação no modo full scan por GC-MS não foi realizada para esses últimos ensaios. Dessa maneira, validou-se o método proposto a partir dos melhores resultados obtidos nos testes com diferentes sorventes.

3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA.

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

3.9.1 Seletividade e sensibilidade

A avaliação da seletividade do método foi realizada analisando-se extratos de amostras branco, isentas dos analitos em estudo, no sistema cromatográfico e amostras fortificadas com esses analitos. Comparou-se os cromatogramas verificando se algum interferente poderia estar coelúndo com os analitos selecionados e se isso afetaria a análise por UHPLC-MS/MS.

3.9.2 Linearidade e curva analítica

A linearidade do método proposto foi avaliada através da análise cromatográfica de soluções analíticas nas concentrações de 0,5, 1, 2;5; 10; 20; 30; 40 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparadas em acetonitrila e no extrato do branco da matriz (azeite de oliva e azeitona). As soluções foram preparadas previamente conforme descrito no item 3.3. Foram preparadas 3 curvas analíticas em extrato branco da matriz (azeite de oliva), uma curva em solvente orgânico (acetonitrila) e uma curva no extrato branco da matriz (azeitona). Com esses dados foi possível calcular a equação da curva analítica para cada um dos compostos avaliados bem como o RSD% e o coeficiente de determinação (r^2) de cada curva.

3.9.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de quantificação (LOQ) foi considerado como sendo o menor ponto da curva analítica para cada composto avaliado levando-se em conta a relação sinal/ruído e os ensaios de recuperação (DOC-CGCRE-008, 2016). Para tal, o limite de detecção (LOD) pode ser calculado como derivado do LOQ, sendo, portanto 3,33 vezes menor que esse.

No método proposto houve etapas de diluição da amostra, desse modo, os limites em relação ao instrumento e ao método foram diferentes. O limite de detecção do instrumento (LODi) e o limite de quantificação do instrumento (LOQi) referem-se aos limites em relação ao instrumento, expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$. Já o LODm e LOQm referem-se aos limites do método, ou seja, a concentração real nas amostras e são obtidos através da relação entre o fator de concentração/diluição do método e os limites do instrumento, expressos em $\mu\text{g kg}^{-1}$ tanto para os azeites de oliva como para as azeitonas.

3.9.4 Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi realizada em 4 níveis de fortificação (0,5, 10,20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$). Para cada nível de fortificação foram feitas 6 réplicas nas amostras “branco” de azeite de oliva. Para as azeitonas fez-se três níveis de fortificação na concentração de 0,5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. A faixa de aceitação considerada para o cálculo dos percentuais de recuperação foi de 70 a 120%.

3.9.5 Precisão

Em termos de repetibilidade, a precisão foi avaliada extraindo-se 6 amostras fortificadas para cada nível de fortificação analisado uma vez no equipamento. A variação entre as réplicas foi expressa pelo desvio padrão relativo (RSD). Foram considerados dentro da faixa de aceitação os ensaios que apresentaram RSD <20%.

Para a verificação da precisão intermediária, foram feitas análises de uma curva analítica na matriz “branco” e três níveis de fortificação nas concentrações de 0,5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ uma semana após a validação do método. Esse procedimento foi realizado por diferentes analistas.

3.9.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada durante o processo de validação e precisão intermediária, pois foi preparada nova fase móvel, realizada a limpeza da fonte de ionização, trocado o lote do solvente extrator (acetoneitrila) e o ensaio foi realizado por outro analista. Além disso, a solução contendo os agrotóxicos avaliados no método foi preparada novamente para os ensaios de precisão intermediária. Também os ensaios do planejamento experimental

demonstraram que as variações no pH da fase móvel não interferiram na eficiência do método desenvolvido (Anvisa, 2017)

3.9.7 Efeito matriz

A avaliação do efeito matriz foi realizada comparando-se a inclinação das curvas analíticas no solvente (acetonitrila) e na matriz. Foi considerado que um efeito superior a $\pm 20\%$ confirma a ocorrência de efeito matriz (CARDOSO, NÓBREGA e ABRANTES, 2008, SANTE, 2017).

3.10 –AMPLIAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A MATRIZ AZEITONA

Foi realizada a ampliação do método desenvolvido para a matriz azeitona considerando os mesmos analitos e obedecendo aos parâmetros de validação descritos no item 3.9.

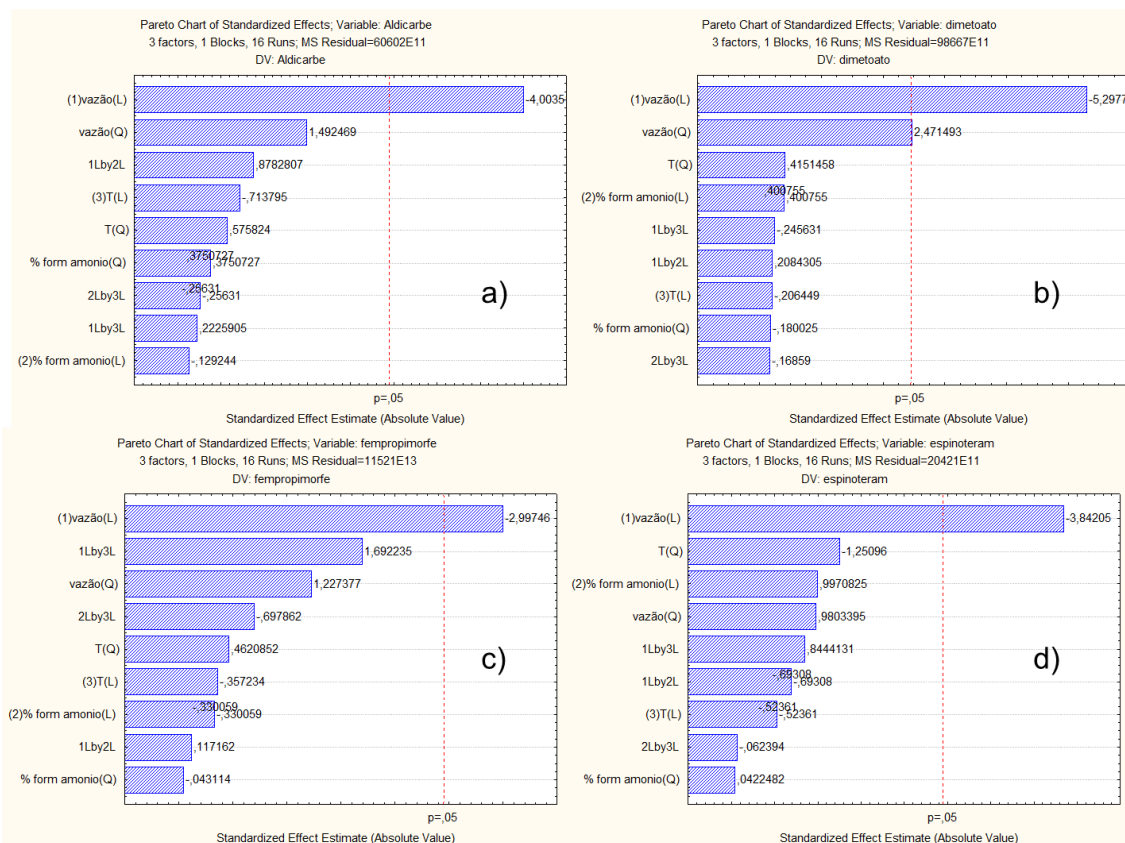
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Optou-se pela execução de um planejamento experimental considerando os solventes geralmente utilizados na rotina de laboratório de análise de resíduos de agrotóxicos. A utilização de pequenas variações na fase móvel implica em menores oscilações no sistema cromatográfico, bem como, evita falhas ou problemas relacionados à operação do equipamento (Neto, 2009).

A resposta do planejamento foi avaliada em termos de melhora no sinal analítico do equipamento (área dos picos). O planejamento foi realizado levando-se em conta todos os agrotóxicos em estudo. Para a maioria dos compostos avaliados, o fator temperatura da coluna cromatográfica foi o menos relevante. Fato que pode ser justificado pela estreita faixa de operação da mesma (de 20 a 70 °C), pois segundo Maldanere Jardim (2012) o aumento da temperatura pode melhorar a eficiência e a resolução cromatográfica. No entanto, a maioria das fases estacionárias não é estável a altas temperaturas, como é o caso da coluna ACQUITY UPLC[®] BEH. A Figura 8 mostra os gráficos de Pareto exemplificando que avazão foi o ponto crítico para a melhora no sinal analítico.

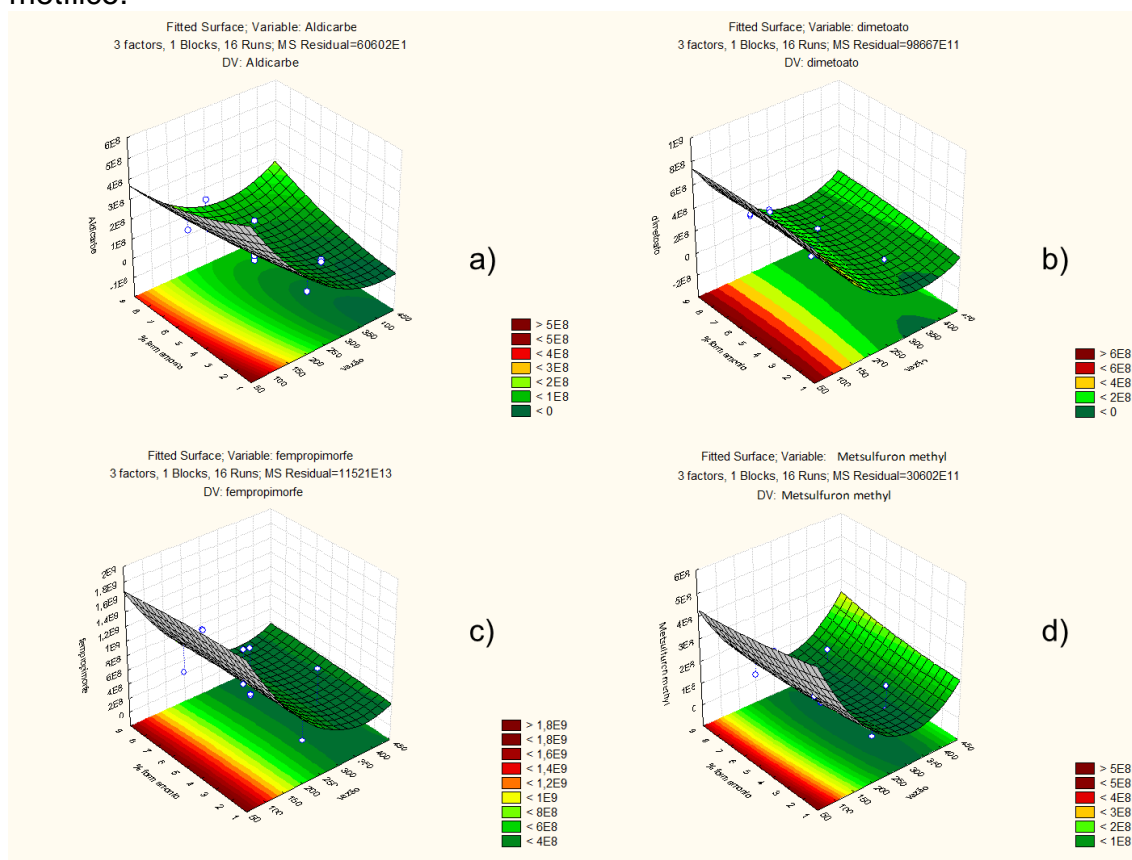
Figura 8 - Gráficos de Pareto obtidos pelo planejamento experimental para os agrotóxicos: a) Aldicarbe, b) dimetoato, c) fempropimorfe e d) metsulfurom metílico.



Fonte: Statistica 8.0, 2007.

Ainda, pela superfície de resposta desses compostos é possível observar que, independente da proporção da fase móvel, na vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ foram obtidas as melhores respostas cromatográficas. Fato que foi observado para a maioria dos agrotóxicos estudados. Na Figura 9 estão demonstrados alguns desses resultados.

Figura 9 - Superfícies de resposta obtidas pelo planejamento experimental para os agrotóxicos: a) Aldicarbe, b) dimetoato, c) fempropimorfe e d) metsulfurom metílico.



Fonte: Statistica 8.0, 2007.

A diminuição da vazão não implicou numa diminuição no desempenho cromatográfico. Pelo contrário, pois em colunas cromatográficas com tamanho de partícula menor ($1,7 \mu\text{m}$) a faixa de vazão de ótimo desempenho é maior. Por isso, não foram necessárias modificações na proporção da fase móvel de rotina, o que viabiliza que esse método seja utilizado no laboratório sem alteração da vazão normalmente utilizada. Dessa maneira a fase móvel do sistema UHPLC-MS/MS foi otimizada constituindo-se de dois solventes operando em gradiente linear, com vazão de $0,100 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de 40°C , volume de injeção $10 \mu\text{L}$ e tempo total de análise de 12 min. A fase aquosa (A) foi uma solução composta por 98% de água e 2% de metanol (v/v) e a fase orgânica (B) metanol, ambas contendo $0,1\%$ de ácido fórmico e 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio como aditivos. O uso de aditivos na fase móvel permite uma melhora na separação cromatográfica, além de favorecer o processo de ionização dos compostos, aumentando a resposta dos mesmos.

Recomenda-se a utilização de aditivos com baixas concentrações salinas ($< 10 \text{ mmol L}^{-1}$) e elevada volatilidade, para que não causem contaminação da fonte de ionização ou supressão de sinal. A utilização de ácido fórmico no modo eletronebulização positiva forma íons $[M+H]^+$ e com o formiato de amônio ocorre formação de adutos de amônio $[M+NH_4]^+$, reduzindo a formação de adutos de sódio provenientes de vidrarias e impurezas de solventes (CASS e CASSIANO, 2015).

As condições estabelecidas para o espectrômetro de massas foram:

- * Capilar: 2,0 kV;
- * Temperatura da fonte de ionização (ESI): 150 °C.
- * Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- * Vazão do gás de colisão (argônio): 0,15 mL min⁻¹;
- * Vazão do gás de secagem (N₂): 600 L h⁻¹;
- * Vazão no cone (N₂): 80 L h⁻¹;

4.1.1 Ajuste das condições de determinação dos agrotóxicos por UHPLC-MS/MS

Os parâmetros de quantificação e confirmação utilizados para cada analito no modo SRM estão apresentados na Tabela 13. Já a Figura 10 apresenta o cromatograma de ions totais (TIC) para uma mistura dos analitos na concentração de 20 µg L⁻¹ em acetonitrila, com destaque para o composto atrazina, mostrando também as duas transições monitoradas para o mesmo.

Tabela 13 - Analitos caracterizados pelo tempo de retenção, ions precursor e produto para duas transições (quantificação e confirmação) e energia de colisão.

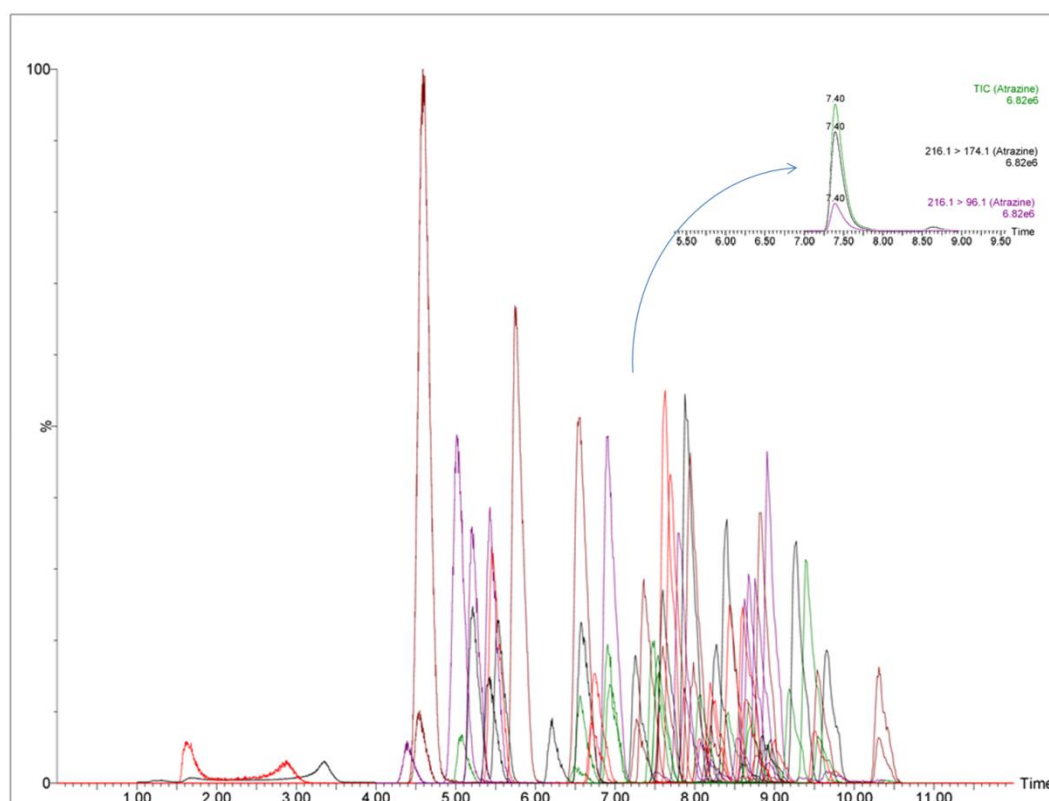
t _R (min)	Analito	Íon precursor (m/z)	Tensão do cone (eV)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)
7,4	2,4-D	219	18	161	13	125	13
3,4	Acefato	184	8	143	8	125	18
5,5	Acetamiprido	223	23	126	20	56	15
6,2	Aldicarbe	208	7	116	7	89	7
7,4	Atrazina	216	30	174	18	96	23

$t_R(mn)$	Analito	Íon precursor (m/z)	Tensão do cone (eV)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)
7,4	Atrazina-d5(PC)	343	23	151	21	311	11
8,3	Azinfós etílico	346	10	132	16	77	36
7,6	Azinfós metílico	318	12	160	8	261	8
7,7	Azoxistrobina	404	17	329	30	375	15
6,5	Bentazona	241	12	199	12	107	26
10,4	Bifentrina	294	22	69	20	197	15
8,8	Bitertanol	440	15	166	42	181	20
7,9	Boscalida	338	12	99	16	70	8
9,3	Buprofezina	343	32	307	20	140	20
7,0	Carbaril	306	22	201	12	57	20
4,6	Carbendazim	202	19	145	22	117	28
5,4	Carbofurano-3-hidróxido	192	24	160	18	132	28
10,2	Carbosulfano	238	25	163	16	181	10
6,9	Carboxina	381	31	118	22	76	34
8,2	Ciproconazol	236	25	143	16	87	22
7,7	Clomazona	292	27	125	24	70	18
9,6	Clorpirifos	240	23	125	18	89	46
9,1	Clorpirifós metil	350	27	97	32	198	20
8,6	Cresoxim metílico	322	23	125	20	289	16
9,8	Deltametrina	314	15	206	7	116	12
6,7	Diclorvos	523	16	281	18	506	11
8,9	Difenoconazol	221	23	109	22	79	34
8,5	Diflubenzuron	406	37	251	25	111	60
5,5	Dimetoato	328	20	158,3	12	141	28
8,9	Disulfoton	230	12	125	20	199	10
7,5	Diuron	275	14	89	20	61,1	35
8,3	Epoxiconazol	233	27	72	18	46	14
9,0	Espineteram	296	12	70	10	99	15
8,7	Espinosade A	330	25	101	50	121	22
9,0	Espinosade D	749	142,4	25	98	40	32
7,6	Etefon	409	25	145	40	186	16
10,4	Etiona	216		174	18	96	23
10,4	Etofenprox	733	47	142	31	98	59
8,6	Famoxadona	733	47	142	31	98	59
8,5	Fenoxicarbe	302	19	88	20	116	11
9,7	Fenpiroximato	145	10	85	8	73	14
7,8	Fenpropimorfe	285	16	97	46	199,1	10
8,7	Fentiona	394	17	107	43	177	15
8,4	Fipronil	392	12	331	10	238	20
7,6	Flumioxazin	327		215	37	152	28
8,2	Fluquinconazol	302	19	88	20	116,1	11

$t_R(mn)$	Analito	Íon precursor (m/z)	Tensão do cone (eV)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)
7,3	Flutriafol	422	23	366	15	138	32
8,9	Forato	304	41	147	28	57	30
7,7	Fosmete	279	25	169	16	247	13
7,3	Imazalil	435	25	330,2	16	250	26
5,1	Imidacloprido	355	20	327,1	28	299	32
7,9	Linurom-d6(PC)	355	17	88	16	108	16
9,3	Lufenuron	376	37	307	30	349	18
8,0	Malationa	302	23	123	29	70	18
1,6	Metamidofós	261	10	75	12	97	32
7,6	Metidationa	318	19	160	22	77	46
7,9	Metiocarbe	297	31	159	22	69	22
5,6	Metiocarbe sulfona	256	23	175	20	209	15
5,2	Metiocarbe sulfóxido	511	20	141	50	158	25
4,4	Metomil	331	12	99	24	127	12
6,6	Metomil metílico	142	17	93.4	12	125	13
9,6	Pendimetalina	303	10	145	10	85	20
8,4	Picoxistrobina	226	19	169	10	121	22
8,7	Piraclostrobina	258	22	107	38	122	19
8,8	Pirazofós	242	17	122	28	185	14
6,6	Pirimicarbe	163	19	106	10	88	10
8,9	Pirimifós metílico	382	22	167	16	199	22
9,5	Piriproxifem	282	12	212	10	194	17
8,4	Procimidona	368	10	145	22	205	10
8,2	Procloraz	388	20	1163	25	79	30
9,2	Profenofos	374	33	194	32	222	22
9,6	Propargito	239	25	182	15	72	18
8,7	Propiconazole	306	25	108	32	164	22
8,1	Propizamida	295	23	93	14	96	14
6,8	Simazina	284	33	256	17	67	28
8,7	Tebuconazol	376	13	307	16	70	34
8,0	Terbutilazina	373	25	128	40	303	20
8,3	Tetraconazol	368	15	175	15	231	15
5,1	Tiabendazol	347	37	159	34	69	22
5,8	Tiacloprido	256	27	190	15	156	15
4,6	Tiametoxam	202	34	96	22	124	16
6,9	Tiodicarbe	308	31	70	22	125	40
6,6	Tiofanato metílico	230	28	174	16	96	28
8,1	Triadimefon	327	32	159	30	70	20
8,3	Triadimenol	202	42	175	25	131	30

t_R (min)	Analito	Íon precursor (m/z)	Tensão do cone (eV)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)	Íon produto (m/z)	Energia colisão (eV)
8,7	Trifenilfosfato (PI)	292	19	132	22	211	12
9,0	Trifloxistrobina	253	32	126	20	90	40

Figura 10 - Cromatograma de ions totais (TIC) obtido por UHPLC-MS/MS para os analitos quantificados em uma solução de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ no extrato da matriz azeite de oliva.

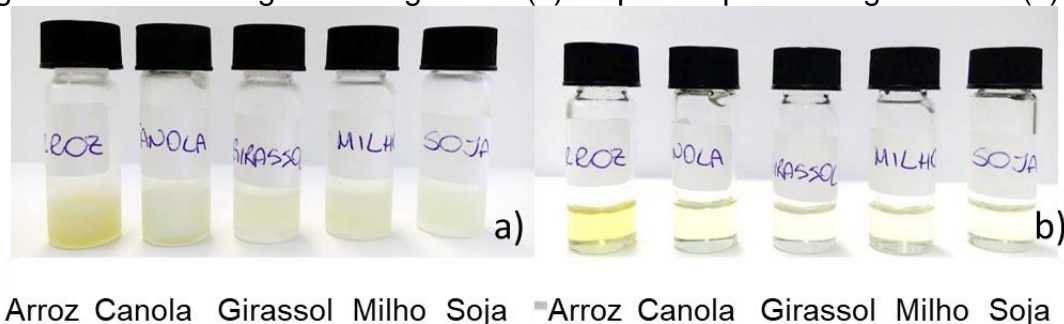


Fonte: UHPLC-MS/MS (XEVO TQ).

4.2 TESTES PRELIMINARES

Nos testes preliminares notou-se que o óleo de arroz foi o que apresentou maior quantidade de material particulado em suspensão antes do congelamento. Porém, após 12 h de congelamento, esse material não precipitou, mantendo a solução levemente turva (Figura 11).

Figura 11 - Óleos vegetais congelados (a) e após etapa de congelamento (b).



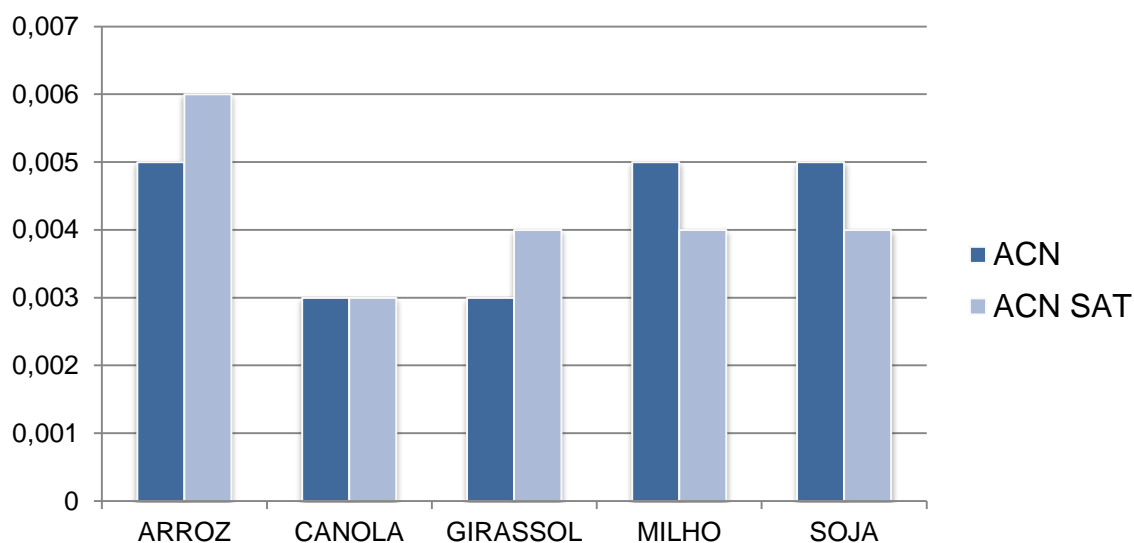
Fonte: o autor

A utilização de ACN saturada com hexano foi baseada no trabalho de Shen e colaboradores (2011) que desenvolveram um método para a determinação de 17 piretroides em matrizes de difícil preparo de amostra, incluindo alho, cebola, cebolinha e pimentão. A saturação da acetonitrila com hexano também é reportada por outros autores por melhorar o desempenho da extração dos analitos em relação à utilização de ACN pura (HISKIA, ATMAJIDOU e TSIPI, 1998; TSATSAKIS *et al.*, 2003).

O volume de extração para todos os solventes foi de 10 mL, já o volume de amostra foi de 3 g, baseado no trabalho de Hernando e colaboradores (2007) que desenvolveram um método para determinação multiclasse de 100 agrotóxicos em azeite de oliva. O uso de um menor volume de amostra tende a minimizar os interferentes da matriz na análise cromatográfica. Após a agitação por 1 min as amostras foram centrifugadas a 3400 rpm a 10 °C por 10 min.

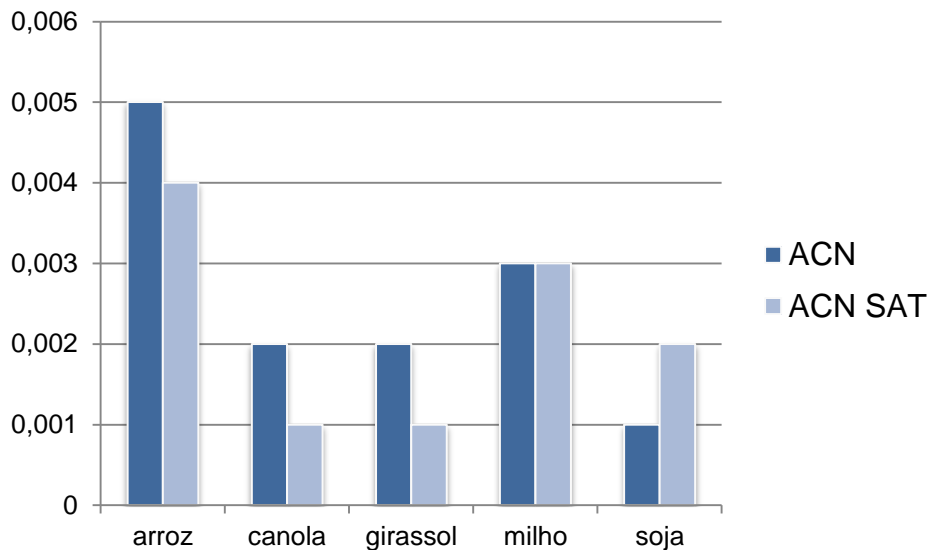
O sobrenadante dos solventes extratores foi coletado antes da etapa de congelamento e depois da mesma, então evaporou-se até a secura no evaporador Turbovap® com fluxo suave de nitrogênio e temperatura controlada de 60°C. Os resíduos remanescentes nas diferentes situações estão registrados nas Figuras 12 e 13. Excetuando-se os resíduos da evaporação dos extratos com hexano, pois para ambos os testes, a extração com hexano resultou numa maior retenção de resíduos de gordura, dificultando a comparação entre a extração com acetonitrila e acetonitrila saturada com hexano.

Figura 12 - Resíduo de gordura (g) para as extrações com diferentes tipos de solvente sem congelamento, excluindo-se a extração com hexano para melhor visualização dos resultados obtidos.



Fonte: o autor.

Figura 13 - Resíduo de gordura (g) para as extrações com diferentes tipos de solvente com congelamento, excluindo-se a extração com hexano para melhor visualização dos resultados obtidos.



Fonte: o autor.

Aplicada a análise de variância para os 3 solventes sem congelamento (Figura 12), percebe-se que houve diferença significativa entre eles. Porém, quando a análise de variância foi feita entre os solventes ACN e ACN saturada, não houve diferença significativa entre os resultados de resíduo de gordura. Desse modo, o teste de extração com hexano foi o que mais retirou

coextrativos das amostras de óleo vegetal. Ademais, quando comparadas às extrações com ACN e ACN saturada com hexano, não houve diferença significativa na remoção de gordura das amostras.

Quando realizada a análise de variância pra os 3 solventes após a etapa de congelamento (Figura 13), os resultados foram similares aos encontrados sem congelamento. Para os melhores resultados (ACN e ACN saturada) foram comparados os resíduos de gordura e fez-se uma nova análise de variância. Os resultados da análise mostraram que há diferença significativa entre os valores considerando $p=0,05$ (Apêndice C). Desse modo foi avaliada a diferença entre os solventes extratores com e sem congelamento. Percebeu-se que o uso de ACN saturada com hexano foi significativamente diferente dos testes sem congelamento. Portanto, esse foi considerado o solvente extrator ideal em termos de menor residual de gordura por mL de solvente extrator.

Esse resultado mostra-se de acordo com relatos da literatura (PRESTES *et al.*, 2011) que destacam que a acetonitrila retira da matriz uma quantidade menor de coextrativos quando comparada com solventes mais apolares, e por isso tem sido amplamente utilizada em métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e matrizes ambientais.

A utilização de ACN saturada com hexano é mais bem aplicada para determinação por cromatografia a gás. Porém, devido às limitações práticas, esse trabalho foi desenvolvido por cromatografia líquida. Assim, o uso de hexano na etapa de extração foi considerado inadequado, pois o mesmo poderia vir a comprometer o sistema cromatográfico (tubos peek).

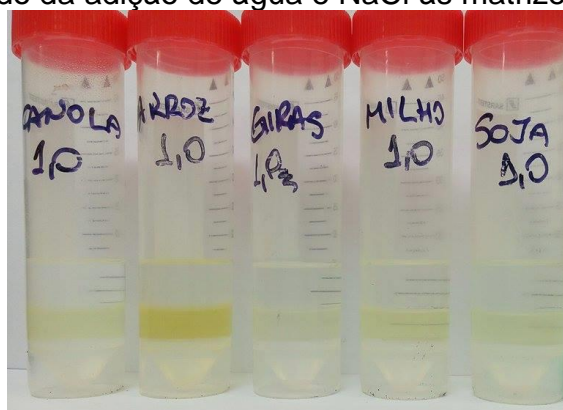
Ainda, os extratos finais para análise cromatográfica por cromatografia líquida (LC) em acetonitrila saturada com hexano ficaram turvos após serem diluídos em água ultrapura (5 e 10 vezes) devido a insolubilidade hexano/água. Fez-se o processo de filtração nesses extratos e foi possível eliminar a turbidez. Porém, com receio de que o hexano remanescente da extração pudesse interagir negativamente com o equipamento a extração foi efetuada empregando somente acetonitrila, eliminando-se a etapa de saturação com hexano.

Procedeu-se com a evaporação dos extratos de acetonitrila saturada com hexano e redissolução em acetonitrila pura. No entanto, essa etapa além

de causar um aumento de mais de 1 h na etapa de preparo de amostra gerava um consumo alto de N_2 durante a etapa de evaporação. Portanto, o uso de acetonitrila saturada com hexano foi descartado na etapa de extração dos analitos da amostra.

A fim de melhorar a etapa de extração adicionou-se cloreto de sódio à mesma, pois compostos orgânicos são menos solúveis em água com sal solubilizado. Esse efeito é conhecido como *salting-out* (KAUFMANN *et al.*, 2014). A Figura 14 apresenta os frascos contendo amostra, água e sais após a centrifugação.

Figura 14 - Resultado da adição de água e NaCl às matrizes de óleo vegetal.



Nessa etapa, percebeu-se que não havia diferença visível entre os óleos vegetais, apesar de o óleo de arroz se destacar pela cor amarelo intensa possivelmente devido a presença de oryzanol, que é uma mistura de ésteres, álcoois e ácidos de cor amarelada.

Os testes que apresentaram melhores resultados visuais quanto à partição foram com 3 g de amostra, 7 mL de água, e 10 mL de ACN a quantidade de cloreto de sódio variando de 0,5 a 1 g.

Os ensaios com óleos vegetais serviram como base para o desenvolvimento do método analítico para azeites de oliva, visto que sua composição é análoga. Parâmetros de extração similares foram utilizados por MORENO-GONZÁLEZ e colaboradores (2014) para a determinação de carbamatos em óleos comestíveis. Outros autores (POLGÁR *et al.*, 2012, HERNANDO *et al.*, 2007, GILBERT-LÓPEZ *et al.*, 2010) também usaram essa

proporção de amostra:água:acetonitrila (3:7:10 m/v/v) para a extração de agrotóxicos em azeites ou óleos comestíveis, evidenciando sua eficácia.

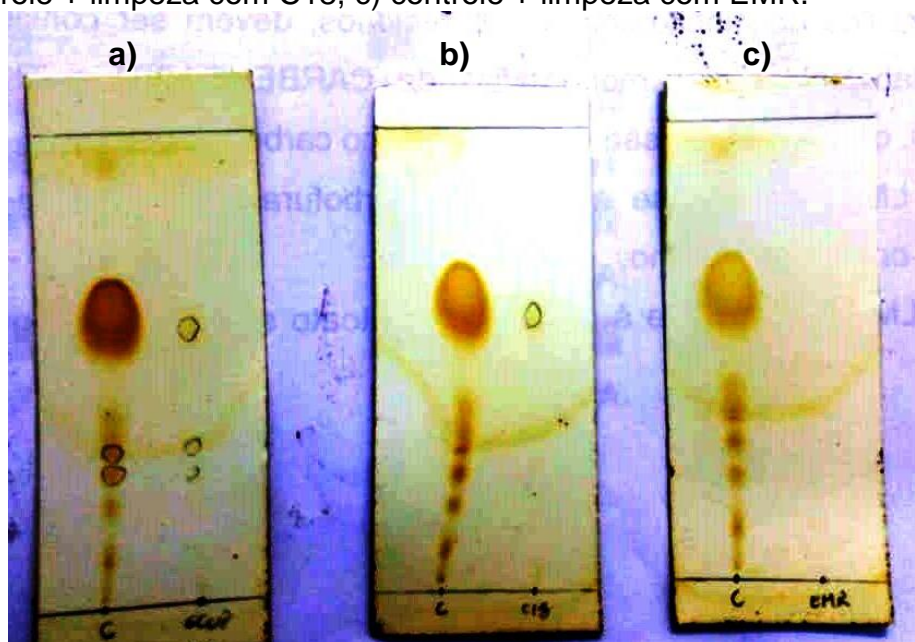
4.3 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS PARA VERIFICAR A PRESENÇA DE COEXTRATIVOS NOS EXTRATOS DAS AMOSTRAS

Ao desenvolver métodos para determinação de agrotóxicos por técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas um dos pontos críticos é o preparo de amostra. É ele que irá garantir a limpeza dos extratos da amostra analisada. Assim, antes de realizar as primeiras análises cromatográficas, alguns testes tem se mostrado úteis para verificação da qualidade (em termos de limpeza) do extrato gerado pelo preparo de amostra.

4.3.1 Placas de sílica utilizando a CCD

Caracterizar a presença de ácidos graxos por placa de sílica gel foi uma das primeiras abordagens quando se estava iniciando a pesquisa com óleos vegetais e, por conseguinte, com azeite de oliva. A técnica mostrou-se rápida e eficiente para confirmar que coextrativos haviam sido removidos do extrato final da matriz. No entanto, essa técnica foi utilizada somente para os ensaios preliminares, visto que a caracterização foi apenas qualitativa. Ainda assim, destaca-se sua utilidade visto que os materiais para que seja realizado esse teste são facilmente encontrados em laboratórios de rotina, podendo a placa de sílica ser confeccionada no laboratório. A Figura 15 demonstra alguns dos resultados obtidos.

Figura 15 - Demonstração da eficácia da CCD para análise qualitativa da presença de ácidos graxos nos extratos da matriz: a) controle + sem limpeza, b) controle + limpeza com C18, c) controle + limpeza com EMR.



Fonte: o autor.

4.3.2 Testes gravimétricos

Os testes gravimétricos são mais onerosos que a CCD, tanto pelo custo (gasto de nitrogênio) quanto pelo tempo empregado. No entanto, eles fornecem resultados quantitativos, visto que, é possível mensurar os resíduos remanescentes no extrato da amostra após o processo de limpeza (OSHITA e JARDIM, 2014). Para isso pesam-se tubos de vidro antes da adição do extrato e depois da secagem do mesmo.

Os testes gravimétricos foram usados como critério de decisão para a escolha do método QuEChERS original que seria empregado no desenvolvimento do método analítico. Realizou-se a extração dos azeites de oliva conforme o procedimento descrito na Figura 6 (item 3.8). Desses, reservou-se uma alíquota de 5 mL do extrato final para que fosse evaporada. É importante não usar um volume de extrato muito pequeno, pois as diferenças entre os testes podem não ser percebidas. Para cada método QuEChERS (original, citrato e acetato) foram feitas três réplicas. Ainda, fez-se uma extração controle que desconsiderou a etapa de limpeza. Os resultados dos

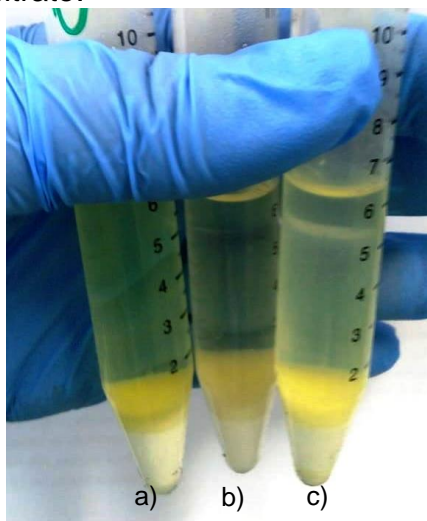
testes gravimétricos estão representados na Tabela 14. Pode-se perceber pela Figura 16 que visualmente os três testes não apresentaram diferenças no extrato da matriz.

Tabela 14 - Comparação dos testes gravimétricos para os três diferentes métodos QuEChERS.

QuEChERS Acetato	QuEChERS Citrato	QuEChERS Original
Com limpeza		
0,00908 g	0,00473 g	0,00602 g
Sem limpeza		
0,01367 g	0,00957 g	0,01080 g
% remoção de coextrativos		
33,6%	50,6%	44,3%

Fonte: o autor.

Figura 16 - Comparação visual entre os três métodos QuEChERS avaliados: a) original, b) acetato e c) citrato.



Fonte: o autor.

4.3.3 Avaliação no modo SRM por UHPLC-MS/MS

A investigação da presença de coextrativos por UHPLC-MS/MS confirmou os resultados dos testes gravimétricos. No entanto, o teste foi bem mais rápido, levando apenas 12 min para cada análise cromatográfica. Por

isso, pode-se dizer que esse tipo de abordagem pode facilitar o trabalho dos analistas, visto que envolve menos etapas e consome menos tempo. Porém, é um processo mais caro que o anterior.

Os resultados da determinação no modo SRM por UHPLC-MS/MS para os íons selecionados estão demonstrados na Figura 17. Da mesma maneira que os testes gravimétricos a diferença entre o método QuEChERS acetato e os demais foi significativa, porém, entre os métodos citrato e original não houve diferença significativa.

Figura 17- Determinação no modo SRM por UHPLC-MS/MS para comparação do teor de coextrativos nos diferentes métodos QuEChERS avaliados: a) acetato, b) citrato e c) original. Em destaque a intensidade máxima de cada ensaio.



Fonte: o autor.

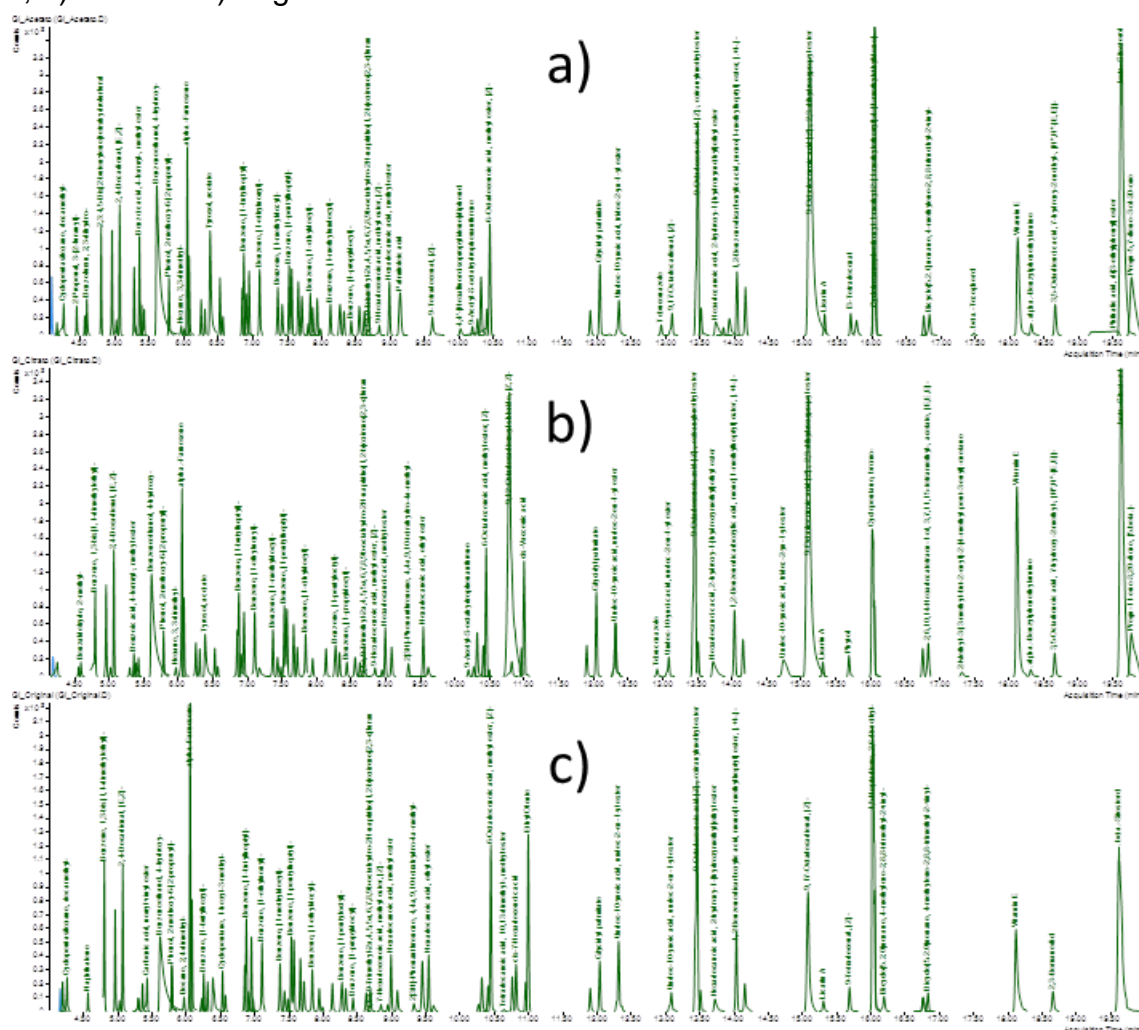
4.3.4 Avaliação dos extratos das amostras através da varredura por GC-MS

Como critério de decisão foi escolhida a varredura por GC-MS, pois essa possibilitou uma visão mais global do tipo de coextrativos que ainda permaneciam na matriz. Percebeu-se que o método QuEChERS original (Figura 18) foi o que apresentou menos compostos detectados no modo varredura e também uma menor intensidade do sinal analítico. Por isso ele foi escolhido para dar continuidade ao desenvolvimento do método analítico proposto. O tempo de análise para cada amostra foi de 20 min e o volume de injeção de 2 μ L.

Também foi usado o modo varredura por GC-MS para comparar a limpeza dos extratos na avaliação da etapa de congelamento, no ensaio de

precipitação por agitação ultrassônica e da escolha dos sorventes de extração. Os detalhes desses resultados estão descritos nos itens 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4, respectivamente.

Figura 18 - Varredura no modo *full scan* por GC-MS para comparação do teor de coextrativos nos diferentes métodos QuEChERS avaliados (obtidos por deconvolução através do software Agilent MassHunter Unknowns Analysis[®]): a) acetato, b) citrato e c) original.



Fonte: o autor.

4.4 PREPARO DE AMOSTRA

Conforme descrito no item 4.3.4, o método que se mostrou mais eficaz na remoção de coextrativos da matriz e recuperação dos analitos avaliados foi

o QuEChERS original. A partir desse foram desenvolvidas as etapas seguintes no preparo de amostra.

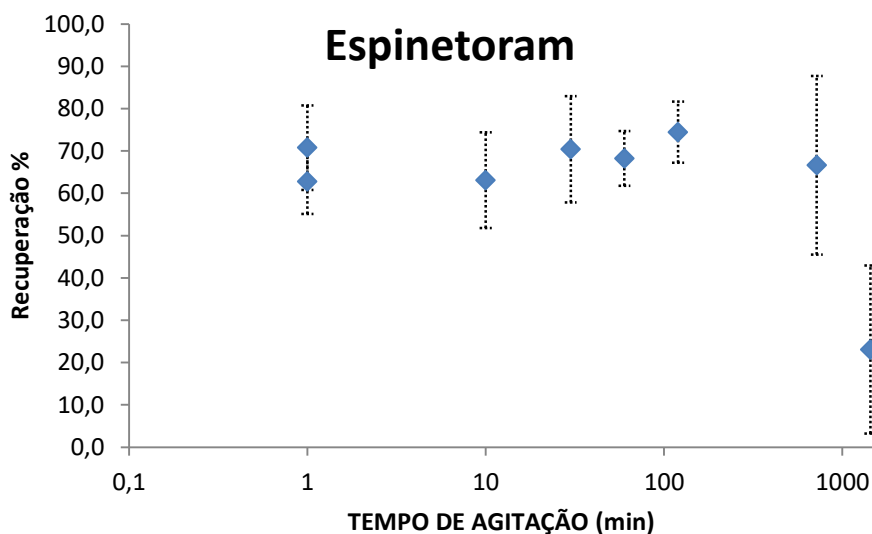
4.4.1 Variações na etapa de agitação para extração dos agrotóxicos na matriz azeite de oliva

A utilização de diferentes técnicas de agitação, bem como diferentes tempos não foi significativa para a maioria dos compostos, não alterando a taxa de recuperação dos mesmos. No entanto, moléculas de elevado peso molecular, como no caso do espinoteram e espinosade sofreram redução na taxa de recuperação após períodos de agitação superiores a duas horas. Esse comportamento pode ser observado pelas Figuras 19 e 20, nas quais o tempo de agitação foi plotado em escala logarítmica para facilitar a visualização. Percebe-se que os dois últimos pontos (equivalentes a 12 e 24 h) tiveram um aumento no desvio padrão entre os ensaios. Ainda, após 24 h de agitação os compostos quase não foram recuperados.

As moléculas de espinetoram e espinosade são muito parecidas (vide apêndice A). O espinetoram difere do espinosade apenas pela redução de um oxigênio em sua estrutura. Assim, era de se esperar que ambas as moléculas apresentassem comportamento similar.

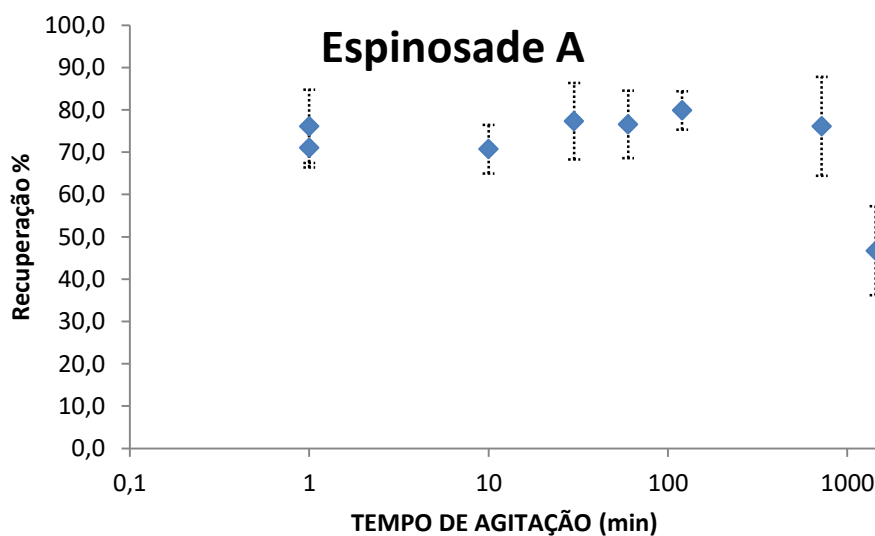
A baixa recuperação desses compostos pode ser explicada pelo fato de ambos apresentarem tempo de meia-vida (DT50) em meio aquoso de 0,4 e 0,9 dias para espinetoram e espinosade, respectivamente. O que ocorre é que ambos sofrem fotólise aquosa, podendo se decompor ou dissociar, ficando impossibilitados de serem detectados pelo método proposto (IUPAC, 2018).

Figura 19 - Variação na faixa de recuperação para o composto Espinetoram durante os ensaios de agitação.



Fonte: o autor.

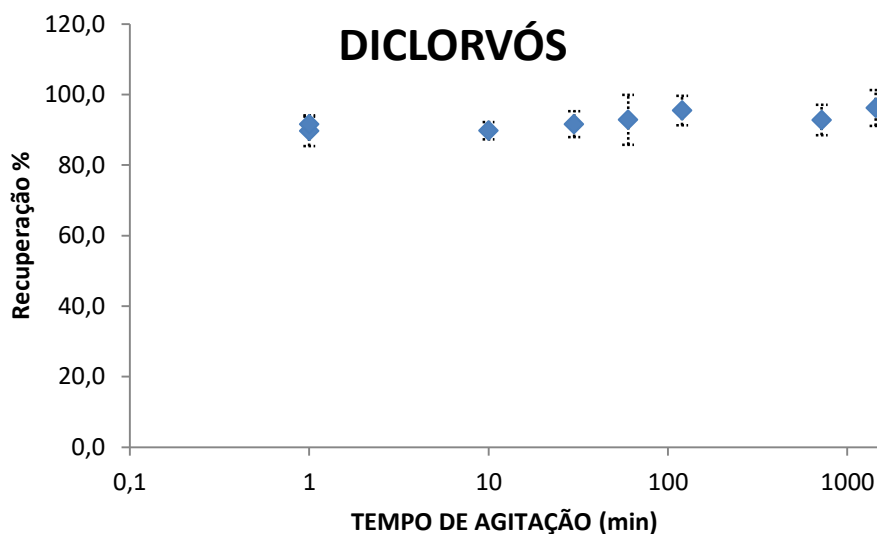
Figura 20 - Variação na faixa de recuperação para o composto Espinosade A durante os ensaios de agitação.



Fonte: o autor.

Moléculas menores, como diclorvós, não sofreram influência significativa na recuperação com a variação do tipo e tempo de agitação (Figura 23). Considerando a melhor agitação para todos os compostos do método desenvolvido, optou-se pelo ensaio número um (A1) que consistiu na agitação manual dos tubos de extração durante 1 min.

Figura 21 - Variação na faixa de recuperação para o composto diclorvós durante os ensaios de agitação.



Fonte: o autor.

4.4.2 Avaliação da influência da etapa de congelamento na remoção dos coextrativos da amostra no extrato da matriz azeite de oliva

O congelamento é uma etapa considerada no preparo de amostra para reduzir os coextrativos que apresentam baixa solubilidade no solvente extrator (acetoneitrila) (ANASTASSIADES *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2011). Essa etapa é mais indicada quando se quer realizar a determinação de agrotóxicos hidrofóbicos ($\log K_{ow} > 1$), já que analitos mais hidrofílicos tendem a ficar retidos na parte aquosa.

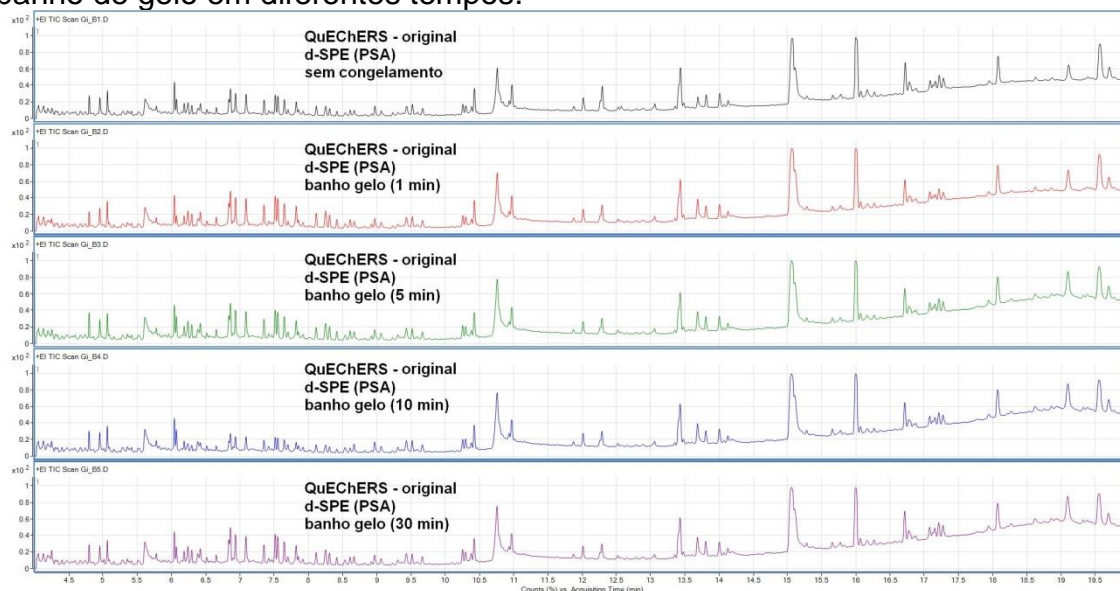
Da Costa Morais, Collins e Jardim (2018) perceberam uma redução na recuperação de compostos como metamidofós, acefato, imidacloprido, tiametoxam e etiona para a matriz pimentão. Para a matriz azeite de oliva esses compostos não apresentaram o mesmo comportamento, ficando dentro da faixa de aceitação de 70 a 120%, exceto para etiona que não foi validada.

Em termos de número de compostos recuperados, não houve diferença entre os ensaios maior que 2 ou 3 analitos. Então, realizou-se a avaliação no modo SRM por UHPLC-MS/MS para verificar se havia diferença entre os extratos da matriz. Porém, percebeu-se que essa diferença também era muito pequena (RSD <20%).

Como alternativa, realizou-se a análise no modo varredura por GC-MS para averiguar se esse mostraria alguma diferença entre os ensaios. Porém, tanto em relação ao número de compostos coextraídos como em relação à intensidade do sinal analítico, não houve um destaque entre o ensaio sem congelamento e os ensaios com diferentes tempos de congelamento. A Figura 22 compara o ensaio sem congelamento e os ensaios com congelamento utilizando banho de gelo em diferentes tempos. Já a Figura 23 compara o ensaio sem congelamento com o ensaio utilizando congelamento em banho de gelo seco + álcool por 1 minuto. E, por fim, a Figura 24 compara o ensaio sem congelamento com os ensaios utilizando congelamento em freezer por diferentes períodos.

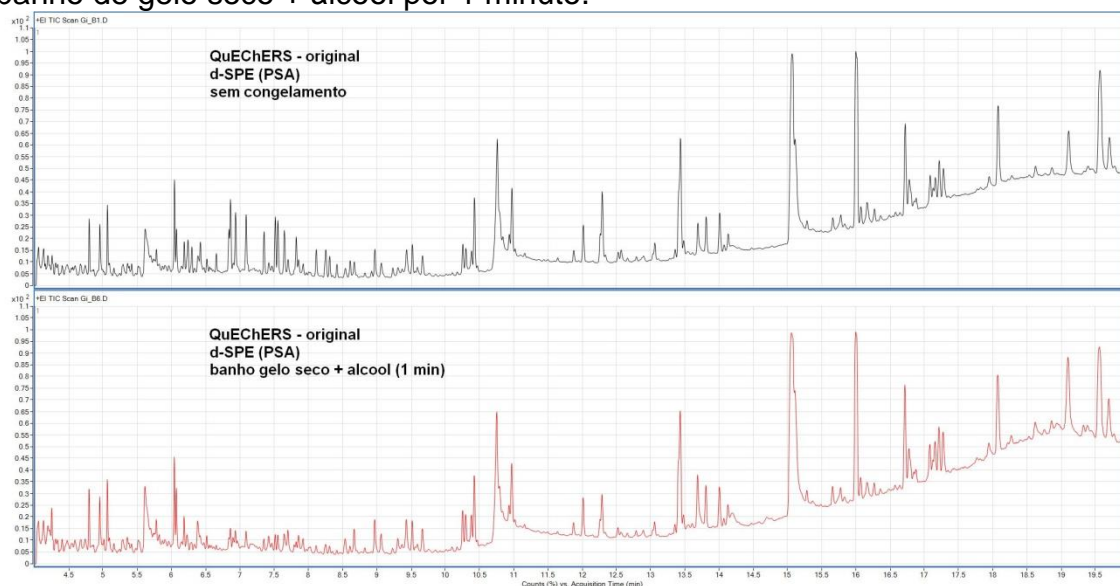
Por isso, optou-se pela exclusão da etapa de congelamento para as matrizes estudadas no método proposto. A eliminação dessa etapa diminui o tempo de preparo de amostras e minimiza os erros de operação durante o processo.

Figura 22- Cromatogramas no modo varredura obtido por GC-MS comparando os ensaios sem congelamento e os ensaios com congelamento utilizando banho de gelo em diferentes tempos.



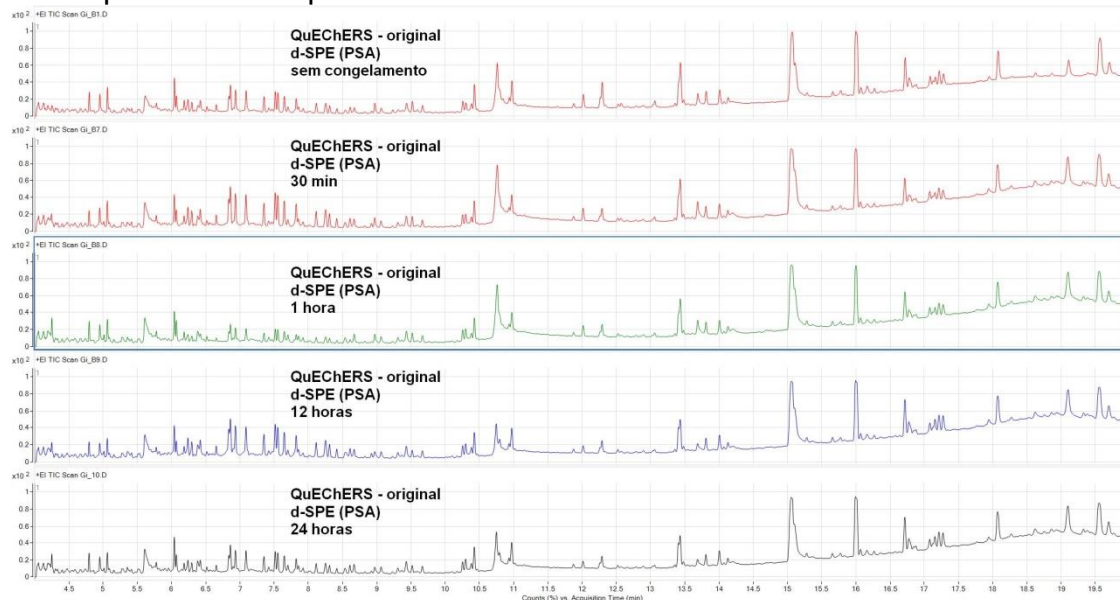
Fonte: o autor.

Figura 23 - Cromatogramas no modo varredura obtido por GC-MS comparando os ensaios sem congelamento com o ensaio utilizando congelamento em banho de gelo seco + álcool por 1 minuto.



Fonte: o autor.

Figura 24 – Cromatogramas no modo varredura obtido por GC-MS comparando os ensaios sem congelamento com os ensaios utilizando congelamento em freezer por diferentes períodos.

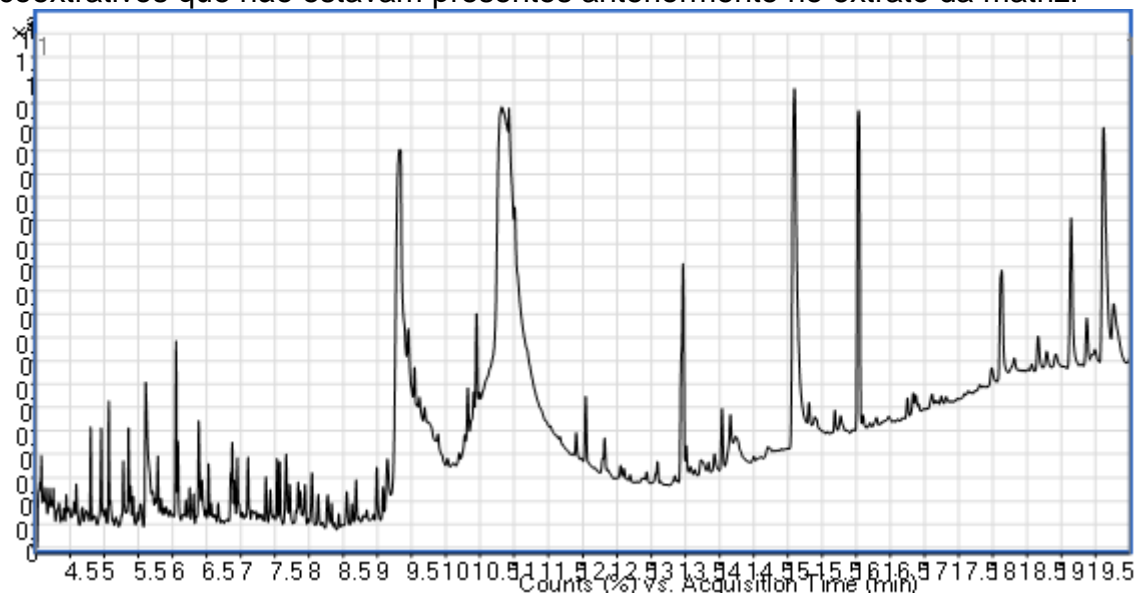


Fonte: o autor.

4.4.3 Precipitação de coextrativos por agitação ultrassônica

A precipitação de coextrativos por adição de surfactante e agitação ultrassônica é uma técnica rápida e barata. Visualmente a solução apresentou melhora na cor do extrato da matriz. Porém, quando analisada no modo *full scan* pelo GC-MS, apresentou um ruído que não existia antes nos extratos. Ou seja, apesar de reduzir os coextrativos, perceberam-se novos interferentes na matriz, advindos do sorvente (Figura 25).

Figura 25 - Análise no modo varredura por GC-MS indicando a presença de coextrativos que não estavam presentes anteriormente no extrato da matriz.



Fonte: GC-MS.

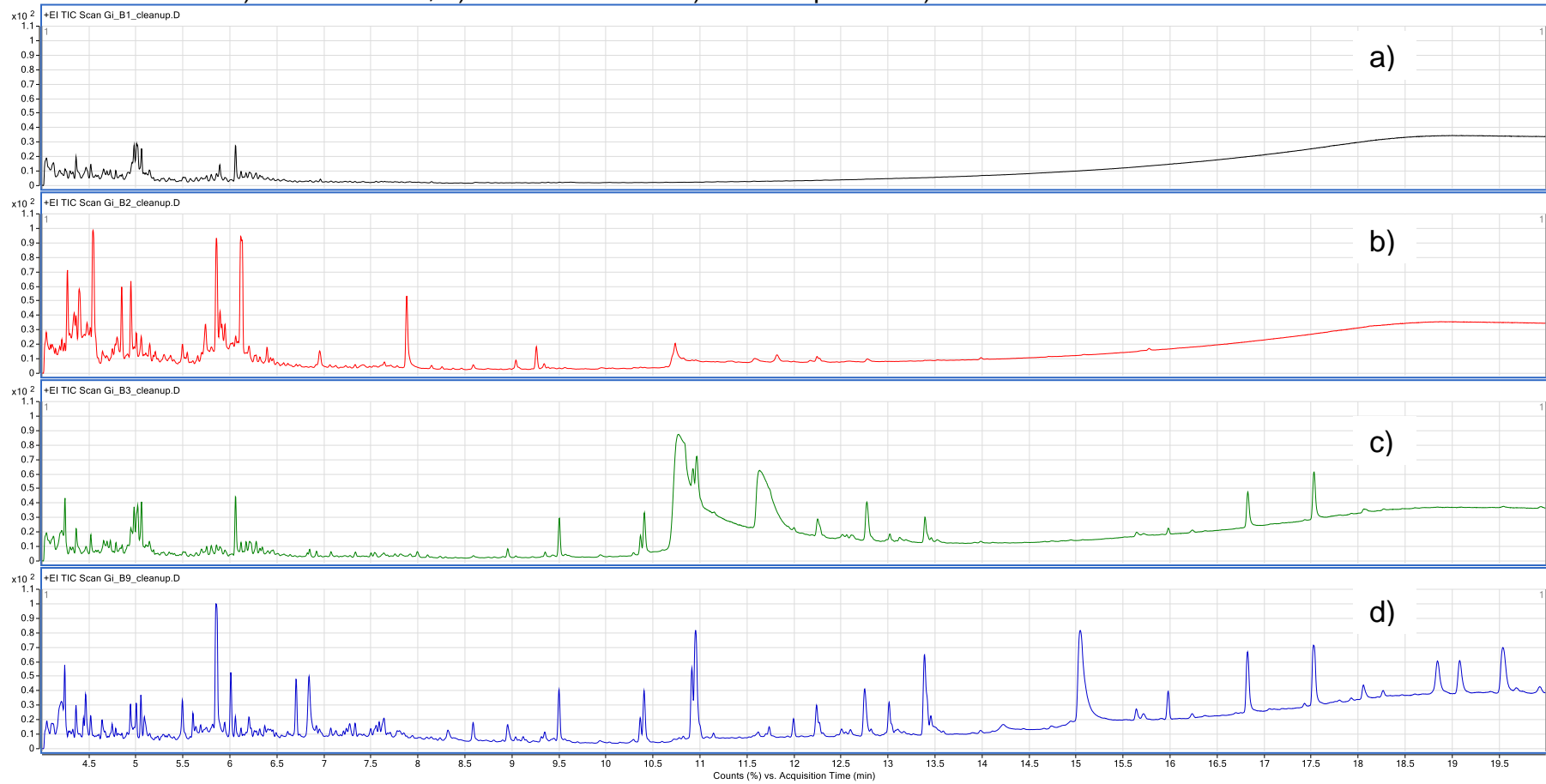
4.4.4 Utilização de diferentes sorventes na etapa de limpeza

Dos doze ensaios realizados comparando diferentes sorventes e proporções para limpeza do extrato da matriz quatro eram cartuchos comumente utilizados em extração em fase sólida (SPE), um era um produto comercial pré-pesado (ensaio 4) e os demais foram pesados no laboratório.

Em termos de velocidade do preparo de amostra seria interessante que os testes em cartucho ou a proporção comercial dessem melhores resultados, visto que, não haveria a necessidade de pesá-los no laboratório. A Figura 26

compara os extratos da matriz analisados no modo varredura para os ensaios de limpeza com SPE.

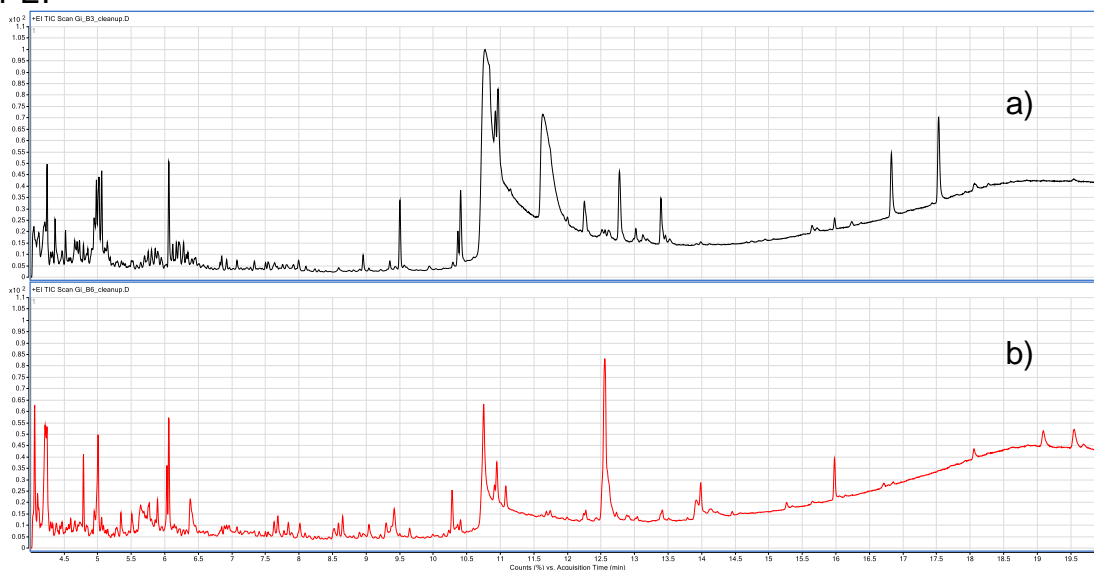
Figura 26 - Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz com os cartuchos de SPE: a) Carvão+ PSA, b) STRATA SDB-L c) EMR Captiva® e d) Amino.



Percebe-se que a melhor limpeza do extrato ocorreu com o ensaio 1. Nesse, são utilizados o sorvente PSA, característico do método QuEChERS original e o sorvente carbono grafitizado (GCB), característico para remoção de pigmentos, principalmente clorofila. Esse seria a combinação ideal para limpeza do extrato. Porém, a estrutura plana do GCB interage fortemente com compostos aromáticos planares, como é o caso do tiabendazol, causando sua retenção (Yee Claus, 2018). Por isso, para esse ensaio, observou-se uma fraca recuperação dos analitos (Figura 32).

Ao se comparar o sorvente na forma SPE Captiva EMR[®] Lipid com sua variação dispersiva (d-SPE), espera-se encontrar resultados muito semelhantes, ou ainda, que o cartucho tenda a ser mais eficiente na remoção dos coextrativos, visto que, atua também como barreira física à passagem de interferentes. Por conseguinte, o SPE EMR[®] não necessita de ativação e nem da etapa de polimento com Polish[®], o que reduz ainda mais o tempo do preparo de amostra (Zhao e Lucas, 2017). Todavia, os resultados de varredura contrapuseram essas suposições. A Figura 27 mostra a comparação entre a utilização dessas duas formas de sorvente. É visível a diferença entre os resultados em termos de coextrativos (Figura 32), no entanto, o número de analitos recuperados foi o mesmo para os dois ensaios.

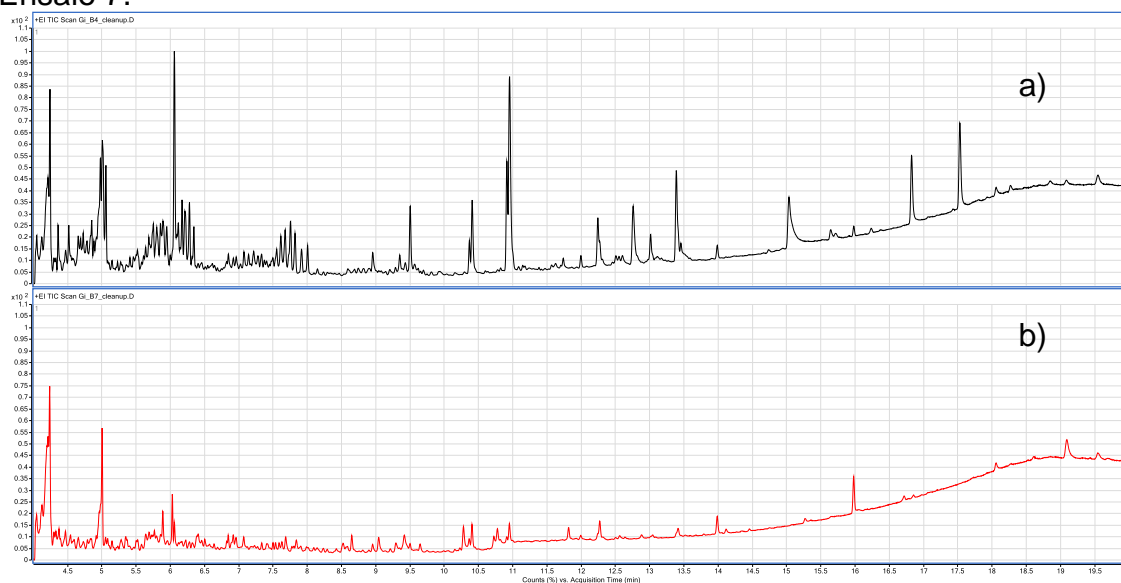
Figura 27–Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz comparando: a) EMR SPE e b) EMR d-SPE.



Fonte: GC-MS.

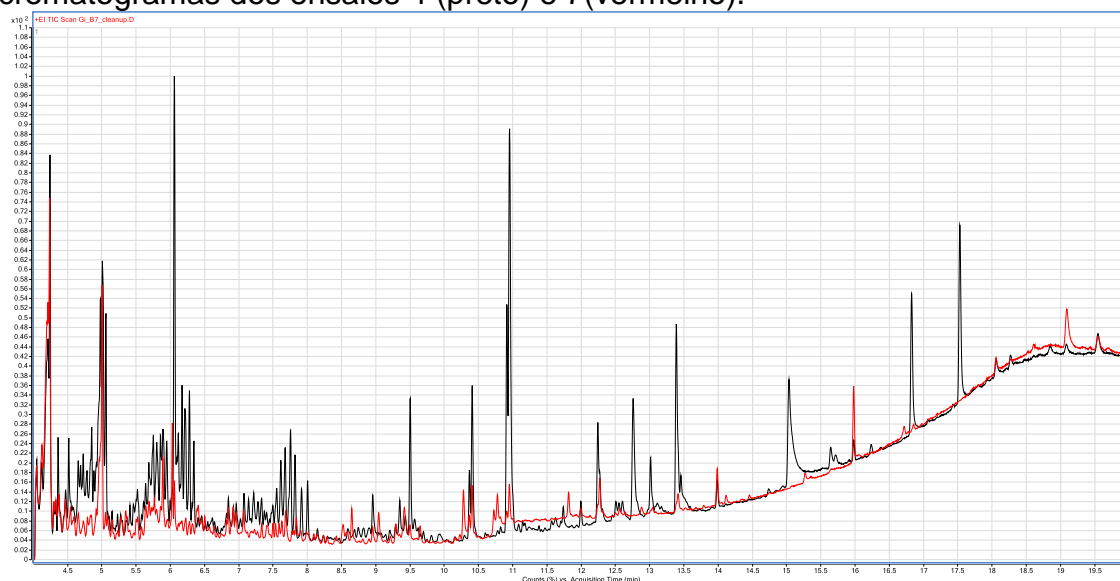
Comparação semelhante pode ser realizada entre os ensaios 4 e 7 (Figura 28 e 29). Ambos são uma mistura dos sorventes C18, PSA e agente secante $MgSO_4$. O ensaio 4 é a mistura comercial, na proporção de 1:1 (C18:PSA) e é indicada para ser usada com 1 mL de extrato. Já o ensaio 7 usa a proporção de 5:1 (C18:PSA) e também é indicado para ser usado com 1 mL de extrato. Segundo LEHOTAY e colaboradores (2010), a utilização de C18 diminui os coextrativos da matriz, principalmente compostos altamente lipofílicos, quando usado na etapa de limpeza dispersiva. Assim como no caso do sorvente EMR Lipid, não houve variação no número médio de compostos recuperados para os dois ensaios (Figura 32).

Figura 28 - Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz comparando: a) Ensaio 4 SPE e b) Ensaio 7.



Fonte: GC-MS

Figura 29 - Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz da figura 29, sobrepondo os cromatogramas dos ensaios 4 (preto) e 7(vermelho).



Fonte: GC-MS

Os ensaios que apresentaram melhor recuperação dos compostos avaliados no método desenvolvido foram o S8, o S10 e o S11, que utilizaram Florisil® ativado, sílica gel ativada e alumina neutra, respectivamente. Esses testes apresentaram recuperação média dos analitos bem semelhante: 69, 70 e 71, concomitantemente (Figura 32). Em relação à remoção dos coextrativos o ensaio com alumina foi o melhor (Figura 30).

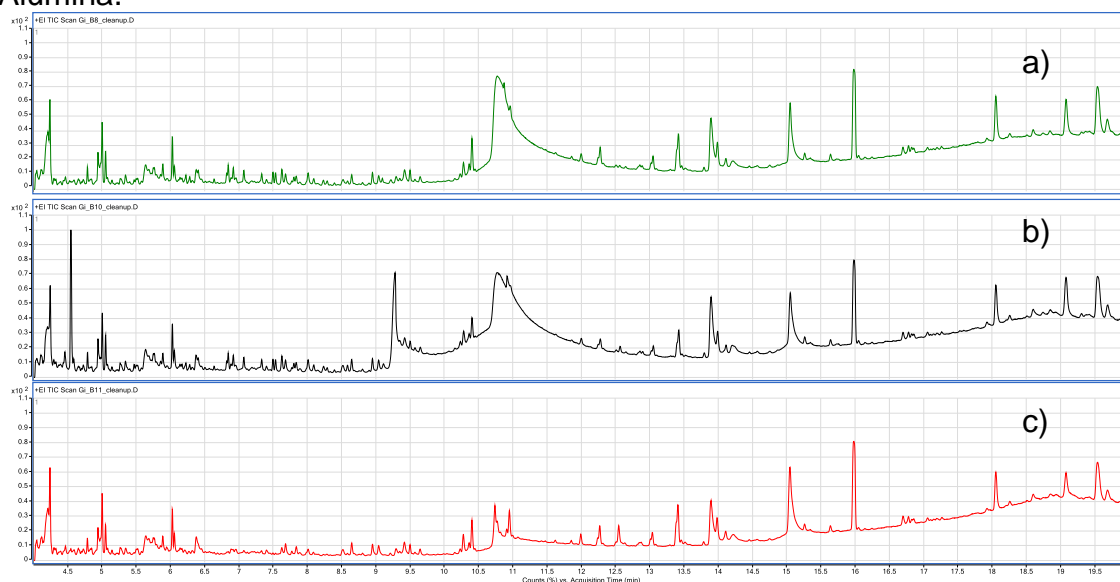
Florisil® é o nome comercial dado ao silicato de magnésio ((MgO)SiO₂) com propriedades básicas (alcalinas) (pH varia de 8,5 a 9,5 numa proporção 1:10 (m/v)). É um sorvente comumente usado para a limpeza de extratos na determinação resíduos de agrotóxicos. Tem aplicações similares para uso com gorduras, óleos e ceras. Segundo Collins, Braga e Bonato (2006) esse sorvente apresenta propriedades intermediárias entre a alumina e a sílica.

A sílica (SiO₂) (ensaio 10) é o sorvente mais usado em cromatografia. Também é conhecida como ácido silício amorfo, pois apresenta caráter fracamente ácido. Ela é usada na separação de compostos lipofílicos como cetonas, aldeídos e ácidos graxos.

A alumina (Al₂O₃) (ensaio 11), ao contrário da sílica, tem características alcalinas, porém, pode ser preparada como ácida e neutra também. Costuma

ser empregada na separação de compostos lipofílicos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

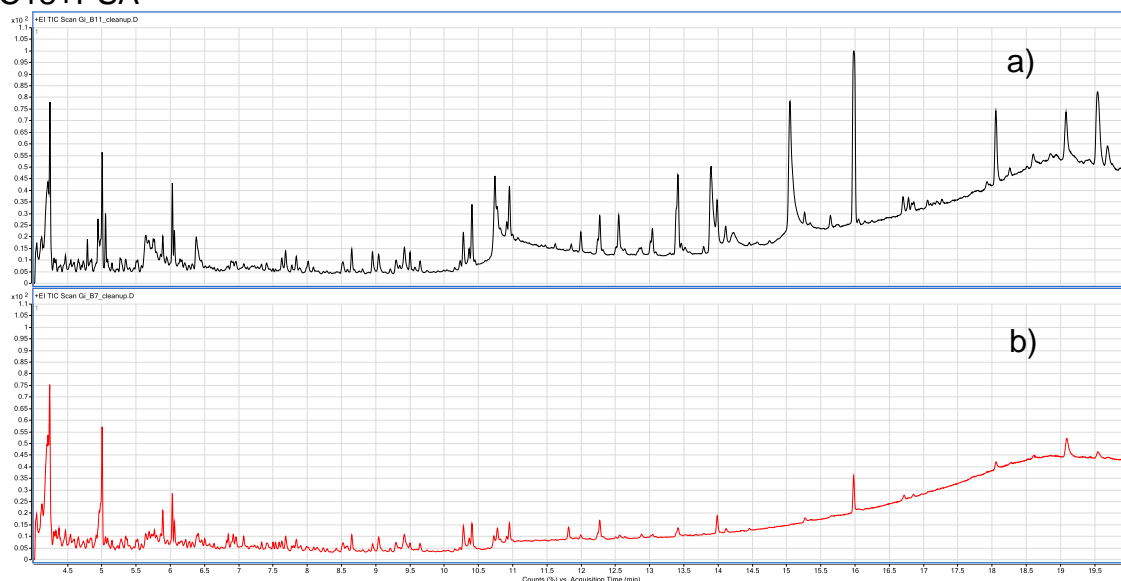
Figura 30 - Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz comparando: a) Florisil[®], b) Sílica e c) Alumina.



Fonte: GC-MS

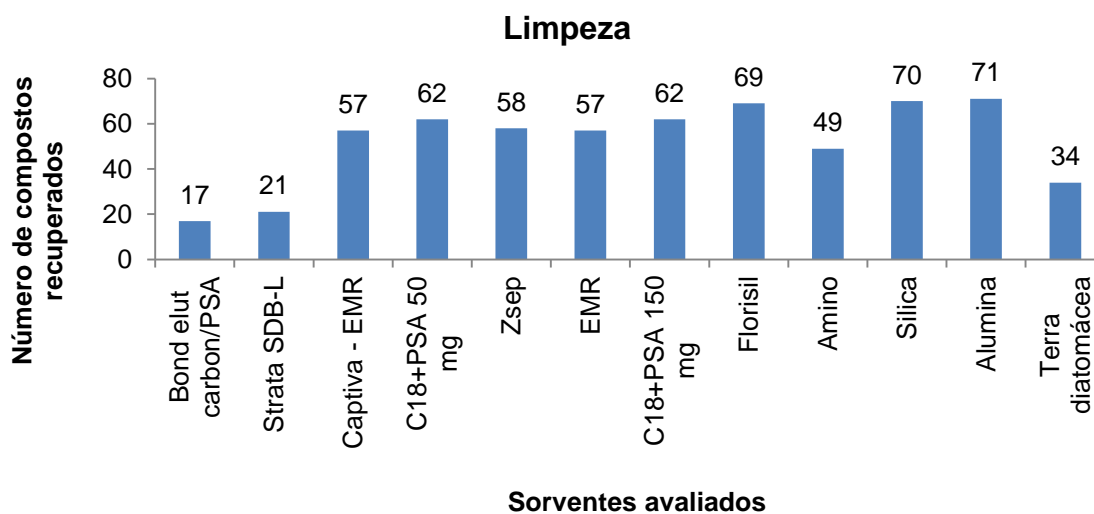
Tentando conciliar a melhor limpeza com a melhor recuperação de analitos compararam-se os ensaios 7 e 11 (Figura 31). A melhor limpeza foi com a proporção 5:1 (C18:PSA), já a melhor recuperação dos analitos foi com o sorvente alumina. No entanto, percebeu-se que o composto espinetoram não apresentou boas recuperações para os ensaios com o sorvente C18, possivelmente devido à sua estrutura. Assim, o ensaio com alumina foi considerado para a validação do método analítico proposto.

Figura 31 - Cromatogramas no modo varredura obtidos por GC-MS para os ensaios de limpeza do extrato da matriz comparando: a) alumina e b) C18+PSA



Fonte: GC-MS

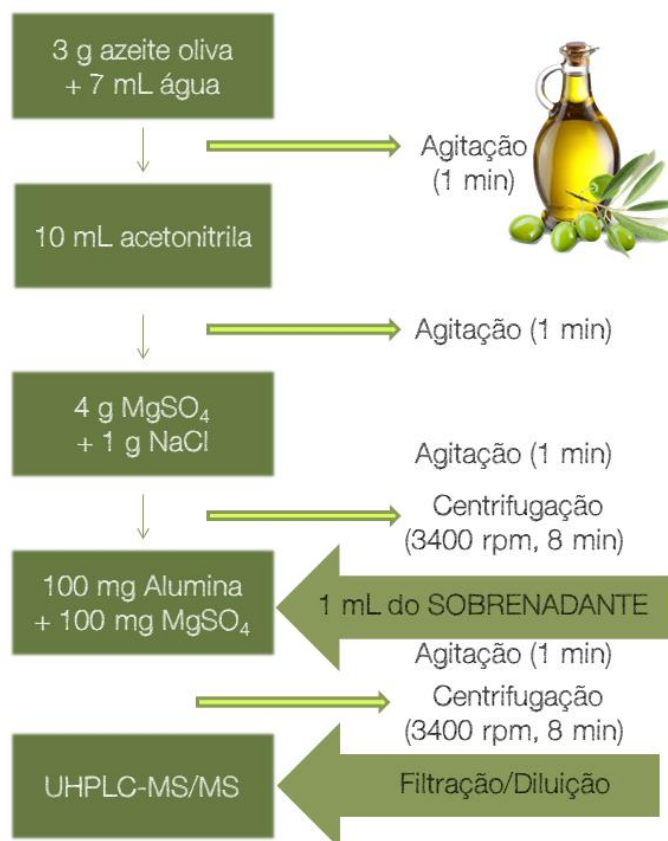
Figura 32 - Comparação em número de compostos recuperados entre os sorventes de limpeza avaliados.



Fonte: o autor.

Assim, o método proposto está descrito na Figura 33.

Figura 33 - Fluxograma do preparo de amostra para azeite de oliva.



Fonte: o autor.

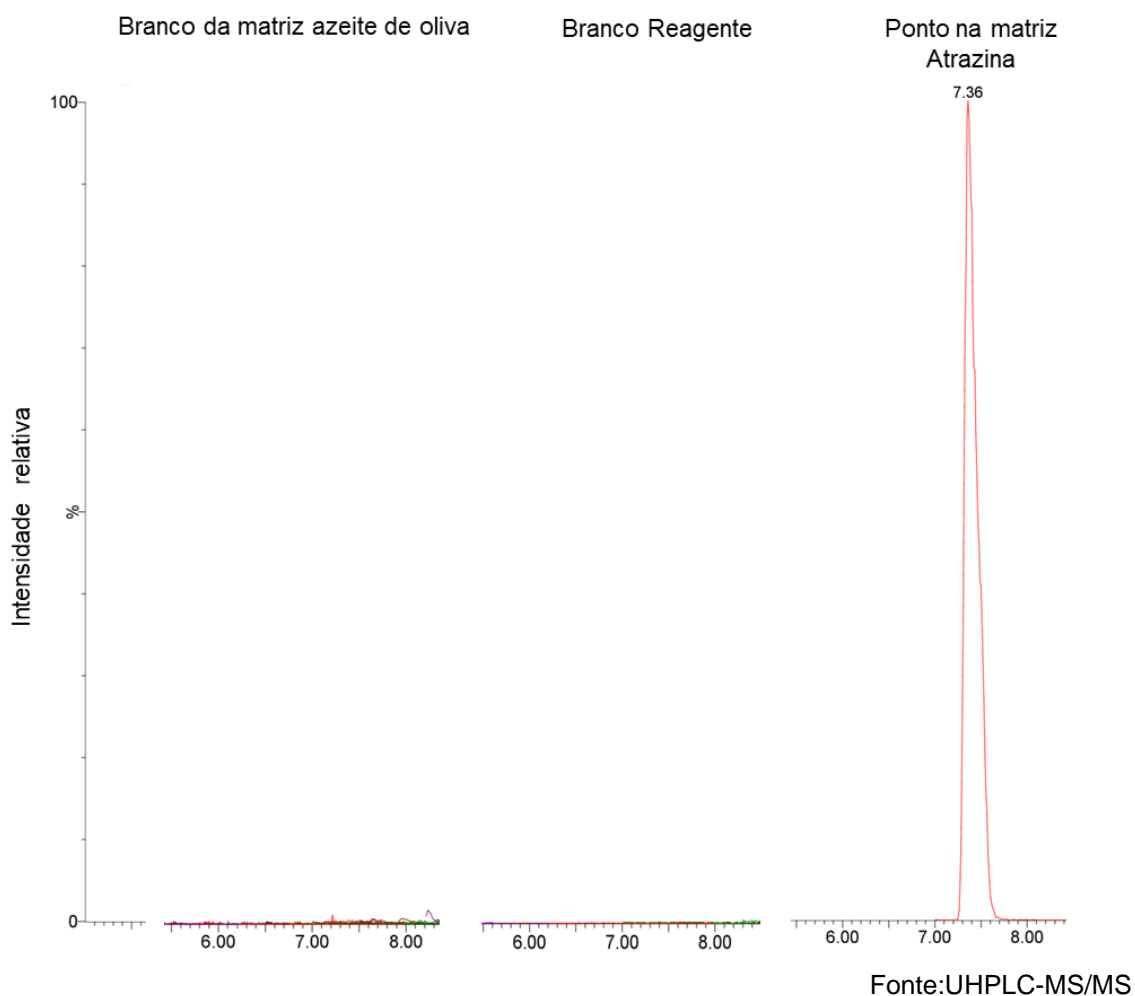
4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA.

O preparo de amostra utilizado para a validação do método seguiu o procedimento descrito na Figura 33. A análise cromatográfica foi realizada por UHPLC-MS/MS. Os compostos determinados estão descritos no item 3.2. Segundo a SANTE (2017), quando se tem mais de uma matriz do mesmo grupo de subprodutos, como no caso azeitonas e azeite de oliva, é possível utilizar apenas uma delas para a validação, desde que seja representativa. No entanto, optou-se por realizar todos os critérios de validação para as duas matrizes. Iniciou-se com a validação do método para a matriz azeite de oliva e posteriormente ampliou-se para a matriz azeitona. A ampliação do escopo para azeitonas está descrita no item 4.6.

4.5.1 Seletividade e sensibilidade

A seletividade do método foi assegurada comparando o branco da matriz azeite de oliva, com o branco reagente e o branco fortificado na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Não foram detectados interferentes/coextrativos co-eluíndo com os analitos de interesse (Figura 34).

Figura 34–Cromatogramas do branco da matriz em azeite de oliva, branco reagente e ponto $20 \mu\text{g L}^{-1}$ na matriz para o composto atrazina mostrando a seletividade e sensibilidade do método proposto obtidos no modo SRM por UHPLC-MS/MS.



4.5.2 Linearidade e curva analítica

A faixa linear foi avaliada para cada analito em triplicata preparando-se a curva na matriz (isenta dos analitos de interesse) nos pontos 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Assegurou-se a linearidade do método proposto pela aplicação do método dos mínimos quadrados – caso linear, conforme indicado pelo Guia para tratamento estatístico da validação analítica (2017).

Nem todos os compostos apresentaram faixa linear de 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Alguns apresentaram linearidade apenas acima de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para esses, foram feitos dois pontos adicionais na precisão intermediária (30 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$) a fim de confirmar se a linearidade era mantida, pois, de acordo com a SANTE (2017) no mínimo cinco pontos são necessários para assegurar a linearidade da curva analítica. O coeficiente de determinação obtido pela regressão linear do modelo dos mínimos quadrados foi maior que 0,99 para todos os compostos validados.

A faixa de trabalho linear e o r^2 , bem como os coeficientes de inclinação e intercepção para os compostos validados são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Principais parâmetros de validação avaliados para o método proposto para a matriz azeite de oliva.

Analito	Efeito matriz	LOQ mg kg ⁻¹	Faixa linear µg L ⁻¹	r ²	Coeficiente de inclinação A	Coeficiente de interceptação B	Ensaio de repetibilidade Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)				Ensaio de prec. interm. Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	
							0,5	10	20	50	10	20
Acefato	10,0	0,170	10 - 50	1,000	18130312,3	45314041,2		60 ±12	70 ±10	75 ±8	93 ±12	91 ±12
Acetamiprido	-1,9	0,008	0,5 - 50	0,997	59074680,5	47780127,9	89 ± 4	102 ±8	104 ±8	98 ±6	107 ±5	99 ±1
Aldicarbe	-8,7	0,008	0,5 - 51	1,000	16759029,5	-213353,9	95 ± 8	96 ±3	96 ±3	94 ±5	87 ±4	95 ±3
Atrazina	-13,0	0,008	0,5 - 52	1,000	54291101,1	10185757,0	97 ± 16	82 ±4	83 ±1	81 ±2	87 ±1	87 ±1
Azinfós	7,7	0,008	0,5 - 53	0,999	5538851,1	823574,6	105 ± 7	93 ±8	94 ±6	92 ±6	88 ±5	93 ±13
Azinfós metílico	1,1	0,008	0,5 - 54	0,998	5318027,0	1005601,9	85 ± 14	92 ±7	91 ±5	92 ±3	101 ±4	96 ±6
Azoxistrobina	-1,3	0,008	0,5 - 55	1,000	93600545,8	6024791,7	75 ± 7	95 ±4	95 ±3	92 ±3	99 ±3	105 ±3
Bentazona	-24,9	0,170	10 - 50	1,000	4190919,5	-2394509,5		93 ±7	93 ±4	89 ±2	98 ±3	96 ±3
Bitertanol	42,5	0,008	0,5 - 55	0,999	5281967,8	1479657,7	96 ± 17	98 ±16	97 ±9	92 ±9	98 ±17	96 ±17
Boscalida	2,6	0,008	0,5 - 55	1,000	20772607,5	4172075,8	86 ± 9	89 ±6	92 ±2	89 ±3	94 ± 1	97 ±1
Buprofezina	-3,8	0,008	0,5 - 55	1,000	60496453,0	12618463,6	71 ± 16	61 ±18	60 ±18	65 ±6	72 ±5	72 ±5
Carbaril	0,1	0,008	0,5 - 55	1,000	24903890,1	4044430,7	82 ± 5	92 ±3	93 ±4	88 ±2	94 ±2	93 ±2
Carbendazim	-13,5	0,008	0,5 - 55	0,999	129156133,5	1736136824	89 ± 6	94 ±8	97 ±8	95 ±6	104 ±7	104 ±5
Carbofuran-3-OH	0,4	0,008	0,5 - 55	0,999	16640555,8	6349189,3	111 ± 11	100 ±8	102 ±7	96 ±6	99 ±5	98 ±3
Carboxina	-6,1	0,008	0,5 - 55	0,998	95886708,1	34469164,6	90 ± 8	81 ±5	82 ±4	79 ±2	84 ±5	85 ±4
Ciproconazol	-0,1	0,008	0,5 - 55	1,000	29792752,4	4411390,0	83 ± 18	91 ±4	91 ±3	88 ±4	84 ±5	96 ±4
Clomazona	-6,5	0,008	0,5 - 55	1,000	94894877,1	21324853,4	70 ± 9	87 ±3	88 ±2	85 ±2	90 ±2	91 ±4
Clorpirifós	20,1	0,008	0,5 - 55	1,000	8146627,2	13976313,2	95 ± 20	58 ±6	58 ±11	63 ±3	82 ±6	77 ±3
Clorpirifós metílico	-2,0	0,008	0,5 - 55	1,000	4762612,3	-159339,3	73 ± 13	69 ±9	66 ±14	69 ±1	76 ±8	83 ±6

Analito	Efeito matriz	LOQ mg kg ⁻¹	Faixa linear µg L ⁻¹	r ²	Coeficiente de inclinação A	Coeficiente de intercepção B	Ensaio de repetibilidade Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)				Ensaio de prec. interm. Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	
							0,5	10	20	50	10	20
							Cresoxim-metílico	4,6	0,008	0,5 - 55	1,000	9466132,6
Deltametrina	290,7	0,170	10 - 50	1,000	1987890,7	2008357,0		38 ± 11	48 ± 13	58 ± 11	79 ± 9	69 ± 8
Diclorvós	-0,9	0,008	0,5 - 50	1,000	18048230,0	10478925,4	86 ± 7	88 ± 2	92 ± 2	91 ± 4	94 ± 5	92 ± 1
Difenoconazol	18,1	0,008	0,5 - 55	1,000	13102056,1	2581841,7	94 ± 17	88 ± 12	91 ± 10	90 ± 7	93 ± 7	96 ± 3
Diflubenzuron	5,7	0,008	0,5 - 55	1,000	13758035,7	4142280,1	72 ± 14	92 ± 6	90 ± 5	87 ± 4	87 ± 5	95 ± 6
Dimetoato	-3,4	0,008	0,5 - 55	0,997	30249023,3	19764673,6	68 ± 10	100 ± 8	103 ± 7	99 ± 6	100 ± 6	98 ± 2
Diuron	-4,9	0,008	0,5 - 55	0,999	38739208,5	6664340,8	75 ± 6	89 ± 4	90 ± 3	86 ± 3	91 ± 3	96 ± 4
Epoxiconazol	-3,2	0,008	0,5 - 55	1,000	37254529,7	8041892,2	97 ± 8	94 ± 4	94 ± 4	94 ± 4	90 ± 5	98 ± 3
Espinosad A	1,7	0,008	0,5 - 55	1,000	22019111,1	4186530,7	106 ± 9	79 ± 17	85 ± 15	85 ± 8	97 ± 5	110 ± 10
Espinosad D	30,4	0,008	0,5 - 55	0,999	5861281,1	1352941,4	119 ± 17	88 ± 16	87 ± 20	88 ± 11	99 ± 9	100 ± 9
Etofenprox	183,6	0,008	0,5 - 55	0,999	9427258,4	3230057,0	112 ± 18	33 ± 29	37 ± 29	45 ± 2	55 ± 6	53 ± 2
Famoxadona	25,9	0,008	0,5 - 55	1,000	5453115,4	262595,5	118 ± 22	92 ± 19	91 ± 18	92 ± 5	102 ± 5	103 ± 9
Fenpiroximato	63,6	0,008	0,5 - 55	1,000	41178889,4	8943884,4	85 ± 10	64 ± 7	65 ± 8	73 ± 6	81 ± 8	79 ± 4
Fenpropimorfe	-0,1	0,008	0,5 - 55	1,000	73008666,3	3756794,2	70 ± 20	35 ± 4	34 ± 20	36 ± 6	43 ± 5	47 ± 8
Fentiona	-12,0	0,008	0,5 - 55	0,999	14954755,6	3712408,7	78 ± 16	78 ± 7	78 ± 10	76 ± 4	88 ± 4	89 ± 8
Fluquiconazol	-6,9	0,008	0,5 - 55	1,000	6269990,5	261355,2	76 ± 20	87 ± 7	90 ± 5	86 ± 4	90 ± 5	95 ± 2
Flutriafol	-11,6	0,008	0,5 - 55	1,000	6243077,2	-783070,3	112 ± 14	94 ± 7	96 ± 3	92 ± 3	100 ± 9	103 ± 3
Forato	-10,9	0,008	0,5 - 55	1,000	15311572,6	1926466,9	105 ± 18	70 ± 4	68 ± 9	67 ± 5	83 ± 1	77 ± 2
Fosmete	2,9	0,008	0,5 - 55	1,000	55777264,4	14474857,0	116 ± 7	94 ± 2	95 ± 2	92 ± 3	97 ± 3	96 ± 1
Imazalil	-12,0	0,008	0,5 - 55	0,999	24685784,9	2391091,8	118 ± 19	74 ± 9	74 ± 9	69 ± 4	83 ± 18	87 ± 13

Analito	Efeito matriz	LOQ mg kg ⁻¹	Faixa linear µg L ⁻¹	r ²	Coeficiente de inclinação A	Coeficiente de intercepção B	Ensaio de repetibilidade Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)				Ensaio de prec. interm. Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	
							0,5	10	20	50	10	20
							Imidacloprido	-3,3	0,008	0,5 - 55	0,998	6885229,1
Malationa	-3,6	0,008	0,5 - 55	1,000	17321891,2	2614138,2	86 ± 21	94 ± 10	94 ± 4	91 ± 6	92 ± 6	104 ± 9
Metamidofós	4,2	0,008	0,5 - 50	1,000	24894711,7	3113838,6	109 ± 9	77 ± 4	80 ± 4	78 ± 4	82 ± 2	80 ± 5
Metidationa	-5,7	0,008	0,5 - 55	0,999	22056452,2	2788656,5	86 ± 20	86 ± 6	87 ± 4	84 ± 3	94 ± 4	97 ± 7
Metiocarbe	-1,3	0,008	0,5 - 55	1,000	84307327,8	22860727,0	96 ± 7	91 ± 3	92 ± 2	88 ± 3	92 ± 1	96 ± 3
Metiocarbe sulfona	0,9	0,008	0,5 - 55	0,996	32709443,3	30538681,1	102 ± 15	98 ± 8	92 ± 12	87 ± 10	75 ± 18	69 ± 20
Metiocarbe sulfoxido	-4,2	0,008	0,5 - 55	0,998	52688277,3	28306054,5	89 ± 8	98 ± 8	98 ± 8	96 ± 8	95 ± 6	91 ± 4
Metomil	0,4	0,008	0,5 - 55	0,999	6471125,2	1107812,9	95 ± 14	98 ± 8	102 ± 9	100 ± 6	104 ± 7	104 ± 4
Metsulfuron metílico	27,2	0,008	0,5 - 55	0,997	21328703,5	10692510,8	75 ± 6	78 ± 11	80 ± 10	78 ± 7	83 ± 1	81 ± 5
Pendimetalina	25,9	0,008	0,5 - 55	1,000	1939998,0	491307,0	87 ± 5	51 ± 2	59 ± 12	58 ± 5	68 ± 1	69 ± 4
Picoxistrobina	-2,1	0,008	0,5 - 55	1,000	39540222,5	4701322,7	79 ± 15	95 ± 10	94 ± 6	94 ± 5	96 ± 7	103 ± 8
Piraclostrobina	-0,9	0,008	0,5 - 55	1,000	29407649,7	8932000,5	103 ± 21	85 ± 14	86 ± 12	88 ± 6	87 ± 10	97 ± 9
Pirazofós	32,6	0,008	0,5 - 55	0,999	31885694,6	21126586,9	76 ± 11	91 ± 10	91 ± 6	89 ± 8	90 ± 14	95 ± 9
Pirimicarbe	-6,7	0,008	0,5 - 55	0,999	40662282,4	11000692,5	95 ± 4	88 ± 5	90 ± 5	87 ± 4	92 ± 4	91 ± 4
Pirimifós metílico	-8,7	0,008	0,5 - 55	1,000	50890189,7	5702265,0	73 ± 15	76 ± 8	74 ± 9	75 ± 4	83 ± 6	83 ± 7
Piriproxifen	48,9	0,008	0,5 - 55	1,000	14165970,2	2592049,5	83 ± 22	57 ± 7	56 ± 8	64 ± 6	69 ± 2	70 ± 6
Procimidona	-4,5	0,170	10 - 50	1,000	2598491,0	2364832,7	96 ± 8	98 ± 10	90 ± 10	86 ± 9	94 ± 15	89 ± 9
Procloraz	-14,5	0,008	0,5 - 55	0,997	1235998,3	-410785,1	84 ± 20	86 ± 12	88 ± 5	82 ± 5	86 ± 6	107 ± 6
Profenofós	-5,7	0,008	0,5 - 55	1,000	25468847,9	3705426,9	73 ± 17	69 ± 12	69 ± 10	72 ± 5	82 ± 6	82 ± 4
Propargito	60,0	0,008	0,5 - 55	1,000	26812826,2	7534714,7	78 ± 10	68 ± 6	69 ± 10	78 ± 4	88 ± 3	88 ± 3

Analito	Efeito matriz	LOQ mg kg ⁻¹	Faixa linear µg L ⁻¹	r ²	Coeficiente de inclinação A	Coeficiente de intercepção B	Ensaio de repetibilidade Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)				Ensaio de prec. interm. Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	
							0,5	10	20	50	10	20
							Propiconazol	8,7	0,008	0,5 - 55	0,999	17900793,4
Propizamida	-3,6	0,008	0,5 - 55	0,999	13816224,0	3489981,8	78 ± 13	90 ± 4	91 ± 5	87 ± 2	89 ± 4	98 ± 5
Simazina	-5,8	0,008	0,5 - 55	0,999	20928785,4	4543035,4	103 ± 13	85 ± 4	86 ± 4	83 ± 2	88 ± 3	86 ± 2
Tebuconazol	-0,1	0,008	0,5 - 55	0,999	37114096,2	622535643,5	104 ± 7	99 ± 4	94 ± 4	92 ± 6	89 ± 8	100 ± 4
Terbutilazina	-8,0	0,008	0,5 - 55	1,000	95826544,1	19890427,2	94 ± 10	78 ± 6	79 ± 4	77 ± 3	83 ± 3	87 ± 4
Tetraconazol	-7,0	0,008	0,5 - 55	1,000	22018253,2	5819503,2	91 ± 12	98 ± 5	98 ± 4	94 ± 3	95 ± 4	98 ± 4
Tiabendazol	-4,5	0,008	0,5 - 55	0,999	71361026,4	23997171,3	80 ± 3	91 ± 8	93 ± 9	91 ± 9	96 ± 7	94 ± 2
Tiacloprido	-1,9	0,008	0,5 - 55	0,998	117480110,6	75219976,7	77 ± 6	98 ± 8	103 ± 8	99 ± 6	98 ± 11	98 ± 2
Tiametoxam	-2,3	0,008	0,5 - 55	0,998	15273128,6	10633471,4	70 ± 10	101 ± 6	102 ± 6	95 ± 3	103 ± 5	103 ± 2
Tiodicarbe	5,3	0,008	0,5 - 55	0,998	11647690,2	2326137,4	69 ± 8	97 ± 6	97 ± 6	93 ± 3	101 ± 5	99 ± 3
Tiofanato metílico	-9,9	0,008	0,5 - 55	0,999	44167247,0	10505460,6	102 ± 12	81 ± 6	86 ± 4	83 ± 5	79 ± 18	87 ± 9
Triadimefon	7,4	0,008	0,5 - 55	1,000	15973477,6	785275,9	72 ± 22	91 ± 9	92 ± 5	89 ± 6	91 ± 6	101 ± 3
Triadimenol	9,7	0,170	10 - 50	1,000	6844007,0	7068727,5		92 ± 8	90 ± 4	93 ± 7	86 ± 7	94 ± 6
Trifloxistrobina	-9,5	0,008	0,5 - 55	1,000	27299712,6	119295539,2	89 ± 7	85 ± 13	88 ± 11	92 ± 6	99 ± 4	100 ± 9
Linurom d6 (PC)	15,8	0,008	0,5 - 55	0,998	679744,3	20135,6	88 ± 13	100 ± 5	99 ± 20	79 ± 9	83 ± 21	88 ± 7
Atrazina-d5 (PC)	12,2	0,008	0,5 - 55	1,000	48739369,3	-4154486,4	90 ± 3	87 ± 5	88 ± 3	87 ± 4	85 ± 1	88 ± 3
Bifentrina	120,1	0,008	0,5 - 55	0,999	3476640,0	1390714,0	116 ± 22	30 ± 24	34 ± 27	42 ± 5	52 ± 6	54 ± 6
Espinetoran	29,1	0,008	0,5 - 55	1,000	11883417,0	2267217,0	101 ± 18	86 ± 15	84 ± 19	85 ± 10	96 ± 8	103 ± 4
Etefon	1,7	0,008	0,5 - 55	1,000	43136375,8	4334713,5	112 ± 8	90 ± 2	92 ± 2	89 ± 2	94 ± 2	94 ± 3
Fenoxicarbe	0,6	0,008	0,5 - 55	1,000	36792643,7	9477821,4	111 ± 14	89 ± 5	90 ± 6	88 ± 4	94 ± 8	96 ± 2

Analito	Efeito matriz	LOQ mg kg ⁻¹	Faixa linear μg L ⁻¹	r ²	Coeficiente de inclinação	Coeficiente de intercepção	Ensaio de repetibilidade Recuperação ± RSD Nível de fortificação (μg L ⁻¹)				Ensaio de prec. interm. Recuperação ± RSD Nível de fortificação (μg L ⁻¹)	
					A	B	0,5	10	20	50	10	20
Flumioxazin	-5,4	0,008	0,5 - 55	1,000	1868148,671	31780,76086	112 ± 20	101 ± 7	95 ± 3	91 ± 2	95 ± 12	93 ± 14

PC: Padrão de Controle.

Fonte: o autor.

4.5.3 Limites de detecção e quantificação

O LOQ foi considerado como sendo o menor nível de fortificação no qual a precisão e a exatidão ficaram dentro dos limites aceitáveis (recuperação entre 70 e 120% e RSD <20%) (ANVISA, 2017, SANTE, 2017). O limite de detecção (LOD) foi calculado dividindo-se o valor do LOQ por 3,33.

O LOQ do método levou em consideração os fatores de diluição aos quais a amostra foi submetida. Inicialmente na extração um fator de 3,33 e na diluição para análise cromatográfica um fator de 5 vezes. Assim, para a matriz azeite de oliva o fator de diluição do método foi de 16,65 vezes, ou seja, para uma concentração no instrumento de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, tem-se na amostra $8,3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Assim, o LOQ_m variou de 8,3 a $166,5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Já o LOD_m variou de 2,5 a $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A Anvisa só estabelece limite máximo de resíduo para espinetoram (LMR= $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$) e fenproxicato (LMR = $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$). Já o Codex Alimentarius estabelece LMR para outros agrotóxicos (Tabela 5). Só não foram atendidos no método proposto os compostos: cialotrina, cipermetrina, permetrina (compostos tipicamente de GC) e paraquat (composto altamente polar, que não costuma ser determinado em análises multirresíduo). Os demais agrotóxicos permitidos pelo Codex estão contemplados no método proposto e apresentam LOD e LOQ abaixo dos LMR estabelecidos.

4.5.4 Exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Para avaliar a precisão do método foram realizados ensaios de recuperação em 4 níveis de fortificação ($0,5, 10, 20$ e $50 \mu\text{g L}^{-1}$), cada nível com 6 réplicas. Os resultados de recuperação para os compostos avaliados bem como os respectivos RSDs são apresentados na Tabela 15. Os critérios de aceitação foram baseados na faixa de aceitação entre 70 e 120% de recuperação e RSD <20% (SANTE, 2017).

A precisão intermediária foi avaliada uma semana depois da validação, utilizando-se um lote diferente do solvente extrator e diferentes analistas para

execução do ensaio. Os ensaios de recuperação foram realizados em dois níveis de fortificação (10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$), cada nível com 6 réplicas. Os resultados de recuperação e RSD também estão destacados na Tabela 15.

O agrotóxico lufenurom apresentou r^2 de 0,905, com boas recuperações nas concentrações 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Porém, o RSD% entre as recuperações esteve muito acima de 20%. Assim, esse composto foi excluído do método desenvolvido. Etiona e carbossulfam não apresentaram boa linearidade e r^2 , e não foram incluídos na validação. Os compostos bifentrina, 2,4-D, disulfoton, etofenprox e piriproxifen apresentaram boa linearidade e r^2 , no entanto, todos apresentaram baixas recuperações independentemente do nível de fortificação avaliado e também RSD muito acima de 20%. Por isso esses compostos também foram excluídos do método.

Já os agrotóxicos buprofezina, chlorpirifos, chlorpirifós metílico, deltametrina, fenpiroximato, fenpropimorfe, pendimethalina, piriproxifen, profenofos e propargito apresentaram baixas recuperações, porém RSD <20%. As diretrizes sobre os critérios de desempenho para os métodos de análise para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (FAO, 2017) afirma que, em certos casos, recuperações abaixo da faixa podem ser aceitáveis, desde que sejam consistentes, ou seja, demonstrando boa precisão (RSD <20%).

Outro fator que explica a baixa recuperação dos analitos acima citados é sua baixa solubilidade em água, podendo ser considerados compostos lipofílicos. É sabido que os agrotóxicos lipofílicos tendem a permanecer na matriz lipofílica quando extraídos com acetonitrila, o que resulta em uma menor recuperação no extrato da matriz (LEHOTAY e MASÒTOVSKÁ, 2005). Nesse sentido, esses compostos, nesse método, sempre apresentarão uma recuperação abaixo da esperada. Considerando-se essa hipótese, esses compostos foram mantidos no método validado.

Pela avaliação dos padrões de controle linurom-d6 e atrazina-d5 pode-se perceber que não ocorreram perdas durante a extração em nenhuma etapa da validação do método. Ainda, o padrão interno trifenilfosfato foi usado apenas para verificação da manutenção do sinal analítico do instrumento, não sendo necessária sua utilização para fins de correção na etapa de quantificação.

4.5.5 Efeito matriz

O efeito matriz foi calculado levando-se em consideração a inclinação das curvas analíticas no extrato da matriz e no solvente (acetonitrila). Pode-se dizer que analitos que apresentam resultados de efeito matriz superior a 20% sofrem efeito significativo da matriz sob sua resposta cromatográfica (CARDOSO, NÓBREGA e ABRANTES, 2008, SANTE 2017).

Para efeito matriz superior a 20% as curvas preparadas em solvente não são adequadas para determinação dos analitos na matriz em questão, já que são fontes de erro quantitativos bastante importantes (SANTE, 2017). Quanto menor a concentração dos analitos, mais significativo é o efeito da matriz sobre eles. Percebeu-se que o efeito matriz foi significativo para 15 analitos na matriz azeite de oliva (Tabela 15).

4.5.6 Robustez

Durante os processos de validação e precisão intermediária do método proposto avaliou-se o parâmetro robustez pelo preparo de fase móvel, limpeza da fonte de ionização e troca de lote do solvente extrator (acetonitrila). Ainda entre os ensaios de validação e precisão intermediária houve a troca do analista que executou os procedimentos. Para finalizar os ensaios de robustez a solução contendo os agrotóxicos avaliados no método foi preparada novamente para os ensaios de precisão intermediária.

Outro parâmetro que foi avaliado já durante a etapa de planejamento experimental foi o de realizar pequenas variações no pH da fase móvel, que demonstraram a não interferência na eficiência do método desenvolvido.

4.6 AMPLIAÇÃO DO ESCOPO PARA A MATRIZ AZEITONA

Conforme descrito nos parâmetros de validação, a ampliação do escopo para a matriz azeitona seguiu as diretrizes da SANTE (2017). Os dados

referentes a efeito matriz, faixa linear, coeficiente de determinação, coeficiente de inclinação, interceptação, recuperação e RSD estão apresentados na Tabela 16. O fluxograma de extração para azeitonas é apresentado na Figura 37.

Para a azeitona o fator de diluição do método foi de 5 vezes, pois não houve diluição na etapa de extração. Assim, o LOQm variou entre 2,5 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, já o LODm foi de 0,75 a 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Para a ampliação do escopo em azeitonas foram realizados três ensaios nos níveis de fortificação 0,5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados de recuperação e RSD para esta matriz estão apresentados na Tabela 16. Os critérios de aceitação foram baseados na faixa de aceitação entre 70 e 120% de recuperação e RSD <20% (SANTE, 2017).

Também foi feita a comparação entre a curva no extrato da matriz azeite de oliva com a curva no extrato da matriz azeitona, buscando verificar o comportamento de cada matriz (Figuras 35 e 36). Percebeu-se efeito matriz significativo tanto entre a curva no extrato da matriz azeitona e o solvente, quanto na curva no extrato da matriz azeite de oliva e azeitona, indicando a necessidade de preparo da curva analítica no extrato da matriz correspondente. Dados de efeito matriz estão apresentados nas Tabelas 15 e 16, para azeite de oliva e azeitonas, respectivamente.

Na ampliação do escopo, os compostos bifentrina e tiofanato metílico apresentaram recuperações abaixo da faixa de aceitação. No entanto, como tiveram boas recuperações para o método validado para azeites de oliva, essas recuperações foram consideradas adequadas, levando-se em conta o baixo RSD apresentado.

Figura 35 - Efeito matriz para o composto difenoconazol

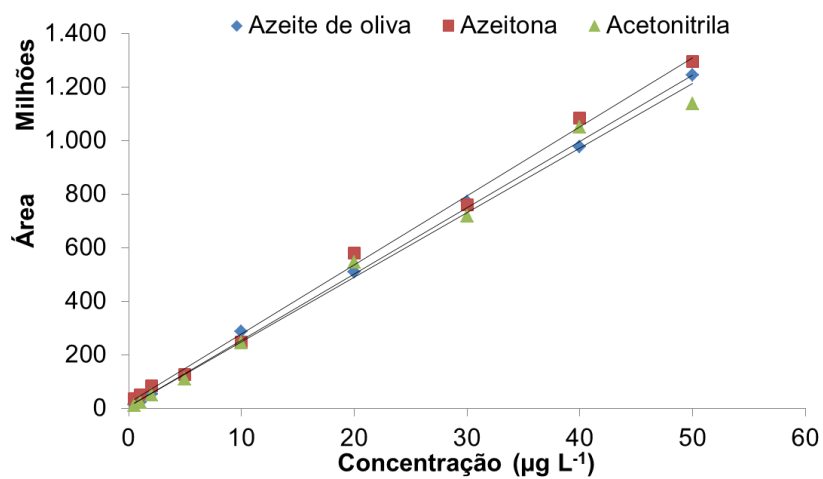


Figura 36 - Efeito matriz para o composto tiabendazol.

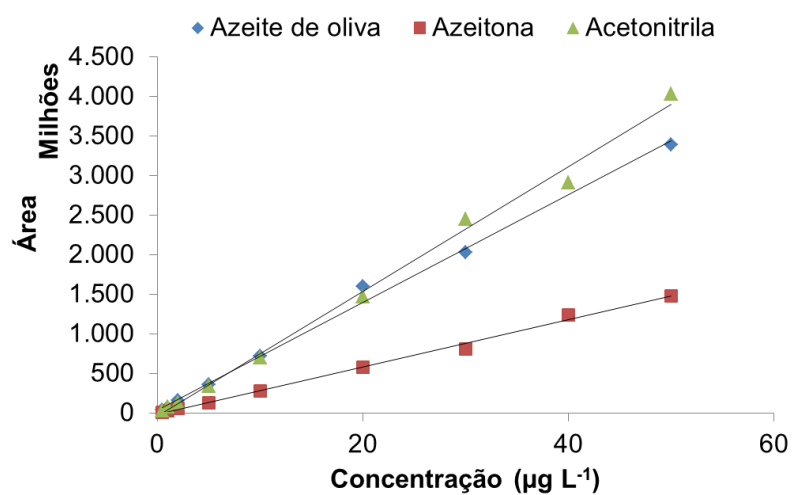
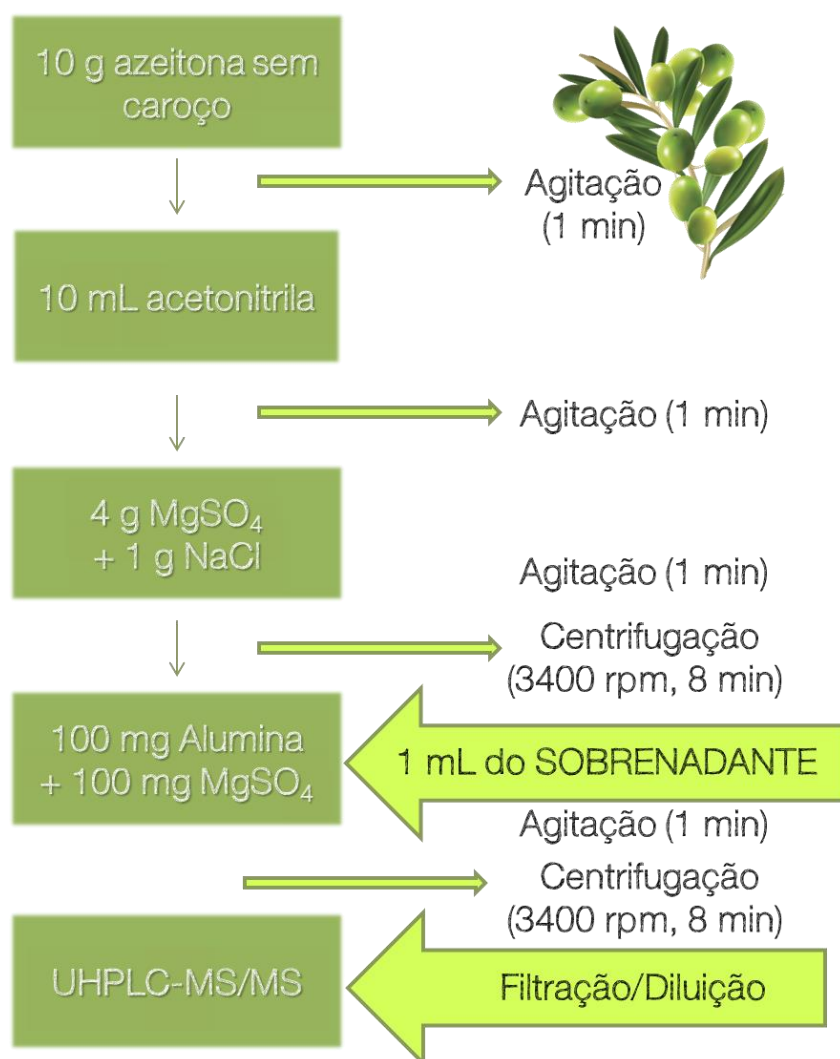


Figura 37 - Fluxograma do preparo de amostra para azeitona.



Fonte: o autor.

Tabela 16 - Principais parâmetros de validação avaliados para ampliação do método proposto para a matriz azeitona.

Analito	Efeito matriz		LOQ mg kg ⁻¹	Faixa linear µg L ⁻¹	r ²	Coeficiente de inclinação A	Coeficiente de intercepção b	Ensaio de repetibilidade Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	
	em relação ao solvente	em relação ao azeite de oliva						10	20
Acefato	13,9	8,7	0,050	10 – 50	0,997	12948596,8	-322645,5	103 ± 8	84 ± 12
Acetamiprid	112,1	101,1	0,003	0,5 – 50	0,999	28408306,4	-10159204,3	90 ± 1	88 ± 4
Aldicarbe	224,3	200,2	0,003	0,5 – 50	0,997	5280496,3	-1993161,1	80 ± 9	83 ± 1
Atrazina-d5(PC)	119,1	95,3	0,003	0,5 – 50	0,997	24960692,3	-23878328,6	88 ± 3	87 ± 4
Atrazina	115,1	92,5	0,003	0,5 – 50	0,997	23392240,4	-19561387,9	91 ± 2	88 ± 9
Azinfós	-0,9	-0,7	0,003	0,5 – 50	0,998	4704133,9	-2706778,7	103 ± 13	92 ± 10
Azinfós metílico	52,2	50,2	0,003	0,5 – 50	0,998	3320384,7	-3163540,7	92 ± 7	94 ± 10
Azoxistrobina	26,0	26,6	0,003	0,5 – 50	0,998	58748373,1	-9774576,5	101 ± 4	98 ± 5
Bentazona	195,9	111,8	0,050	10 – 50	0,995	1641911,4	-2277240,4	76 ± 11	81 ± 1
Bifentrina	-66,2	-7,6	0,003	0,5 – 50	0,998	3348135,5	3873772,5	55 ± 8	64 ± 9
Bitertanol	-18,8	0,9	0,003	0,5 – 50	0,992	4465040,9	974480,5	105 ± 18	113 ± 3
Boscalida	16,5	20,2	0,003	0,5 – 50	0,998	12645635,8	996845,9	96 ± 5	94 ± 6
Buprofezina	-26,3	-11,6	0,003	0,5 – 50	0,996	50310846,7	7786054,1	79 ± 3	86 ± 3
Carbaril	211,0	207,1	0,003	0,5 – 50	0,996	6666412,5	-7628015,0	84 ± 7	90 ± 6
Carbendazim	160,8	123,6	0,003	0,5 – 50	0,997	48279484,6	-20148324,5	82 ± 1	77 ± 4
Carbofuran-3-OH	86,3	80,3	0,003	0,5 – 50	0,999	7739351,6	-5517704,5	91 ± 4	89 ± 4
Carboxin	269,8	239,8	0,003	0,5 – 50	0,997	23746719,6	-21229886,5	70 ± 2	74 ± 2
Clorpirifós	-41,8	-14,1	0,003	0,5 – 50	0,999	6537543,9	387225,6	80 ± 9	84 ± 6
Clorpirifós-metílico	-9,1	-13,4	0,003	0,5 – 50	0,997	4256248,5	-696164,7	79 ± 10	86 ± 5
Clomazona	42,8	36,4	0,003	0,5 – 50	0,999	58911863,1	-5301966,7	94 ± 3	94 ± 6
Cresoxim metílico	-2,7	-10,1	0,003	0,5 – 50	0,990	9346974,0	-4686533,5	99 ± 7	90 ± 16
Ciproconazol	1,7	0,3	0,003	0,5 – 50	0,998	20422787,9	-3300236,2	97 ± 5	96 ± 5

Analito	Efeito matriz		LOQ mg kg ⁻¹	Faixa linear µg L ⁻¹	r ²	Coeficiente de inclinação A	Coeficiente de intercepção b	Ensaio de repetibilidade Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	
	em relação ao solvente	em relação ao azeite de oliva						10	20
Deltametrina	-77,9	-5,1	0,050	10 – 50	0,993	1624689,9	830453,4	60 ± 20	75 ± 6
Diclorvós	167,2	158,1	0,050	10 – 50	0,992	7687935,7	-5562763,5	82 ± 8	83 ± 7
Difenoconazol	-6,6	-4,2	0,003	0,5 – 50	0,997	25836840,4	19302888,9	98 ± 3	104 ± 5
Diflubenzuron	-9,3	-5,3	0,003	0,5 – 50	0,996	7254967,5	3224277,6	96 ± 3	98 ± 2
Dimetoato	111,2	96,3	0,003	0,5 – 50	0,999	13542846,7	-7032468,0	92 ± 4	91 ± 4
Disulfoton	6,4	-47,6	0,050	10 – 50	0,997	525354,1	62666,7	101 ± 28	79 ± 27
Diuron	89,3	77,8	0,003	0,5 – 50	0,999	17317430,9	-7090305,6	91 ± 3	89 ± 6
Epoxiconazol	-1,5	-0,8	0,003	0,5 – 50	0,996	36385227,9	9968171,3	96 ± 2	101 ± 4
Espinetoran	-84,7	-34,1	0,003	0,5 – 50	0,992	10546983,0	3895789,7	93 ± 6	105 ± 11
Espinosad A	-77,9	-34,7	0,003	0,5 – 50	0,991	21469211,2	6761199,4	87 ± 2	94 ± 7
Espinosad D	-86,5	-34,4	0,003	0,5 – 50	0,991	5933688,9	1756516,2	87 ± 10	96 ± 9
Etefon	37,2	40,9	0,003	0,5 – 50	0,998	26852009,2	-11869421,4	93 ± 2	94 ± 4
Etofenprox	-75,2	-0,4	0,003	0,5 – 50	0,999	8806524,3	6236068,4	60 ± 1	68 ± 4
Famoxadona	-17,3	-1,5	0,003	0,5 – 50	0,991	4223462,2	2343036,7	93 ± 10	98 ± 8
Fenoxicarbe	-3,3	-4,2	0,003	0,5 – 50	0,997	32013575,4	13143923,1	95 ± 1	96 ± 2
Fenpropimorfe	-41,8	-10,7	0,003	0,5 – 50	0,998	53381254,3	6273590,0	94 ± 4	94 ± 4
Fenpiroximato	-52,6	-7,8	0,003	0,5 – 50	0,995	43036003,4	-5458222,8	84 ± 9	88 ± 2
Fentiona	-2,0	-15,4	0,003	0,5 – 50	0,999	21585732,3	6583379,2	84 ± 4	92 ± 1
Flumioxazina	36,7	32,3	0,003	0,5 – 50	0,996	583812,7	-317321,7	93 ± 12	91 ± 6
Fluquiconazol	18,4	5,6	0,003	0,5 – 50	0,999	6240174,8	-2431087,7	92 ± 3	94 ± 5
Flutriafol	98,1	69,3	0,003	0,5 – 50	0,996	3247147,9	-2191800,9	96 ± 3	93 ± 5
Forato	-2,5	-16,0	0,003	0,5 – 50	0,998	16110055,6	-4477026,3	93 ± 3	87 ± 6
Fosmete	36,6	36,8	0,003	0,5 – 50	0,999	32588840,1	-14850907,7	94 ± 3	94 ± 7

Analito	Efeito matriz		LOQ mg kg ⁻¹	Faixa linear µg L ⁻¹	r ²	Coeficiente de inclinação A	Coeficiente de intercepção b	Ensaio de repetibilidade Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	
	em relação ao solvente	em relação ao azeite de oliva						10	20
Imazalil	65,5	48,1	0,003	0,5 – 50	0,999	10135415,8	-6027380,6	65 ± 13	68 ± 8
Imidacloprido	34,6	32,6	0,003	0,5 – 50	0,999	4729848,1	-1043289,3	83 ± 3	86 ± 7
Linurom d6(PC)	30,2	12,4	0,003	0,5 – 50	0,993	604659,7	-973570,4	99 ± 20	79 ± 9
Malationa	11,8	17,6	0,003	0,5 – 50	0,995	19625741,0	12531055,6	105 ± 6	105 ± 7
Metamidofós	22,7	20,4	0,050	10 – 50	0,999	19025269,9	-7791669,9	78 ± 2	81 ± 6
Metidationa	49,3	39,6	0,003	0,5 – 50	0,998	12739802,4	-1678213,8	89 ± 5	88 ± 2
Metiocarbe	17,8	15,3	0,003	0,5 – 50	0,999	60387193,2	-20421031,0	97 ± 4	95 ± 7
Metiocarbe sulfona	47,5	54,3	0,003	0,5 – 50	1,000	19613777,4	-6635777,7	92 ± 1	89 ± 4
Metiocarbe sulfóxido	63,2	51,7	0,003	0,5 – 50	1,000	31200668,4	-12466487,6	84 ± 4	86 ± 3
Metomil	22,8	19,1	0,003	0,5 – 50	0,999	4545569,8	-2474416,0	91 ± 1	90 ± 8
Metsulfuron metílico	-15,2	8,8	0,003	0,5 – 50	0,998	16009099,0	-8023610,5	90 ± 1	89 ± 3
Pendimethalina	-43,1	-5,1	0,003	0,5 – 50	0,999	1481404,0	658130,0	76 ± 7	85 ± 2
Picoxistrobina	-4,3	-4,0	0,003	0,5 – 50	0,995	31793698,5	6507810,6	97 ± 2	99 ± 6
Pirimicarbe	145,9	125,9	0,003	0,5 – 50	0,998	16475327,6	-11337890,9	86 ± 3	87 ± 4
Pirimifós metílico	0,3	-6,4	0,003	0,5 – 50	0,999	44235151,6	4976563,6	87 ± 2	90 ± 5
Procloraz	43,7	10,7	0,003	0,5 – 50	0,993	1093423,3	-32575,0	95 ± 20	102 ± 14
Procimidona	12,6	-5,7	0,050	10 – 50	0,991	2763007,3	11395349,8	78 ± 8	76 ± 15
Profenofós	-1,1	-9,3	0,003	0,5 – 50	0,999	18710230,5	50029,4	85 ± 3	91 ± 2
Propargito	-56,7	-6,5	0,003	0,5 – 50	0,998	23210257,5	1563437,7	86 ± 4	94 ± 3
Propiconazol	-3,5	-3,0	0,003	0,5 – 50	0,996	14782248,7	2698439,9	91 ± 3	99 ± 5
Propizamida	13,1	4,9	0,003	0,5 – 50	0,998	10543466,5	1041711,9	99 ± 2	95 ± 6
Piraclostrobina	-5,6	-1,0	0,003	0,5 – 50	0,997	22423607,6	4184022,7	91 ± 6	95 ± 5
Pirazofós	-14,7	4,0	0,003	0,5 – 50	0,994	25573300,0	16172877,3	97 ± 7	106 ± 2

Analito	Efeito matriz		LOQ mg kg ⁻¹	Faixa linear µg L ⁻¹	r ²	Coeficiente de inclinação A	Coeficiente de intercepção b	Ensaio de repetibilidade Recuperação ± RSD Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	
	em relação ao solvente	em relação ao azeite de oliva						10	20
Piriproxifem	-47,1	-6,7	0,003	0,5 – 50	0,994	11627872,2	-3593443,4	83 ± 1	88 ± 3
Simazina	267,0	245,7	0,003	0,5 – 50	0,990	4707377,3	-4895728,5	85 ± 9	84 ± 9
Tebuconazol	-4,4	-8,5	0,003	0,5 – 50	0,998	32733606,6	10604160,8	90 ± 2	96 ± 2
Terbutilazina	28,6	19,7	0,003	0,5 – 50	0,999	66846778,1	-6680989,3	93 ± 3	92 ± 5
Tetraconazol	26,3	22,2	0,003	0,5 – 50	0,996	14132189,1	369028006,0	118 ± 12	120 ± 1
Tiabendazol	165,2	139,1	0,003	0,5 – 50	0,996	29788708,0	-13871903,9	74 ± 1	72 ± 6
Tiacloprido	539,0	506,4	0,003	0,5 – 50	0,997	10386453,7	-6949850,5	85 ± 2	83 ± 1
Tiametoxam	101,1	102,2	0,003	0,5 – 50	0,995	6064243,4	4326478,5	97 ± 15	82 ± 1
Tiodicarbe	103,1	106,5	0,003	0,5 – 50	0,998	3791924,3	-3052261,3	92 ± 3	88 ± 3
Tiofanato metílico	285,7	235,4	0,003	0,5 – 50	0,993	8688351,0	-6341201,9	68 ± 3	75 ± 10
Triadimefon	-5,1	-0,2	0,003	0,5 – 50	0,996	12509527,9	2093186,5	102 ± 7	99 ± 5
Triadimenol	-12,1	1,0	0,050	10 – 50	0,992	5794324,4	3496362,3	94 ± 2	100 ± 1
Trifloxistrobina	-6,5	-6,6	0,003	0,5 – 50	0,996	22290987,6	3283994,4	93 ± 2	99 ± 4

Fonte: o autor.

4.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

O método validado foi aplicado em 23 amostras de azeites de oliva de marcas nacionais e importadas e também foi aplicado em 11 marcas de azeitonas diferentes que foram adquiridos em mercados da cidade de Santa Maria – RS (Anexo A). Dos azeites, 25% apresentaram resíduos acima do LOQ. Já para as azeitonas, não houve nenhuma que não tivesse pelo menos a presença de um dos agrotóxicos do método desenvolvido. No entanto, tanto para azeites de oliva como para azeitonas, a concentração dos analitos detectados não ultrapassou o LMR permitido pela Anvisa ou pelo Codex Alimentarius. A Figura 38 mostra o cromatograma positivo para uma das amostras contaminadas com o agrotóxico tebuconazol numa concentração acima do LOQ do método desenvolvido.

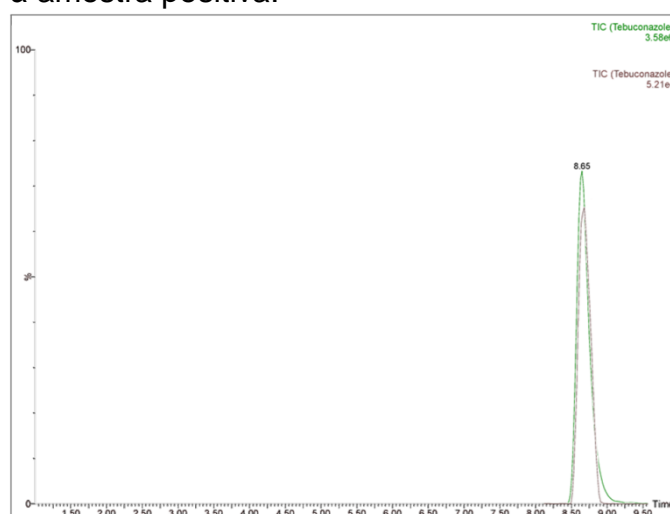
Somente o fungicida tetraconazol que não é permitido para a cultura foi detectado nas amostras tanto de azeite de oliva quanto de azeitonas. A concentração encontrada variou de 0,164 a 0,949 mg kg⁻¹ para azeite de oliva e de 0,149 a 0,164 mg kg⁻¹ para azeitonas. Conforme a Tabela 6, esse agrotóxico já foi encontrado em amostras de azeite de oliva nos últimos anos na Grécia e Espanha, porém em concentrações menores. Segundo o dossiê da União Europeia EU (IUPAC, 2018) não houve degradação do tetraconazol durante os testes em laboratório e, em testes de campo, a DT50 variou de 136 a 1688 dias, o que pode explicar seu aparecimento nas amostras. A Tabela 17 apresenta os resultados positivos para azeitonas e azeite de oliva, ou seja, a concentração encontrada nessas amostras é maior que o LOQ do método desenvolvido. O fungicida trifloxistrobina está destacado na tabela, pois a concentração do mesmo na amostra ficou abaixo do LOQ, mas acima do LOD. Nesse caso, pode-se dizer que esse analito está presente na amostra, porém, não é possível determinar em que concentração.

Tabela 17 - Resultados positivos para as 23 amostras de azeite de oliva e 11 amostras de azeitonas avaliados pelo método validado.

Agrotóxico	Nº de amostras positivas	Concentração (mg kg ⁻¹)
Azeite de oliva		
Clorpirifós*	1	<LOQ
Difenoconazol	3	<LOQ, 0,14, 0,20
Procimidona	1	0,166
Tetraconazol	4	0,164, 0,320, 0,902, 0,949
Trifloxistrobina*	1	<LOQ
Azeitonas		
Azoxistrobina	1	0,005
Clorpirifós	3	0,009, 0,020, 0,063
Difenoconazol	5	0,003, 0,009, 0,009, 0,028, 0,070
Etefom	1	0,011
Metidationa	1	0,009
Pendimetalina	4	0,008, 0,010, 0,018, 0,026
Procimidona	2	<LOQ, 0,104
Tebuconazol	2	0,029, 0,085
Tetraconazol	2	0,149, 0,164
Tiametoxam	2	0,090, 0,104

Fonte: o autor.

Figura 38 - Cromatogramas do agrotóxico tebuconazol. Em azul o cromatograma no LOQ do método, e em verde o cromatograma correspondente à amostra positiva.



5 CONCLUSÕES

O método proposto e validado mostrou-se simples, rápido e eficaz para a determinação de 80 agrotóxicos de diferentes classes em azeite de oliva e azeitonas. A partir da otimização das condições cromatográficas pelo uso do planejamento fatorial o método poderá ser facilmente empregado em análises de rotina do laboratório, não havendo a necessidade de alteração de fase móvel e coluna cromatográfica.

Segundo LMR do Codex Alimentarius e Anvisa, o método proposto está adequado para a determinação de agrotóxicos tanto em azeite de oliva quanto em azeitona. Ainda, o método atendeu a todos os parâmetros de validação apresentando alta detectabilidade para todos os analitos validados o que permitiu abranger limites de detecção e quantificação menores que os LMR vigentes.

Em relação ao efeito matriz, tanto para a matriz azeite de oliva quanto para a matriz azeitona há a necessidade de que sejam preparadas curvas no extrato da matriz, pois o efeito foi maior que 50% para a maioria dos analitos do método. Dessa maneira, deve-se ter branco disponível para essas duas matrizes no laboratório.

A ampliação do escopo para a matriz azeitona pode ampliar a utilização do método desenvolvido e, por consequência, auxiliar os produtores no controle de qualidade de produção dos frutos antes mesmo desses serem convertidos em azeites.

O método validado foi aplicado tanto em amostras de azeite de oliva, como azeitonas de mesa. Diferentemente do que se esperava, as azeitonas tiveram mais amostras positivas que os azeites. Fato que pode ser justificado pelo prazo de validade das azeitonas de mesa ser menor que o dos azeites, de modo que o tempo de prateleira destas é menor que o dos azeites também. Assim, agrotóxicos com tempos de meia vida mais curtos podem ter se degradado antes de terem sido analisados no azeite.

Considerando os objetivos traçados por essa pesquisa e os resultados obtidos, pode-se dizer que os mesmos foram atingidos e o método pode ser aplicado em análises de azeite de oliva e azeitonas de mesa.

6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS

No LARP os resíduos gerados, tanto sólidos como líquidos, são encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, rotulados e devidamente separados em: resíduos halogenados, resíduos não halogenados, vidros contaminados e resíduos sólidos. Todos os resíduos provenientes do processamento de amostras recebidas foram descartados como lixo orgânico.

A destinação correta dos resíduos é feita por uma empresa terceirizada especializada e licenciada para essa finalidade.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliação do escopo do método para compostos que possam ser determinados por GC-MS/MS;
- Validação e aplicação do método para outros óleos vegetais;
- Reavaliar a possibilidade da utilização de sulfato de alumínio para remoção dos coextrativos da matriz;
- Implementação do método em laboratório para permitir parcerias com empresas produtoras de azeites de oliva do estado para fornecer o suporte técnico através de análises de resíduos de agrotóxicos em seus produtos.

8 REFERÊNCIAS

ADITIVOS e INGREDIENTES. Gorduras, margarinas e óleos vegetais. Editora Insumos. Acessado em <janeiro 2016>. Disponível em <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/655.pdf>.

ANAGNOSTOPOULOS C., MILIADIS G.E. Development and validation of an easy multiresidue method for the determination of multiclass pesticide residues using GC-MS/MS and LC-MS/MS in olive oil and olives. *Talanta* 112 (2013) 1-10. doi: 10.1016/j.talanta.2013.03.051.

AGRICULTURA. Fiscalização reprovou 59,7% das amostras de azeite de oliva. Acessado em <março, 2018>. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/fiscalizacao-reprovou-59-7-das-amostras-de-azeite-de-oliva>>.

AMVRAZI, E.G., ALBANIS, T.A., Multiresidue method for determination of 35 pesticides in virgin olive oil by using liquid-liquid extraction techniques coupled with solid-phase extraction clean up and gas chromatography with nitrogen phosphorus detection and electron capture detection. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9642-9651.

AMVRAZI, E.G. AND ALBANIS, T.A. Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected. *Food Chem.* 113 (2009) 253-261.

ANASTASSIADES M, LEHOTAY S, ŠTAJNBAHER D, SCHENCK FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticides in produce. *J AOAC Int* 86 (2003) 412–431.

ANASTASSIADES, M., SCHERBAUM, E., TASDELEN, B., STAJNBAHER, D. Crop Protection, Public Health, environmental Safety, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2007) 439.

ANVISA. REGULAMENTO TÉCNICO PARA ÓLEOS VEGETAIS, GORDURAS VEGETAIS E CREME VEGETAL. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005.

ANVISA. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017.

ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. RE Nº899, DE 29 DE MAIO DE 2003.

ANVISA. Saúde e Anvisa publicam Nota Técnica sobre azeitona. 2011. Acessado em <dez, 2017>. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/saude-e-anvisa-publicam-nota-tecnica-sobre-azeitona/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US>.

BALLESTEROS, E., GARCÍA SÁNCHEZ, A., RAMOS MARTOS, N. Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1111 (2006) 89-96. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.01.101

BELAJ, A., LEÓN, L., SATOVIC, Z., DE LA ROSA, R. Variability of wild olives (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) analyzed by agromorphological traits and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 129 (2011) 561–569.

BENAVENTE-GARCÍA, O., CASTILLO, J., LORENTE, J., ORTUÑO, A., DEL RIO, J.A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* 68 (2000) 457–462.

BERNARDI, B., FALCONE, G., STILLITANO, T., BENALIA, S., STRANO, A., BACENETTI, J., DE LUCAA, A. I. Harvesting system sustainability in Mediterranean olive cultivation. *Science of The Total Environment*. 625 (2018) 1446-1458.

BRAADBAART, F., MARINOVA, E. e SARPAKI, A. Charred olive stones: experimental and archaeological evidence for recognizing olive processing residues used as fuel. *Veget Hist Archaeobot.* (2016). DOI 10.1007/s00334-016-0562-2.

BRETON, C., TERRAL, J., PINATEL, C., MÉDAIL, F., BONHOMME, F., BERVILLÉ, A. The origins of the domestication of the olive tree. *Comptes Rendus Biologies*. Volume 332, Issue 12, December 2009, Pages 1059-1064.

CAPPATO, L.P., FERREIRA, E.H.R., ROSENTHAL, A. Azeitonas de mesa no Brasil: mercado, tecnologia e aspectos legais. *Ciência Rural, Santa Maria*. 45 (2015) 1327-1335. Doi: 10.1590/0103-8478cr20140879.

CARDOSO, M. H. W. M., NÓBREGA, A. W. e ABRANTES, S. Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso EM tomates. *Revista Analítica*. 34 (2008) 48-55.

CARDOSO, S. M., MAFRA, I., REIS, A., NUNES, C., SARAIVA, J. A., e COIMBRA, M. A. Naturally fermented black olives: Effect on cell wall polysaccharides and on enzyme activities of Taggiasca and Conservolea varieties. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (2010) 153–160.

CASS, Q., CASSIANO, N. Cromatografia Líquida. 2015. Editora campus. 392p.

CICEK, G. Determination of harvesting costs and cost analysis for different olive harvesting methods. *J.of Food, Agric.& Environm.*9(2011) 201–204.

CODEX ALIMENTARIUS. Acessado em <julho, 2018>. Disponível em <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/home/en/>>.

COI (CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL). Trade standard applying to table olives. 2004. Acessado em <dez, 2017>. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/222-standards>>.

COLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

COLLINS, L.M., DZIAK, J.J., LI, R.. Design of Experiments With Multiple Independent Variables: A Resource Management Perspective on Complete and Reduced Factorial Designs. *Psychological Methods.* 14 (2009) 202–224. DOI: 10.1037/a0015826.

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.* 9(2008) 23-32.

CZECH, T., BONILLA, N.B., GAMBUS, F., GONZÁLEZ, R.R., MARÍN-SÁEZ, J., VIDAL, J.L.M., FRENICH, A.G. Fast analysis of 4-tert-octylphenol, pentachlorophenol and 4-nonylphenol in river sediments by QuEChERS extraction procedure combined with GC-QqQ-MS/MS. *Sci.of the Total Environm.* 557–558 (2016) 681–687.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.135>

DA COSTA MORAIS, E.H., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F. Pesticide determination in sweet peppers using QuEChERS and LC-MS/MS. *Food Chem.* 30 (2018) 249:77-83. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.092.

DAMODARAN, S., PARKIN, K.L., FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DÍAZ-PLAZA, EM., CORTÉS, JM., VÁZQUEZ, A., VILLÉN, J. Automated determination of pesticide residues in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface with electron-capture and nitrogen-phosphorus detectors operating simultaneously. *J Chromatogr A.* 1174 (2007) 145-50.

DE CASTRO A., MONTANO A., CASADO F. J., SANCHEZ A. H., REJANO L. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiol.* 19 (2002) 637–644,. Doi: 10.1006/fmic.2002.0466.

DOQ-CGCRE-008. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS Documento de caráter orientativo. Revisão 05 – Agosto 2016.

EC.EUROPA.EU. Agriculture and rural development. Olive Oil. Acessado em <abril, 2018>. Disponível em <https://ec.europa.eu/agriculture/olive-oil_en>.

EUROFINS. GC/MS SIM vs. Scan Mode Acessado em <maio, 2018>. Disponível em <<https://www.eurofinsus.com/environment-testing/our-company/newsletters/gcms-sim-vs-scan-mode/>>.

FAO. Diretrizes sobre os critérios de desempenho para os métodos de análise para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos - CXG 90-2017. (2017).

FARAJZADEH, M.A., KHOSH MARAM, L., NABIL, A.A.A. Determination of pyrethroid pesticides residues in vegetable oils using liquid–liquid extraction and dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–flame ionization detection. *Journal of Food Composition and Analysis* 34 (2014) 128–135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2014.03.004>.

FERRARI, C.K.B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Rev. Nutr., Campinas*, 11 (1998) 3-14.

FERREIRA, J.A., FERREIRA, J.M.S., TALAMINI, V., FACCO, J.F., RIZZETTI, T.M., PRESTES, O.D., ADAIME, M.B., ZANELLA, R., BOTTOLI, C.B.G. Determination of pesticides in coconut (*Cocos nucifera* Linn.) water and pulp using modified QuEChERS and LC–MS/MS. *Food Chemistry* 213 (2016) 616–624. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.114>

FINDINGGREECE.COM. The traditional olive press. 2017. Acessado em <junho, 2018>. Disponível em <<https://www.findinggreece.com/traditional-olive-press/>>.

FROEHNER, S., LEITHOLD, J., JÚNIOR, L.F.L. Transesterificação de óleos vegetais: caracterização por cromatografia em camada delgada e densidade. *Quím. Nova*. 30(2007) 2016-2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000800037>

GHANBARI, R., ANWAR, F., ALKHARFY, K.M., GILANI, A.-H., SAARI, N. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) – a review. *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 3291–3340

GILBERT-LÓPEZ, B., GARCÍA-REYES, J.F., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., MOLINA-DÍAZ, A. Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3736-3747.

GLOBO. Rio Grande do Sul é o maior produtor de oliveiras do país. Acessado em <maio, 2018>. Disponível em <<https://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/campo-e-lavoura/noticia/rio-grande-do-sul-e-o-maior-produtor-de-oliveiras-do-pais.ghtml>>.

GÓMEZ-ALMENAR M. C., GARCÍA-MESA J. A. Determination of pesticide residues in olives by liquid extraction surface analysis followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Grasas y Aceites* 66 (2015) 78. doi: 10.3989/gya.0828142

GREEN, P.S. A revision of *Olea* L. (Oleaceae), *Kew Bull.* 57 (2002) 91–140.

GUARDIA-RUBIO, M. MEDINA, A.R., DÍAZ, A.M., DE CÓRDOVA, M.L.F. Determination of pesticides in washing waters of olive processing by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1578 – 1586.

HERNANDO, M.D., FERRER, C., ULASZEWSKA, M., GARCÍA-REYES, J.F., MOLINA-DÍAZ, A. FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1815-1831.

IUPAC. Iupac Database Pesticides. Acessado em <dezembro, 2017>. Disponível <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>>.

HETZNER, H., SCHMID, C., TREMMEL, S., DURST, K., WARTZACK, S. Empirical-Statistical Study on the Relationship between Deposition Parameters, Process Variables, Deposition Rate and Mechanical Properties of a-C:H:W Coatings *Coatings*.4 (2014) 772-795; doi:10.3390/coatings4040772.

HISKIA, A. E., ATMAJIDOU, M.E., TSIPI, D.F. Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Greek Virgin Olive Oil by Capillary Gas Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, , 46 (1998) 570–574. DOI: 10.1021/jf970427y

HOFFMANN, G. *The Chemistry and Technology of Edible Oils and Fats and Their High Fat Products*. Academic Press (2013)

IOOC (INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL). Statistic of table olive's world importation. Acessado em <maio, 2018>. Disponível em <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-tableolive-figures>>.

IOOC (INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL). Statistic of table olive oils world importation. Acessado em <maio, 2018>. Disponível em <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>>.

KAUFMANN, A.; BUTCHER, P.; MADEN, K.; WALKER, S.; WIDMER, M. Multiresidue quantification of veterinary drugs in milk with a novel extraction and clean-up technique: Salting out supported liquid extraction (SOSLE). *Analytica Chimica Acta*. 820 (2014) 56-68.

KEMMERICH, M., BERNARDI, G., PRESTES, O.D., ADAIME, M.B., ZANELLA, R. Comprehensive Method Validation for the Determination of 170 Pesticide Residues in Pear Employing Modified QuEChERS Without Clean-Up and Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods* (2017).

KLEES, M., BOGATZKI, C., HIESTER, E. Selective pressurized liquid extraction for the analysis of polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in soil. *Journal of Chromatography A*, 1468 (2016) 10–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.029>

LEE, S. W., CHOIB, J. H., CHO, S. K., YU, H. Y., EL-ATY, A. M. A., SHIM, J. H. Development of a new QuEChERS method based on dry ice for the determination of 168 pesticides in paprika using tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 4366–4377.

LEHOTAY, S.J., MAÒTOVSKÁ, K. Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. *J. OF AOAC INT.* 88 (2005) 630-638.

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*, 1217 (2010) 2548–2560. [10.1016/j.chroma.2010.01.044](http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044)

LI, J., LIU, D., WU, T., ZHAO, W., ZHOU, Z., WANG, P. A simplified procedure for the determination of organochlorine pesticides and polychlorobiphenyls in edible vegetable oils. *Food Chemistry* 151 (2014) 47–52. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.047>

LIKUDIS, Z., COSTARELLI, V., VITORATOS, A., APOSTOLOPOULOS, C. Pesticide residues in Greek apples with protected geographical indication or designation of origin. *J. Pestic. Sci.* 39 (2014) 29–35.

LIU, S., XIE, Q., CHEN, J., SUN, J. HEA, H., ZHANG, X. Development and comparison of two dispersive liquid–liquid microextraction techniques coupled to high performance liquid chromatography for the rapid analysis of bisphenol A in edible oils. *Journal of Chromatography A*, 1295 (2013) 16–23. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.054>

MACINEDELTRASIMENO. The traditional method to extract olive oil: stone mills, presses, and fiescoli. Acessado em <outubro, 2017>. Disponível em<<http://macinedeltrasimeno.it/en/usda-organic-certified-italian-extra-virgin-olive-oil/the-traditional-method/>>.

MALDANER, L., JARDIM, I.C.S.F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica*. 4 (2012) 197-207. DOI: 10.4322/sc.2012.014.

MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1, DE 30 DE JANEIRO DE 2012.

MARSILIO, V.; CAMPESTRE, C.; LANZA, B.. Phenolic compounds during Californiastyle ripe olive processing. *Food Chemistry*, 74 (2001) 55-60.

MARTINI, E., MEROLA, G., TOMASSETTI, M., CAMPANELLA, L. Agent orange herbicides, organophosphate and triazinic pesticides analysis in olive oil and industrial oil mill waste effluents using new organic phase immunosensors. *Food Chemistry* 169 (2015) 358–365.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.137>

MARTINS, N., CARREIRO, E.P., LOCATI, A., RAMALHO, J.P.P., CABRITA, M.J., BURKE, A.J., GARCIA, R. Design and development of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of deltamethrin in olive oil: An integrated computational-assisted approach. *Journal of Chromatography A*, 1409 (2015) 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.025>

MELLON, F., STARTIN, J.R., SELF, R. *Mass Spectrometry of Natural Substances in Food*. Royal Society of Chemistry; 1 edition (2000) 29-30.

MORENO-GONZÁLEZ, D., HUERTAS-PÉREZ, J.F., GARCÍA-CAMPAÑA, A.M., GÁMIZ-GRACIA, L. Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology. *Talanta* 128 (2014) 299–304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.045>.

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

NETO, A.J.S. Uma visão técnica para a compreensão e resolução de problemas em sistemas de cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica*. 1 (2009).

NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos*. 4ª ed. Bookman, 2010, cap. 26.

NGUYEN, T.D., LEE, M. H., LEE, G.H. Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid–liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Microchemical Journal* 95 (2010) 113–119. doi:10.1016/j.microc.2009.11.009.

NIST. Central Composite Designs (CCD). Acessado em <fevereiro, 2018>. Disponível em <<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm>>.

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

OLIVEGROVEOUNDLE. History of the Olive Tree | Olive Tree Origin. 2017. Acessado em <janeiro, 2018>. Disponível em <<https://www.olivegroveoundle.co.uk/history-olive-tree/>>.

OLIVEOILSOURCE.COM. Extraction Process. Acessado em <março, 2018>. Disponível em <<https://www.oliveoilsource.com/page/extraction-process>>.

OSHITA, D., JARDIM, I.C.S.F. Comparison of Different Sorbents in the QuEChERS Method for the Determination of Pesticide Residues in Strawberries by LC–MS/MS. *Chromatographia* 77 (2014)1291–1298. DOI 10.1007/s10337-014-2726-5

PANAGOUE, E. Z., HONDRODIMOU, O., MALLOUCHOS, A. & NYCHAS, G.-J. E. A study on the implications of NaCl reduction in the fermentation profile of *Conservolea* natural black olives. *Food Microbiology*, 28 (2011) 1301–7.

PANDA, H. *The Complete Book on Managing Food Processing Industry Waste*. National institute of industrial research (2011).

PARRILLA VÁZQUEZ, P., HAKME, E., UCLÉS, S., CUTILLAS, V., MARTÍNEZ GALERA, M., MUGHARI, AR., FERNÁNDEZ-ALBA, AR. Large multiresidue analysis of pesticides in edible vegetable oils by using efficient solid-phase extraction sorbents based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe methodology followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2016 Sep 9;1463:20-31. doi: 10.1016/j.chroma.2016.08.008.

PATEL, K., FUSSELL, R.J., HETMANSKI, M., GOODALL, D.M., KEELY, B.J. Evaluation of gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils. *Journal of Chromatography A*, 1068 (2005) 289–296. doi:10.1016/j.chroma.2005.01.040

PEREIRA, J. M., JUNIOR, P. A. Study of the degradation of olive oil (*olea europaea*) by optical spectroscopy. *Journal of Engineering and Technology for Industrial Applications*, Edition. 03 (2017). DOI: <https://dx.doi.org/10.5935/2447-0228.20170009>.

POLGÁR, L., KMELLÁR, B., GARCÍA-REYES, J.F., FODOR, P. Comprehensive evaluation of the clean-up step in QuEChERS procedure for the multi-residue determination of pesticides in different vegetable oils using LC-MS/MS, *Anal. Methods*. 4 (2012) 1142-1148.

PRESTES, O.D., FRIGGI, C.A., ADAIME, M.B., ZANELLA, R. QuEChERS - A modern sample preparation method for pesticide multiresidue determination in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry. *Quím. Nova*. 32 (2009). <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046>

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* 3 (2011) 51-64.

PROGRAMA PRÓ-OLIVA. SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E IRRIGAÇÃO DO ESTADO DO RS. Acessado em <janeiro, 2018>. Disponível em <<http://www.agricultura.rs.gov.br/pro-oliva> >.

PURCARO, G., PICARDO, M., BARP, L., MORET, S., CONTE, L.S. Direct-immersion solid-phase microextraction coupled to fast gas chromatography mass spectrometry as a purification step for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in olive oil. *Journal of Chromatography A*, 1307 (2013) 166– 171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.068>

QUEST-RITSON, C. Guia ilustrado Zahar: Azeite. Rio de Janeiro: Zahar, 2011.

RANCIDEZ OXIDATIVA. REVISTA ADITIVOS& INGREDIENTES, 2010.

RASTRELLI L., TOTARO K., DE SIMONE F. Determination of organophosphorus pesticide residues in Cilento (Campania, Italy) virgin olive oil by capillary gas chromatography. *Food Chem*. 79 (2002) 303-305.

ROCCISANO, D., KUMARATILAKE, J., SANIOTIS, A. AND HENNEBERG, M. Dietary Fats and Oils: Some Evolutionary and Historical Perspectives Concerning Edible Lipids for Human Consumption. *Food and Nutrition Sciences*, 7(2016) 689-702. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2016.78070>

RODRIGUES, F., PIMENTEL, F.B., OLIVEIRA, M.B.P.P. Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. *Industrial Crops and Products* 70 (2015) 116–124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.027>

RUPP, R. The Bitter Truth About Olives. *National Geographic*. Acessado em <dezembro, 2017>. Disponível em <<https://www.nationalgeographic.com/people-and-culture/food/the-plate/2016/07/olives--the-bitter-truth/> >.

SÁNCHEZ, L., ROMERO, E., CASTILLO, A., PEÑA, A. Field study of methidathion in soil amended with biosolid and a cationic surfactant under different irrigation regimes. Solute transport modeling. *Chemosphere* 63 (2006) 616–625.

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, 21 – 22 November 2017 rev.0.

SAPOZHNIKOVA, Y., LEHOTAY, S.J.. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 758 (2013) 80–92. DOI: 10.1016/j.aca.2012.10.034.

SHAO, G., AGAR, J., GIESE, R.W. Cold-induced aqueous acetonitrile phase separation: A salt-free way to begin quick, easy, cheap, effective, rugged, safe. *Journal of Chromatography A*, 1506 (2017) 128–133.

SHEN, C.Y, CAO, X.W., SHEN, W.J., JIANG, Y., ZHAO, Z.Y., WU, B., YU, K.Y., LIU, H., LIAN, H.Z. Determination of 17 pyrethroid residues in troublesome matrices by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization. *Talanta* 84 (2011) 141–147. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.12.041.

SOBHANZADEH, E., BAKAR, N.K.A, ABAS, M.R.B, NEMATI, K. Low temperature followed by matrix solid-phase dispersion-sonication procedure for the determination of multiclass pesticides in palm oil using LC-TOF-MS. *Journal of Hazardous Materials* 186 (2011) 1308–1313. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.001

STATISTICA StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.

STATSOFT.COM. STATISTICA Features Overview. Acessado em <abril, 2018>. Disponível em <<http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features>>.

STEVENS, J., ZHAO, L. Efficient Quantitative Analysis of THC and its Metabolites in Whole Blood Using Agilent Captiva EMR—Lipid and LC-MS/MS. Application Note - Forensic Analysis. Agilent Technologies, 2017.

STOCKA, J., TANKIEWICZ, M., BIZIUK, M., NAMIEŚNIK, J. Green Aspects of Techniques for the Determination of Currently Used Pesticides in Environmental Samples. *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 7785-7805.

STORM, S., ASCHENBRENNER, D., SMIRNOVA, I. Reverse micellar extraction of amino acids and complex enzyme mixtures. *Separation and Purification Technology* 123 (2014) 23–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.11.035>.

TACO. Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl.. -- Campinas: NEPAUNICAMP, 2011. 161 p.

TSATSAKIS, AM, TSAKIRIS, IN, TZATZARAKIS, MN, AGOURAKIS, ZB, TUTUDAKI, M, ALEGAKIS, AK. Three-year study of fenthion and dimethoate pesticides in olive oil from organic and conventional cultivation. *Food Addit Contam.* 20 (2003) 553-9.

TEÓFILO, R.F., FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quim. Nova.* 29 (2006) 338-350.

TRIPOLLI, E., GIAMMANCO, M., TABACCHI, G., DI MAJO, D., GIAMMANCO, S., LA GUARDIA, M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev.*18(2005):98-112. doi: 10.1079/NRR200495.

TSATSAKIS, A.M., TSAKIRIS, I.N., TZATZARAKIS, M.N., AGOURAKIS, Z.B., TUTUDAKI, M., ALEGAKIS, A.K. Three-year study of fenthion and dimethoate pesticides in olive oil from organic and conventional cultivation. *Food Addit Contam.* 20(2003)553-9. DOI: 10.1080/0265203031000070786.

TUZIMSKI T., REJCZAK, T. Application of HPLC–DAD after SPE/QuEChERS with ZrO₂-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. *Food Chemistry* 190 (2016) 71–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.072>

VARGAS CASTILHOS, Rodolfo. Espinetoram, alternativa eficaz e registrada para controle de *Palpita forcifera* Munroe, 1959 (Lepidoptera: Crambidae) em OLIVEIRA. *FRUSUL - Simpósio de Fruticultura da Região Sul*, [S.l.], v. 1, n. 1, maio 2017. ISSN 2526-9909. Acessado em <janeiro, 2018>. Disponível em: <<https://periodicos.uffs.edu.br/index.php/FRUSUL/article/view/5031>>.

VIM. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias, RJ:INMETRO, 2012. 94 p.

VISENTAINER, J.V.; FRANCO, M.R.B. Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação. São Paulo: Varela. 2006. 120p.

VISIOLI, F., BELLOSTA, S., GALLI, C. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.*62(1998)541-6.

VISIOLI, F., POLI, A., GALLI, C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev.* 22 (2002)65-75.

WANG, J.H., GUO, C. Ultrasonication extraction and gel permeation chromatography clean-up for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil by an isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A.* 1217 (2010) 4732-4737. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.05.008.

WANG, X.C., SHU, B., LI, S., YANG, Z.G., QIU, B. QuEChERS followed by dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for organochlorine pesticides analysis in fish. *Talanta* 162 (2017) 90–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.069>

WANG, Y., SUN, Y., XU, B., LI, X., JIN, R., ZHANG, H., SONG, D. Magnetic ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of triazine herbicides in vegetable oils by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1373 (2014) 9–16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.009>.

WATERS. The Relationship between Resolution and Intra-column Band Spreading. Acessado em <setembro, 2017>. Disponível em <http://www.waters.com/waters/pt_BR/The-Promise-of-Small-Particles/nav.htm?cid=134804750&locale=pt_BR>.

YADA, S., & HARRIS, L. J. Olives: Safe method for home pickling. 2007. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Acessado em <outubro, 2017>. Disponível em <<https://anrcatalog.ucanr.edu/pdf/8267.pdf> >.

YAGÜE, C. et al. Determination of pesticides and PCBs in virgin olive oil by multicolumn solid-phase extraction cleanup followed by GC-NPD/ECD and confirmation by ion-trap GCMS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 5105-5109.

YE, M., CLAUS, J. Extraction of Planar Pesticides from Spinach and Fresh Oregano Using QuEChERS Methodology With a Novel Carbon Adsorbent. Sigma Aldrich. Acessado em <fevereiro, 2018>. Disponível em <<https://www.sigmaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/planar-pesticides-spinach-oregano-carbon-adsorbent.html>>.

ZAMAN, R.A., ABU, M.J., MOHAMED, J.J., AIN, M.F., AHMAD, Z.A. Investigation of the Mixing Medium Effect on the Development of the CCTO Microstructure at 1000°C. *Procedia Chemistry* 19 (2016) 906 – 909. doi: 10.1016/j.proche.2016.03.133

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

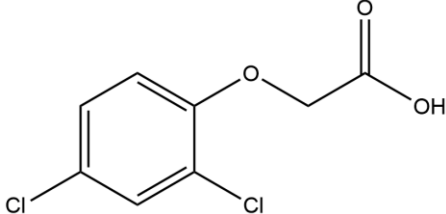
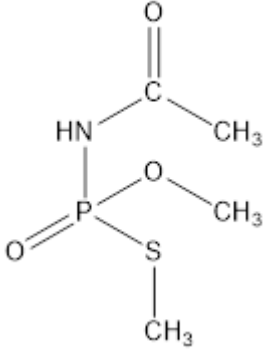
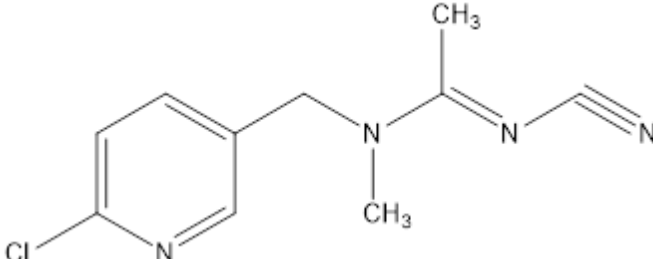
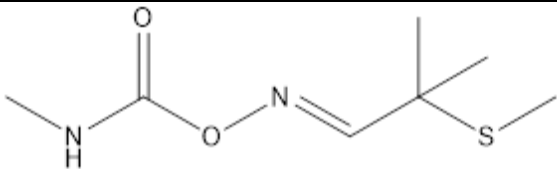
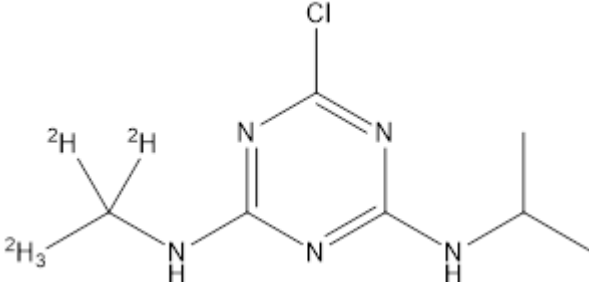
ZAVITSANOS, A. P., MACDONALD, C., BASSOO, E., GOPAUL, D. Determination of domperidone in human serum and human breast milk by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 730 (1999) 9–24.

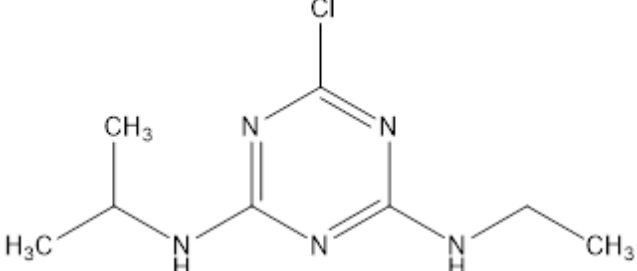
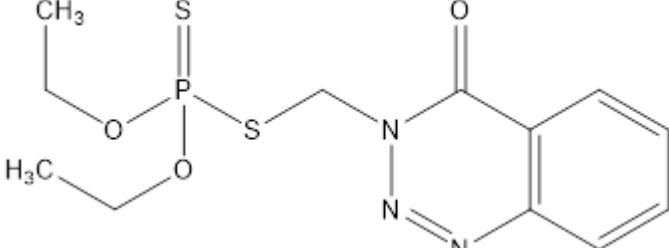
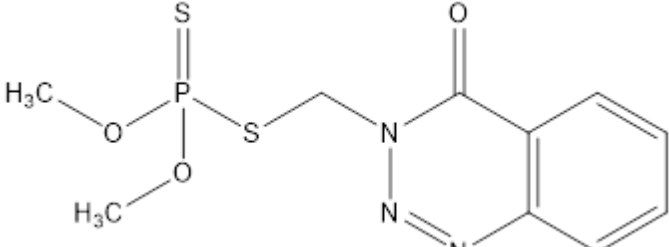
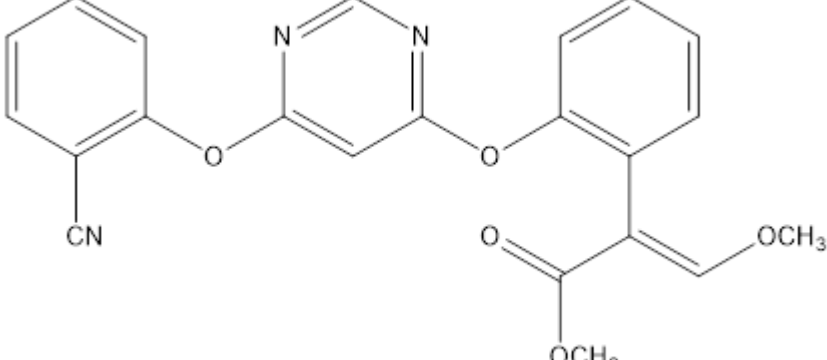
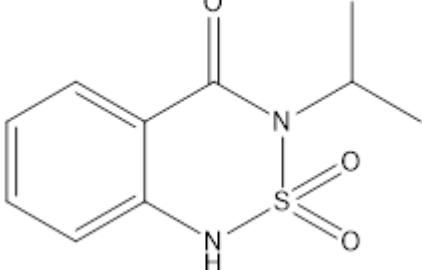
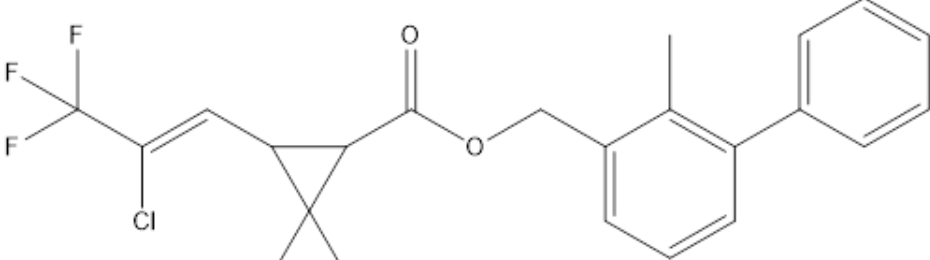
ZHAO, L., LUCAS, D. Quantitative LC/MS/MS Analysis of Drugs in Human Serum With Agilent Captiva EMR–Lipid Cleanup. Application Note. Agilent Technologies, Inc., 2017. Published in the USA, July 26, 2017. 5991-8007EN.

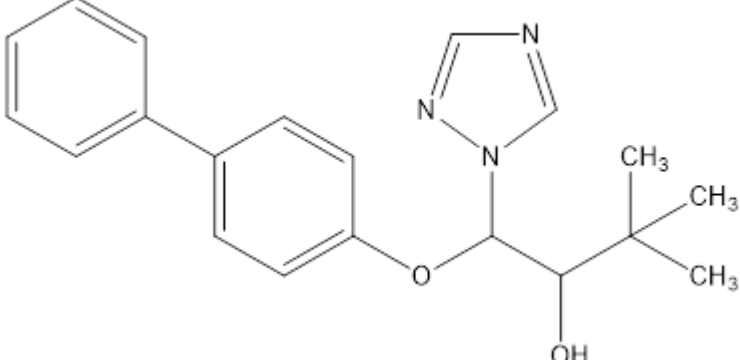
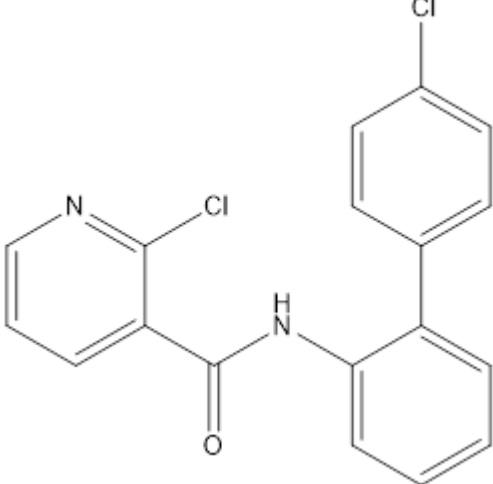
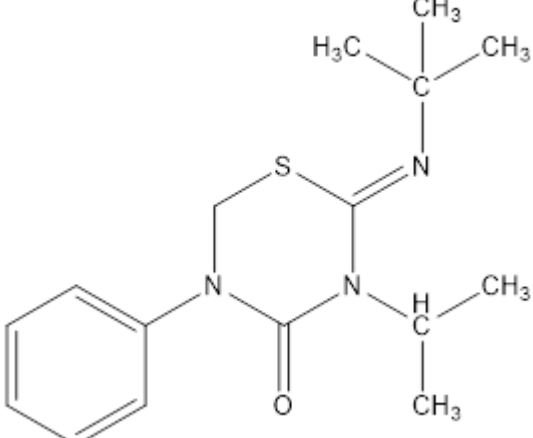
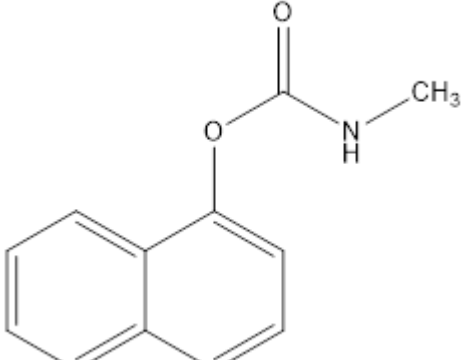
ZOIDOU, E., MAGIATIS, P., MELLIOU, E., CONSTANTINO, M., HAROUTOUNIAN, S., SKALTSOUNIS, A. L. Oleuropein as a bioactive constituent added in milk and yogurt. *Food Chem.* 158 (2014) 319-24. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.137.

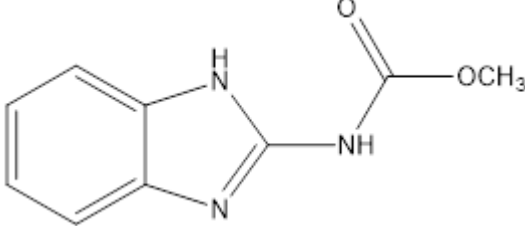
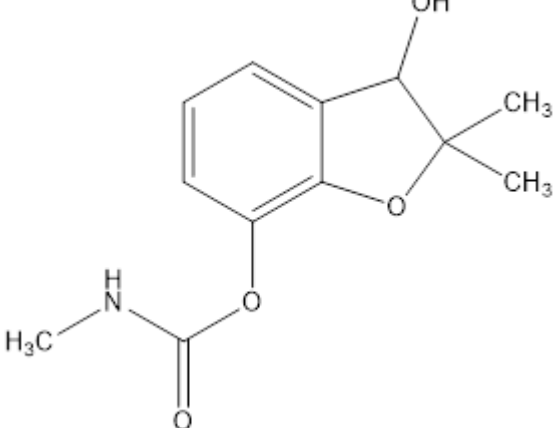
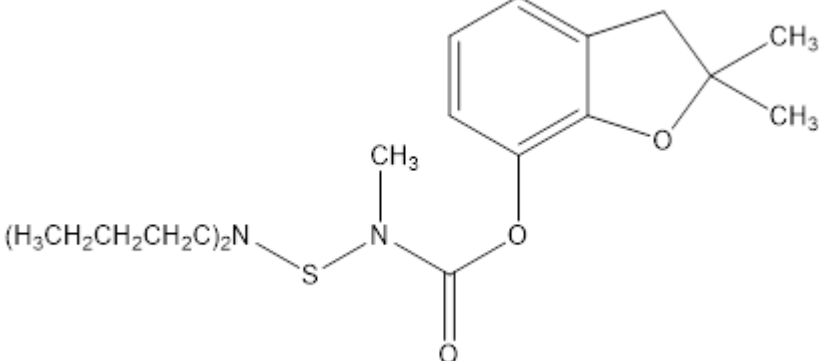
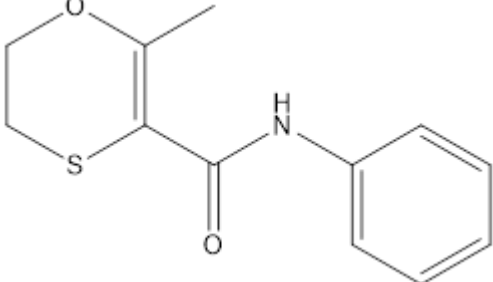
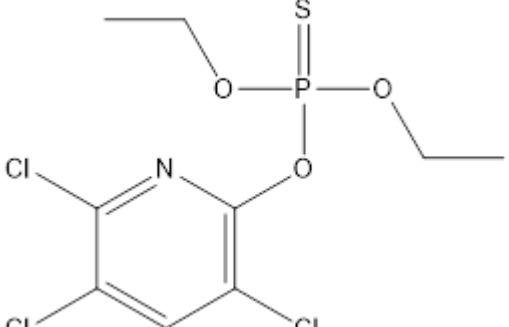
APÊNDICES

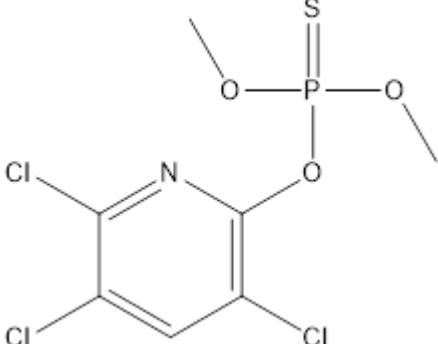
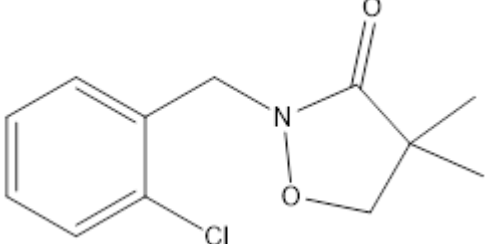
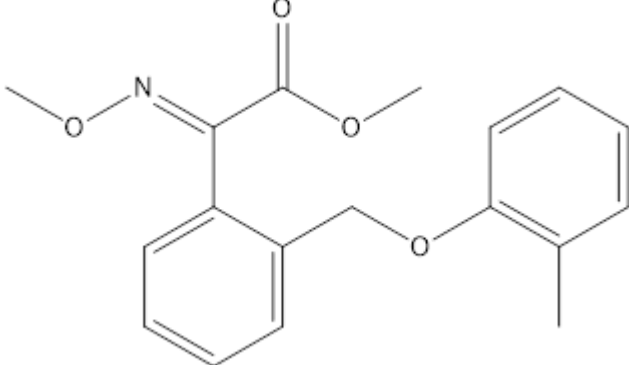
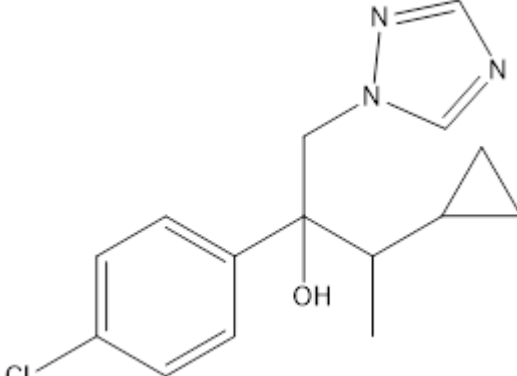
APÊNDICE A - Estruturas dos compostos estudados

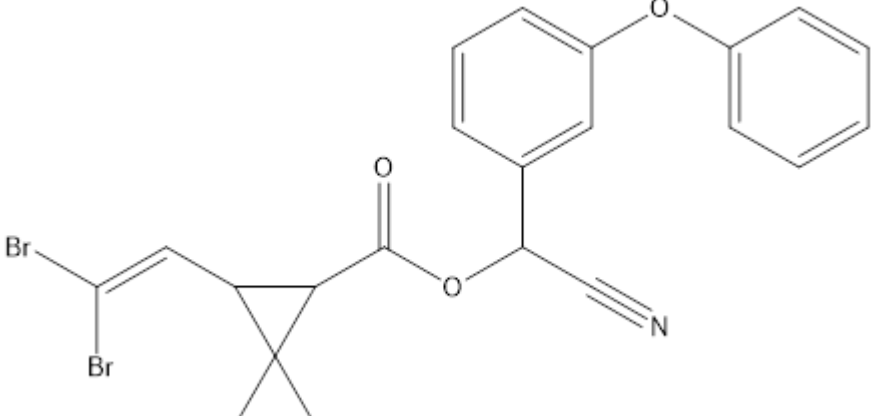
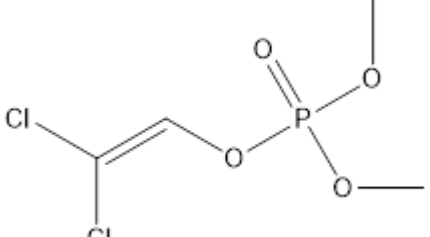
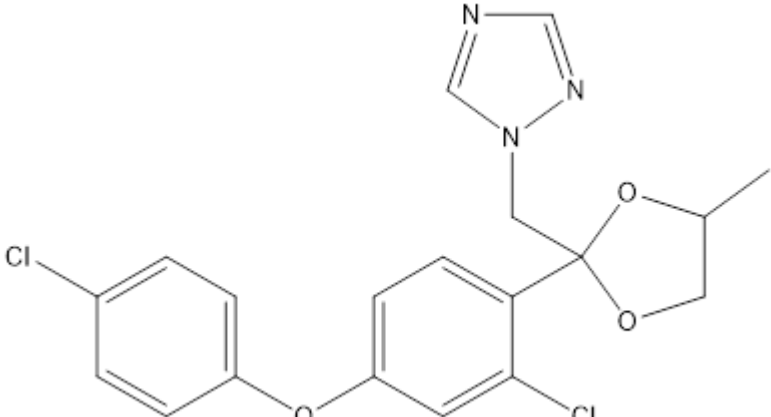
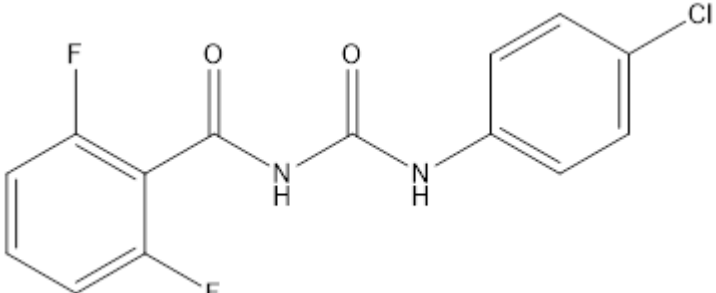
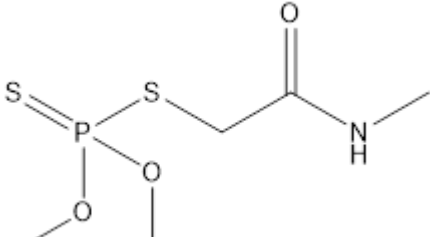
Nome	Estrutura
2,4-D	
Acefato	
Acetamiprido	
Aldicarbe	
Atrazina-d5	

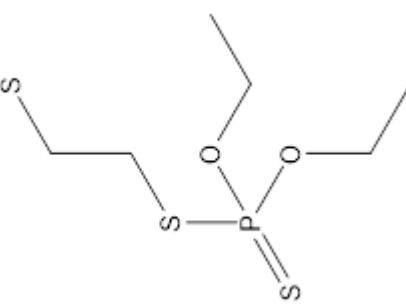
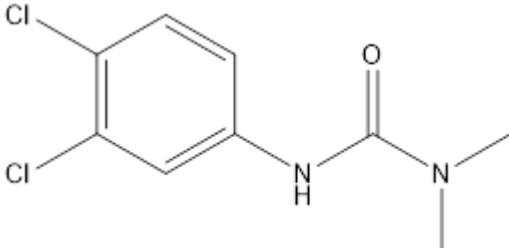
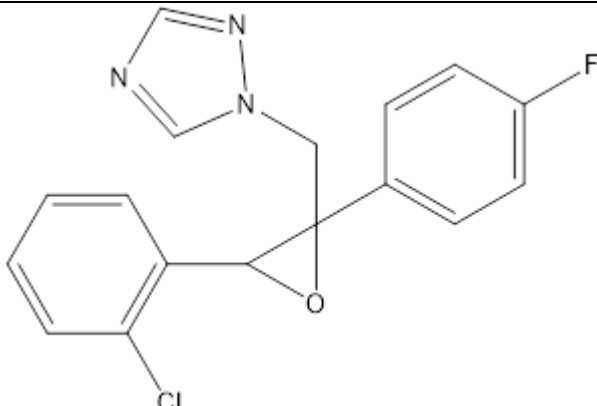
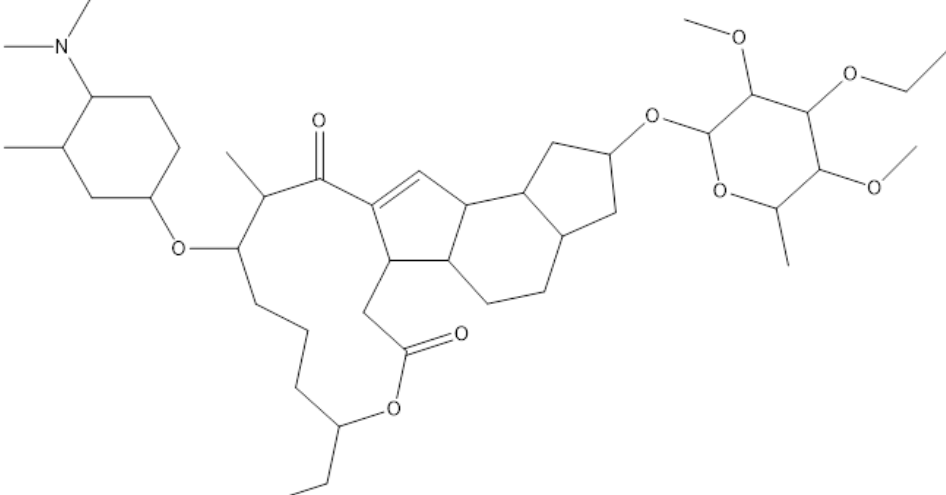
Atrazina	
Azinfós	
Azinfós metílico	
Azoxistrobina	
Bentazona	
Bifentrina	

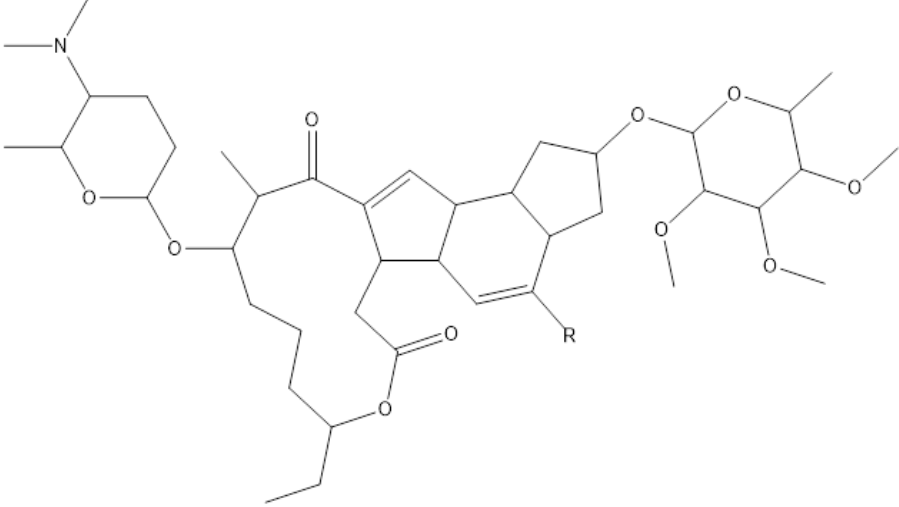
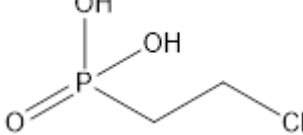
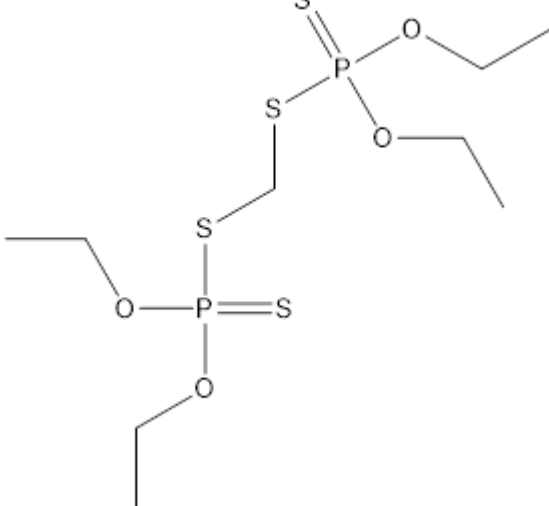
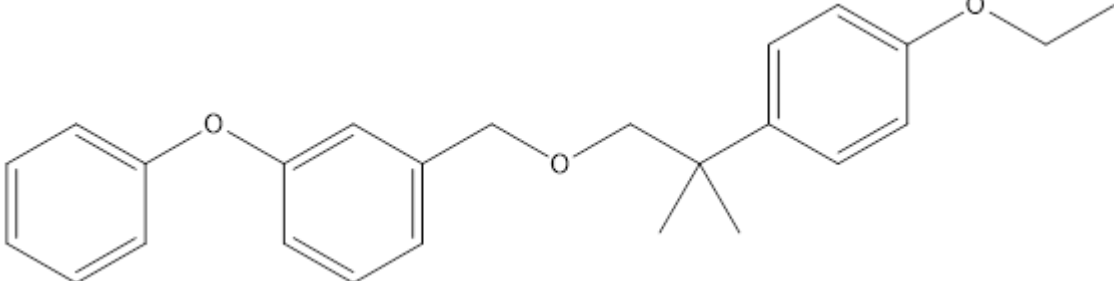
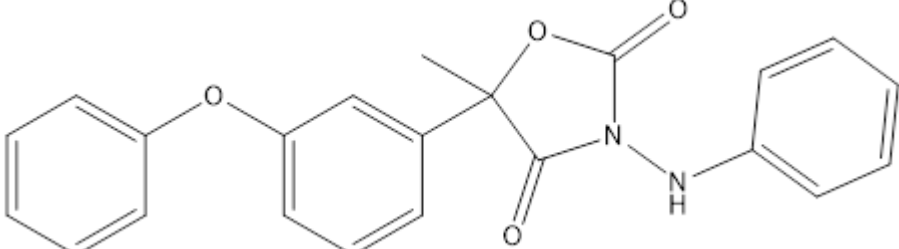
Bitertanol	 <p>The structure of Bitertanol consists of a phenyl ring connected to a para-substituted benzene ring. This benzene ring is further connected to an oxygen atom, which is bonded to a chiral carbon atom. This carbon atom is also bonded to a 1,2,4-triazole ring and a hydroxyl group (-OH). The chiral carbon is also bonded to a quaternary carbon atom, which is bonded to three methyl groups (-CH₃).</p>
Boscalida	 <p>The structure of Boscalida features a pyridine ring with a chlorine atom at the 2-position and a carbonyl group at the 3-position. The carbonyl group is linked to an amide nitrogen, which is further connected to a benzene ring. This benzene ring has a chlorine atom at the para position and is also connected to another benzene ring.</p>
Buprofezina	 <p>The structure of Buprofezina is a thiazolidine derivative. It features a five-membered ring containing a sulfur atom and two nitrogen atoms. One nitrogen atom is bonded to a phenyl ring, and the other is bonded to an isopropyl group. The ring also contains a carbonyl group and a double bond to a nitrogen atom, which is further substituted with a tert-butyl group.</p>
Carbaril	 <p>The structure of Carbaril consists of a naphthalene ring system with a methylcarbamoyloxy group (-O-C(=O)-NH-CH₃) attached to the 1-position.</p>

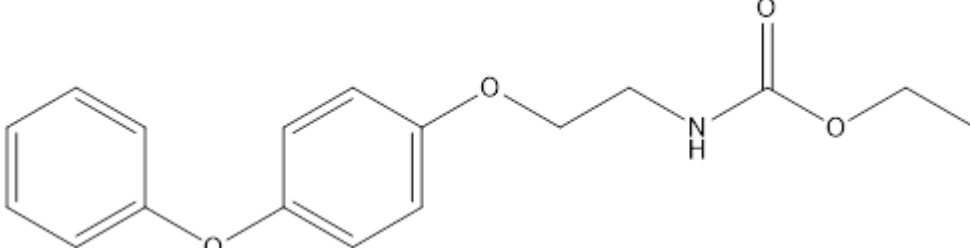
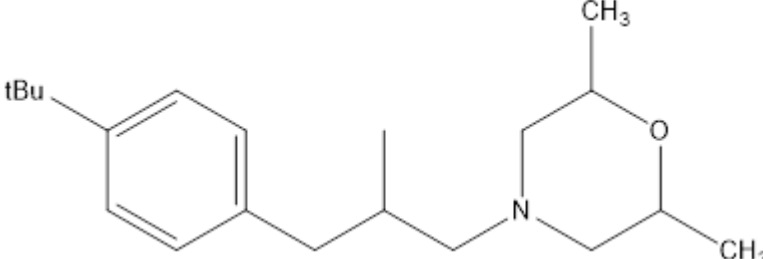
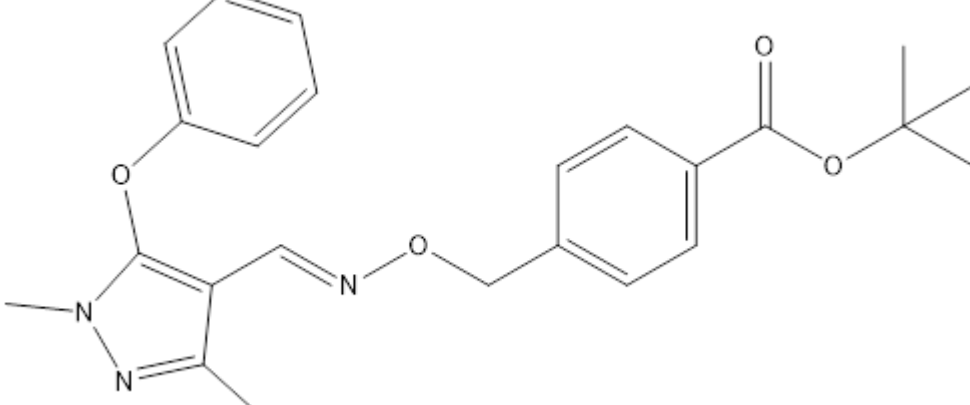
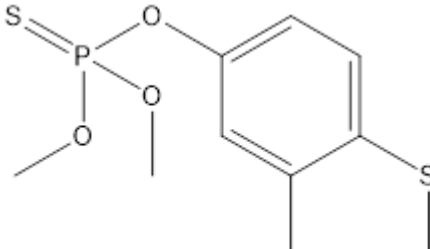
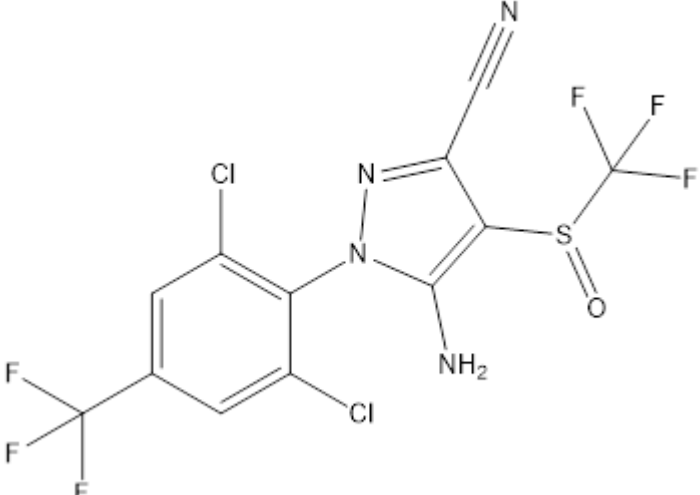
Carbendazim	 <chem>COC(=O)Nc1nc2ccccc2n1</chem>
Carbofuran-3-OH	 <chem>CN(C)C(=O)Oc1ccc2c(c1)OC(C)(C)c2O</chem>
Carbosulfan	 <chem>CCCCNSC(=O)Oc1ccc2c(c1)OC(C)(C)c2</chem>
Carboxina	 <chem>Cc1cc(C)sc(=O)c1NC2=CC=CC=C2</chem>
Clorpirifós	 <chem>CCOP(=S)(OCC)Oc1nc(Cl)c(Cl)c(Cl)n1</chem>

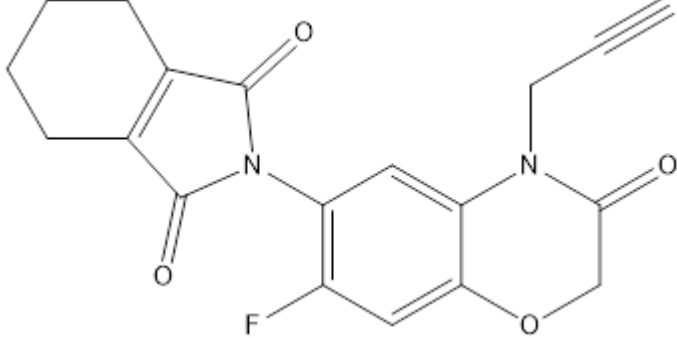
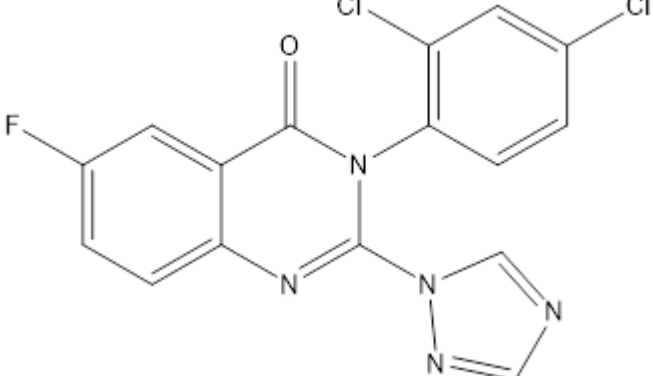
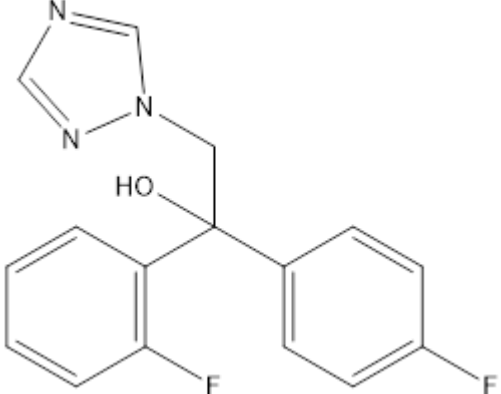
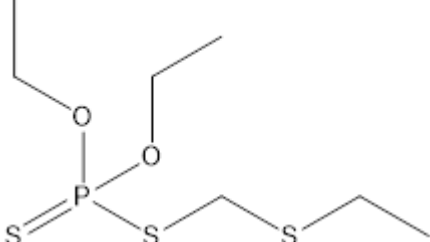
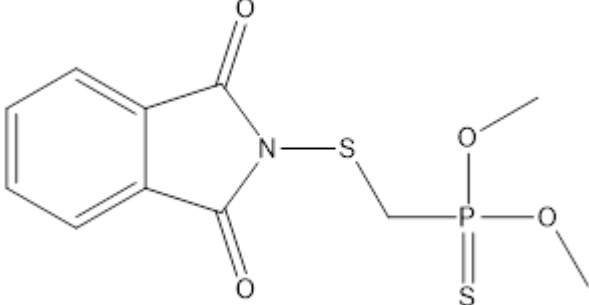
Clorpirifós- metílico	 <chem>COP(=S)(OC)Oc1nc(Cl)c(Cl)cc1Cl</chem>
Clomazona	 <chem>CC1(C)ON(C1)CC2=CC=CC=C2Cl</chem>
Cresoxim- metílico	 <chem>COC(=O)C(=NOC)c1ccccc1CCOc2cc(C)ccc2</chem>
Ciproconazol	 <chem>CC(C)C(O)(c1ccc(Cl)cc1)CNc2nn[nH]2</chem>

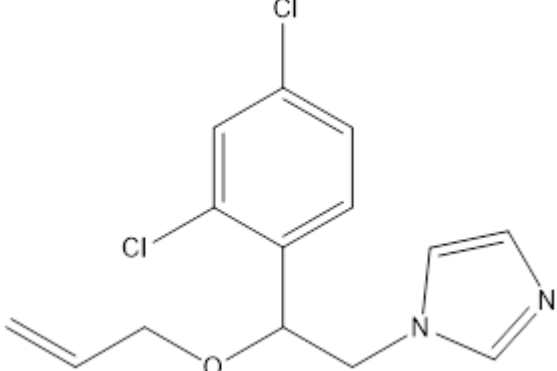
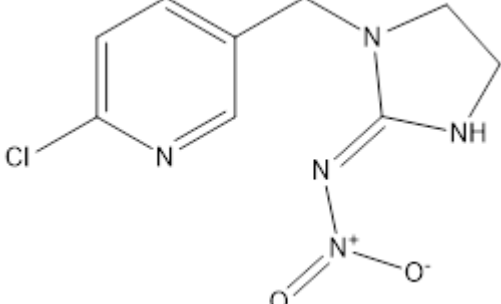
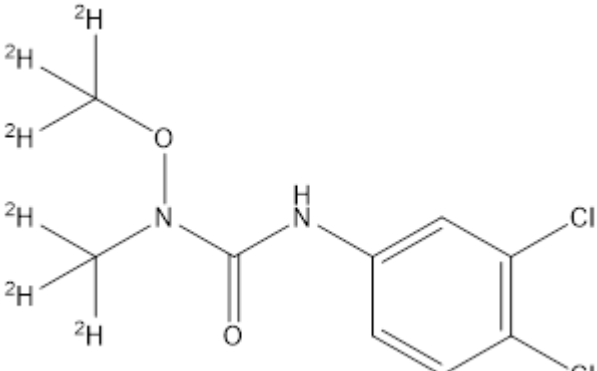
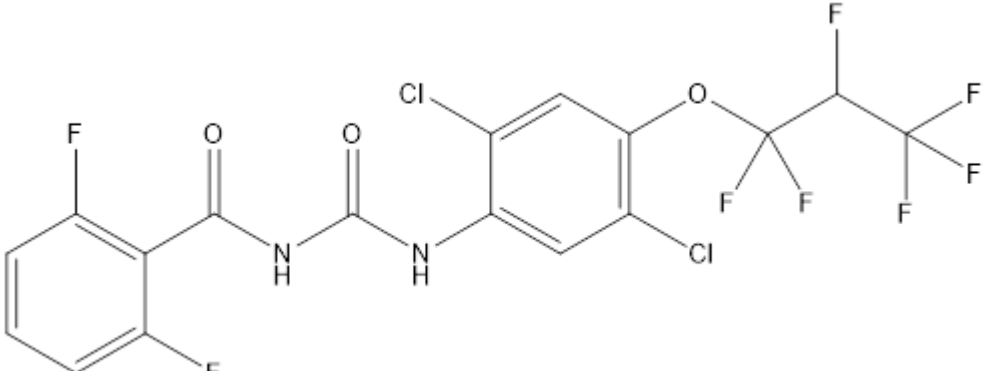
Deltametrina	 <p>The structure of Deltamethrin consists of a central cyclopropane ring. One carbon of the ring is substituted with two methyl groups. The adjacent carbon is part of a propenyl chain with two bromine atoms at the terminal carbon. The third carbon of the cyclopropane ring is attached to a carbonyl group, which is further linked to an oxygen atom. This oxygen atom is connected to a chiral carbon atom that also bears a nitrile group (-C≡N) and a 4-phenoxyphenyl group.</p>
Diclorvós	 <p>The structure of Dieldrin is a cyclohexene ring with two chlorine atoms at the 1 and 2 positions. At the 3 position, there is a propenyl chain. The terminal carbon of this chain is attached to an oxygen atom, which is part of a phosphate ester group. The phosphate group is further substituted with two methoxy groups.</p>
Difenoconazol	 <p>The structure of Difenoconazole features a central 1,3,4-oxadiazole ring. One of the nitrogen atoms of this ring is connected via a methylene group to a quaternary carbon atom. This quaternary carbon is also bonded to a methyl group and two oxygen atoms that form a five-membered cyclic acetal ring. Additionally, the quaternary carbon is bonded to a 2,4-dichlorophenoxy group.</p>
Diflubenzurom	 <p>The structure of Diflufenican consists of a benzene ring with two fluorine atoms at the 2 and 6 positions. This ring is connected via a carbonyl group to an amide linkage (-NH-). This amide nitrogen is further connected to another carbonyl group, which is linked to a second amide nitrogen (-NH-). This second amide nitrogen is attached to a 4-chlorophenyl ring.</p>
Dimetoato	 <p>The structure of Dimethoate features a central phosphorus atom double-bonded to a sulfur atom and single-bonded to two methoxy groups. The phosphorus atom is also single-bonded to a sulfur atom, which is further bonded to a methylene group. This methylene group is attached to a carbonyl group, which is in turn bonded to a nitrogen atom substituted with two methyl groups.</p>

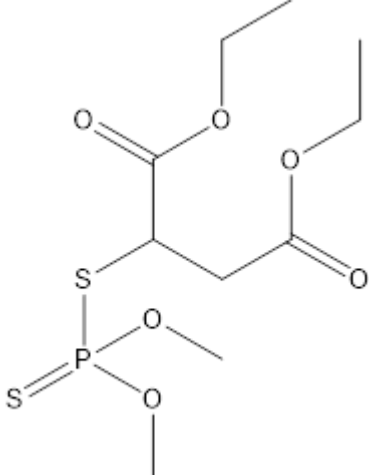
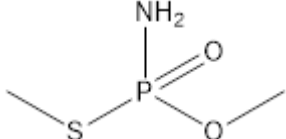
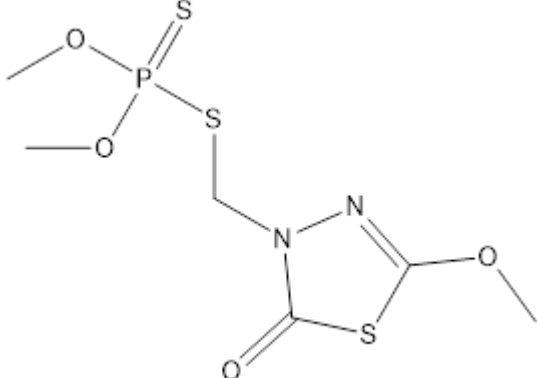
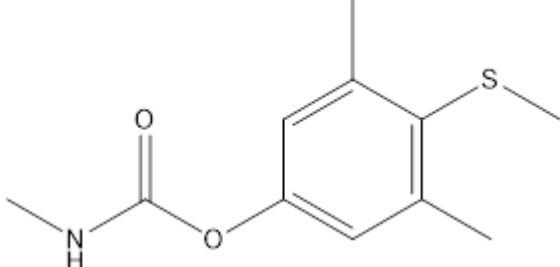
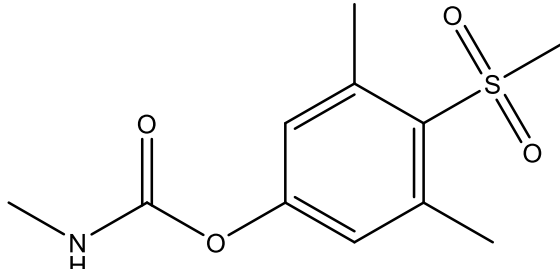
Disulfoton	 <p>The chemical structure of Disulfoton (disulfoton) is shown. It features a central phosphorus atom (P) double-bonded to a sulfur atom (S) at the bottom. The phosphorus atom is also single-bonded to two ethoxy groups (-OCH₂CH₃) and a propylsulfanyl group (-S-CH₂-CH₂-CH₂-). The propylsulfanyl group is attached to a vertical line on the left, indicating it is a substituent.</p>
Diuron	 <p>The chemical structure of Diuron is shown. It consists of a benzene ring with two chlorine atoms (Cl) at the 3 and 4 positions. At the 1 position, there is a dimethylcarbamoyl group (-NH-C(=O)-N(CH₃)₂).</p>
Epoxiconazol	 <p>The chemical structure of Epoxiconazol is shown. It features a central epoxide ring. One carbon of the epoxide ring is bonded to a 2-chlorophenyl group. The other carbon of the epoxide ring is bonded to a 4-fluorophenyl group and a 1,2,4-triazol-5-ylmethyl group.</p>
Espineteram	 <p>The chemical structure of Espineteram is shown. It is a complex molecule with a central bicyclic core. The core is substituted with a piperidine ring (with a methyl group and a methylamino group), a methyl group, a propyl group, and a complex sugar moiety. The sugar moiety is a pyranose ring with multiple methoxy and ethoxy substituents.</p>

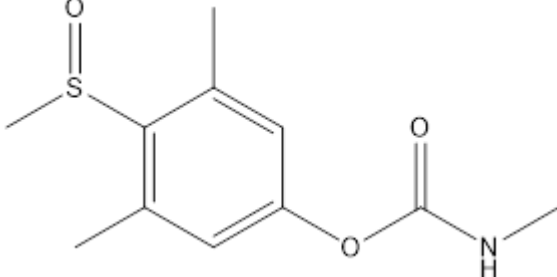
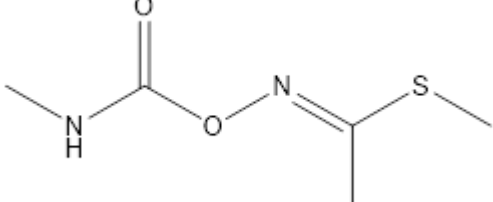
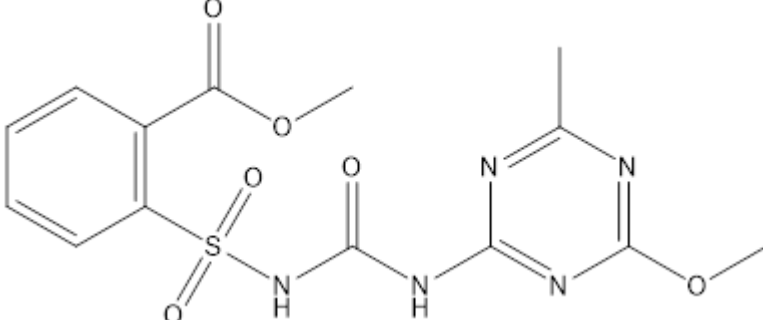
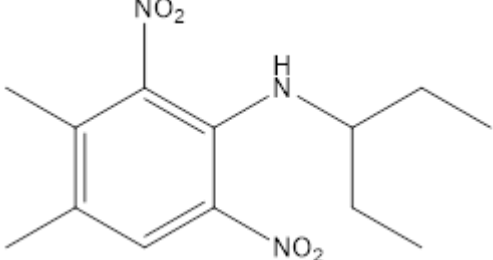
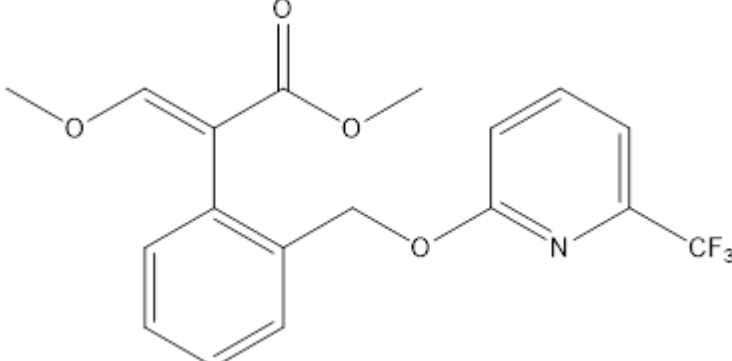
<p>Espinosad A e D</p>	 <p>R=CH₃ - D</p> <p>R=H - A</p>
<p>Etefon</p>	
<p>Etiona</p>	
<p>Etofenproxi</p>	
<p>Famoxadona</p>	

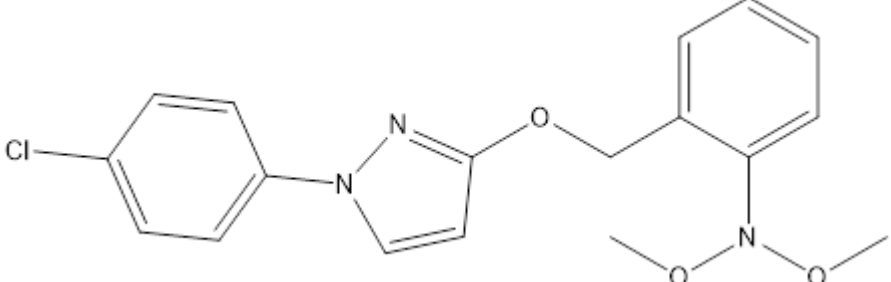
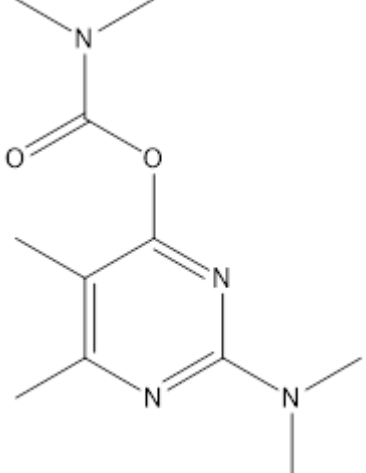
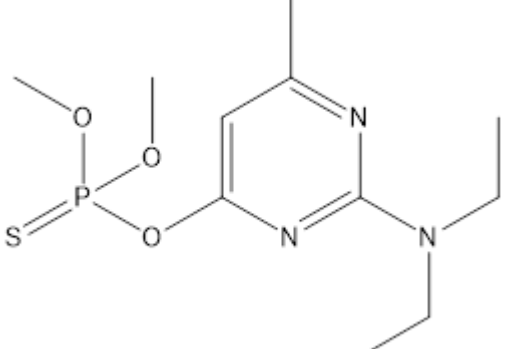
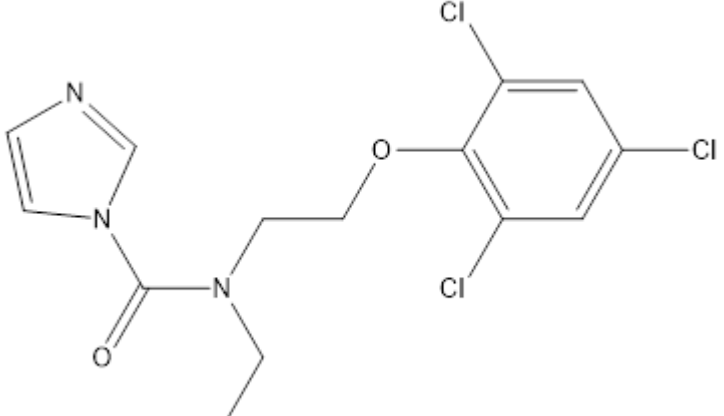
Fenoxicarbe	 <chem>CCOC(=O)NCCCOc1ccc(Oc2ccccc2)cc1</chem>
Fenpropimorfe	 <chem>CC1CN(C(C)C)CC1C(C)CCc2ccc(C(C)(C)C)cc2</chem>
Fenpiroximato	 <chem>CC1=CN(C)C(Oc2ccccc2)=C1C=CN(OCCc3ccc(C(=O)OC(C)(C)C)cc3)</chem>
Fentiona	 <chem>COP(=S)(OC)Oc1ccc(S)c(C)c1</chem>
Fipronil	 <chem>CC1=CN(C(=N1)C#N)C(N)=C1S(=O)(=O)C(F)(F)Fc2cc(Cl)c(C(F)(F)F)c(Cl)c2N</chem>

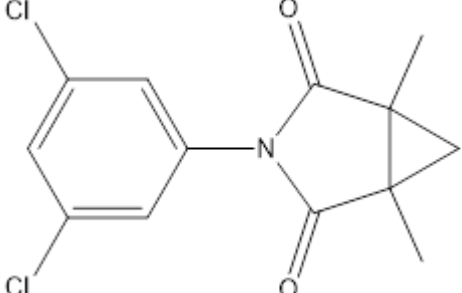
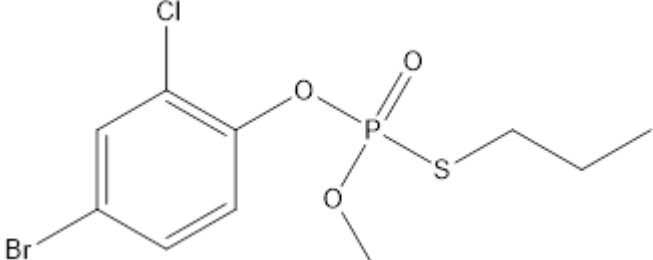
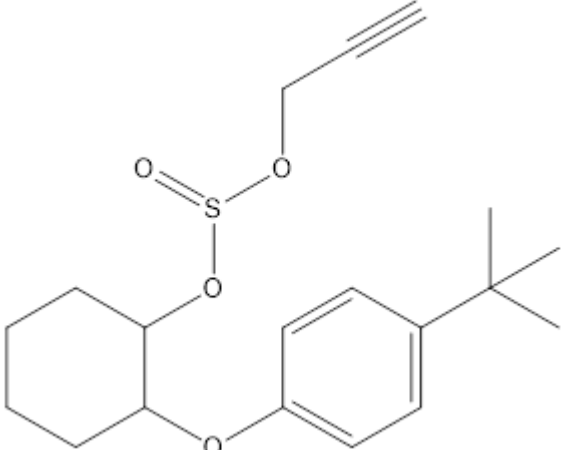
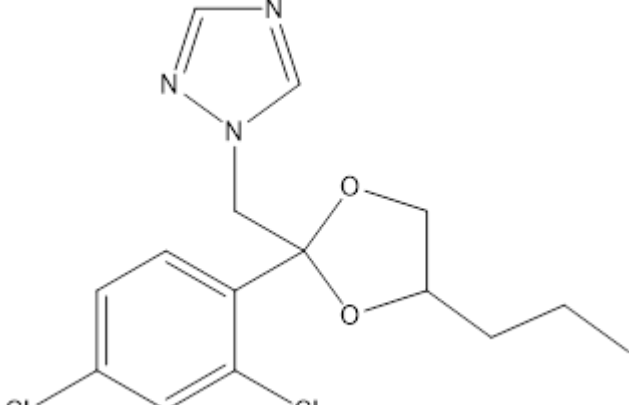
Flumioxazin	 <p>The chemical structure of Flumioxazin consists of a central benzene ring. At the 1-position, there is a nitrogen atom bonded to a cyclohexane ring and a carbonyl group. At the 2-position, there is a fluorine atom. At the 3-position, there is a nitrogen atom bonded to a propargyl group (-CH₂-C≡CH) and a 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyridin-5-yl group.</p>
Fluquiconazol	 <p>The chemical structure of Fluquiconazol features a central pyrimidopyrimidinone ring system. It has a fluorine atom at the 6-position, a carbonyl group at the 2-position, and a 2,4-dichlorophenyl group at the 4-position. The 5-position is connected to a 1,2,4-triazole ring.</p>
Flutriafol	 <p>The chemical structure of Flutriafol is a biphenyl derivative. It has a hydroxyl group (-OH) at the 1-position of the first phenyl ring, a fluorine atom at the 2-position, and a 2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)ethyl group at the 3-position. The second phenyl ring has a fluorine atom at the 4-position.</p>
Forato	 <p>The chemical structure of Forato is a phosphorothioate. It features a central phosphorus atom double-bonded to a sulfur atom and single-bonded to two ethoxy groups (-OCH₂CH₃) and a diethylsulfanyl group (-S-CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₃).</p>
Fosmet	 <p>The chemical structure of Fosmet consists of a benzimidazole ring system. The nitrogen atom at the 2-position is bonded to a sulfur atom, which is further bonded to a methylene group (-CH₂-). This methylene group is attached to a phosphorus atom that is double-bonded to a sulfur atom and single-bonded to two methoxy groups (-OCH₃).</p>

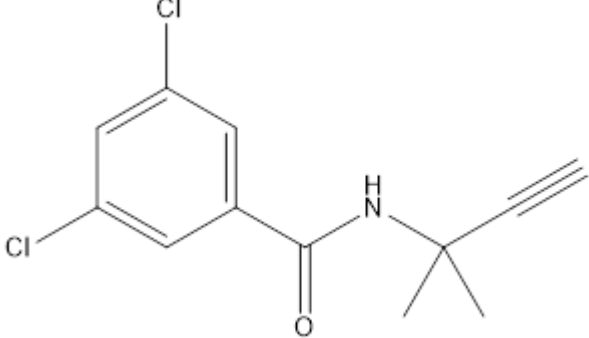
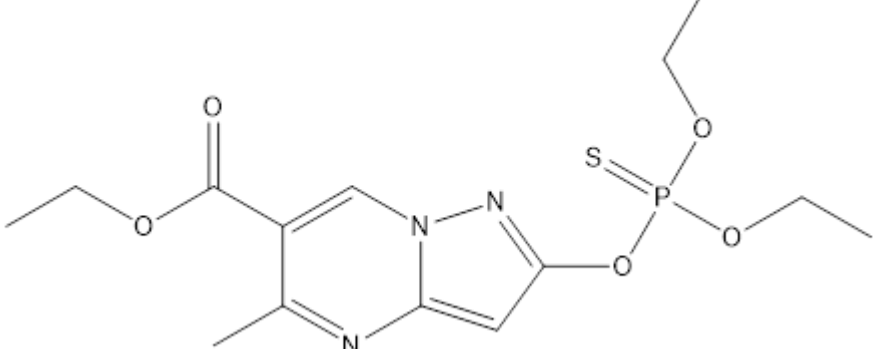
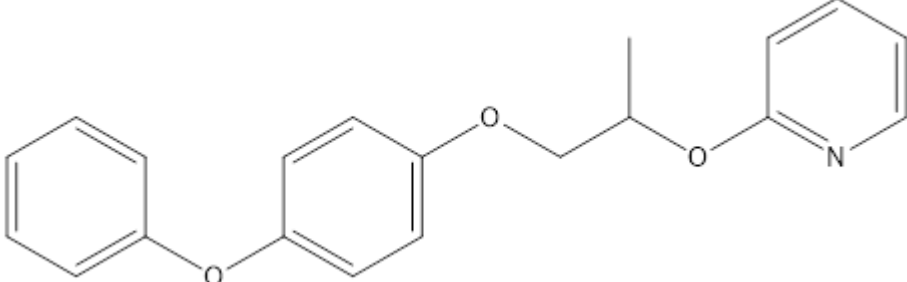
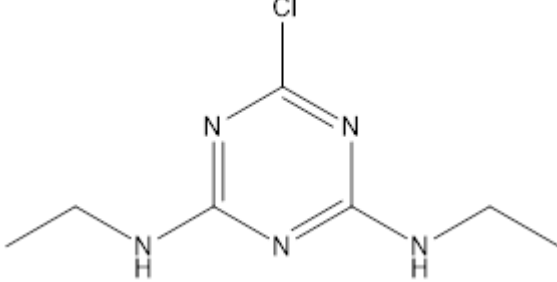
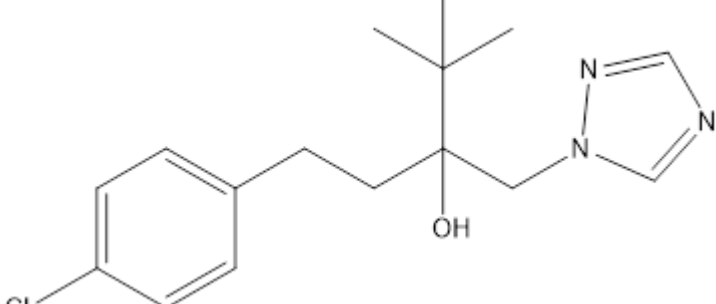
Imazalil	 <chem>CC(=C)OCC(C1=CN=CN1)c2cc(Cl)cc(Cl)c2</chem>
Imidacloprid	 <chem>CC1=CN=CN1C2=CC=CC=C2N(C2=CC=CC=C2Cl)[N+](=O)[O-]</chem>
Linurom d6	 <chem>CC(C)(C)N(C(=O)Nc1ccc(Cl)c(Cl)c1)OC(C)(C)C</chem>
Lufenuron	 <chem>FC1=CC=C(C=C1C(F)=O)C(=O)NC(=O)Nc2cc(Cl)cc(Cl)c2OCC(F)C(F)F</chem>

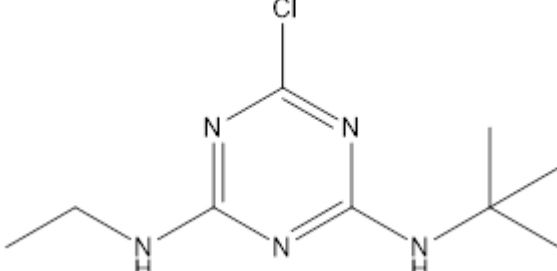
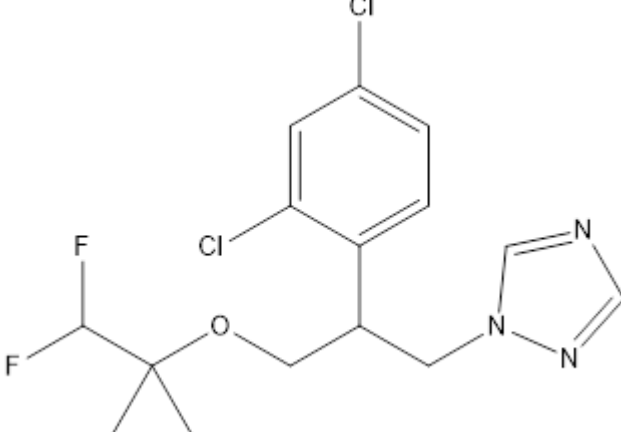
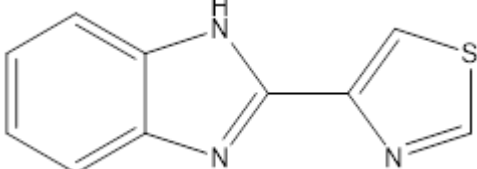
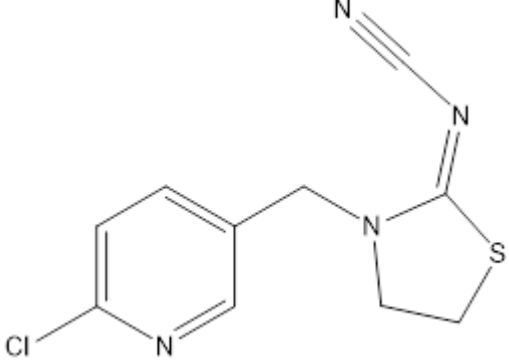
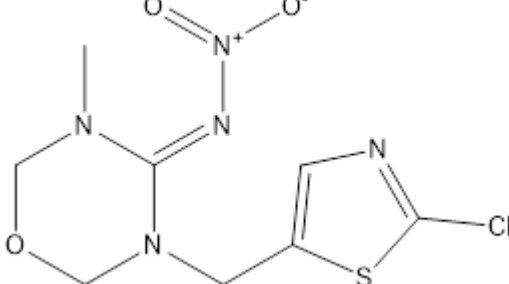
Malationa	 <chem>CCOP(=S)(OC)SCC(C)SCC(=O)OCC</chem>
Metamidofós	 <chem>CSP(=O)(OC)N</chem>
Metidationa	 <chem>COP(=S)(OC)SCCN1C(=O)SC1OC</chem>
Metiocarbe	 <chem>CN(C)C(=O)OC1=CC=C(C)C(OC)=C1C</chem>
Metiocarbe sulfona	 <chem>CN(C)C(=O)OC1=CC=C(C)C(S(=O)(=O)C)=C1C</chem>

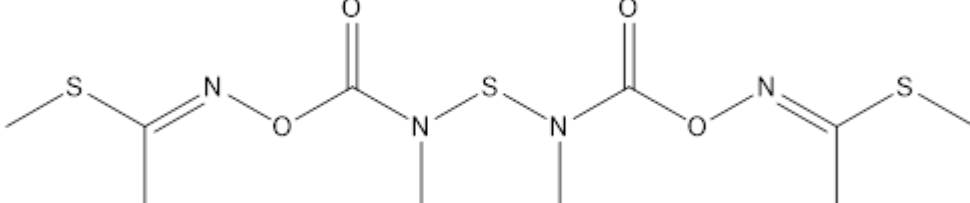
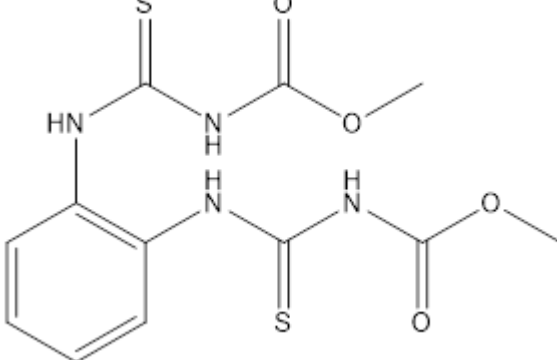
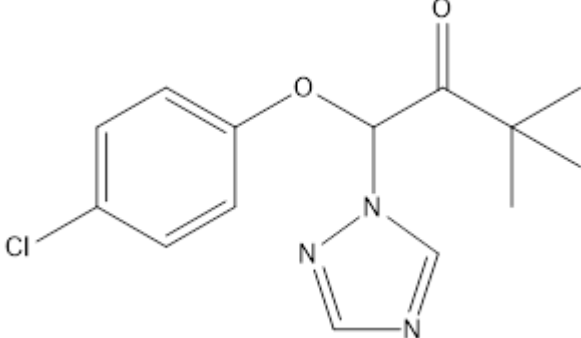
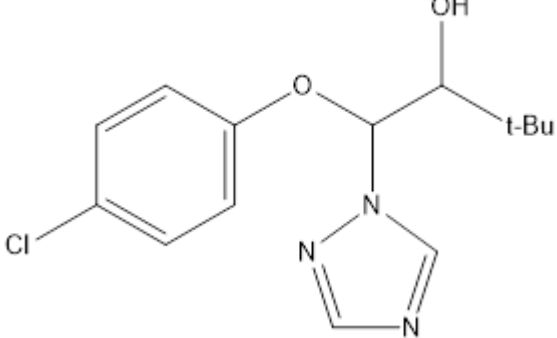
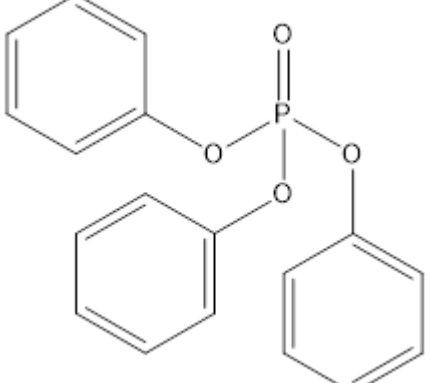
Metiocarbe sulfoxide	 <chem>CSC(=O)c1cc(C)c(C)c1OC(=O)NC</chem>
Metomil	 <chem>CN(C)C(=O)ON=C(C)S</chem>
Metsulfuron metílico	 <chem>COC(=O)c1ccc(S(=O)(=O)NC(=O)NC2=NC(C)=NC(OC)=N2)cc1</chem>
Pendimetalina	 <chem>CCN(CC)c1c(C)cc([N+](=O)[O-])cc1[N+](=O)[O-]</chem>
Picoxistrobina	 <chem>COC(=O)C(OC)C1=CC=C(C1)COc2cc(C(F)(F)F)nc2</chem>

Piraclostrobina	 <p>The chemical structure of Piraclostrobina consists of a 4-chlorophenyl ring connected to the 2-position of an imidazole ring. The 5-position of the imidazole ring is linked via an oxygen atom to a benzyl group. The benzyl group is further substituted with a dimethylamino group (-N(CH₃)₂) at the para position.</p>
Pirimicarbe	 <p>The chemical structure of Pirimicarbe is a pyrimidine ring substituted with two methyl groups at the 2 and 6 positions, a dimethylamino group (-N(CH₃)₂) at the 4 position, and a dimethylcarbamoyloxy group (-O-C(=O)-N(CH₃)₂) at the 5 position.</p>
Pirimifós metílico	 <p>The chemical structure of Pirimifós metílico features a pyrimidine ring with a dimethylphosphoryloxy group (-O-P(=S)(CH₃)₂) at the 2 position, an ethylamino group (-N(CH₂CH₃)₂) at the 4 position, and a methyl group at the 6 position.</p>
Procloraz	 <p>The chemical structure of Procloraz consists of a 1H-imidazole ring attached to the 2-position of a piperidine ring. The piperidine ring has a carbonyl group (-C(=O)-) at the 4 position and a propyl chain at the 1 position. The propyl chain is terminated by an ether linkage (-O-) to a 2,4,6-trichlorophenyl ring.</p>

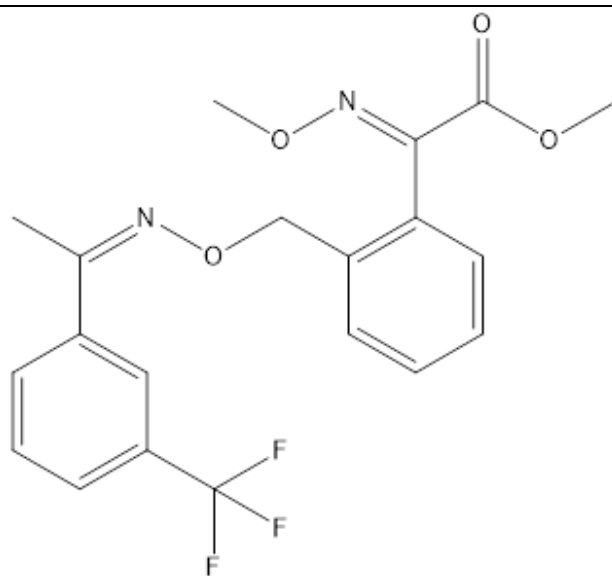
Procimidona	 <p>The chemical structure of Procimidona consists of a 1,3-dichlorobenzene ring attached to the nitrogen atom of a bicyclic imidazolidinone ring system. The bicyclic system is a 2,2,4,4-tetramethyl-1,3-dioxolane-5-one fused to a cyclopropane ring.</p>
Profenofós	 <p>The chemical structure of Profenofós features a benzene ring with a chlorine atom at the 1-position and a bromine atom at the 3-position. At the 4-position, there is a phosphorus atom double-bonded to an oxygen atom and single-bonded to another oxygen atom. This phosphorus atom is also bonded to a propyl group and an ethoxy group.</p>
Propargito	 <p>The chemical structure of Propargito is a cyclic ether consisting of a cyclohexane ring fused to a six-membered ring containing two oxygen atoms. One of the oxygen atoms is part of a sulfonate group (-SO₂O-) which is further attached to a propargyl group (-CH₂-C≡CH). The other oxygen atom is attached to a para-substituted phenyl ring, which has a tert-butyl group at the 4-position.</p>
Propiconazol	 <p>The chemical structure of Propiconazol features a 1,2,4-triazole ring connected via a methylene group to a central carbon atom. This central carbon is also bonded to a 1,3-dichlorobenzene ring and a five-membered cyclic acetal ring. The acetal ring has a propyl group attached to one of its oxygen atoms.</p>

Propizamida	 <p>The chemical structure of Propizamida consists of a benzene ring with two chlorine atoms at the 3 and 5 positions. A propionamide group is attached to the benzene ring at the 1 position. The nitrogen atom of the propionamide group is further substituted with a tert-butyl group and a propargyl group (a methylene group attached to a terminal alkyne).</p>
Pirazofós	 <p>The chemical structure of Pirazofós features a pyrazolo[1,5-a]pyrimidine bicyclic core. It has a methyl group at the 6-position, an ethyl ester group at the 7-position, and a diethyl phosphoramidate group at the 5-position.</p>
Piriproxifen	 <p>The chemical structure of Piriproxifen is a symmetrical ether compound. It consists of two phenyl rings connected by an oxygen atom. This central ether linkage is further connected via two other oxygen atoms to a central carbon atom, which is also bonded to a methyl group. This central carbon is also connected to a pyridine ring.</p>
Simazina	 <p>The chemical structure of Simazina is a 1,3,5-triazine ring with a chlorine atom at the 4-position and two ethylamino groups (-NHCH₂CH₃) at the 2 and 6 positions.</p>
Tebuconazol	 <p>The chemical structure of Tebuconazol features a 1,2,4-triazole ring connected via its nitrogen atom to a propyl chain. The terminal carbon of this propyl chain is also bonded to a hydroxyl group (-OH) and a tert-butyl group. The other end of the propyl chain is attached to a 4-chlorophenyl ring.</p>

Terbutilazina	 <p>The chemical structure of Terbutilazina consists of a central 1,3,5-triazine ring. A chlorine atom is attached to the 4-position of the triazine ring. The 2-position is substituted with an ethylamino group (-NH-CH₂-CH₃), and the 6-position is substituted with a tert-butylamino group (-NH-C(CH₃)₃).</p>
Tetraconazol	 <p>The chemical structure of Tetraconazol features a central 1,2,4-triazole ring. A tert-butyl group is attached to the 5-position of the triazole ring. The 4-position is substituted with a 2-chlorophenyl group. The 3-position is substituted with a 2-(2-(2-(2-fluoroethyl)ethyl)ethyl)oxyethyl group.</p>
Tiabendazol	 <p>The chemical structure of Tiabendazol consists of a benzimidazole ring system. The 2-position of the benzimidazole ring is substituted with a 1,3,4-thiazole ring.</p>
Tiacloprido	 <p>The chemical structure of Tiacloprido features a 3-chloropyridine ring. The 4-position of the pyridine ring is substituted with a 2-(1,3,4-thiazolidin-2-ylidene)ethyl group.</p>
Tiametoxam	 <p>The chemical structure of Tiametoxam consists of a 1,3,6-triazin-2(1H)-one ring system. The 4-position of the triazinone ring is substituted with a tert-butyl group. The 6-position is substituted with a 2-(2-chloro-1,3,4-thiazol-5-yl)ethyl group.</p>

Tiodicarbe	
Tiofanato metílico	
Triadimefon	
Triadimenol	
Trifenilfosfato	

Trifloxistrobina



APÊNDICE B – Equações da superfície de resposta para o planejamento experimental das condições cromatográficas para cada um dos analitos avaliados.

Composto	equação
2,4 D	$z = 5662813,25 - 11286,13 * x - 454622,5 * y + 27,9465 * x^2 - 557021,5$
Acefato	$z = 243698714,8125 + 64642,067500001 * x - 9688222,75 * y - 15994,107375 * x^2 + 158046209,$
Acetamiprido	$z = 1692243815,5625 - 4503755,3925 * x - 11411750, * y + 41419,144625 * x^2 - 6062846E2$
Aldicarbe	$z = 583565257,9375 - 1363953,9375 * x - 23275468,75 * y - 292,098125 * x^2 - 5637790,4$
Atrazina	$z = 1970259531,875 - 3796878,005 * x - 113795781,25 * y + 1081,8612499999 * x^2 - 1148871E2$
Azinfós etil	$z = 225324600,6875 - 590568,0175 * x - 5989437,5 * y + 1566,372375 * x^2 - 21414480,$
Azinfós metil	$z = 217265756,0625 - 651629,1725 * x - 5911937,5 * y + 10078,493375 * x^2 - 82538483,$
Azoxistrobina	$z = 2397500049,0625 - 6227719,1425 * x - 70679906,25 * y + 21806,820375 * x^2 - 3179393E2$
Bentazona	$z = 163590137,3125 - 381143,4425 * x - 10397778,5 * y + 1590,661375 * x^2 - 23239018,$
Bifentrina	$z = 19950900,75 - 77752,35 * x + 2078768, * y + 154,498 * x^2 + 1589086,$
Bitertanol	$z = 171184010,125 - 422719,385 * x - 10585790, * y + 3876,75375 * x^2 - 36412937,$
Boscalida	$z = 423459450,6875 - 1014819,0375 * x - 14182461, * y - 7655,489625 * x^2 + 86902010,1$
Buprofezina	$z = 1567997723,75 - 2998830,04 * x - 35411718,75 * y - 47134,67775 * x^2 + 367751514,$
Carbaril	$z = 1152207880, -2833603,35 * x - 66280367,25 * y + 25114,729 * x^2 - 2934291E2$
Carbendazim	$z = 2520249828,125 - 3589520,625 * x - 51888250, * y - 22956,75 * x^2 + 280026750,$
Carbofurano 3-OH	$z = 430149385,5 - 1047985,55 * x - 9952785,25 * y + 4224,74925 * x^2 - 75486074,$
Carboxim	$z = 3723488045,9375 - 10263943,8675 * x - 167620250, * y + 153958,798875 * x^2 - 1320178E3$

Composto	equação
Ciproconazol	$z=561991260,9375-1359653,0275*x-15791664,*y-2200,620125*40,*x+33408319,6$
Clomazona	$z=2457968988,125-6518090,155*x-29415968,75*y+22177,05075*40,*x-3196042E2$
Clorpirifós	$z=347047876,75-613098,97*x-26402080,*y-1192,43725*40,*x-12817345,$
Clorpirifós metil	$z=192109422,3125-463597,1625*x-7561173,*y+4133,516875*40,*x-59764662,$
Cresoxim metílico	$z=429100717,5-952513,71*x-16305449,25*y+4932,043*40,*x-83986215,$
Deltametrina	$z=41111470,25-100822,58*x-2649640,75*y+1321,03025*40,*x-14894552,$
Diclorvós	$z=403340388,375-900765,825*x-20885988,25*y-7724,454*40,*x+94255723,$
Difenoconazol	$z=366993773,3125-745941,2725*x-13939371,25*y+4447,631875*40,*x-67777128,$
Diflubenzurom	$z=491210762,6875-1085216,2875*x-29394132,75*y-867,188625*40,*x-6868619,9$
Dimetoato	$z=537207011,5-1451783,71*x+762359,24999998*y-8433,541*40,*x+111650892,$
Dissulfotom	$z=5475446,3125-18221,8225*x+304738,5*y-380,624875*40,*x+7195816,37$
Diurom	$z=1507548356,5-3726683,97*x-75690328,25*y+32987,4815*40,*x-3847770E2$
Epoxiconazol	$z=1221775539,75-2293957,62*x-87654664,25*y-6381,623*40,*x-7772948,$
Espinetoram	$z=272574560,3125-888568,7925*x+10081175,75*y+8604,403125*40,*x-84858993,$
Espinosade a	$z=625615115,375-1535035,235*x-12699789,*y+6083,1445*40,*x-98939973,$
Espinosade d	$z=125215511,5-343987,8*x+3829045,*y+2110,84125*40,*x-27273737,$
Etefom	$z=1725423758,9375-4642166,9375*x-50447015,75*y+26968,934625*40,*x-2344665E2$
Etiona	$z=422843,625-1728,195*x+20293,75*y+53,14775*40,*x-406117,75$

Composto	equação
Etofenprox	$z=174241567,75-242921,3*x-7596201,25*y-2077,98975*40,*x-12413950,$
Famoxadona	$z=156751362,3125-304058,4425*x-4178435,5*y+5353,769625*40,*x-68579583,$
Fenoxicarbe	$z=1533617745,-3622594,84*x-90922078,*y+12050,44325*40,*x-1661958E2$
Fenpiroximato	$z=1337330854,9375-3345042,5275*x-65632125,*y+45059,889125*40,*x-5874030E2$
Fenpropimorfe	$z=3086099878,4375-8981254,5275*x-69877562,5*y+128741,179625*40,*x-1106824E3$
Fentiona	$z=656228820,1875-1635773,8375*x-20476465,*y+12271,700625*40,*x-1726208E2$
Fipronil	$z=3091103,3125+802,11750000002*x+190472,*y-264,135625*40,*x+892416,125$
Flumioxazin	$z=63725644,1875-171271,4775*x-2243952,5*y+1610,723375*40,*x-16302349,$
Fluquiconazol	$z=303621533,8125-762380,5725*x-13616953,25*y+3966,562625*40,*x-54214142,$
Flutriafol	$z=227514858,0625-521810,1225*x-12917326,25*y+1363,299875*40,*x-21430851,$
Forato	$z=666498415,5-1609804,48*x-38111379,*y+9196,769*40,*x-96047782,$
Fosmete	$z=2166172427,125-4852730,545*x-115864390,5*y+36692,832*40,*x-4950030E2$
Imazalil	$z=943590761,625-2349770,915*x-47541710,75*y+11155,37*40,*x-97099068,$
Imidacloprido	$z=209655389,875-387771,745*x-14995300,75*y-1667,30475*40,*x+7857734,75$
Lufenurom	$z=491361,375-568,665*x-18518,75*y-81,6825*40,*x+908256,5$
Malationa	$z=719645262,-1714183,37*x-34137722,75*y+13638,8325*40,*x-1986431E2$
Metamidofós	$z=21045278,375+641850,275*x+7675257,75*y-28014,627*40,*x+354089057,$
Metidationa	$z=915895352,5-2016820,81*x-47235140,75*y+12518,00925*40,*x-2075119E2$
Metiocarbe	$z=1425268988,375+90253,715000002*x-84513359,25*y-106318,76375*40,*x+697543819,$

Composto	equação
Metiocarbe sulfona	$z=1255976695,5-2896165,25*x-70814304,75*y+3565,73525*40,*x-55964676,$
Metiocarbe sulfóxido	$z=1181170013,625-2571504,105*x-43710375,*y+733,63475000002*40,*x-56524049,$
Metomil	$z=97821658,25-123331,55*x-4525476,5*y-1395,732*40,*x+20030996,$
Metsulfurom metílico	$z=568687471,3125-1721856,6425*x-8040164,*y+20173,277375*40,*x-1516275E2$
Pendimetalina	$z=47938329,5625-82879,0925*x-2886112,*y-1069,671625*40,*x+7635582,13$
Picoxistrobina	$z=1751468091,1875-3903651,0975*x-44663422,*y+27196,359375*40,*x-4879771E2$
Piraclostrobina	$z=1661022823,9375-4275557,7775*x-102417742,25*y+66970,259875*40,*x-5966431E2$
Pirazofós	$z=903641066,875-2145342,285*x-42335156,25*y+16415,3975*40,*x-1968241E2$
Pirimicarbe	$z=997318728,8125-2226408,0825*x-14782125,*y-5650,9161249999*40,*x+8647393,62$
Pirimifós metílico	$z=2380926419,-5528993,98*x-134812890,5*y+38287,40225*40,*x-5233000E2$
Piriproxifem	$z=420442167,1875-995650,9375*x-17760660,*y+3021,266625*40,*x-50114661,$
Procimidona	$z=62196606,8125-135642,9525*x-2620882,75*y-1897,120875*40,*x+21925167,4$
Procloraz	$z=36979439,4375-72298,1775*x-2931170,25*y-426,476375*40,*x+3343946,88$
Profenofós	$z=933706797,6875-2111573,1275*x-39102031,25*y+6847,205125*40,*x-1452129E2$
Propargito	$z=1006519408,75-2418140,54*x-62526707,25*y+11499,147*40,*x-1473528E2$
Propiconazol	$z=418373586,0625-574337,6625*x-12751527,25*y-8030,581625*40,*x+10273627,1$
Propizamida	$z=638297055,375-1563354,035*x-36371293,*y+13897,4995*40,*x-1690094E2$
Simazina	$z=618331948,1875-1832193,9575*x-17468312,5*y+17946,901875*40,*x-93196603,$
Tebuconazol	$z=1174642543,9375-2152453,5975*x-44484968,75*y-7746,484375*40,*x-42972328,$

Composto	equação
Terbutilazina	$z=3771419470,3125-10072182,2625*x-93407812,5*y+112001,066375*40,*x-1499580E3$
Tetraconazol	$z=722402011,125-2011961,775*x-23146054,75*y+11149,59075*40,*x-73426204,$
Tiabendazol	$z=1518250796,25-2414235,*x-35355984,25*y-12982,9375*40,*x+20592250,5$
Tiacloprido	$z=3840119100,9375-10005506,0575*x-82075343,75*y+110558,748125*40,*x-1524932E3$
Tiametoxam	$z=265378165,3125-453935,7025*x-1317101,5*y-8002,017625*40,*x+77560354,1$
Tiodicarbe	$z=375213604,5625-1066755,7125*x-10987398,5*y+8445,825625*40,*x-59737112,$
Tiofanato metílico	$z=1257537453,3125-3113303,2525*x-33644593,75*y+18270,648875*40,*x-2924021E2$
Triadimefom	$z=415644262,6875-1091566,5375*x-8298062,5*y+2477,409875*40,*x-35406627,$
Triadimenol	$z=116089619,375-131550,235*x-5333475,5*y-1044,00875*40,*x+3060512,75$
Trifenilfosfato	$z=3506409,375-13236,045*x+493873,25*y-84,15875*40,*x+2562160,75$
Trifloxistrobina	$z=1302829355,0625-3229298,2725*x-76684336,*y+12674,107875*40,*x-1236933E2$

APÊNDICE C – Resultados estatísticos da avaliação do solvente extrator

ANOVA para os 3 solventes (acetonitrila, acetonitrila saturada com hexano e hexano) sem congelamento

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,16905	2	0,084525	1815,141	1,28E-15	3,885294
Dentro dos grupos	0,000559	12	4,66E-05			
Total	0,169609	14				

ANOVA para os solventes acetonitrila e acetonitrila saturada com hexano sem congelamento

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0	1	0	0	1	5,317655
Dentro dos grupos	9,6E-06	8	1,2E-06			
Total	9,6E-06	9				

ANOVA para os 3 solventes (acetonitrila, acetonitrila saturada com hexano e hexano) com congelamento

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,200738	2	0,100369	20483,43	6,31E-22	3,885294
Dentro dos grupos	5,88E-05	12	4,9E-06			
Total	0,200796	14				

ANOVA para os solventes acetonitrila e acetonitrila saturada com hexano com congelamento

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	4E-07	1	4E-07	0,2	0,666581	5,317655
Dentro dos grupos	0,000016	8	0,000002			
Total	1,64E-05	9				

ANOVA comparando os solventes (acetonitrila e acetonitrila saturada com hexano) com e sem congelamento

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,66E-05	3	5,53E-06	3,458333	0,041481	3,238872
Dentro dos grupos	2,56E-05	16	1,6E-06			
Total	4,22E-05	19				

ANEXOS

ANEXO A – DADOS DAS AMOSTRAS UTILIZADAS

Nº da amostra	Tipo	Lote	Data de fabricação	Data de validade
A01	Azeite de Oliva	2066/17	12/2017	06/2019
A02	Azeite de Oliva	L867	08/09/2017	08/09/2019
A03	Azeite de Oliva	7292H9495	19/10/2017	19/04/2019
A04	Azeite de Oliva	L291	18/10/2017	18/10/2019
A05	Azeite de Oliva	8101423	13/01/2018	13/07/2019
A06	Azeite de Oliva	L06P	12/06/2017	12/06/2019
A07	Azeite de Oliva	15FEV18	-	15/07/2019
A08	Azeite de Oliva	15FEV18	-	15/07/2019
A09	Azeite de Oliva	15FEV18	-	15/07/2019
A10	Azeite de Oliva	15FEV18	-	15/07/2019
A11	Azeite de Oliva	090517	09/05/17	09/05/19
A12	Azeite de Oliva	15-180-01	28/12/2016	28/12/2018
A13	Azeite de Oliva	OCT17	10/2017	10/2019
A14	Azeite de Oliva	B298A	25/10/2017	25/10/2019
A15	Azeite de Oliva	7292H9495	10/2017	04/2019
A16	Azeite de Oliva	NC004	30/11/2017	30/11/2020
A17	Azeite de Oliva	-	-	-
A18	Azeite de Oliva	-	-	-
A19	Azeite de Oliva	NC004	30/11/2017	30/11/2020
A20	Azeite de Oliva	174054	20/10/2017	20/08/2019
A21	Azeite de Oliva	LVO1Y	27/08/16	27/08/2018
A22	Azeite de Oliva	029	28/12/2016	28/12/2019
A23	Azeite de Oliva	L04017	09/02/2017	09/02/2019
O01	Azeitona Verde colhida em pomar	-	-	-
O02	Azeitona Verde colhida em pomar	-	-	-
O03	Azeitona Verde colhida em pomar	-	-	-
O04	Azeitona Verde colhida em pomar	-	-	-

Nº da amostra	Tipo	Lote	Data de fabricação	Data de validade
O05	Azeitona Verde colhida em pomar	-	-	-
O06	Azeitona Verde	L26/03/18	-	26/09/2019
O07	Azeitona Verde	1800665	-	18/05/2019
O08	Azeitona Verde	67684		11/2019
O09	Azeitona Verde	28/05/18(3)		28/11/2019
O10	Azeitona Verde	13/06/18		13/06/2019
O11	Azeitona Verde	656		10/2018