

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

Jonatan Vinicius Dias

**AGROTÓXICOS EM ÓLEOS COMESTÍVEIS: AVALIAÇÃO DE
PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DE EXTRATO EMPREGANDO
DIFERENTES ADSORVENTES E VALIDAÇÃO POR UHPLC-MS/MS**

**Santa Maria, RS
2016**

Jonatan Vinicius Dias

**AGROTÓXICOS EM ÓLEOS COMESTÍVEIS: AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTO
DE PURIFICAÇÃO DE EXTRATO EMPREGANDO DIFERENTES ADSORVENTES
E VALIDAÇÃO POR UHPLC-MS/MS**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. Carmem Dickow Cardoso

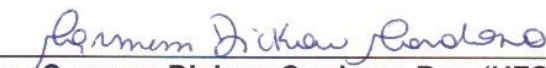
Santa Maria, RS
2016

Jonatan Vinicius Dias

AGROTÓXICOS EM ÓLEOS COMESTÍVEIS: AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DE EXTRATO EMPREGANDO DIFERENTES ADSORVENTES E VALIDAÇÃO POR UHPLC-MS/MS

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

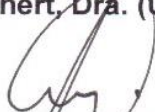
Aprovado em 16 de dezembro de 2016:



Carmem Dickow Cardoso, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



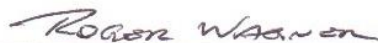
Bárbara Reichert, Dra. (UNIOESTE)



Luciano Gebler, Dr. (EMBRAPA)



Marcelo Barcellos, Dr. (UFSM)



Roger Wagner, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

- A Deus que sempre se fez presente em minha vida, guiando meus passos e me mostrando os caminhos a seguir.
- Aos meus pais Francisco e Inês. Só tenho a agradecer imensamente a Deus por ter me dado vocês como pais. Vocês são minha força e minha inspiração. Com vocês e por vocês aprendi, e busco sempre, me tornar uma pessoa melhor.
- À Suelen pela presença e cuidados constantes. Não tenho palavras que descrevam a gratidão que sinto por ter você ao meu lado. Obrigado por me dar força e ânimo para finalizar essa etapa que não seria possível sem você. Eu te amo.
- À Prof.^a Dr.^a Carmem Cardoso, minha orientadora e amiga, por toda a ajuda, palavras de conforto e incentivo.
- À minha co-orientadora e amiga Prof.^a Dr.^a Ionara Pizzutti. Obrigado por todas as oportunidades de crescimento, tanto pessoal quanto profissional.
- Ao professor Dr. Amadeo R. Fernández-Alba pela confiança e orientação desse trabalho durante o período na Espanha.
- Ao EURL-FV por financiar o período na Espanha e à União Europeia (*Directorate-General SANTE*) por financiar essa pesquisa.
- Às professoras Dr.^a Eloisa Dutra Caldas, Dr.^a Veronica Cesio e Dr.^a Carla Botolli e à Dr.^a Adélia Araújo pelas contribuições no exame de qualificação desta tese.
- Aos professores Dr.^a Bárbara Reichert, Dr. Marcelo Barcellos e Dr. Roger Wagner e ao Dr. Luciano Gebler por terem aceitado o convite de avaliar esta tese.
- Aos amigos que fiz no EURL, em especial à Sonia, Elena, Ana Lozano, Victor, Ana Uclés, Lukasz, Samanta e Carmen. Obrigado por toda a ajuda no desenvolvimento desse trabalho e pelas mensagens de incentivo, mesmo de longe.
- Às todos os meus amigos, de longe ou de perto, em especial as de longa data Laís e Karla por todo o apoio e incentivo e à Bárbara, por ter tornado o tempo na Espanha menos difícil.
- Aos colegas e amigos do CEPARC.
- Ao Ademir e à Valéria por estarem sempre dispostos a auxiliar e serem sempre tão solícitos e competentes em seus trabalhos.

“Everybody is a genius. But if you judge a fish by its ability to climb a tree it will live its whole life believing that it is stupid.”

(Albert Einstein)

RESUMO

AGROTÓXICOS EM ÓLEOS COMESTÍVEIS: AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DE EXTRATO EMPREGANDO DIFERENTES ADSORVENTES E VALIDAÇÃO POR UHPLC-MS/MS

AUTOR: Jonatan Vinicius Dias

ORIENTADORA: Carmem Dickow Cardoso

O objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência de diferentes adsorventes na remoção de gordura de extratos provenientes de matrizes de óleos comestíveis (oliva, soja e girassol) durante a determinação de resíduos de 165 agrotóxicos empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O procedimento de extração empregado nesse estudo foi o método QuEChERS citrato e o primeiro estudo realizado foi avaliando a eficiência de uma etapa de precipitação em baixas temperaturas (*freezing out*) anterior a etapa de purificação, ambos realizados em azeite de oliva. Durante a avaliação da etapa de purificação, três diferentes adsorventes foram estudados, onde um deles foi empregando de duas maneiras distintas, totalizando quatro técnicas diferentes de purificação: i) PSA em combinação com sulfato de magnésio (d-SPE); ii) Z-sep combinado com sulfato de magnésio (d-SPE); iii) Z-sep (SPE em cartucho) e iv) EMR-Lipid (d-SPE). Após avaliação da etapa de *freezing out* e da etapa de purificação empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-QTOF-MS) a técnica de precipitação em baixas temperaturas combinada com a purificação por dispersão em fase sólida empregando EMR-Lipid demonstrou importantes vantagens quando comparadas às outras técnicas avaliadas, como melhores resultados de recuperação dos analitos e RSD%. O método foi validado para azeite de oliva e óleos de soja e girassol empregando cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-TQ-MS/MS) nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O percentual de recuperação médio para os três níveis de fortificação nas três matrizes foi de cerca de 70% com RSD médio menor do que 11%. A maioria dos agrotóxicos com percentuais de recuperação inferiores a 70% demonstraram valores de RSD% menores do que 10. Por essa razão, os estudos de linearidade e efeito matriz foram realizados empregando a técnica de *procedural standard calibration*, uma técnica alternativa de calibração que compensa os baixos valores de recuperação e efeitos da matriz, na faixa de 10 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Dos agrotóxicos estudados, 93% apresentaram coeficientes de determinação maiores ou iguais a 0,99. O efeito matriz foi similar quando os três óleos foram comparados. O método foi aplicado com sucesso na determinação de agrotóxicos em matrizes de óleos adquiridas nas cidades de Almería e Murcia, localizadas na região sudeste da Espanha.

Palavras-chave: azeite; resíduos; cromatografia; espectrometria de massas.

ABSTRACT

PESTICIDES IN EDIBLE OILS: EVALUATION OF EXTRACT CLEAN-UP PROCEDURE USING DIFFERENT ADSORBENTS AND VALIDATION BY UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Jonatan Vinicius Dias
ADVISOR: Carmem Dickow Cardoso

The goal of this study was to evaluate the efficiency of several adsorbents on fat removal from extracts of edible oil matrices (olive, soya and sunflower) during residue determination of 165 pesticides employing liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The extraction procedure employed in this study was the citrate version of QuEChERS method and the first study carried out was evaluating the efficiency of low temperature precipitation step (freezing out) before clean-up step, both tested in olive oil. During clean-up evaluation, three different adsorbents were studied, where one of them was employed in two different ways, totalizing four different clean-up procedures: i) PSA in combination with magnesium sulfate (d-SPE); ii) Z-sep combined with magnesium sulfate (d-SPE); iii) Z-sep (cartridges SPE) and iv) EMR-Lipid (d-SPE). After evaluation of freezing out and clean-up procedures employing liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS), the freezing out combined with clean-up by dispersive solid phase extraction using EMR-Lipid showed important advantages when compared to the other evaluated techniques, such better recovery rates and RSD%. The method was validated for olive, soya and sunflower oils employing ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-TQ-MS/MS) at 10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Mean recovery for all evaluated levels in the three matrices was about 70% with mean RSD% below 11%. Most of the pesticides that showed recovery below 70% presented RSD% values lower than 10. For this reason, linearity and matrix effect studies were carried out employing procedural standard calibration approach, an alternative type of calibration that compensates low recovery values and matrix effect, in the range from 10 to 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. From all evaluated pesticides, 93% showed determination coefficient equal to or higher than 0.99. Matrix effect was similar when the three oils were compared. The method was successfully applied on pesticides determination in oil matrices purchased in Almería and Murcia cities, located at southeastern of Spain.

Key words: oils; residues; chromatography; mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Dados do consumo de azeite de oliva dos dez maiores consumidores do mundo durante os anos de 2014/2015.....34
- Figura 2 – Cromatograma obtido pela análise de amostras “branco” de azeite de oliva por UHPLC-QTOF-MS submetidas ao procedimento de extração pelo método QuEChERS avaliando a influência da etapa de *freezing out*.....66
- Figura 3 – Substâncias extraídas da matriz “branco” de azeite de oliva quando submetidas ao procedimento de extração empregando *freezing out* (A) e sem o uso de *freezing out* (B). Cada ponto do gráfico corresponde a um componente da matriz.67
- Figura 4 – Cromatograma obtido pela análise de amostras “branco” de azeite de oliva por UHPLC-QTOF-MS submetidas ao procedimento de extração pelo método QuEChERS seguido de *freezing out* e purificação por SPE empregando quatro procedimentos.69
- Figura 5 – Substâncias extraídas da matriz “branco” de azeite de oliva quando submetidas ao procedimento de extração pelo método QuEChERS e *freezing out* empregando purificação com (A) EMR-Lipid, (B) Z-sep d-SPE, (C) Z-sep SPE em cartucho e (D) PSA. Cada ponto do gráfico corresponde a um componente da matriz70
- Figura 6 – Percentuais de recuperação e RSD (%) (n=5) para os agrotóxicos fortificados na matriz “branco” de azeite de oliva empregando diferentes técnicas de purificação e análise por UHPLC-TQ-MS/MS.....71
- Figura 7 – Procedimento de extração empregado para determinação de agrotóxicos em óleos comestíveis empregando UHPLC-TQ-MS/MS72
- Figura 8 – Percentual de variação da inclinação das curvas analíticas preparadas via PSC para azeite de oliva e óleos de soja e girassol.....90
- Figura 9 – Sinais das transições de quantificação (A) e confirmação (B) do agrotóxico dimetoato determinado em amostras de azeite de oliva.....98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agrotóxicos selecionados, tempos de retenção e parâmetros de análise do espectrômetro de massas para determinação dos agrotóxicos analisados por UHPLC-TQ-MS/MS.	54
Tabela 2 – Limite de quantificação, percentual de recuperação e desvio padrão relativo (n=5) dos agrotóxicos fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras “branco” de azeite de oliva.	74
Tabela 3 – Limite de quantificação, percentual de recuperação e desvio padrão relativo (n=5) dos agrotóxicos fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras “branco” de óleo de soja.	78
Tabela 4 – Limite de quantificação, percentual de recuperação e desvio padrão relativo (n=5) dos agrotóxicos fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras “branco” de óleo de girassol.	82
Tabela 5 – Coeficiente de determinação (r^2) para as curvas analíticas preparadas via PSC para azeite de oliva, soja e girassol na faixa de 10 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$	86
Tabela 6 – Inclinações (<i>slopes</i>) das curvas analíticas preparadas através da técnica de PSC para os diferentes tipos de óleos estudados comparadas com uma curva analítica referência preparada em azeite de oliva.....	92
Tabela 7 – Resultados das análises de amostras de óleos de oliva soja e girassol e comparação com os valores de limite máximo de resíduo estabelecidos na união europeia para azeitonas e soja.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica, do idioma inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
CE	Energia de colisão, do idioma inglês <i>Collision Energy</i>
CI	Ionização química, do idioma inglês <i>Chemical Ionization</i>
C.I	Controladores do instrumento
C.P	Controladores do procedimento
CV	Coeficiente de variação
C18	Sílica modificada com hidrocarboneto linear octadecilsilano.
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do idioma inglês <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
ECD	Detector por captura de elétrons, do idioma inglês <i>Electron Capture Detector</i>
EI	Ionização por elétrons, do idioma inglês <i>Electron Ionization</i>
ESI	Ionização por eletronebulização, do idioma inglês <i>Electrospray Ionization</i>
EURL-FV	Laboratório de Referência da União Europeia para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, do idioma inglês <i>European Union Reference Laboratory for Pesticides in Fruit & Vegetable</i>
eV	Elétron volts
FAO	Organização das nações unidas para Agricultura e Alimentação, do idioma inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FPD	Detector fotométrico de chama, do idioma inglês <i>Flame Photometric Detector</i>
GC	Cromatografia gasosa, do idioma inglês <i>Gas Chromatography</i>
GPC	Cromatografia por permeação em gel, do idioma inglês <i>Gel Permeation Chromatography</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do idioma inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Ibama	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
Inpev	Instituto Nacional de Processamento de Embalagens Vazias
ISO	Organização Internacional para Padronização, do idioma inglês <i>International Organization for Standardization</i>
ITD	Detector por armadilha de íons, do idioma inglês <i>Ion Trap Detector</i>
LC	Cromatografia líquida, do idioma inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LMR	Limite máximo de resíduos
LOD	Limite de detecção, do idioma inglês <i>Limit of Detection</i>
LODi	Limite de detecção do instrumento, do idioma inglês <i>Instrument Limit of Detection</i>
LODm	Limite de detecção do método, do idioma inglês <i>Method Limit of Detection</i>

LOQ	Limite de quantificação, do idioma inglês <i>Limit of Quantification</i>
LOQi	Limite de quantificação do instrumento, do idioma inglês <i>Instrument Limit of Quantification</i>
LOQm	Limite de quantificação do método, do idioma inglês <i>Method Limit of Quantification</i>
MRC	Material de referência certificado
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas, do idioma inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Espectrometria de massas, do idioma inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial, do idioma inglês <i>Tandem Mass Spectrometry</i>
MSPD	Dispersão da matriz em fase sólida, do idioma inglês <i>Matrix solid phase dispersion</i>
m/z	Relação massa/carga
NBR	Norma Brasileira emitida pela ABNT
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do idioma inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
NFA	Administração Nacional de Alimentos da Suécia, do idioma inglês <i>National Food Administration</i>
NPD	Detector de nitrogênio e fósforo, do idioma inglês <i>Nitrogen Phosphorus Detector</i>
NVWA	Autoridade em segurança dos alimentos, produtos e consumidores, do idioma holandês <i>Nederlandse Voedsel-en Warenautoriteit</i>
ORBITRAP	Armadilha de íons orbital, do idioma inglês <i>orbital ion trap</i>
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos da Anvisa
PFPD	Detector fotométrico de chama pulsada, do idioma inglês <i>Pulsed Flame Photometric Detector</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PNCRC	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes do MAPA
PSA	Amina primária e secundária, do idioma inglês <i>Primary Secondary Amine</i>
PSC	Calibração por padrões de procedimento, do idioma inglês <i>Procedural Standard Calibration</i>
QTOF	Espectrômetro de massas híbrido tipo quadrupolo-tempo de voo, do idioma inglês <i>Quadrupole-Time of flight</i>
QuEChERS	Rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do idioma inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
RSD	Desvio padrão relativo, do idioma inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SIM	Monitoramento seletivo de íons, do idioma inglês <i>Selective Ion Monitoring</i>
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SPE	Extração em fase sólida, do idioma inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SRM	Monitoramento seletivo de reações, do idioma inglês <i>Selective Reaction Monitoring</i>
SweEt	Método sueco do acetato de etila, do idioma inglês <i>Swedish Ethyl Acetate Method</i>
TOF	Espectrômetro de massas do tipo tempo de voo, do idioma inglês <i>Time of Flight</i>

TQ Espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, do idioma inglês
Triploquadrupole

tR Tempo de retenção

UHPLC Cromatografia líquida de ultra alta eficiência, do idioma inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Fórmulas estruturais dos agrotóxicos estudados (Fonte: Sigma-Aldrich).....	108
APÊNDICE B – Agrotóxicos estudados e suas classificações, agrupados de acordo com o grupo químico.....	118
APÊNDICE C – Artigo referente ao trabalho da tese publicado na revista <i>Journal of Chromatography A</i> , volume 1462, páginas 8 – 18, 2016. Fator de impacto 3,926. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.07.072.....	121

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Principais solventes utilizados em cromatografia e suas características (Adaptado da Farmacopéia Brasileira 5ª ed. 2005).....	132
--	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Objetivo geral	19
1.2.2	Objetivos específicos	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	AGROTÓXICOS	20
2.1.1	Programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos no Brasil	23
2.2	MÉTODOS MULTIRRESÍDUO	25
2.3	DESENVOLVIMENTO HISTÓRICO DOS MÉTODOS MULTIRRESÍDUO BASEADOS NO USO DE ACETONITRILA, ACETATO DE ETILA E ACETONA	27
2.3.1	Acetonitrila	27
2.3.2	Acetato de etila	29
2.3.3	Acetona	31
2.4	ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS	32
2.5	DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM MATRIZES COM ALTO TEOR DE GORDURA	34
2.5.1	Técnicas de extração	34
2.5.2	Técnicas de purificação de extrato (<i>clean-up</i>)	35
2.6	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS	38
2.6.1	Cromatografia gasosa	39
2.6.2	Cromatografia líquida	41
2.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	42
2.7.1	Precisão	43
2.7.2	Seletividade	43
2.7.3	Exatidão	45
2.7.4	Sensibilidade/linearidade/faixa de trabalho	46
2.7.5	Limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ)	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	48
3.2	MATERIAIS	50
3.3	GASES, SOLVENTES E REAGENTES	50
3.4	AGROTÓXICOS SELECIONADOS	50
3.5	PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS	51
3.6	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	52
3.7	PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO	58
3.8	PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO	58
3.8.1	Procedimento de precipitação em baixas temperaturas (<i>freezing out</i>)	58
3.8.2	Procedimento de purificação do extrato (<i>clean-up</i>)	59

3.9	VALIDAÇÃO	60
3.9.1	Exatidão e precisão (estudo de fortificação e recuperação)	61
3.9.2	Limite de quantificação do método.....	61
3.9.3	Linearidade e faixa dinâmica linear.....	61
3.9.4	Avaliação da sensibilidade das curvas analíticas nos diferentes óleos (“efeito matriz”).....	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO EM BAIXAS TEMPERATURAS (<i>FREEZING OUT</i>)	64
4.2	PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO POR D-SPE E SPE EM CARTUCHO	68
4.3	VALIDAÇÃO	73
4.3.1	Exatidão e precisão	73
4.3.2	Curva analítica e linearidade	86
4.3.3	Avaliação da sensibilidade das curvas analíticas (“efeito matriz”)	90
4.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE ÓLEOS COMESTÍVEIS	95
5	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE A	108
	APÊNDICE B	118
	APÊNDICE C	121
	ANEXO A	132

1 INTRODUÇÃO

A presença de substâncias tóxicas em alimentos pode ser ocasionada por diversas fontes. Uma das principais é a utilização de agroquímicos, que são substâncias empregadas para aumentar a qualidade e a quantidade de alimentos necessários ao sustento da população.

Dentre os agroquímicos mais utilizados estão os agrotóxicos que são aplicados nos alimentos em vários estágios de cultivo e pós-colheita, para protegê-los do ataque de pragas e doenças e mantê-los próprios para consumo.

Na última década o uso de agrotóxicos no Brasil cresceu assustadoramente. Entre os anos de 2001 e 2008 a venda de agrotóxicos movimentou cerca de 7 bilhões de dólares, 5 bilhões a mais que nos anos anteriores. Desde então, o Brasil passou a ser o maior utilizador de agrotóxicos no mundo com cerca de 990 mil toneladas de agrotóxicos aplicados anualmente. No ano de 2009 esse número ultrapassou a marca de 1 milhão de toneladas. Devido à repercussão negativa pelo aumento de todos esses números, no ano de 2010 esses dados não foram divulgados (LONDRES, 2011).

Para garantir a aplicação das Boas Práticas Agrícolas no campo e, assim, garantir a segurança da população quanto ao consumo de alimentos, agências governamentais realizam o controle da presença de agrotóxicos remanescentes nos alimentos para que não gerem danos à saúde dos consumidores, estabelecendo os limites máximos de resíduos (LMR). Para garantir que os LMR sejam respeitados, os métodos analíticos empregados para determinação de agrotóxicos em alimentos devem ser capazes de quantificar resíduos dessas substâncias em concentrações muito baixas (ANVISA, 2010).

Nesse contexto, os métodos multirresíduo de extração combinados com a cromatografia acoplada à espectrometria de massas aparecem como poderosas ferramentas utilizadas há muitos anos, e continuamente empregadas, na detecção e quantificação de resíduos de agrotóxicos. Contudo, devido aos baixos valores de LMR estabelecidos pelos órgãos de fiscalização e a necessidade de que sejam detectadas quantidades cada vez mais baixas dessas substâncias nas mais diversas matrizes, os métodos multirresíduo devem ser cada dia mais eficientes para realizar a extração dos agrotóxicos das matrizes e as técnicas de detecção e de quantificação utilizadas devem gerar resultados inequívocos.

O desenvolvimento de métodos multirresíduo, os quais permitem a determinação de um grande número de substâncias em apenas uma análise, é a estratégia mais aplicada para a determinação de agrotóxicos. Entretanto, diferentes classes e propriedades, tanto de analitos quanto de matrizes, levam a algumas dificuldades relacionadas ao desenvolvimento de um método que cubra todos os analitos sob estudo levando em consideração todas as suas diferenças. Nesses casos, torna-se necessário diferentes métodos de processamentos das amostras considerando os analitos e a natureza da amostra (MASTOVSKA et al., 2005).

O desenvolvimento de métodos de extração para determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes com alto teor de gordura é uma tarefa difícil, já que mesmo pequenas quantidades de gordura extraídas devem ser removidas a fim de manter o sistema cromatográfico funcionando adequadamente. Por essa razão, diferentes estratégias durante a extração dos analitos podem suprir essa demanda e resolver os principais problemas relacionados a esse tipo de matriz. Métodos de extração efetivos combinados com técnicas de purificação aliados à tecnologias como a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/MS) conduzem a uma identificação e quantificação inequívocas dos agrotóxicos presentes nessas amostras.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver um método para purificação de extrato e posterior determinação de resíduos de agrotóxicos em óleos comestíveis empregando método QuEChERS citrato em combinação com cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS).

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência do procedimento de precipitação em baixas temperaturas na remoção de gordura de extratos de óleos comestíveis;
- Avaliar a eficiência de diferentes adsorventes na remoção de gordura de extratos de óleos comestíveis;
- Empregar a técnica de UHPLC-QTOF-MS na avaliação da eficiência dos diferentes adsorventes empregados durante a etapa de purificação;
- Comparar os resultados dos adsorventes avaliados em termos de recuperação (%) dos agrotóxicos em estudo;
- Investigar o efeito matriz em diferentes amostras de óleos, para o adsorvente escolhido, a fim de avaliar o emprego de uma única matriz “branco” de óleo para quantificação dos agrotóxicos em diferentes tipos de óleo;
- Aplicar o método desenvolvido e validado no monitoramento de amostras de óleos comestíveis comercializados na região sul e sudeste da Espanha.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGROTÓXICOS

A preocupação com a presença de agrotóxicos nos alimentos é tão antiga quanto à introdução destes produtos químicos no controle de pragas e doenças que afetam a produção agrícola. A relação entre agricultura e saúde pública sempre foi muito grande, seja na função de supridora de alimentos, seja pelos riscos à saúde humana, animal e ao meio ambiente causados pela utilização de agrotóxicos. O crescimento da demanda por alimentos que acompanhou a explosão demográfica resultou, em um primeiro momento, na intensificação da cultura em terras mais férteis e, em um segundo momento, na expansão dessas fronteiras agrícolas para áreas menos produtivas (VEIGA, 2007).

Apesar disso, somente em anos mais recentes, o avanço do conhecimento científico e as novas tecnologias da área laboratorial, vêm permitindo a avaliação da qualidade dos alimentos que chegam à mesa da população. O desenvolvimento dos agrotóxicos foi impulsionado pelo anseio do homem em melhorar sua condição de vida, procurando aumentar a produção dos alimentos. O modelo atual de produção agrícola brasileiro baseia-se na utilização de agrotóxicos para compensar problemas do processo produtivo. Neste contexto, os agrotóxicos foram introduzidos na agricultura brasileira como uma tentativa de corrigir as necessidades do solo e prevenir e/ou eliminar as pragas que prejudicariam a produtividade. Buscava-se, ao aumentar a produtividade, elevar a eficiência econômica do processo produtivo rural (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; VEIGA, 2007).

Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná, divulgados durante o Segundo Seminário sobre Mercado de Agrotóxicos e Regulação, realizado em Brasília, em abril de 2012, enquanto nos últimos dez anos o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos aplicando, naquele ano, cerca de 900 mil toneladas desses produtos nas mais diversas culturas (ABRASCO, 2012).

Apesar de os agrotóxicos auxiliarem no controle de pragas e doenças, os efeitos potenciais adversos da exposição da população em geral a essas

substâncias e, mais especificamente, nos grupos mais suscetíveis como idosos e crianças é um problema de saúde pública. Na união europeia a avaliação de produtos utilizados como protetores em plantas e o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos é regulamentada pela Regulação EC N° 1107/2009 e pela Regulação N° 396/2005. No Brasil, as bases para regulamentação foram definidas pela lei federal nº 7802, publicada em 1989 e, mais tarde, pelos decretos nº 4074/2002 e 5981/2006 (REICHERT et al., 2015).

De acordo com a lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989, agrotóxico é definido como: “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 1989).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization*), agrotóxico é definido como qualquer substância, ou mistura de substâncias de ingredientes químicos ou biológicos que se destinam a repelir, destruir ou controlar qualquer peste, ou regular o crescimento de uma cultura (FAO, 2014).

Já resíduo é definido como sendo qualquer substância presente no alimento, produto agrícola ou outro tipo de cultura ou ração animal bem como no meio ambiente incluindo solo, ar e água, como resultado do uso de um agrotóxico. O termo inclui qualquer substância derivada de um agrotóxico como produtos de conversão, metabólitos, produtos de quebra, produtos de reação e impurezas de significância toxicológica ou ecotoxicológica. O termo resíduo de agrotóxico inclui ainda, resíduo de fontes desconhecidas ou inevitáveis como, por exemplo, a contaminação ambiental (FAO, 2014).

A produção comercial de um agrotóxico envolve a obtenção do ingrediente ativo, cujo processo de síntese adotado irá determinar seu grau de pureza bem como o teor de impurezas. O ingrediente ativo corresponde a produtos químicos, na forma sólida ou líquida, que se encontra em pequenas porções nas formulações sendo o responsável pelo combate à praga ou doença que se deseja tratar. Sua

concentração é expressa em gramas por litro do produto comercial, em percentagem ou em partes por milhão em peso unitário. Esse composto obtido é chamado de produto técnico, que será utilizado para a formulação do produto final. A este são adicionados outros elementos químicos que garantem, sobretudo, a dispersão e a fixação do produto nas plantas a serem protegidas ou destruídas pelo efeito tóxico específico. O diluente ajuda a manter a dispersão e suspensão do ingrediente ativo aumentando a segurança no manuseio. Já os aditivos são substâncias surfactantes que melhoram a eficiência do agrotóxico pela alteração de suas propriedades físicas, químicas e biológicas. O produto final, obtido da mistura do produto técnico com outros produtos químicos auxiliares (aditivo e diluente), corresponde ao chamado produto formulado, que é aplicado nas lavouras (TERRA; PELAEZ, 2008; RODRIGUES, 2012).

No Brasil, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) é um dos órgãos federais responsáveis pelo registro e controle de agrotóxicos, atuando conjuntamente com a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A classificação dos agrotóxicos, por finalidade de uso, é definida pelo poder de ação do ingrediente ativo sobre organismos-alvo, como: inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, reguladores e inibidores de crescimento, entre outros. Dentre essas classes, as três principais, que representam cerca de 95% do consumo mundial de agrotóxicos, são os herbicidas (48%) inseticidas (25%) e fungicidas (22%) (TERRA; PELAEZ, 2008; BORSOI et al., 2014).

A ação esperada de um agrotóxico ocorre pela presença em sua composição de uma molécula química tóxica que incide sobre a atividade biológica normal dos seres vivos sensíveis a ela (TERRA, 2008).

A contaminação do meio ambiente pelos agrotóxicos não ocorre devido apenas pela aplicação desses produtos nas lavouras, mas também pelo descarte incorreto de embalagens de agrotóxicos. Segundo dados do ano de 2015 publicados pelo Instituto Nacional de Processamento de Embalagens Vazias (Inpev), 45,5 mil toneladas de embalagens vazias de agrotóxicos tiveram destino ambientalmente correto por meio do sistema campo limpo, programa gerenciado pelo Inpev para realizar o retorno das embalagens vazias de agrotóxicos no Brasil. Esse número representa 94% do total de embalagens primárias (aquelas que entram em contato

direto com o produto) comercializadas. Para o ano de 2016 a estimativa é de que sejam devolvidas 46,5 mil toneladas (Inpev, 2015).

2.1.1 Programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos no Brasil

No Brasil, dois programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal estão em andamento a fim de avaliar a concordância com os limites máximos de resíduos estabelecidos no país: o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). O primeiro destinado a amostras consumidas internamente e o segundo destinado a amostras para exportação (JARDIM; CALDAS, 2012).

Limite máximo de resíduo é definido como a concentração máxima de um resíduo que é legalmente permitido ou reconhecido como aceitável em um alimento, cultura ou ração animal (FAO, 2014).

O PARA da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foi criado em 2001 como um projeto com o objetivo de estruturar um serviço para avaliar e promover a qualidade dos alimentos em relação ao uso de agrotóxicos e afins. Em 2003, o projeto transformou-se em Programa, através da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 119/03, e passou a ser desenvolvido anualmente no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) (ANVISA, 2014).

Os resultados do Programa permitem: (a) verificar se os alimentos comercializados no varejo apresentam níveis de resíduos de agrotóxicos dentro dos LMR estabelecidos pela ANVISA e publicados em monografia específica para cada agrotóxico; (b) conferir se os agrotóxicos utilizados estão devidamente registrados no país e se foram aplicados somente nas culturas para as quais estão autorizados; (c) estimar a exposição da população a resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal e, conseqüentemente, (d) avaliar o risco à saúde dessa exposição (ANVISA, 2014).

Segundo resultados do PARA, publicados em outubro de 2014, para as amostras coletadas referentes à segunda etapa do ano de 2012, das 1397 amostras analisadas, 75% apresentaram resultados satisfatórios sendo que destes, 33% não apresentaram resíduos e 42% apresentaram quantidade de resíduo igual ou inferior ao LMR permitido pela legislação (ANVISA, 2014).

Das 1397 amostras avaliadas, 347 (25%) apresentaram resultados insatisfatórios. Do total de amostras, 1,9% apresentaram resíduos de agrotóxicos acima do LMR permitido. Em 294 amostras, 21% do total, foram determinados resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura. Do total de amostras, 27, correspondendo a 1,9% do total apresentaram simultaneamente, resíduos acima do LMR e presença de agrotóxico não autorizado para a cultura (ANVISA, 2014).

Segundo os dados mais atuais do PARA publicados pela Anvisa em 25 de novembro de 2016, foram analisadas 12051 amostras nos 27 estados do Brasil e no Distrito Federal durante os anos de 2013 e 2015. Pela primeira vez desde que o PARA foi criado, o risco de intoxicação agudo foi monitorado, o qual está relacionado às intoxicações que podem ocorrer dentro de um período de 24 horas após o consumo do alimento contendo resíduos. Do total de amostras analisadas nesse período, 1,11% apresentou potencial risco de intoxicação aguda relativo a 13 culturas. A grande parte das amostras que apresentaram situações de risco agudo está relacionada com a presença de Carbofurano, agrotóxico que está em fase de reavaliação pela Anvisa. A laranja foi a cultura com o maior número de amostras com potencial risco agudo de contaminação (12%) de um total de 744 amostras analisadas. Nesta cultura, do total de amostras com potencial risco agudo, 11% são relativas ao agrotóxico Carbofurano. Já para a cultura do abacaxi, 5% do total de amostras apresentou potencial risco agudo de contaminação pela presença de Carbendazim.

Com relação às irregularidades, aproximadamente 1% do total de amostras analisadas apresentaram agrotóxicos com concentrações maiores do que o LMR estabelecido. Já para aproximadamente 17% do total de amostras os agrotóxicos determinados não são permitidos para a cultura. Para outros 2% das amostras, as irregularidades foram devidas à presença de agrotóxicos acima do LMR, além de agrotóxicos não autorizados para a cultura. O agrotóxico Acefato foi detectado em um total de 602 amostras consideradas irregulares, já que não é permitido em nenhuma delas.

Salienta-se que essas irregularidades não representam, necessariamente, riscos à saúde, já que o estabelecimento de LMR tem como objetivo principal garantir a aplicação das boas práticas agrícolas no campo (ANVISA, 2016).

Em 2006 foi criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) que

abrange tanto matrizes de origem animal (PNCRC Animal) quanto vegetal (PNCRC Vegetal). O PNCRC Vegetal iniciou suas atividades analisando amostras de maçã e mamão para exportação e amostras dessas mesmas culturas oriundas de supermercados locais nos anos seguintes. As bases legais do PNCRC foram estabelecidas em 2009 quando as culturas de abacaxi, banana, uva, limão, melão, manga, morango, tomate, alface e batata foram incluídas no programa (JARDIM; CALDAS, 2012).

Segundo dados mais recentes do PNCRC, publicados em Maio de 2015 referentes às safras 2013/2014, das 570 amostras avaliadas, 534 (93%) apresentaram resultados em conformidade com os LMR estabelecidos com relação à presença de resíduos de agrotóxicos. (MAPA, 2015).

2.2 MÉTODOS MULTIRRESÍDUO

Os métodos multirresíduo para determinação de agrotóxicos são normalmente adotados, por laboratórios de análise, pela simplicidade na determinação de vários agrotóxicos, de diversas classes, e de grande número de princípios ativos, após a extração e análise, facilitando a demanda rápida e eficiente de monitoramento (KASSUMI, 2007).

A extração com solventes seguida pelas etapas de partição líquido-líquido e procedimentos de purificação foram os métodos padrão em análise de resíduos por muito tempo e ainda são comumente utilizados. A principal vantagem desses, sobre os muitos e mais modernos procedimentos, é que não necessitam de equipamentos complexos e caros, e os solventes orgânicos de alta pureza são facilmente encontrados, mesmo que com preços elevados (PIZZUTTI, 2006). Por outro lado, as técnicas de extração líquido-líquido empregam grandes volumes de solvente, quando comparadas às técnicas mais modernas, o que acarreta em uma geração de grande quantidade de resíduo.

A escolha do solvente para extração é uma das escolhas cruciais a ser tomada durante o desenvolvimento de novos métodos multirresíduo para determinação de resíduos de agrotóxicos. Atualmente, os solventes mais comumente utilizados em métodos multirresíduo são a acetonitrila, acetona e acetato de etila. Cada solvente apresenta vantagens e desvantagens em termo de seletividade, eficiência na extração e disponibilidade. Algumas características dos

principais solventes empregados em cromatografia estão descritas no Anexo A (HIEMSTRA; DE KOK, 2007).

Na maioria dos métodos clássicos para determinação de resíduos de agrotóxicos, estes são extraídos das amostras utilizando um único solvente orgânico, uma mistura de solventes orgânicos ou uma mistura de solvente orgânico com uma solução aquosa. Além disso a combinação desses métodos com a adição de sais para promover o efeito *salting out* tem sido utilizadas em vários métodos. Dependendo do solvente utilizado na etapa de partição obtém-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade desses compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica (PRESTES et al., 2009).

Amostras que não passaram por processamento ou foram pouco processadas necessitarão ser homogeneizadas e isso pode ser realizado como parte do procedimento de extração. Equipamentos para homogeneização (como maceradores, processadores de alimentos e Ultra Turrax) podem ser utilizados para processar as amostras e misturá-las com o solvente extrator simultaneamente (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

Existe uma grande gama de solventes orgânicos e combinações de solventes que podem ser utilizadas para realizar a extração dos resíduos de agrotóxicos dos alimentos. A escolha de um solvente, em termos de eficiência de extração, será diretamente dependente da polaridade dos analitos que serão determinados. Agrotóxicos apolares como, por exemplo, os organoclorados podem ser facilmente extraídos utilizando-se solventes apolares. Já os compostos polares como, por exemplo, os organofosforados são extraídos na presença de solventes polares a mediamente polares.

Se o solvente presente nos extratos das amostras necessita ser evaporado a fim de realizar uma concentração dos analitos ou uma troca de solvente apenas, então o ponto de ebulição do solvente é uma propriedade que precisa ser avaliada. Entretanto, é importante ter em mente que a maioria das amostras de alimentos, frutas e vegetais particularmente, contém uma alta proporção de água. Se o solvente, ou mistura de solventes, utilizados para realizar a extração dos analitos das amostras for miscível com água como, por exemplo, acetona o extrato resultante dessa extração também conterá uma elevada proporção de água que pode

necessitar ser removida antes da etapa de concentração (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

Nos últimos anos muitos métodos multirresíduo têm sido desenvolvidos que permitem a análise simultânea de uma grande variedade de resíduos de agrotóxicos em uma vasta gama de culturas. Entretanto, como é impossível desenvolver uma única condição para extração e/ou procedimentos de purificação para todas as combinações de agrotóxicos/culturas, os métodos multirresíduo possuem limitações (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

Diferentes solventes orgânicos e mistura de solventes tem sido utilizado para extrair um grande número de substâncias com as mais diversas propriedades físicas e químicas. Três solventes (acetona, acetonitrila e acetato de etila) tem sido predominantes em métodos multirresíduo e continuam sendo largamente utilizados nas mais recentes publicações. Esses solventes são utilizados em centenas de laboratórios de análise de resíduos ao redor do mundo na extração de agrotóxicos polares e apolares de uma diversidade de alimentos *in natura* e produtos processados.

2.3 DESENVOLVIMENTO HISTÓRICO DOS MÉTODOS MULTIRRESÍDUO BASEADOS NO USO DE ACETONITRILA, ACETATO DE ETILA E ACETONA

2.3.1 Acetonitrila

Uma das principais desvantagens do uso da acetonitrila como solvente extrator é seu custo elevado acompanhado de sua alta toxicidade. Entretanto, existem vantagens quando comparada com acetona ou acetato de etila como, por exemplo, sua alta polaridade que auxilia na extração de menos coextrativos como materiais lipofílicos e clorofila (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

Um dos primeiros métodos publicados utilizando acetonitrila como solvente extrator foi desenvolvido por Mills e colaboradores em 1963. Naquele ano, os autores propuseram um método para extrair agrotóxicos organoclorados de uma série de amostras de frutas e vegetais utilizando acetonitrila. Essas substâncias apolares foram, então, particionados em éter de petróleo após adição de um grande volume de água e um pequeno volume de solução saturada de cloreto de sódio. O extrato em éter de petróleo foi percolado por uma coluna empacotada com Florisil

utilizado como purificador do extrato anterior à análise utilizando cromatografia gasosa e detecção por captura de elétrons (MILLS; ONLEY; GAITHER, 1963).

Por volta dos anos 60 com o aumento na utilização de inseticidas organoclorados houve a necessidade de introdução desses compostos em métodos multirresíduo. A partição utilizando éter de petróleo não era adequada para essas substâncias e isso significaria baixos valores de recuperação. Em 1971, Storherr e colaboradores utilizaram diclorometano para substituir o éter de petróleo e carvão ativo tratado com ácido para substituir o Florisil (STORHERR; OTT; WATTS, 1971).

Nos anos 90 a acetonitrila foi empregada na extração de mais de 100 agrotóxicos selecionados das mais diversas classes (por exemplo, organoclorados, organofosforados e carbamatos). Em 1991, Ton Joe e Cusick utilizaram acetonitrila na extração de 143 agrotóxicos de 13 matrizes diferentes pela utilização de 100 mL de acetonitrila para 50 g de amostra e adição de cloreto de sódio sólido. Uma alíquota da camada orgânica de acetonitrila foi evaporada e concentrada anterior à injeção no sistema de cromatografia gasosa modo *splitless* acoplada à espectrometria de massas sem a necessidade de etapa de purificação (TON JOE; CUSICK, 1991).

No mesmo ano, Lee e colaboradores utilizaram exatamente o mesmo procedimento de extração empregando acetonitrila, porém adicionaram uma etapa de purificação utilizando extração em fase sólida com um cartucho de C18 para que o extrato fosse compatível com detectores como, por exemplo, o detector fotométrico de chama (FPD, do inglês *Flame Photometric Detector*) e captura de elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detector*) além de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (LEE et al., 1991).

Em 1999, Cook e colaboradores utilizaram o mesmo procedimento de extração empregando uma variedade de sólidos na etapa de purificação por extração em fase sólida (COOK et al., 1999).

Em 2003, Anastassiades e colaboradores relataram um atraente método para preparo de amostras empregando acetonitrila denominado QuEChERS (rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do inglês, *quick, easy, cheap, effective, rugged e safe*). Este método cobre um grande escopo de analitos, incluindo analitos polares, mediamente polares, e não polares em várias matrizes. O procedimento envolve uma etapa única de extração da amostra com acetonitrila, seguido de partição líquido-líquido pela adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. A

remoção de água e a purificação são realizadas simultaneamente com extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*), usando sulfato de magnésio e o adsorvente amina primária e secundária (PSA, do inglês *Primary Secondary Amine*) (ANASTASSIADES et al., 2003).

O método QuEChERS e várias versões modificadas tem sido utilizados com sucesso para a extração de agrotóxicos de uma variedade de frutas e vegetais. Anastassiades et al. (2003) e Lehotay et al. (2005) modificaram o QuEChERS original, não tamponado, passando a utilizar um tampão acetato e citrato respectivamente, para evitar a degradação de certos agrotóxicos sob condições alcalinas (LEHOTAY, 2007).

Em 2007, Pizzutti e colaboradores desenvolveram e validaram um método para determinação simultânea de 221 agrotóxicos e 26 micotoxinas em amostras de arroz empregando uma versão modificada do método QuEChERS. Foram utilizados 10 g de amostras que foram extraídas com 10 mL de acetonitrila acidificada seguido de partição líquido-líquido utilizando sulfato de magnésio anidro (PIZZUTTI et al., 2007).

2.3.2 Acetato de etila

Ao contrário da acetonitrila e acetona, o acetato de etila é muito pouco solúvel em água. A principal vantagem do acetato de etila é que pequenas quantidades de água presente nos extratos podem ser facilmente removidas pela adição de sais sem a necessidade de realizar qualquer etapa extra de partição líquido-líquido. Quando comparado aos outros dois solventes, o acetato de etila apresenta-se como solvente menos polar o que facilita a extração de matéria lipofílica de amostras com alto teor de gordura como abacate e matrizes de origem animal (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

O primeiro método multirresíduo baseado na extração com acetato de etila foi publicado por Watts e colaboradores em 1969. Os autores realizaram a determinação de 60 agrotóxicos organofosforados em matrizes de maçã, cenoura e couve utilizando extração com acetato de etila. Os extratos das amostras foram submetidos a procedimento de purificação em coluna de carvão ativo e os analitos foram determinados por GC-NPD (WATTS et al., 1969).

Na década seguinte houve uma escassez de publicações sobre métodos empregando acetato de etila até que no final dos anos 80 esse solvente ganhou popularidade como solvente de extração. Ross e colaboradores utilizaram acetato de etila como solvente de extração na determinação de resíduos de organoclorados e organofosforados de uma série de matrizes alimentares, incluindo frutas e vegetais. Os autores utilizaram um procedimento de purificação empregando cromatografia por permeação em gel (GPC, do inglês *Gel Permeation Chromatography*) e obtiveram resultados estatisticamente iguais àqueles obtidos quando empregado o método utilizando acetona para cereais (ROSS et al., 1987).

No ano de 1994, Fernández-Alba e colaboradores utilizaram acetato de etila para extrair resíduos de organoclorados e piretróides de frutas e vegetais. Eles utilizaram cartuchos de sílica gel no procedimento de purificação e empregaram GC-ECD e GC-MS para determinar os resíduos (FERNÁNDEZ-ALBA et al., 1994).

No mesmo ano, Holstege e colaboradores empregaram acetato de etila modificado com 5% de etanol para extrair agrotóxicos organoclorados, organofosforados e carbamatos de uma série de matrizes de origem animal e vegetal. Os autores justificaram o uso de etanol para auxiliar nos valores de recuperação dos compostos mais polares como, por exemplo, acefato, metamidofós e monocrotofós de amostras de água sem afetar as recuperações do agrotóxico organofosforado mais apolar, clorpirifós (HOLSTEGE et al., 1994).

Em 1999, Obana e colaboradores utilizaram acetato de etila para extrair agrotóxicos de uma série de classes, de matrizes de frutas e vegetais. Os autores empregaram um homogeneizador de alta velocidade para homogeneizar as amostras e substituíram o sulfato de sódio por um polímero industrial com alta capacidade absorvente (OBANA et al., 1999).

A Administração Nacional de Alimentos da Suécia (NFA, do inglês *National Food Administration*) emprega, desde 1989, um método multirresíduo baseado na extração empregando acetato de etila como solvente de extração seguido de análise cromatográfica empregando LC e GC-MS. Esse método, chamado método sueco do acetato de etila (SweEt, do inglês *Swedish Ethyl Acetate Method*), tem sido otimizado ao longo dos anos a fim de ampliar o número de matrizes e analitos contemplados. O método SweEt, que empregava inicialmente 75 g de amostra, atualmente faz o uso de apenas 10 g seguido da adição de 20 mL de acetato de etila sem a necessidade de qualquer etapa extra de purificação. A principal desvantagem

desse método é o fato de que o acetato de etila extrai grandes quantidades de substâncias lipídicas de matrizes com alto teor de gordura, dificultando essas análises (JANSSON et al., 2004).

2.3.3 Acetona

A acetona é o solvente menos tóxico, mais barato e o mais volátil quando comparado com acetonitrila e acetato de etila. Em 1971, Becker utilizou acetona como solvente para a extração de agrotóxicos organoclorados e organofosforados em amostras vegetais. Entretanto, o método não se apresentou viável, visto que na etapa de purificação envolvia o uso de benzeno (BECKER, 1971).

Quatro anos mais tarde, Luke e colaboradores desenvolveram um método multirresíduo que incluía não somente agrotóxicos organofosforados e organoclorados, mas também agrotóxicos nitrogenados. Amostras de frutas e vegetais (100 g) foram extraídas com 200 mL de acetona e a partição se deu pela adição de éter de petróleo e diclorometano seguido de etapa de purificação empregando Florisil (LUKE; FROBERG; MASUMOTO, 1975).

Em 1981, Luke e colaboradores aperfeiçoaram o procedimento inicialmente desenvolvido pela eliminação da etapa de purificação com Florisil (LUKE et al., 1981).

Na mesma época, Specht e colaboradores desenvolveram um método de extração multirresíduo para 90 agrotóxicos em amostras de origem vegetal e animal. Assim como no método de Luke desenvolvido em 1975, diclorometano foi utilizado na partição dos agrotóxicos da fase aquosa em acetona, porém os autores fizeram uso de procedimento de purificação por GPC (SPECHT; TILLKES, 1980).

Por volta dos anos 90, vários laboratórios ao redor do mundo aumentaram as pesquisas a fim de eliminar cada vez mais o uso de solventes clorados, como o diclorometano. Em 1994, Koinecke e colaboradores estudaram o uso de solventes com a menor toxicidade possível a fim de substituir o diclorometano. Os autores concluíram que ciclohexano, éter de petróleo e éter metil-terc-butilíco apresentavam percentuais de recuperação dentro da faixa aceitável para um grande número de analitos, inclusive aqueles altamente solúveis em água (KOINECKE et al., 1994).

No ano de 1996, de Kok e colaboradores da Autoridade em Segurança dos Alimentos, Produtos e Consumidores (NVWA, do holandês *Nederlandse Voedsel-en*

Warenautoriteit) do ministério da agricultura da Holanda desenvolveram o “*Dutch mini-Luke Method*”, uma otimização do método de Luke original desenvolvido em 1975 no qual realizou-se uma notável redução no volume de solventes e quantidade de amostras. Nesse método, 15 g de amostra são homogeneizadas e 30 mL de acetona são adicionados. A partição é realizada pela adição de éter de petróleo e diclorometano (30 mL de cada) e em seguida uma etapa de troca de solventes é realizada a fim de torna-los compatíveis com a técnica instrumental a ser empregada. Mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa optou por implementar uma etapa de adição de sulfato de sódio para promover o efeito *salting out* e auxiliar na recuperação dos analitos mais polares que não tinham resultados tão satisfatórios quando esta etapa não era realizada (GENERAL INSPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION, 1996).

Em 2014, Lozano e colaboradores do laboratório de referência da comunidade europeia para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais (EURL-FV) em parceria com o NVWA realizaram uma importante otimização no “*Dutch mini-Luke Method*”. No novo método, chamado “*New Dutch mini-Luke method*” (ou apenas método NL), 15 g de amostra foram extraídos pela adição de 20 mL de acetona. Adicionou-se 15 g de sulfato de sódio e, após agitação em ultraturrax, procedeu-se a etapa de partição com 20 mL de éter de petróleo e 10 mL de diclorometano. O extrato é evaporado e reconstituído em metanol, para análise por LC-MS/MS, e em uma mistura de isoctano e tolueno para análise por GC-MS/MS (LOZANO et al., 2016).

2.4 ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS

Os óleos e gorduras vegetais são produtos constituídos principalmente de glicerídeos de ácidos graxos de espécies vegetais. Podem conter pequenas quantidades de outros lipídeos, como os fosfolipídeos e ácidos graxos livres naturalmente presentes no óleo ou gordura. Os óleos vegetais se apresentam na forma líquida e as gorduras na forma sólida ou pastosa, ambos a 25 °C (ANVISA, 2005).

A designação “azeite de oliva” deve ser empregada para os óleos obtidos do fruto da oliveira (*Olea Europaea L.*). As expressões “virgem” e “extra virgem” devem ser empregadas somente para os produtos obtidos por processos mecânicos ou

outros meios físicos, em condições térmicas que não produzam alteração do azeite, e que não tenha sido submetido a outros tratamentos além de lavagem dos frutos, decantação, centrifugação e filtração (ANVISA, 2005).

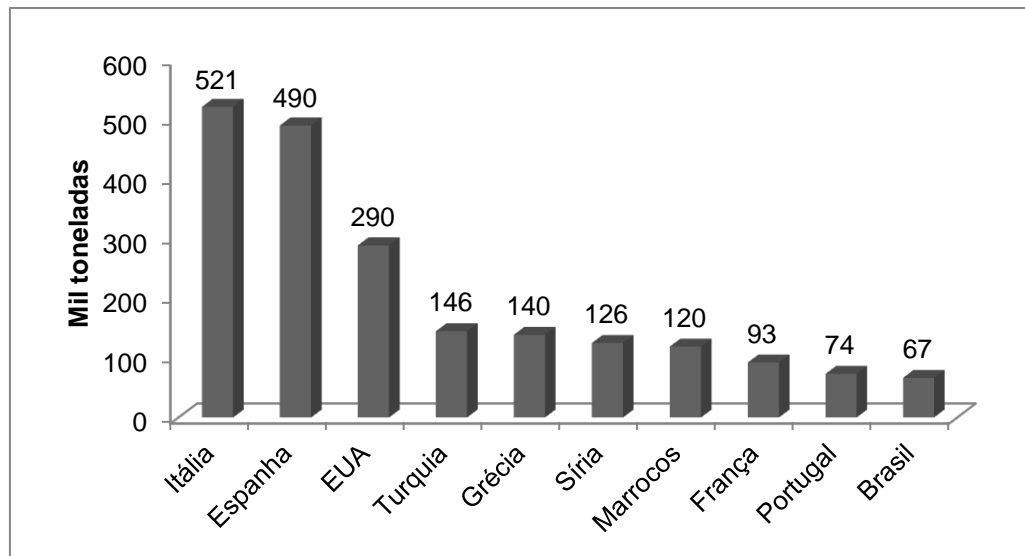
A azeitona é uma das culturas mais cultivadas na região do Mediterrâneo e o azeite de oliva é o principal produto dessa cultura sendo a principal fonte de lipídeos na dieta dos países dessa região. O consumo de azeite de oliva cresce anualmente devido a benefícios à saúde como, por exemplo, a menor incidência de doenças cardiovasculares e neurológicas, auxilia no combate a diversos tipos de câncer pela presença de substâncias que mimetizam o efeito de anti-inflamatórios, combate ao colesterol alto além de ser um dos óleos vegetais mais ricos em vitamina E, um antioxidante natural (GIMENO et al., 2002)

De acordo com os últimos dados oficiais publicados no final do ano de 2015 pelo Conselho Oleícola Internacional, a Espanha é o principal produtor de azeite de oliva na Europa com cerca de 840 mil toneladas durante a safra 2014/2015 e uma previsão de cerca 1 milhão de toneladas na safra 2015/2016. A Grécia aparece em segundo lugar nesses números com cerca de 300 mil toneladas produzidas nas safras 2014/2015 seguido da Itália com cerca de 220 mil toneladas e Portugal com cerca de 60 mil toneladas. Com relação ao consumo na Europa, a Itália é o maior consumidor com cerca de 520 mil toneladas nos anos 2014/2015 seguido da Espanha com 490 mil toneladas e Grécia com cerca de 140 mil toneladas nos mesmos anos (INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL, 2015).

O Brasil é um dos dez maiores consumidores mundiais de azeite de oliva, com cerca de 70 mil toneladas consumidas nos anos 2014/2015. Desse total consumido, grande parte é importada da Espanha. A Figura 1 demonstra os maiores consumidores de azeite de oliva no mundo nos anos 2014/2015.

Neste trabalho, a escolha pela matriz de azeite de oliva se deu pela importância nutricional que esse produto oferece aos seus consumidores e pela importância econômica desse azeite na Espanha, onde este trabalho foi desenvolvido. Os outros dois tipos de óleos utilizados neste estudo (soja e girassol) foram empregados com a finalidade de avaliar o desempenho do método, já que a Espanha não é grande consumidor desses outros tipos de óleos.

Figura 1 – Dados do consumo de azeite de oliva dos dez maiores consumidores do mundo durante os anos de 2014/2015.



Fonte: Conselho Oleícola Internacional, 2015.

2.5 DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM MATRIZES COM ALTO TEOR DE GORDURA

2.5.1 Técnicas de extração

A determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes contendo alto teor de gordura remete a dificuldades conhecidas no que diz respeito à composição dessas matrizes. Em particular, quando técnicas comuns de cromatografia gasosa e líquida são empregadas, substâncias lipídicas tendem a aderir à coluna de separação e ao injetor e lentamente degradar a substâncias voláteis danificando colunas, detectores e causando supressão do sinal dos analitos (FERRER et al., 2005; CUNHA et al., 2010).

Muitos procedimentos de extração multirresíduo empregando diferentes abordagens e técnicas de purificação de extratos combinados com uma variedade de métodos de separação e detecção têm sido reportados na área de determinação de resíduos de agrotóxicos nesse tipo de matriz. Mesmo com o advento das técnicas hífenadas de espectrometria de massas, essas matrizes gordurosas complexas geralmente requerem procedimentos exaustivos de preparo e extração de amostras

e purificação. A maioria dos procedimentos envolve o uso de uma ou mais técnicas combinadas para extração e purificação (GILBERT-LÓPEZ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2009).

A tendência dos métodos de extração em matrizes com alto teor de gordura é direcionada ao desenvolvimento de métodos simples, com o menor custo possível, adequado ao objetivo pretendido e que levam a extratos mais limpos, com percentuais de recuperação dentro da faixa aceitável para vários agrotóxicos e ainda que promovam uma redução no volume total de solventes e reagentes empregados (GARCÍA-REYES et al., 2007).

A técnica mais empregada na extração de agrotóxicos de matrizes com alto teor de gordura é a extração líquido-líquido empregando solventes orgânicos seguido de etapa de purificação e quantificação por técnicas cromatográficas acopladas à espectrômetro de massas (GILBERT-LÓPEZ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2009). A quantidade de gordura no extrato final depende diretamente do solvente empregado na extração devido ao fato dessas substâncias lipídicas serem ligeiramente solúveis na maioria dos solventes orgânicos (LEHOTAY; MASTOVSKÁ; YUN, 2005). A escolha por acetonitrila ou metanol é uma alternativa importante, visto que a gordura é parcialmente miscível com estes solventes, dificultando a migração de substâncias lipídicas para o solvente (RAJSKI et al., 2013). Por essa razão o método QuEChERS, que emprega acetonitrila como solvente de extração, largamente empregado na análise de frutas e vegetais, tem sido bastante empregado também para matrizes com alto teor de gordura em combinação com diversas técnicas de purificação. O único inconveniente do método QuEChERS durante essas análises está no fato de que, para os agrotóxicos mais apolares, como por exemplo os organoclorados, os percentuais de recuperação ficam abaixo de 70% na maioria dos casos devido à baixa taxa de transferência dessas substâncias para a fase orgânica (GARCÍA-REYES et al., 2007).

2.5.2 Técnicas de purificação de extratos (*clean-up*)

Os métodos de purificação de extratos mais empregados na remoção de gordura são a precipitação em baixas temperaturas (*freezing out*), GPC (cromatografia por permeação em gel, do idioma inglês *gel permeation chromatography*) e técnicas de adsorção dos interferentes como a SPE (extração

em fase sólida, do idioma inglês *solid phase extraction*), d-SPE (extração em fase sólida dispersiva, do idioma inglês *dispersive solid phase extraction*) e a MSPD (dispersão da matriz em fase sólida, do idioma inglês *matrix solid phase dispersion*).

A precipitação em baixas temperaturas é um método simples baseado, basicamente, no armazenamento do extrato em temperaturas inferiores a - 20 °C em congelador, geralmente de um dia para o outro, a fim de precipitar a gordura para posterior separação do extrato purificado. Essa maneira de realizar esse procedimento demanda um tempo relativamente grande e, por esta razão, o processo é acelerado pelo uso de nitrogênio líquido ou gelo seco. A principal desvantagem durante esse tipo de procedimento é a possibilidade de congelamento do solvente devido às baixas temperaturas o que pode causar degradação dos agrotóxicos presentes no meio. Apesar de ser um método largamente empregado, ele não remove totalmente o conteúdo lipídico e, portanto, outras técnicas de purificação adicionais são necessárias (NGUYEN; LEE; LEE, 2010; KOESUKWIWAT et al., 2010).

A técnica de GPC, apesar de não ser amplamente utilizada atualmente como foi nas décadas de 80 e 90, ainda permanece como uma poderosa ferramenta para remoção de gordura de extratos oriundos de matrizes complexas, como os óleos comestíveis. Essa técnica é baseada na exclusão molecular onde moléculas são separadas devido às suas diferenças de tamanho. Nessa abordagem, os agrotóxicos (geralmente com baixa massa molecular) são separados de moléculas com massas maiores como os triglicerídeos (GILBERT-LÓPEZ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2009; FERRER et al., 2005). Os principais aspectos negativos associados à utilização de GPC são perdas por adsorção de alguns agrotóxicos e separações insuficientes entre a fração gordurosa e a fração contendo os analitos de interesse com alto peso molecular como, por exemplo, os piretróides, que são substâncias lipofílicas.

O terceiro método de purificação de extratos, baseado na retenção dos interferentes da matriz em fase sólida, é o mais comum e o mais empregado em laboratórios de rotina com o objetivo de purificar os extratos, especialmente aqueles oriundos de matrizes complexas, como os óleos comestíveis. As técnicas de extração por adsorção baseiam-se na partição dos analitos entre uma fase líquida ou gasosa e a superfície de um adsorvente. Os adsorventes são geralmente sólidos

porosos com uma elevada área superficial contendo grupamentos ativos com os quais os analitos irão interagir.

As técnicas de adsorção podem ser empregadas, basicamente, de três maneiras. A primeira delas é a SPE que se baseia no processo de extração físico envolvendo um adsorvente sólido e uma fase líquida. Esta técnica, que também é chamada de extração líquido-sólido ou extração por sorventes, é frequentemente empregada na extração seletiva de analitos, concentração e purificação de extratos (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005). Na SPE, cartuchos são preenchidos com uma quantidade pré-estabelecida do adsorvente mais apropriado levando em consideração as características dos analitos e também da matriz. O extrato é percolado através do cartucho e o sólido retém ou analitos ou interferentes, dependendo das características do adsorvente. No caso de o adsorvente reter o analito de interesse, esse pode ser removido do sólido pela eluição empregando um solvente orgânico apropriado compatível com as características dos analitos e também do adsorvente. A principal desvantagem dessa técnica é que o extrato ou o solvente para eluição dificilmente irão percolar através da coluna apenas pela ação da gravidade. Por essa razão, a técnica de SPE em cartucho exige que seja empregada uma bomba de vácuo a fim de auxiliar nesse processo.

Por outro lado, para realização de d-SPE não se faz necessário o uso de bombas de vácuo, já que ao contrário da SPE tradicional, a d-SPE é baseada na dispersão do adsorvente juntamente com a mistura de amostra e solvente de extração ou simplesmente com o extrato após a remoção da matriz. Após adição do adsorvente, a mistura é homogeneizada manualmente, ou empregando vortex, e após centrifugação o extrato pode ser injetado em sistema cromatográfico.

Na técnica de dispersão da matriz em fase sólida, uma fração da matriz é homogeneizada com o adsorvente fazendo uso de gral e pistilo. Após a mistura, o material é colocado em um cartucho e empacotado e então, de maneira similar à SPE, um pequeno volume de solvente apropriado é empregado para realizar a eluição dos analitos.

2.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS

As técnicas mais usualmente empregadas para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos são a cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e a cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) acoplada à espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*). Vários tipos de espectrômetros de massas podem ser empregados em cromatografia como, por exemplo, *single* quadrupolo, triplo quadrupolo (TQ, do inglês *Triple quadrupole*), armadilha de íons (ITD, do inglês *Ion Trap Detector*), tempo de voo (TOF, do inglês *Time Of Flight*) e armadilha de íons orbital (ORBITRAP, do inglês *Orbital Ion Trap*) operados em diversos modos de ionização como a ionização por elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*), ionização química (CI, do inglês *Chemical Ionization*), ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) em diferentes modos de aquisição como, por exemplo, escaneamento total (*full scan*), monitoramento seletivo de íons (SIM, do inglês *Selective Ion Monitoring*), monitoramento seletivo de reações (SRM, do inglês *Selective Reaction Monitoring*) e monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*). A combinação da MS com outras técnicas de separação como, por exemplo, a eletroforese capilar, cromatografia em camada delgada e cromatografia por permeação em gel são possíveis, porém menos comuns (CHIARADIA et al., 2008; SANTE, 2015).

A espectrometria de massas acoplada aos métodos cromatográficos de separação é uma poderosa combinação para identificação e quantificação dos analitos nos extratos das amostras. Essa técnica é capaz de fornecer uma quantidade significativa de dados tais como tempos de retenção, razão massa/carga (m/z) e abundância relativa dos íons que auxiliam na identificação inequívoca de um contaminante. Atualmente, detectores seletivos para cromatografia gasosa como, por exemplo, detector por captura de elétrons (ECD), detector fotométrico de chama pulsada (PFPD) e detector de nitrogênio e fósforo (NPD) e para cromatografia líquida (detector de fluorescência e detector por arranjo de diodos) são menos utilizados por gerarem informações menos específicas quando comparadas àquelas geradas por espectrômetro de massas (SANTE, 2015).

Dentre os principais componentes de um espectrômetro de massas, o analisador de massas possui relevância particular pelo fato de ser o responsável pela seleção e/ou separação dos íons de acordo com sua relação massa carga. As características de construção e operação diferem de um analisador para outro, assim como seus benefícios ou limitações (LANÇAS, 2013).

Quando se fala em cromatografia acoplada à espectrometria de massas, um dos parâmetros mais importantes que deve ser monitorado ao longo das análises cromatográficas é o tempo de retenção (tR). O tempo de retenção corresponde ao tempo que o analito leva para alcançar o detector após a injeção. O valor mínimo de tR aceitável para os analitos monitorados deve ser duas vezes o volume morto da coluna. O tR de um analito quando determinado na amostra deve ser o mesmo do padrão analítico com uma tolerância de $\pm 0,2$ min tanto para cromatografia líquida quanto para cromatografia gasosa. Variações nos tR acima da faixa tolerável são admissíveis desde que um padrão interno análogo isotopicamente marcado apresente o mesmo comportamento tanto para tR quanto para formato do pico do analito em questão (SANTE, 2015).

2.6.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica de separação na qual os componentes de uma mistura são separados por interação diferencial de seus componentes com uma fase estacionária (líquida ou sólida). A fase móvel, ou apenas gás de arraste, é um gás inerte e tem unicamente a função de arrastar a amostra através da coluna para que a separação ocorra.

Quando a fase estacionária é um líquido, este pode estar simplesmente espalhado sobre um suporte sólido ou imobilizado sobre este. O processo de imobilização pode envolver ligações químicas entre o líquido e o suporte sólido ou somente entre as cadeias do próprio líquido (COLLINS et al., 2010).

Na década de 60 a GC utilizando colunas recheadas foi adotada devido a sua capacidade de análise multirresidual de agrotóxicos. A alta vazão do gás de arraste quando empregadas colunas recheadas é incompatível com o vácuo necessário na câmara de ionização dos espectrômetros de massa. Porém, o advento das colunas capilares permitiu a redução da vazão do gás de arraste e tornou possível o acoplamento de espectrômetros de massa como detectores para GC.

O acoplamento de um cromatógrafo com um espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia com as vantagens da espectrometria de massas. Para que o acoplamento seja possível, idealmente, é necessário que as características de cada instrumento não sejam afetadas pela sua conexão, assim como não devem ocorrer modificações químicas não controladas do analito e perda de amostras durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas. A combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas (ARDREY, 2003).

Quando são utilizadas colunas capilares em GC é possível conectar a saída da coluna diretamente à fonte do espectrômetro, uma vez que, em condições normais de operação, o sistema de bombeamento do espectrômetro de massas é capaz de captar todo o eluente da coluna. A interface nesse caso pode ser realizada por meio de um separador de jato que é constituído por dois capilares alinhados tendo vácuo estabelecido entre eles por meio de uma bomba. Dessa maneira, quando o eluente da coluna atravessa o primeiro capilar, grande parte do gás de arraste (geralmente hélio) é bombeado para fora dos capilares por ter baixo peso molecular, enquanto as moléculas de analito mantêm-se em fluxo linear e são direcionadas à fonte de íons (CHIARADIA et al., 2008).

Os métodos de ionização mais empregado em GC-MS são a ionização por elétrons (EI) e a ionização química (CI). Na ionização por elétrons as moléculas de interesse (M) em fase gasosa são bombardeadas com um fluxo de elétrons de alta energia de cerca de 70 eV. As moléculas absorvem essa energia e desencadeiam uma série de reações e, dentre elas, a principal é onde o analito perde apenas um elétron (M^+). Este processo requer, geralmente, apenas 10 eV, e o restante da energia fragmenta os analitos. Isto consiste em um dos maiores problemas na aplicação da EI, pois o excesso de energia conduz a não observação do íon molecular, uma das informações mais importantes oferecidas pela espectrometria de massas (CHIARADIA et al., 2008).

A ionização química foi desenvolvida especialmente para aumentar a produção do íon molecular e, dessa forma, aumentar a informação a cerca de um analito. Nesta técnica, da mesma maneira que na EI, os analitos são direcionados à câmara de ionização após serem separadas no sistema cromatográfico. Essa

câmara é, anterior à chegada dos analitos, preenchida com um gás reagente (o mais utilizado é o metano). Ao alcançarem a câmara de ionização, as moléculas em fase gasosa dos analitos são misturadas ao gás reagente e um fluxo de elétrons de 70 eV é aplicado nessa mistura. Como o gás reagente está em excesso (geralmente em proporção maior que 1000:1) este é ionizado quase que exclusivamente e passam a ocorrer reações entre os íons em fase gasosa do gás reagente e as moléculas neutras do analito (M), dando origem aos íons pseudo-moleculares do analito pelo recebimento de um próton na formação de íons positivos ($[M+H]^+$) ou pela perda de um próton na formação de íons negativos ($[M-H]^-$). Por esse processo de relativamente baixa energia, quase não é observada fragmentação (NIESSEN, 1999).

2.6.2 Cromatografia Líquida

Quando se utiliza a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas são encontradas incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente do sistema cromatográfico com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projeto da fonte de íons do espectrômetro de massas. As vazões empregadas em cromatografia líquida são grandes, de maneira que não é possível introduzir o eluente de um cromatógrafo a líquido diretamente em um espectrômetro de massas operado sob vácuo. Assim, uma das mais importantes funções de uma interface empregada em LC-MS, e também um dos maiores desafios quando desenvolvida, é remover toda, ou pelo menos uma parte significativa da fase móvel e promover a ionização dos analitos anterior à entrada desses no MS (CHIARADIA et al., 2008).

Os principais métodos de ionização utilizados em LC-MS são a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), ambas as técnicas operadas a pressão atmosférica.

A introdução de técnicas de ionização a pressão atmosférica aumentaram o número de substâncias que puderam ser analisadas por LC-MS. Os analitos são ionizados, em um primeiro momento, sob pressão atmosférica. Após essa etapa os íons são mecanicamente e eletrostaticamente separados da fase móvel e de moléculas neutras.

Na ESI, o eluente do sistema cromatográfico é bombeado através de uma agulha para a câmara de ionização onde há um eletrodo altamente carregado. A diferença de potencial entre a agulha e o eletrodo produz um forte campo elétrico que carrega a superfície do líquido e forma um spray de gotas carregadas. As gotas são atraídas pelo capilar de amostragem (entrada do espectrômetro de massas) onde um contra fluxo do gás de dessolvatação, geralmente N_2 , é aplicado a alta temperatura. O gás de dessolvatação auxilia na diminuição da gota pela evaporação do solvente, além de expulsar espécies de carga neutra que por ventura ainda encontram-se no meio. As cargas de mesmo sinal acumulam-se na superfície da gota e as cargas de sinal oposto no seu interior. As gotas maiores (de aproximadamente 20-50 μm) expõem micro gotas de aproximadamente 1 μm . Esse fenômeno ocorre até que as micro gotas sejam entre 0,08 e 0,03 μm . Nesse momento o acúmulo de cargas é grande e o volume de solvente é mínimo. Ocorre, então, uma repulsão entre as cargas de mesmo sinal e o resultado desse fenômeno é o analito na sua forma ionizada. Uma sequencia de dispositivos guias conduzem os íons para o separador de massas (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

A APCI envolve a nebulização do conteúdo proveniente do Cromatógrafo pela passagem por um nebulizador aquecido, o qual vaporiza a amostra. A ionização química ocorre no estado de vapor, onde as moléculas neutras são primeiramente vaporizadas e depois protonadas para formar o íon $[M+H]^+$. A fonte APCI possui uma agulha carregada que é responsável por criar um fluxo de elétrons que irá ionizar o solvente presente na fase móvel. As espécies protonadas $CH_3OH_2^+$ e H_3O^+ , presentes na fase de vapor, irão transferir prótons para os compostos presentes no meio de acordo com suas afinidades por prótons. Esta técnica de ionização é mais eficiente para compostos que são neutros em solução e difíceis de ionizar por ESI. Além disso, essa técnica pode ser operada tanto no modo positivo quanto negativo (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método analítico é o processo que prova que um método é aceitável para os propósitos a que ele se destina. Segundo a norma NBR ISO/IEC 17025 de 2005, validação é: “[...] a confirmação por exame e fornecimento de

evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos” (ABNT, 2005).

De acordo com o documento orientativo do Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial (INMETRO) “Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos – DOQ-CGCRE-008” de Julho de 2011, o laboratório deve avaliar os seguintes parâmetros de validação para análise de elementos menores e traços: precisão, seletividade, tendência/recuperação (exatidão), robustez, sensibilidade/linearidade/faixa dinâmica de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação (INMETRO, 2011).

2.7.1 Precisão

É o termo geral utilizado para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, analisadas em condições definidas.

Normalmente determinada em circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação.

O coeficiente de variação (CV%) também conhecido como desvio padrão relativo (RSD%, do inglês *Relative Standard Deviation*) é calculado de acordo com a equação 1:

$$CV=RSD= \left(\frac{SD}{M} \right) \times 100 \quad (1)$$

Sendo: SD: desvio padrão;

M: média das medidas realizadas.

2.7.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de discriminação entre os analitos a serem determinados e componentes análogos. Um método que apresenta alta

seletividade será capaz de determinar o analito de forma exata mesmo em presença de interferentes provenientes da amostra (ALBANO & RODRIGUEZ, 2009).

Experimentos para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões analíticos e materiais de referência, amostras na presença ou ausência dos analitos de interesse, avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (INMETRO, 2011).

A seletividade é considerada um parâmetro importante, especialmente na análise de amostras complexas e está intimamente relacionada ao efeito da detecção. Um método que consegue produzir resposta para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de cada um deles é chamado seletivo (LANÇAS, 2009).

O efeito matriz é um parâmetro avaliado em cromatografia e está intimamente ligado com a seletividade do método. O efeito matriz é o efeito observado pelo aumento ou decréscimo na resposta do detector, para um determinado analito, presente no extrato da matriz, comparado com a resposta do detector para o analito em solvente orgânico (SANTE, 2015).

O efeito matriz pode afetar fortemente a reprodutibilidade, linearidade e precisão do método analítico e promover uma quantificação errônea das substâncias em questão. Este efeito é bastante variável e depende da natureza da amostra e devido à sua imprevisibilidade uma variação na resposta pode ser observada mesmo entre diferentes lotes de uma mesma amostra ou com o mesmo método. Apesar do mecanismo exato que rege o efeito matriz ser ainda desconhecido, é de comum consenso que os componentes coeluídos da matriz podem influenciar na intensidade do sinal em uma possível competição por cargas disponíveis ou pela ocupação da superfície da gota formada na interface (TRUFELLI et al., 2011).

Como consequência desse efeito, ações durante o desenvolvimento do método analítico devem ser tomadas, antes da detecção pelo espectrômetro de massas, a fim de se ter uma quantificação correta. Procedimentos de purificação da amostra e separação cromatográfica mais eficiente podem reduzir a introdução de componentes oriundos da matriz no sistema analítico (TRUFELLI et al., 2011).

Para determinação do efeito que a matriz exerce sobre um determinado analito é preciso que se realize uma comparação dos resultados do referido analito quando determinado em uma solução preparada em solvente orgânico e em uma solução do analito preparada em extrato “branco” da matriz. Para determinação do

efeito matriz pela comparação das respostas da solução em solvente e em extrato da matriz faz-se uso da equação 2 abaixo:

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left(\frac{A_1 - A_2}{A_2} \right) \times 100 \quad (2)$$

Sendo: A_1 : média das áreas da solução em matriz em uma determinada concentração;

A_2 : média das áreas da solução em solvente orgânico em uma determinada concentração.

2.7.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico traduz a proximidade do valor obtido em relação ao valor esperado, estipulado ou verdadeiro. Um método diz-se exato se o erro sistemático é inferior ao intervalo de confiança estimado. É calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro, acrescida dos intervalos de confiança.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são o uso de materiais de referência certificado (MRC), participação em comparações inter laboratoriais e realização de estudos de fortificação/recuperação.

Os materiais de referência certificado são utilizados no processo de validação de um método de ensaio para avaliar o desempenho do laboratório, por isso o fornecimento de MRC é realizado por organismos reconhecidos e confiáveis como, por exemplo, o Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, do inglês *National Institute of Standards and Technology*). Na avaliação da exatidão utilizando um MRC, os valores médios obtidos pelo laboratório e o desvio padrão de uma série de ensaios em replicatas devem ser comparados com os valores certificados do material de referência (PEREIRA, 2012).

Devido ao alto custo dos materiais de referência certificados e a existência para um número limitado de matrizes, a grande maioria dos laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos faz o uso de ensaios de fortificação/recuperação para avaliação da exatidão do método.

A recuperação de um determinado analito pode ser estimada pela análise de amostras “branco” fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método (INMETRO, 2011).

Em termos de validação do método analítico, os percentuais de recuperação devem estar na faixa de 70 a 120% com valores de RSD% ≤ 20 . Com relação aos percentuais de recuperação para análises de rotina, os limites aceitáveis devem estar dentro da faixa do percentual de recuperação médio $\pm 2 \times$ RSD%. O percentual de recuperação médio deve ser calculado a partir dos dados iniciais de validação. Valores de recuperação no intervalo de 60 a 140% são aceitáveis para análises de rotina para métodos multirresíduo. Caso o percentual de recuperação varie fora dessa faixa, o lote de amostras deve ser reanalisado exceto em casos justificados como, por exemplo, quando os percentuais encontram-se fora da faixa, porém as amostras não estejam contaminadas. Entretanto, esses valores fora da faixa devem ser investigados independente da presença ou não de um agrotóxico (SANTE, 2015).

A recuperação (%) é calculada segundo a equação 3:

$$R (\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (3)$$

Sendo: R: recuperação em percentagem

C_1 : concentração do analito determinada na amostra fortificada;

C_2 : concentração do analito na amostra não fortificada (“branco”);

C_3 : concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

2.7.4 Sensibilidade/linearidade/faixa de trabalho

A relação entre o sinal instrumental medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada em uma amostra muito raramente é conhecida antes de uma medida. Na maior parte dos casos, o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, na maioria dos casos, pode

ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (RIBANI et al., 2004).

Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório (INMETRO, 2011).

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada utilizando o método matemático conhecido como regressão linear que, na maioria das vezes, são ajustados utilizando a abordagem dos mínimos quadrados (RIBANI et al., 2004).

2.7.5 Limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ)

Limite de detecção pode ser definido como o menor valor detectado com uma precisão aceitável em função do ruído do equipamento. Neste caso, o limite de detecção do instrumento (LODi) é definido como a concentração do analito que gera um sinal três vezes a razão sinal/ruído do equipamento. Esse limite é correspondente à concentração que produz um valor três vezes maior do que o nível de ruído médio da solução de controle ou branco. Já o limite de detecção do método (LODm) é definido como a concentração mínima de uma substância medida, com 95% ou 99% de confiança, que é maior que zero (ALBANO; RODRIGUEZ, 2009).

O limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo de amostra. É fundamental assegurar-se que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção (INMETRO, 2011).

Já limite de quantificação pode ser definido como o menor valor determinado com confiabilidade analítica definida, em que o analito esteja dentro da sensibilidade normal do equipamento ou da técnica. Rotineiramente, é comum calcular o LOQ como sendo 10 vezes o desvio padrão da média da solução controle (branco) (ALBANO; RODRIGUEZ, 2009). No entanto, na análise de resíduos de agrotóxicos, adota-se como sendo o limite de quantificação do método a concentração de fortificação mais baixa estudada que apresenta percentuais de recuperação entre 70 e 120% e desvio padrão relativo menor do que 20% (SANTE, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Referência da União Europeia para Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Frutas e Vegetais (EURL-FV, do inglês, *European Union Reference Laboratory for Pesticides in Fruits & Vegetable*), localizado na Universidade de Almería, Espanha.

As amostras “branco” de óleos de oliva, soja e girassol foram adquiridas em supermercados na cidade de Almería, sul da Espanha. As amostras empregadas para aplicação do método desenvolvido foram adquiridas de supermercados da cidade de Almería, e também de produtores de azeite de oliva das cidades de Almería e Múrcia, região sudeste da Espanha.

Para esse estudo, foram selecionados 165 agrotóxicos de diversas classes e propriedades englobando produtos de degradação e substâncias não autorizadas.

Os procedimentos para avaliação da etapa de precipitação em baixas temperaturas (*freezing out*) e da etapa de purificação do extrato (*clean-up*) foram realizados para a matriz de azeite de oliva empregando a técnica de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas híbrido do tipo quadrupolo-tempo de voo (UHPLC-QTOF-MS). Na etapa posterior, após definição de todas as condições experimentais, o método foi validado para azeite de oliva, óleo de soja e girassol, a fim de avaliar o comportamento do método frente a diferentes tipos de óleos empregando a técnica de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (UHPLC-TQ-MS/MS).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Cromatógrafo a líquido, sistema Agilent UHPLC 1290 series (Agilent Technologies, EUA) equipado com:
 - Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação;
 - Coluna cromatográfica Zorbax Extended C₁₈, 50 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 1,8 µm de tamanho de partícula (Agilent Technologies, EUA);

- Detector MS híbrido quadrupolo-tempo de voo (QTOF-MS), Agilent Technologies 6550 Accurate Mass (Agilent Technologies, EUA) utilizando o modo de ionização por eletronebulização (ESI), operando no modo positivo;
 - *Software* Agilent MassHunter Workstation versão B.06.00 para aquisição de dados.
- Cromatógrafo a líquido, sistema Agilent UHPLC 1290 series (Agilent Technologies, EUA) equipado com:
 - Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação;
 - Coluna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C₈, 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 1,8 µm de tamanho de partícula (Agilent Technologies, EUA);
 - Detector MS tipo triplo quadrupolo (TQ-MS), Agilent Technologies 6490 TripleQuad (Agilent Technologies, EUA) utilizando o modo de ionização por eletronebulização (ESI), operando no modo positivo e negativo;
 - *Software* Agilent MassHunter Workstation versão B.07.00 para aquisição de dados.
- Sistema de purificação de água Milli-Q[®] (Millipore, EUA);
 - Balança analítica de precisão com 5 casas decimais para preparo de soluções estoque, XP 105, calibrada (Mettler Toledo, Suíça)
 - Balança analítica de precisão com 2 casas decimais, calibrada (Mettler Toledo, Suíça);
 - Centrífuga Hareaus (Thermo Scientific, Alemanha);
 - Pipetadores automáticos calibrados (Gilson, EUA);
 - Homogeneizador de amostras com agitação vertical AGYTAX[®] (Cirta Lab. S.L., Espanha).

3.2 MATERIAIS

- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueáveis, capacidade de 15 e 50 mL (Nalgene, EUA);
- Frascos de vidro para armazenamento de soluções nos volumes de 5, 15 e 20 mL (National Scientific, EUA);
- Balões volumétricos calibrados de 5, 10 e 50 mL (Blau Brand, Alemanha ou Restek, EUA);
- Vidrarias comuns de laboratório.

3.3 GASES, SOLVENTES E REAGENTES

- Nitrogênio 99,999% de pureza;
- Acetonitrila, grau HPLC (99.9%), ácido fórmico, grau analítico (> 96%) e sulfato de magnésio (98%) (Sigma Aldrich, Alemanha);
- Água grau HPLC, Optima[®] (Fisher Scientific, EUA);
- Cloreto de sódio (J. T. Baker, Holanda);
- Citrato trissódico dihidratado ($\geq 99\%$) e hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado (99%) (Fluka, Alemanha);
- PSA e Z-sep (Supelco, EUA);
- EMR-Lipid[®] - Bond Elut Enhanced Matrix Removal d-SPE (EMR-Lipid) e Bond Elut Final Polish (EMR-Lipid Polish), (Agilent Technologies, EUA);
- Padrões de agrotóxicos (Dr. Ehrenstorfer ou Riedel-de-Haën ou Sigma Aldrich, Alemanha).

3.4 AGROTÓXICOS SELECIONADOS

Os 165 agrotóxicos avaliados neste trabalho, bem como as condições de análise por UHPLC-TQ-MS/MS estão descritos na Tabela 1. Já no Apêndice A estão descritas as estruturas dos agrotóxicos estudados. Destaca-se, na Tabela 1, os agrotóxicos que possuem seu uso proibido no Brasil: clorfenvinfós, demeton-s-metil sulfona, demeton-s-metil sulfóxido, dicrotofós, haloxifope, isoprocarbe, metalaxil,

metamidofós, monocrotofós, ometoato, oxadixil, oxamil, piridato, tolclorfós metílico e triclorfom.

Além dos agrotóxicos avaliados no decorrer das análises, outros quatro foram adicionados a fim de avaliar o desempenho do procedimento e do instrumento. Três desses agrotóxicos foram adicionados imediatamente após adição do solvente de extração, em concentrações conhecidas, a fim de avaliar o desempenho do procedimento de extração (carbendazim-d3, diclorvós-d6 e malation-d10). Estes são chamados controladores do procedimento (C.P.). Já para avaliação do instrumento, dimetoato-d6 (chamado controlador do instrumento, C.I.), foi adicionado nos vials imediatamente antes da análise cromatográfica. Essas substâncias foram empregadas a fim de avaliar possíveis perdas dos analitos durante o procedimento de extração e/ou análise cromatográfica.

3.5 PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS

As soluções estoque foram preparadas individualmente em acetonitrila, na concentração aproximada de 1000 mg L^{-1} , e armazenadas em frascos de vidro âmbar a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

O material de referência (MR) foi pesado diretamente em frasco de vidro contendo tampa com batoque de teflon[®]. Em seguida, o MR foi dissolvido com acetonitrila. A balança analítica empregada nessa etapa realiza o cálculo da concentração dessa solução levando em consideração a massa de material de referência empregado, o volume de acetonitrila adicionado e a pureza do material. O frasco foi fechado, agitado manualmente e então levado para banho de ultrassom por cerca de 5 minutos a fim de solubilizar qualquer partícula sólida remanescente.

Após o preparo das soluções estoque, uma solução mistura foi preparada na concentração de 10 mg L^{-1} em acetonitrila. Para o preparo da solução mistura, volumes calculados de cada solução estoque foram pipetados para balão volumétrico calibrado de 50 mL já contendo um pequeno volume de acetonitrila. Após adição de todas as soluções estoque de cada agrotóxico o volume do balão volumétrico foi completado com o devido solvente. Essa solução foi homogeneizada e fracionada em frascos de vidro âmbar contendo tampa com batoque de teflon[®]. O fracionamento da solução mistura evita que um grande volume da solução seja

manuseado e, como consequência, evita possíveis contaminações do volume total da mesma.

A solução mistura foi utilizada para preparo das soluções de trabalho empregadas na confecção das curvas analíticas. Soluções analíticas nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 ng mL⁻¹ foram preparadas em extrato “branco” da matriz de azeite de oliva, a fim de que fossem obtidas as condições similares àquelas do extrato das amostras, evitando-se, assim, resultados quantitativos influenciados pela ausência das substâncias da matriz.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em congelador a uma temperatura inferior a -18 °C. Qualquer solução, anterior ao uso, foi retirada do congelador e deixada em repouso até alcançar a temperatura ambiente. Após, foi colocada em banho de ultrassom por 5 minutos, para então ser manuseada.

3.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas utilizadas no sistema UHPLC-QTOF-MS foram as seguintes:

- Para o UHPLC:
 - Volume de injeção: 4 µL.
 - Temperatura do forno da coluna: 35 °C.
 - Fase móvel A: acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico e 5% de água.
 - Fase móvel B: solução de ácido fórmico 0,1%.
 - Gradiente da fase móvel: o programa foi iniciado com 90% do eluente A (1 min) e levado linearmente a 0% em 9 minutos. Manteve-se essa proporção por 4 minutos. Posteriormente uma etapa de reequilíbrio da composição da fase móvel foi realizada levando o sistema à composição inicial (90% de A) mantendo-se essa proporção por 3 minutos.
 - Vazão da fase móvel: 0,3 mL min⁻¹.
 - Tempo total de corrida: 17 minutos.

- Para o espectrômetro de massas (QTOF-MS):

- Ionização à pressão atmosférica com ESI no modo positivo (fonte do tipo Dual Spray Agilent Jet Stream ion ESI).
- Modo de operação: 4 GHz *High Resolution*.
- Faixa de massas monitoradas: 70 – 950 *m/z*.
- Voltagem do capilar: 4,00 kV.
- Temperatura do gás de dessolvatação (N₂): 350 °C.
- Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 11 L min⁻¹.
- Pressão do gás de nebulização (N₂): 40 psi.
- Vazão do gás de colisão (N₂): 0,2 mL min⁻¹.
- Temperatura do *sheath gas*: 400 °C.
- Vazão do *sheath gas*: 12 L min⁻¹.
- Voltagem do fragmentador: 90 V.

As condições cromatográficas utilizadas no sistema UHPLC-TQ-MS/MS foram as seguintes:

- Para o UHPLC:
 - Volume de injeção: 5 µL.
 - Temperatura do forno da coluna: 35 °C.
 - Fase móvel A: solução de ácido fórmico 0,1%.
 - Fase móvel B: acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico e 5% de água.
 - Gradiente da fase móvel: o programa foi iniciado com 20% do eluente B (2 min) e elevado linearmente a 100% em 13 minutos. Manteve-se essa proporção por 2 minutos. Posteriormente uma etapa de reequilíbrio da composição da fase móvel foi realizada levando o sistema à composição inicial (20% de B) mantendo-se essa proporção por 2,5 minutos.
 - Vazão da fase móvel: 0,3 mL min⁻¹.
 - Tempo total de corrida: 19,5 minutos.

- Para o espectrômetro de massas (TQ-MS/MS):
 - Ionização à pressão atmosférica com ESI no modo positivo e negativo (fonte do tipo JetStream ESI).
 - Voltagem do capilar: 3,00 kV.

- Temperatura do gás de dessolvatação (N₂): 120 °C.
- Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 13 L min⁻¹.
- Pressão do gás de nebulização (N₂): 45 psi.
- Vazão do gás de colisão (N₂): 0,2 mL min⁻¹.
- Temperatura do *sheath gas*: 375 °C.
- Vazão do *sheath gas*: 10 L min⁻¹.
- Para otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas, soluções individuais de todos os agrotóxicos na concentração de 100 ng mL⁻¹ (em acetonitrila/água 1:1, v/v) foram injetadas diretamente no espectrômetro de massas no modo *full scan* com uma faixa de leitura de massas de 50 a 800 *m/z*. Desta injeção, o íon precursor foi escolhido e mais uma injeção no modo de íons produto foi necessária para a escolha dos dois íons, um de quantificação e outro de confirmação, além da energia de colisão de cada transição. Essas informações estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Agrotóxicos selecionados, tempos de retenção e parâmetros de análise do espectrômetro de massas para determinação dos agrotóxicos analisados por UHPLC-TQ-MS/MS.

Agrotóxico	Tempo de retenção (min)	Íon Precursor	1ª transição		2ª transição		Modo de ionização
			Íon produto	CE*	Íon produto	CE*	
2,4-D	7,8	218,96 / 220,96	160,96	15	162,95	15	Negativo
Acefato	1,1	184,00	143,00	5	125,00	15	Positivo
Acetamiprido	4,4	223,00	126,00	20	56,00	15	Positivo
Aldicarbe	5,7	213,00	116,00	10	89,00	15	Positivo
Aldicarbe sulfona	1,7	223,00	148,00	5	86,00	10	Positivo
Aldicarbe sulfóxido	1,2	207,00	132,00	5	89,00	10	Positivo
Azinfós metílico	9,1	318,00	261,00	0	132,10	8	Positivo
Azoxistrobina	9,6	404,00	372,00	10	344,00	20	Positivo
Bifenazato	10,2	301,10	198,20	10	169,90	20	Positivo
Bitertanol	10,2	338,20	269,20	5	99,10	10	Positivo
Boscalida	9,7	343,00	307,10	16	272,10	32	Positivo
Bromuconazol	9,5	378,00	159,00	20	70,00	20	Positivo
Bupirimato	8,6	317,00	272,00	20	166,00	20	Positivo
Buprofezina	10,1	306,00	201,00	10	116,00	15	Positivo
Carbaril	7,4	202,00	145,00	10	127,00	20	Positivo
Carbendazim	1,2	192,00	160,00	15	132,00	20	Positivo
Carbendazim-d3 (C.P)	1,2	195,10	159,80	20	131,90	20	Positivo
Ciazofamida	11,1	325,00	261,20	10	108,10	15	Positivo

(continuação)

Agrotóxico	Tempo de retenção (min)	Íon Precursor	1ª transição		2ª transição		Modo de ionização
			Íon produto	CE*	Íon produto	CE*	
Cimoxanil	5,0	199,10	128,00	4	110,90	12	Positivo
Ciproconazol	9,1	292,10	125,00	32	70,00	16	Positivo
Ciprodinil	8,0	226,20	92,90	40	76,90	40	Positivo
Ciromazina	0,9	167,00	125,00	15	59,90	20	Positivo
Clofentezina	11,4	303,00	138,00	12	102,00	40	Positivo
Clomazona	8,6	240,10	127,80	10	124,90	20	Positivo
Clorantraniliprol	8,6	483,90	452,90	16	285,90	8	Positivo
Clorfenvinfós	10,8	358,90	155,00	8	99,20	28	Positivo
Clorpirifós	12,9	352,00 / 349,93	200,00	20	198,00	20	Positivo
Clorpirifós metílico	11,7	321,90	289,90	14	125,00	16	Positivo
Coumafós	11,4	363,00	307,00	20	227,00	28	Positivo
Cresoxim metílico	11,0	314,10	267,00	0	222,10	10	Positivo
Demeton-S-metil sulfona	2,3	263,02	169,00	12	109,00	24	Positivo
Demeton-S-metil sulfóxido	1,4	247,00	169,00	8	109,00	24	Positivo
Diazinona	11,4	305,00	169,00	15	153,00	20	Positivo
Diclorvós	6,5	220,80	108,80	15	78,90	30	Positivo
Diclorvós-d6 (C.P)	7,8	226,90	132,90	20	115,00	20	Positivo
Dicrotofós	2,0	238,09	112,10	8	72,10	28	Positivo
Dietofencarbe	9,2	268,00	226,00	5	180,00	15	Positivo
Difenoconazol	10,9	406,00	337,00	15	251,00	20	Positivo
Diflubenzuron	10,1	311,00	158,00	8	141,00	32	Positivo
Dimetoato	4,2	230,00	199,00	5	171,00	10	Positivo
Dimetoato-d6 (C.I)	4,2	236,00	205,00	4	131,00	16	Positivo
Dimetomorfe	8,7	388,00	301,00	20	165,00	20	Positivo
Diniconazol	10,5	326,10	159,00	28	70,00	28	Positivo
Dodine	8,6	228,20	60,10	20	57,20	20	Positivo
Emamectina B1a	9,6	886,50	158,10	40	81,80	50	Positivo
EPN	12,0	324,05	296,01	10	156,99	20	Positivo
Epoconazol	9,6	330,10	121,00	16	101,20	52	Positivo
Espinosina A	8,7	732,50	142,00	20	98,00	20	Positivo
Espinosina D	9,1	746,50	142,00	20	98,00	20	Positivo
Espiroidiclofeno	14,2	411,10	313,00	5	71,20	15	Positivo
Espiromesifeno	14,1	371,00	273,00	5	255,00	20	Positivo
Espirotriamato	9,3	374,20	330,30	15	270,10	20	Positivo
Espiroxamina	7,6	298,00	144,00	20	100,00	20	Positivo
Etiona	13,3	385,10	199,00	5	171,00	10	Positivo
Etirimol	2,5	210,16	140,10	20	43,10	52	Positivo
Etoprofós	9,8	243,10	130,90	15	97,00	30	Positivo
Fembuconazol	10,1	337,10	125,10	40	70,00	33	Positivo
Fempirazamina	10,0	332,20	272,10	10	230,20	20	Positivo
Fempropimorfe	7,6	304,30	147,10	30	130,00	25	Positivo
Fenamidona	9,7	312,00	92,20	28	65,10	56	Positivo
Fenamifós	9,5	304,10	234,00	12	217,10	20	Positivo
Fenamifós sulfona	6,9	336,10	266,00	16	188,00	24	Positivo
Fenamifós sulfóxido	5,8	320,11	292,10	8	108,10	44	Positivo
Fenarimol	9,3	331,00	268,00	20	259,00	20	Positivo
Fenazaquim	12,5	307,30	161,30	15	147,20	15	Positivo
Fenexamida	9,7	302,00	97,00	25	55,00	30	Positivo
Fenoxicarbe	10,3	302,20	116,20	5	88,20	20	Positivo

(continuação)

Agrotóxico	Tempo de retenção (min)	Íon Precursor	1ª transição		2ª transição		Modo de ionização
			Íon produto	CE*	Íon produto	CE*	
Fenpiroximato	13,1	422,21	366,20	12	107,00	64	Positivo
Fentiona	11,2	279,00	247,10	8	169,10	12	Positivo
Fentiona sulfóxido	7,1	295,02	280,00	16	109,00	32	Positivo
Fentoato	11,4	321,00	247,10	4	79,10	44	Positivo
Fipronil	11,2	434,90	329,90	12	249,90	28	Negativo
Fluazifope	9,2	328,20	282,20	15	254,20	20	Positivo
Flubendiamida	11,1	680,90	273,90	15	254,00	20	Negativo
Fludioxonil	9,3	247,00	169,00	32	152,00	32	Negativo
Flufenaceto	10,6	364,10	194,10	15	152,00	15	Positivo
Flufenoxurom	12,9	489,10	158,00	20	140,90	56	Positivo
Fluopiram	10,1	397,10	208,00	20	173,10	20	Positivo
Fluquinconazol	9,7	376,00	307,10	24	108,00	56	Positivo
Flusilazol	10,1	316,10	247,10	12	165,00	24	Positivo
Flutriafol	7,6	302,10	95,00	56	70,10	16	Positivo
Formetanato	1,0	222,13	165,10	8	65,10	52	Positivo
Fosalona	11,8	368,00	182,00	8	110,90	44	Positivo
Fosmete	9,4	317,99	160,00	8	133,00	36	Positivo
Fostiazato	7,6	284,00	227,80	10	103,80	20	Positivo
Foxim	11,9	299,00	129,10	4	77,10	24	Positivo
Haloxifope	10,3	362,10	316,20	12	288,10	24	Positivo
Hexaconazol	10,2	314,10	159,00	30	70,10	20	Positivo
Hexitiazoxi	13,0	353,10	228,20	10	168,20	20	Positivo
Imazalil	6,4	297,00	255,00	15	159,00	20	Positivo
Imidacloprido	3,8	256,00	209,00	15	175,00	15	Positivo
Indoxacarbe	12,2	528,10	218,00	20	203,00	45	Positivo
Ixonil	8,4	369,80	214,80	30	126,80	30	Negativo
Iprovalicarbe	9,5	321,20	202,90	0	119,00	16	Positivo
Isufenfós metílico	11,6	231,00	199,00	15	121,00	15	Positivo
Isoprocarbe	8,2	194,10	152,00	5	95,10	15	Positivo
Isoxaflutol	9,7	360,00	250,90	15	219,70	50	Positivo
Linurom	9,1	249,02	160,10	20	133,00	36	Positivo
Lufenurom	12,6	508,90	339,00	10	325,90	10	Negativo
Malationa	10,4	331,00	127,00	10	99,00	20	Positivo
Malationa-d10 (C.P)	10,3	341,11	132,00	12	100,00	24	Positivo
Mandipropamida	9,8	412,13	356,10	4	328,10	8	Positivo
MCPA	7,9	199,00	154,60	5	140,70	10	Negativo
Mepanipirim	9,7	224,10	206,80	10	190,60	20	Positivo
Meptildinocape	13,8	295,10	193,00	42	163,00	50	Negativo
Metalaxil	7,8	280,30	220,00	5	192,40	10	Positivo
Metamidofós	1,1	142,10	125,00	10	94,10	10	Positivo
Metconazol	10,3	320,10	125,00	48	70,10	24	Positivo
Metidationa	9,1	302,90	145,00	0	85,10	15	Positivo
Metiocarbe	9,0	226,10	121,10	12	169,00	5	Positivo
Metiocarbe sulfóxido	2,8	242,00	185,00	10	170,00	20	Positivo
Metobromurom	8,1	259,00	170,00	15	148,00	10	Positivo
Metomil	2,0	163,10	106,00	4	88,00	0	Positivo
Metoxifenozida	10,2	369,30	149,00	15	133,00	20	Positivo
Miclobutanil	9,6	289,20	125,10	20	70,20	15	Positivo
Monocrotofós	1,7	224,20	193,10	5	127,00	10	Positivo
Nitempiram	1,5	271,00	225,00	10	99,00	10	Positivo
Ometoato	1,2	214,10	183,00	5	125,00	20	Positivo

(conclusão)

Agrotóxico	Tempo de retenção (min)	Íon Precursor	1ª transição		2ª transição		Modo de ionização
			Íon produto	CE*	Íon produto	CE*	
Oxadixil	6,2	279,10	219,20	5	132,30	32	Positivo
Oxamil	1,7	237,00	90,00	5	72,00	10	Positivo
Paclobutrazol	8,9	294,10	125,20	36	70,10	16	Positivo
Paraoxom metílico	6,3	247,80	201,90	15	108,70	30	Positivo
Pencicuron	11,7	329,10	125,10	24	89,10	60	Positivo
Penconazol	10,2	284,00	159,00	20	70,00	15	Positivo
Pendimetalina	13,0	282,10	212,10	4	194,10	16	Positivo
Pimetrozina	0,9	218,11	105,00	20	51,00	60	Positivo
Piraclostrobina	11,4	388,11	193,80	8	163,10	20	Positivo
Piretrina	13,6	329,21	161,00	5	143,00	20	Positivo
Piridabem	13,8	365,20	309,20	10	147,30	20	Positivo
Piridato	14,6	379,10	351,10	5	206,80	10	Positivo
Pirimetanil	6,3	200,00	183,00	20	107,00	20	Positivo
Pirimicarbe	2,5	239,20	182,10	15	72,20	20	Positivo
Pirimicarbe desmetílico	1,4	225,10	168,10	8	72,10	20	Positivo
Pirimifós metílico	11,2	306,20	164,20	20	108,20	20	Positivo
Piriproxifem	12,6	322,00	185,00	20	96,00	10	Positivo
Procloráz	8,8	376,00	308,00	10	266,00	15	Positivo
Profenofós	12,0	374,90	347,00	5	304,90	15	Positivo
Propamocarbe	1,1	189,20	144,10	10	102,10	15	Positivo
Propaquizafope	12,2	444,10	371,00	15	99,90	20	Positivo
Propargito	13,5	368,10	231,20	0	175,20	8	Positivo
Propiconazol	10,4	342,10	159,00	32	69,10	16	Positivo
Propizamida	9,8	256,00	190,00	10	173,00	20	Positivo
Propoxur	7,0	210,11	168,10	5	111,10	10	Positivo
Proquinazida	13,2	373,00	331,00	20	289,10	20	Positivo
Protioconazol	10,4	341,90	306,10	15	99,80	20	Negativo
Protiofós	14,2	345,00	241,00	20	161,00	40	Positivo
Quinoclamina	6,1	208,00	105,10	25	77,00	40	Positivo
Quinoxifen	11,7	308,10	271,90	25	196,90	35	Positivo
Quizalofope etílico	12,1	373,09	271,20	24	255,10	36	Positivo
Rotenona	10,4	395,00	213,10	20	192,10	20	Positivo
Tebuconazol	9,9	308,00	125,00	20	70,00	20	Positivo
Tebufempirado	12,1	334,20	145,10	20	117,00	47	Positivo
Tebufenozida	10,9	353,20	296,90	5	133,10	15	Positivo
Teflubenzurom	11,7	379,00	359,00	0	339,00	4	Negativo
Terbutilazina	9,0	230,00	174,00	15	146,00	20	Positivo
Tetraconazol	10,0	372,00	159,00	36	70,00	20	Positivo
Tiabendazol	1,3	202,00	175,00	30	131,00	40	Positivo
Tiacloprido	5,5	253,00	186,00	10	126,00	20	Positivo
Tiametoxam	2,4	292,00	211,00	10	181,00	20	Positivo
Tiobencarbe	11,5	258,00	124,70	15	99,90	10	Positivo
Tiodicarbe	6,9	355,06	108,10	8	88,10	8	Positivo
Tolclofós metílico	11,7	300,90	269,00	10	125,00	15	Positivo
Triadimenol	9,0	296,00	227,00	5	70,00	10	Positivo
Triazofós	10,4	314,10	286,20	10	162,20	20	Positivo
Triclorfom	3,0	256,90	221,00	4	109,00	12	Positivo
Trifloxistrobina	12,2	409,20	206,20	10	186,20	20	Positivo
Triflumuron	11,1	359,00	156,00	8	139,00	32	Positivo
Triticonazol	9,0	318,10	125,20	41	70,20	33	Positivo
Zoxamida	11,3	336,00	187,00	16	159,00	44	Positivo

*CE: Energia de colisão (V)

3.7 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

O procedimento de extração empregado como base nesse estudo foi o método QuEChERS, versão citrato (OHAKAWA; MIYAGAWA; LEE, 2007) empregado nas análises de rotina do EURL-FV. Nesse procedimento, 10 g de óleo foram pesados em tubo de polipropileno e 10 mL de acetonitrila foram adicionados, seguido da adição de 10 μL de solução 10 mg L^{-1} contendo os controladores do procedimento. A mistura foi levada para agitação em agitador vertical durante 4 minutos. Após, uma mistura de sais previamente pesados contendo 4 g de sulfato de magnésio, 1 g de cloreto de sódio, 1 g de citrato trissódico dihidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado foram adicionados com o objetivo de induzir a migração dos analitos para a fase da acetonitrila. A mistura foi levada novamente para agitação em agitador vertical durante 4 minutos. A mistura foi centrifugada a 3500 rpm durante 3 min. O sobrenadante (2 mL) foi coletado e adicionado em tubo já contendo 300 mg de sulfato de magnésio e 50 mg de amina primária e secundária (PSA, do inglês *Primary-Secondary Amine*), para a etapa de purificação do extrato. A mistura foi homogeneizada em vortex, centrifugada e o extrato separado e armazenado em frasco de vidro âmbar onde se adicionou 10 μL de ácido fórmico 5% em acetonitrila para cada mililitro de extrato, caso a análise não fosse realizada imediatamente. Esse procedimento evita a degradação dos agrotóxicos durante armazenamento. Anterior à análise cromatográfica, 100 μL do extrato foi diluído em vial com 400 μL de água grau HPLC além de adição de 10 μL de solução 2,5 mg L^{-1} contendo os controladores do instrumento.

3.8 PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO

3.8.1 Procedimento de precipitação em baixas temperaturas (*freezing out*)

O procedimento de *freezing out* foi avaliado a fim de se obter um extrato o mais livre possível de substâncias lipídicas oriundas da matriz. Para isso, o procedimento de extração foi conduzido com amostras “branco” de azeite de oliva como descrito em 3.7 e, após adição dos sais para partição, agitação e centrifugação, 5 mL da camada orgânica de acetonitrila foi transferida para tubo cônico com capacidade de 15 mL com tampa rosqueável. Os frascos fechados

foram levados para um recipiente contendo gelo seco. A mistura permaneceu nessas condições durante aproximadamente 7 minutos. Após esse tempo, o tubo foi removido do gelo seco, 2 mL do sobrenadante foi retirado e a sequência do procedimento de purificação se deu como descrito em 3.7.

A eficiência da etapa de precipitação em baixas temperaturas foi avaliada pela injeção dos extratos em sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas híbrido do tipo quadrupolo-tempo de voo (UHPLC-QTOF-MS).

3.8.2 Procedimento de purificação do extrato (*clean-up*)

Para avaliação da etapa de purificação do extrato, as amostras de azeite de oliva foram submetidas ao procedimento de extração conforme descrito em 3.7. O procedimento de purificação foi avaliado empregando três diferentes adsorventes sendo que um deles foi empregado de duas maneiras.

O primeiro procedimento avaliado foi a purificação descrita em 3.7, onde 300 mg de sulfato de magnésio e 50 mg de PSA são empregados para purificação de 2 mL de extrato. O adsorvente Z-sep, formado pela deposição de dióxido de zircônio sobre um suporte de sílica, foi empregado de duas maneiras distintas: na forma dispersiva, onde 300 mg de sulfato de magnésio e 50 mg de Z-sep foram empregados para purificar 2 mL de extrato (procedimento descrito em 3.7 porém substituindo os adsorventes empregados); e na forma de cartucho, onde 40 mg de Z-sep foram transferidos para cartuchos de SPE, condicionados previamente com 1 mL de água e 1 mL de acetonitrila, através do qual 1 mL do extrato em acetonitrila foi percolado, coletado e injetado, após diluição na proporção 1:5 (v/v) com água grau HPLC. Para o quarto tipo de purificação o sólido empregado foi o Agilent EMR-Lipid, um sólido especialmente desenvolvido para matrizes com alto teor de gordura empregado na forma de d-SPE. Para esse procedimento, o extrato em acetonitrila (5 mL) foi transferido para tubo EMR-Lipid d-SPE já contendo 1 g do sólido para purificação onde previamente foram adicionados 5 mL de água para ativação do adsorvente. A mistura foi agitada e centrifugada e 5 mL do extrato foi transferido para um segundo tubo (EMR-Lipid Polish) contendo 2 g de uma mistura de cloreto de sódio e sulfato de magnésio (1:4, m/m). É importante salientar que esses tubos já vêm de fábrica com a quantidade necessária dos adsorventes.

A avaliação da eficiência dos diferentes procedimentos de purificação em termos de número de coextrativos se deu pela injeção dos extratos “branco” de azeite de oliva extraídos e purificados, conforme descrito acima, em sistema UHPLC-QTOF-MS.

Já a avaliação em termos de percentual de recuperação e RSD% se deu pela análise de amostras “branco” de azeite de oliva fortificadas com a mistura de agrotóxicos na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para a etapa de fortificação, um volume calculado da solução mistura na concentração de 10 mg L^{-1} preparada em acetonitrila contendo os agrotóxicos em estudo foi adicionado à 250 g de azeite de oliva. A mistura foi homogeneizada durante 30 minutos permitindo, assim, a total solubilização da fase em acetonitrila no azeite de oliva. As amostras foram, então, pesadas ($n=5$) em tubos individuais para cada procedimento de purificação, submetidas à extração conforme descrito em 3.7 e injetadas em sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (UHPLC-TQ-MS/MS).

3.9 VALIDAÇÃO

Após a definição das condições experimentais para o procedimento de extração e purificação proposto, o método foi validado em termos de linearidade, faixa dinâmica linear, sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão de acordo com o guia de controle de qualidade analítica e procedimentos de validação de métodos para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (SANTE, 2015). O método foi validado para três matrizes de óleos comestíveis (oliva, soja e girassol) empregando UHPLC-TQ-MS/MS.

Neste estudo, durante a avaliação da linearidade e sensibilidade das curvas analíticas, uma técnica de quantificação conhecida como *Procedural Standard Calibration* (PSC) foi empregada com intuito de corrigir a perda de alguns agrotóxicos durante o procedimento de extração. Essa técnica se baseia na construção da curva analítica através da fortificação de porções da matriz “branco” com diferentes volumes da mistura dos agrotóxicos. As amostras são extraídas, injetadas e o sinal, em termos de área, é empregado para construção do gráfico da curva analítica. Diferentemente da técnica de adição de padrão, que se baseia na adição da solução contendo os analitos diretamente sobre a amostra que se quer

quantificar, a PSC é realizada em matriz “branco” e é empregada para matrizes consideradas complexas como, por exemplo, produtos de origem animal e produtos com alto teor de gordura. (SANTE, 2015)

3.9.1 Exatidão e precisão (estudo de fortificação e recuperação)

Para o estudo de exatidão e precisão do método desenvolvido foi empregada a técnica de fortificação e recuperação. Para isso, amostras “branco” de azeite de oliva e óleos de soja e girassol foram fortificadas com a solução mistura de agrotóxicos nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para cada concentração foram realizadas cinco replicatas.

O critério de aceitação para os ensaios de fortificação é que os valores de recuperação estejam compreendidos na faixa de 70 a 120% com valores de RSD (precisão) menores ou iguais a 20% (SANTE, 2015).

3.9.2 Limite de quantificação do método

O limite de quantificação do método (LOQm) foi definido após avaliação dos resultados obtidos no estudo de fortificação e recuperação. Portanto, o LOQm ficou estabelecido como sendo a menor concentração fortificada na matriz, durante o estudo de recuperação, que apresentou resultados entre 70 e 120% com RSD% menor ou igual a 20. Como para alguns agrotóxicos nesse estudo o percentual de recuperação foi menor do que 70%, porém com $\text{RSD} \leq 20\%$, a técnica de calibração *Procedural Standard Calibration* foi utilizada e, portanto, o LOQm foi estabelecido levando em consideração apenas a precisão das determinações durante o estudo de recuperação.

3.9.3 Linearidade e faixa dinâmica linear

A linearidade e faixa dinâmica linear foram avaliadas através de curvas analíticas preparadas pela técnica PSC, aplicada às três matrizes estudadas nesse trabalho. Para isso, porções das amostras “branco” dos diferentes tipos de óleos foram fortificadas com a mistura dos agrotóxicos nas concentrações de 10, 20, 50, 100 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e submetidas ao procedimento de extração e purificação definido

após os estudos prévios. Cada extrato foi injetado em sistema UHPLC-TQ-MS/MS cinco vezes e o valor do coeficiente de determinação (r^2) foi calculado para cada agrotóxico em cada um dos tipos de óleo comestível.

Além do coeficiente de determinação, a linearidade foi avaliada através dos valores de resíduo, que demonstram o percentual de variação de cada ponto de uma curva analítica com relação ao modelo matemático empregado ($y=ax + b$). Segundo o SANTE, valores de resíduos abaixo de 20% são ideais para considerar um método como sendo linear (SANTE, 2015).

3.9.4 Avaliação da sensibilidade das curvas analíticas nos diferentes óleos (“efeito matriz”)

Na análise multirresíduo de agrotóxicos, especialmente em matrizes complexas como os óleos comestíveis, o efeito de supressão ou aumento de sinal é um parâmetro importante. O efeito matriz é comumente avaliado comparando-se curvas analíticas preparadas em solvente orgânico e extrato da matriz, usualmente pela técnica de superposição da matriz, o que fornece importantes informações em termos de supressão ou aumento de sinal quando os agrotóxicos estão em presença da matriz.

Neste trabalho, devido aos baixos percentuais de recuperação para um determinado número de agrotóxicos, a técnica de PSC foi empregada, a qual compensa possíveis perdas dos analitos durante a extração, mas que também corrige os sinais para analitos com efeito matriz considerável. Nesse sentido, a avaliação do efeito matriz da maneira usual nesse trabalho torna-se dispensável, uma vez que o sinal dos analitos empregando PSC não é afetado apenas pelo efeito dos componentes da matriz, mas também por possíveis perdas durante a extração, superestimando, assim, esse efeito.

Nesse sentido, buscou-se avaliar, então, a sensibilidade das curvas analíticas nos diferentes tipos de óleos, através da comparação da inclinação entre as curvas analíticas preparadas como descritas em 3.9.3 nos três óleos com uma curva analítica preparada empregando uma segunda matriz “branco” de azeite de oliva, utilizada como referência, de acordo com a equação 4:

$$EM (\%) = \left(\frac{\text{Inclinação da curva do óleo em estudo}}{\text{Inclinação da curva do azeite de oliva referência}} - 1 \right) \times 100 \quad (4)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO EM BAIXAS TEMPERATURAS (*FREEZING OUT*)

A avaliação da influência do procedimento de precipitação em baixas temperaturas foi realizada executando-se as etapas descritas em 3.8.1. Para a definição do tempo máximo de permanência do tubo contendo o extrato em contato com o gelo seco, um teste prévio foi realizado monitorando o tempo que a gordura levou para precipitar sem que o solvente congelasse evitando-se, assim, possíveis perdas dos agrotóxicos nessa etapa. É importante salientar que o gelo seco empregado nessa etapa foi triturado a fim de que a área de contato entre o gelo e o tubo fosse homogênea o que evita diferença nos resultados.

A Figura 2 demonstra o cromatograma obtido pela análise de amostra “branco” de azeite de oliva submetida ao procedimento de extração empregando a técnica de *freezing out* e uma amostra que passou pelo procedimento de extração sem o emprego da técnica de precipitação em baixas temperaturas. O cromatograma foi obtido pela injeção dos extratos em sistema UHPLC-QTOF-MS no modo *full scan*. Como pode ser observado no cromatograma, as diferenças entre os sinais da amostra que passou pelo procedimento de *freezing out* quando comparado com a amostra sem o emprego de *freezing out* são sutis. As maiores diferenças ocorrem a partir de 15 minutos onde se pode observar que as substâncias, na condição onde o procedimento de *freezing out* foi empregado, apresentam um sinal inferior quando comparado à outra amostra. Esse fato pode ser explicado pelo fato de que, como a gordura tem a tendência em ficar retida, já que a coluna de C18 empregada tem caráter apolar, a identificação nas mudanças desses sinais pode ser observada mais ao final da corrida cromatográfica.

A Figura 3 exhibe o número de substâncias da matriz “branco” presentes no extrato após o procedimento de *freezing out*. Como pode ser observado nessa figura, o número de substâncias presentes no extrato quando submetido ao *freezing out* é reduzido em cerca de 10% quando comparado ao procedimento onde o *freezing out* não foi empregado. Esses dados levam a concluir que o procedimento de precipitação em baixas temperaturas auxilia na remoção de substâncias

extraídas no decorrer do procedimento de extração, apesar de ser uma redução de apenas 10%.

Figura 2 – Cromatograma obtido pela análise de amostras “branco” de azeite de oliva por UHPLC-QTOF-MS submetidas ao procedimento de extração pelo método QuEChERS avaliando a influência da etapa de *freezing out*.

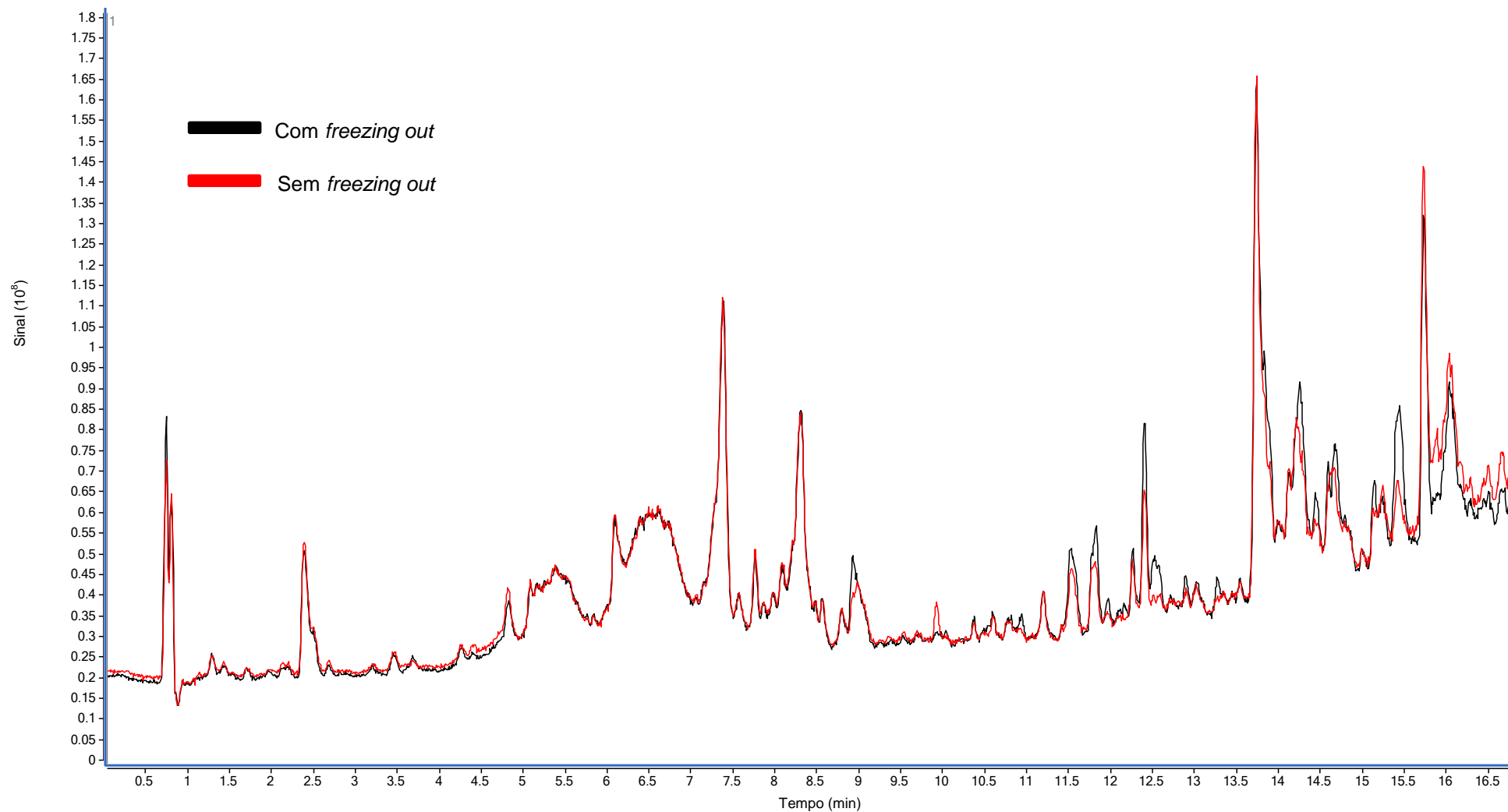
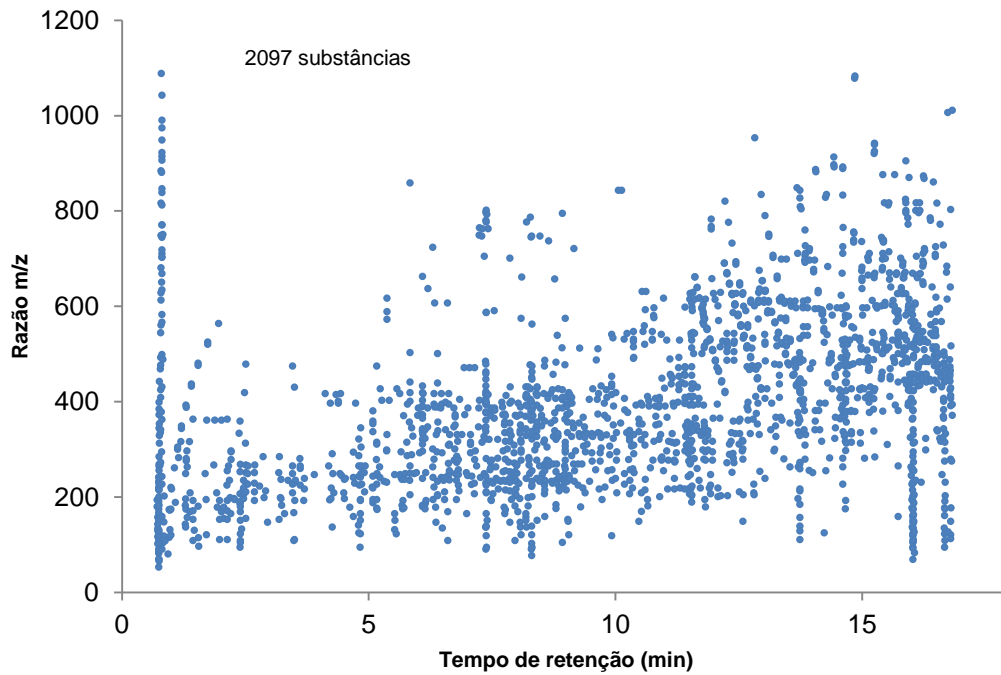
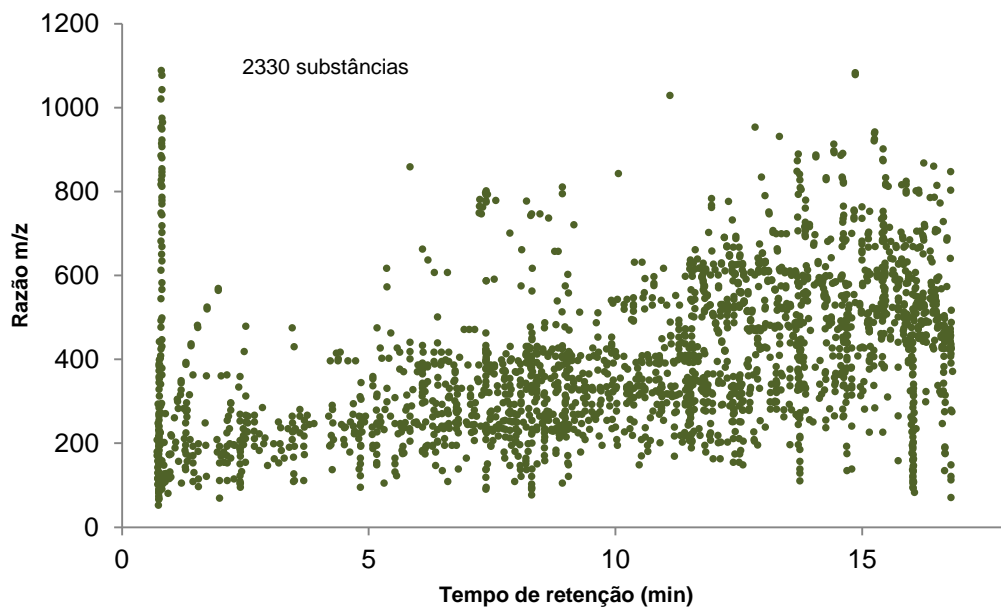


Figura 3 – Substâncias extraídas da matriz “branco” de azeite de oliva quando submetidas ao procedimento de extração empregando *freezing out* (A) e sem o uso de *freezing out* (B). Cada ponto do gráfico corresponde a um componente da matriz.

(A)



(B)



4.2 PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO POR D-SPE E SPE EM CARTUCHO

A avaliação da influência dos diferentes adsorventes empregados na etapa de purificação do extrato foi realizada através da extração das amostras “branco” pelo método QuEChERS citrato e executando-se as etapas descritas em 3.8.2 além do emprego da etapa de precipitação em baixas temperaturas como já discutido em 4.1.

A Figura 4 demonstra os cromatogramas sobrepostos obtidos pela análise de amostras “branco” de azeite de oliva submetidas ao procedimento de extração empregado a técnica de *freezing out* e os procedimentos purificação citados. O cromatograma foi obtido pela injeção dos extratos em sistema UHPLC-QTOF-MS no modo *full scan*. Como pode ser observado nesse cromatograma até cerca de 9 minutos, a técnica de purificação empregando PSA foi a que proporcionou menor sinal das substâncias da matriz quando comparada às outras técnicas empregadas. Já entre 9 minutos e o final da corrida cromatográfica em 17 minutos, o sinal menos intenso foi promovido pela técnica de purificação empregando Z-sep na configuração de SPE em cartucho. O sinal mais intenso em toda a corrida cromatográfica é aquele obtido através da técnica de purificação onde se empregou o adsorvente EMR-Lipid.

A Figura 5 exhibe as substâncias presentes no extrato “branco” após procedimento de extração, *freezing-out* e purificação empregando cada um dos adsorventes estudados. Nesta figura é possível observar que, dentre todos os procedimentos estudados, Z-sep SPE em cartucho demonstrou ser o mais eficiente em termos de remoção de componentes da matriz do extrato (1303 compostos) seguido de PSA (1701 compostos) e Z-sep d-SPE (2312 compostos). Nesta avaliação, o adsorvente EMR-Lipid demonstrou ser o que menos remove componentes da matriz após a extração seguida de *freezing out*. Como esse tipo de análise só permite chegar a conclusões qualitativas, os procedimentos de purificação foram avaliados após fortificação de extrato “branco” de azeite de oliva com a mistura dos analitos estudados na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, extração pelo método QuEChERS e *freezing out* sendo quantificados pela técnica de UHPLC-TQ-MS/MS.

Figura 4 – Cromatograma obtido pela análise de amostras “branco” de azeite de oliva por UHPLC-QTOF-MS submetidas ao procedimento de extração pelo método QuEChERS seguido de *freezing out* e purificação por SPE empregando quatro procedimentos.

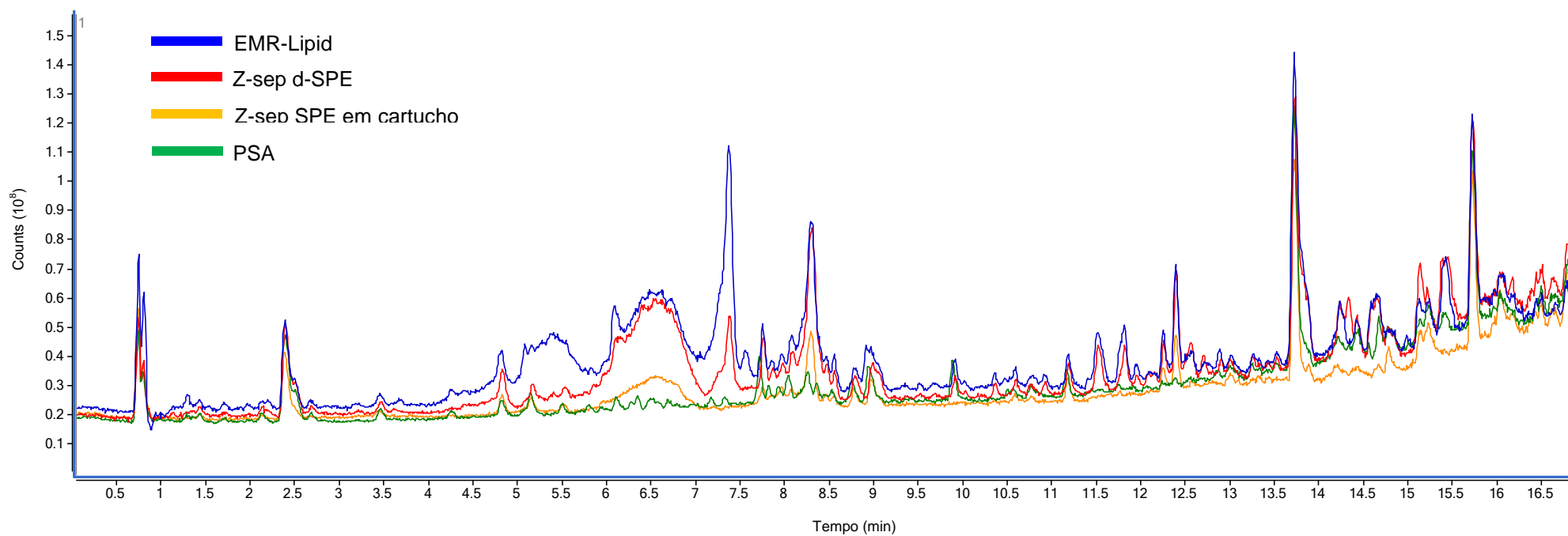
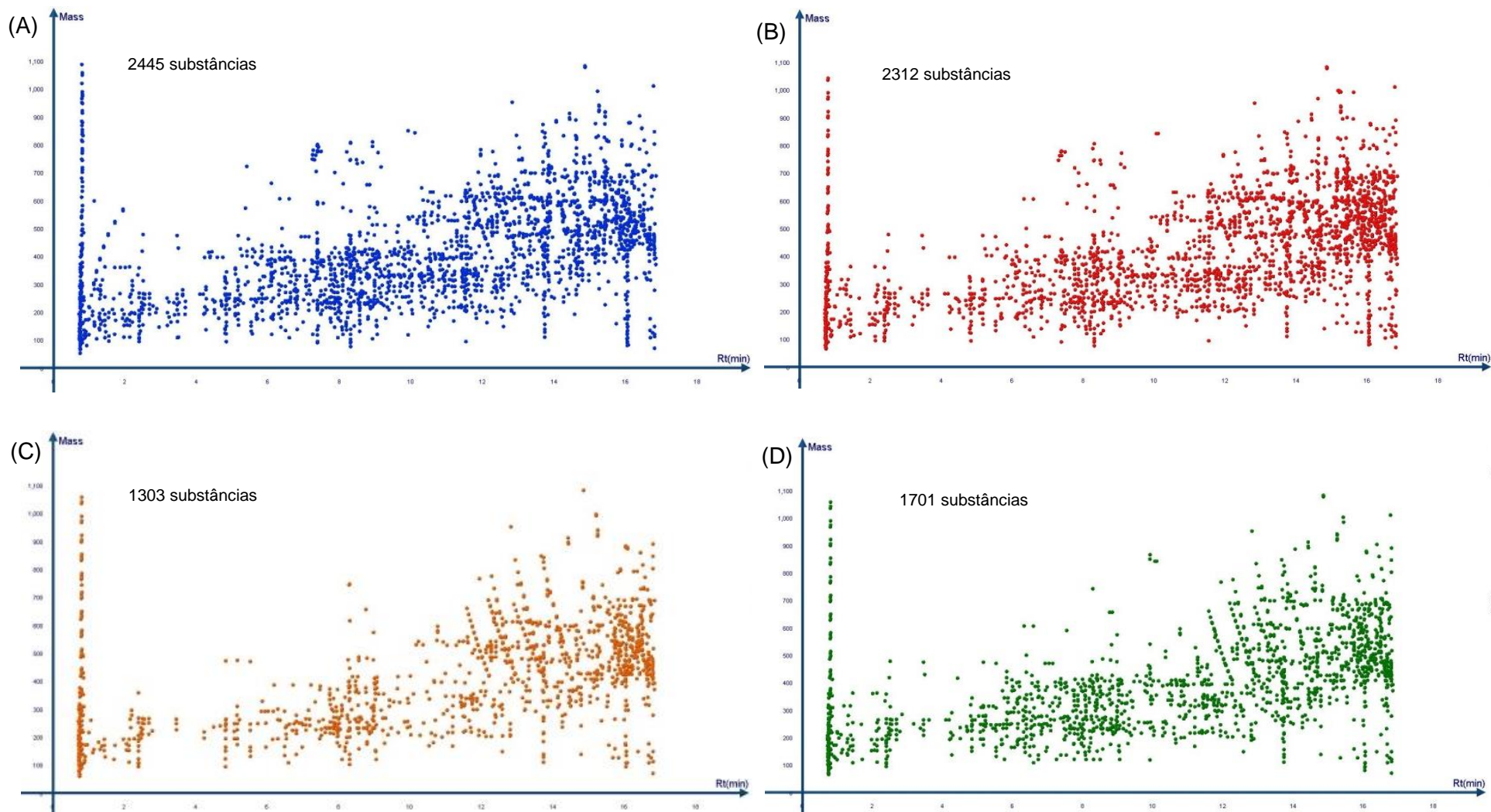


Figura 5 – Substâncias extraídas da matriz “branco” de azeite de oliva quando submetidas ao procedimento de extração pelo método QuEChERS e *freezing out* empregando purificação com (A) EMR-Lipid, (B) Z-sep d-SPE, (C) Z-sep SPE em cartucho e (D) PSA. Cada ponto do gráfico corresponde a um componente da matriz.

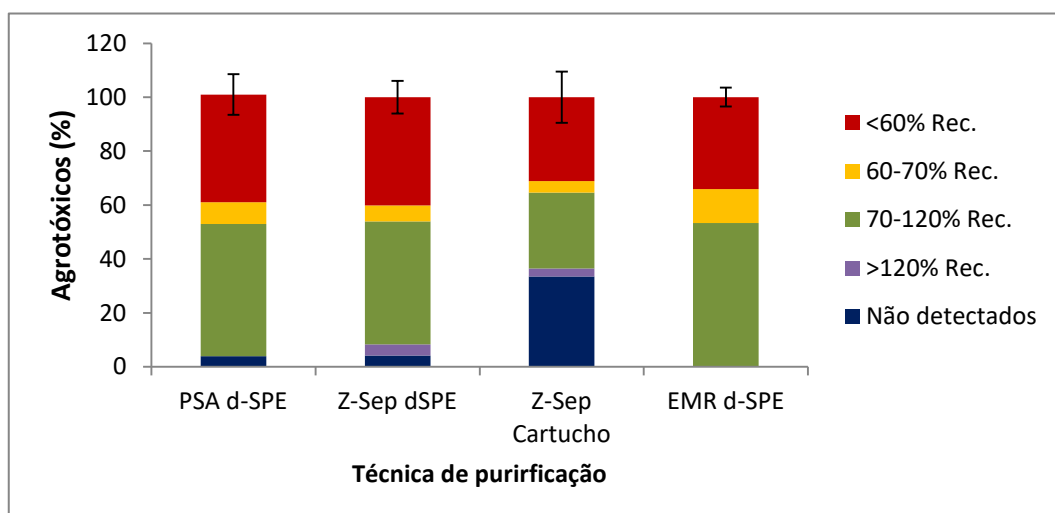


A Figura 6 relaciona os procedimentos de purificação empregados, a faixa de percentual de recuperação dos agrotóxicos e a porcentagem de agrotóxicos agrupados em cada um dos intervalos. Como pode ser observado na figura, a técnica de SPE em cartucho empregando o adsorvente Z-sep se mostrou como sendo a pior técnica de purificação para esse tipo de amostra com cerca de 35% dos agrotóxicos não detectados nessas condições. Comparando com os dados obtidos com os das Figuras 4 e 5 pode-se concluir que esse adsorvente além de remover os interferentes da matriz remove, ainda, os analitos, não fazendo distinção de uma ou outra classe de substâncias. Além disso, esta técnica demonstrou o pior resultado em termos de precisão, apresentando desvio padrão relativo médio de 19%.

As técnicas empregando PSA e Z-sep d-SPE apresentaram resultados similares, sendo que em ambas 4% dos agrotóxicos não foram detectados após o procedimento de purificação. Em termos de precisão, PSA apresentou RSD médio de 15% e Z-sep d-SPE de 12%.

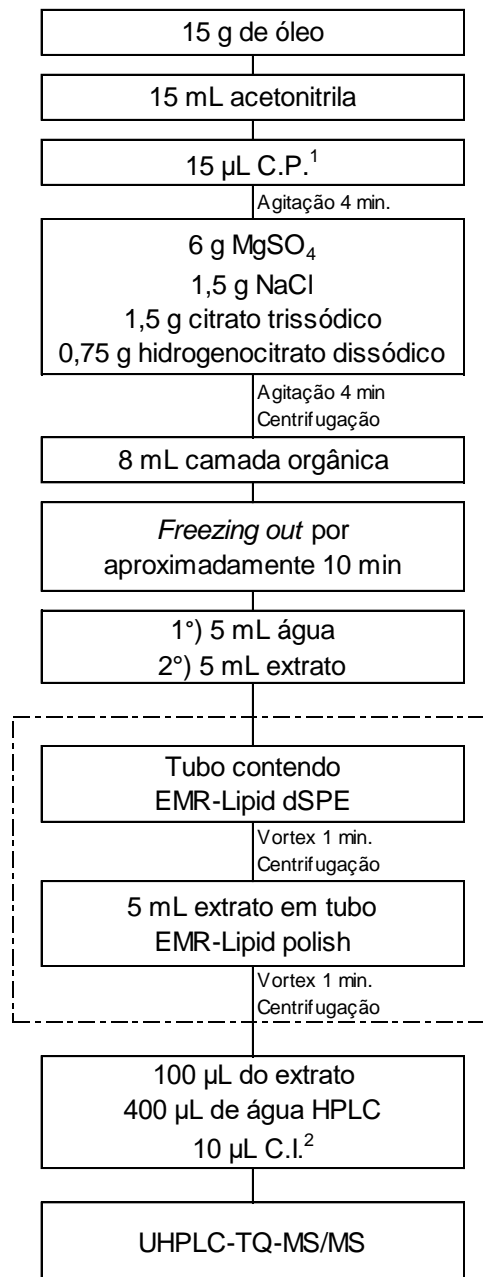
A técnica empregando EMR-Lipid apresentou os melhores resultados em termos de RSD (7%) além de promover o maior número de agrotóxicos com percentuais de recuperação dentro da faixa aceitável de 70 a 120%. Ademais, nesta técnica nenhum dos agrotóxicos foi totalmente perdido durante o processo, sendo então a técnica mais promissora a ser empregada na determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes com alto teor de gordura.

Figura 6 – Percentuais de recuperação e RSD (%) (n=5) para os agrotóxicos fortificados na matriz “branco” de azeite de oliva empregando diferentes técnicas de purificação e análise por UHPLC-TQ-MS/MS.



A Figura 7 demonstra o procedimento final de extração empregado nesse estudo. Esse procedimento foi empregado durante a validação do método e na aplicação do mesmo para determinação de agrotóxicos em amostras provenientes de supermercados e produtores.

Figura 7 – Procedimento de extração empregado para determinação de agrotóxicos em óleos comestíveis empregando UHPLC-TQ-MS/MS.



¹C.P.: Carbendazim-d3, diclorvós-d6 e malationa-d10 (10 mg L⁻¹ em acetonitrila)

²C.I.: Dimetoato-d6 (2,5 mg L⁻¹ em acetonitrila)

É importante salientar que, para extração empregando EMR-Lipid, o procedimento de extração foi executado pesando-se 15 g de azeite de oliva e os volumes de solvente de extração e da solução contendo os controladores foi aumentado proporcionalmente, bem como a massa dos sais empregados na etapa de separação das fases. Isso foi realizado para que se obtivesse o volume de extrato necessário para realização do procedimento de purificação por esta técnica.

4.3 VALIDAÇÃO

4.3.1 Exatidão e precisão

As Tabelas 2, 3 e 4 exibem os resultados do estudo de fortificação e recuperação para os três tipos de óleos estudados (oliva, soja e girassol) fortificados nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A quantificação empregada nesses resultados foi do tipo superposição da matriz (do inglês, *matrix-matched calibration*), onde o extrato “branco” de cada matriz foi empregado na preparação das curvas analíticas.

Como pode ser observado na Tabela 2, os resultados obtidos para azeite de oliva mostram que do total de agrotóxicos estudados (165), 84, 93 e 88 apresentaram percentuais de recuperação dentro da faixa de 70 a 120% quando fortificados nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, com desvio padrão relativo menor do que 20%. Já para os agrotóxicos determinados em óleo de soja (Tabela 3) o número de agrotóxicos que apresentaram percentuais de recuperação e RSD% dentro da faixa aceitável foi de 75, 81 e 83 quando fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Na avaliação dos resultados descritos na Tabela 4, para óleo de girassol, é possível observar que o número de agrotóxicos com percentual de recuperação e RSD dentro da faixa diminuem para 65, 66 e 66 nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Nas Tabelas 2, 3 e 4 é possível observar que para grande maioria dos agrotóxicos que tiveram percentuais de recuperação menores do que 70%, o desvio padrão relativo foi predominantemente abaixo de 20% (em sua maioria menor do que 10%). Por esse motivo, nas etapas seguintes da validação do método (estudo de linearidade e efeito matriz), outra abordagem para a quantificação foi adotada:

Procedural Standard Calibration, uma técnica alternativa de calibração que compensa as perdas durante o procedimento de extração. (SANTE, 2015)

Tabela 2 – Limite de quantificação, percentual de recuperação e desvio padrão relativo (n=5) dos agrotóxicos fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras “branco” de azeite de oliva.

(continua)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	
2,4-D	19	11	18	18	14	15	10
Acefato	48	47	46	7	69	6	20
Acetamiprido	116	2	94	8	91	2	10
Aldicarbe	97	2	102	4	102	6	10
Aldicarbe sulfona	144	7	100	13	90	5	10
Aldicarbe sulfóxido	91	6	73	9	74	8	10
Azinfós metílico	95	12	87	12	79	5	10
Azoxistrobina	100	8	103	8	110	3	10
Bifenazato	40	23	53	9	63	11	20
Bitertanol	59	11	61	7	61	8	10
Boscalida	89	4	74	5	85	3	10
Bromuconazol	60	10	60	7	57	7	10
Bupirimato	76	8	73	6	73	5	10
Buprofezina	51	6	50	9	48	4	10
Carbaril	97	11	88	6	80	4	10
Carbendazim	37	11	38	6	41	6	10
Ciazofamida	108	10	94	5	119	3	10
Cimoxanil	101	3	104	6	101	3	10
Ciproconazol	56	4	53	7	58	6	10
Ciprodinil	34	7	37	5	37	4	10
Ciromazina	n.d.		n.d.		n.d.		n.a.c
Clofentezina	61	10	54	5	57	4	10
Clomazona	82	5	83	7	71	4	10
Clorantniliprol	95	8	85	6	84	3	10
Clorfenvinfós	92	6	82	10	83	7	10
Clorpirifós	57	13	48	6	51	2	10
Clorpirifós metílico	76	13	58	11	57	4	10
Coumafós	87	8	87	8	80	7	10
Cresoxim metílico	100	4	92	9	85	5	10
Demeton-S-metil sulfona	105	6	100	6	113	3	10
Demeton-S-metil sulfóxido	17	19	16	14	24	15	10
Diazinona	68	7	65	7	67	5	10
Diclorvós	84	7	104	6	93	5	10
Dicrotofós	70	10	75	5	80	7	10
Dietofencarbe	92	8	89	5	87	4	10
Difenoconazol	70	7	69	5	66	5	10
Diflubenzuron	96	11	72	15	82	6	10
Dimetoato	115	5	105	8	95	3	10
Dimetomorfe	107	6	88	7	86	6	10
Diniconazol	43	9	49	7	49	7	10

(continuação)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	
Dodine	2	17	2	74	1	54	n.a.c
Emamectina B1a	2	16	3	46	7	31	10
EPN	56	20	70	11	62	14	10
Epoxiconazol	89	5	85	8	78	8	10
Espinosina A	23	12	26	29	44	17	10
Espinosina D	24	16	26	28	45	17	10
Espirodiclofeno	59	5	60	6	56	6	10
Espiromesifeno	75	25	77	10	69	5	20
Espirotetramato	98	7	86	8	90	6	10
Espiroxamina	50	9	46	16	68	10	10
Etiona	67	21	73	4	69	4	10
Etirimol	7	11	10	38	17	24	n.a.c
Etoprofós	74	3	72	9	68	4	10
Fembuconazol	90	8	78	12	85	8	10
Fempirazamina	102	7	96	6	92	4	10
Fempropimorfe	51	13	50	19	72	8	10
Fenamidona	86	6	88	5	91	4	10
Fenamifós	87	8	87	6	85	6	10
Fenamifós sulfona	93	3	89	7	95	5	10
Fenamifós sulfóxido	15	13	13	12	18	17	10
Fenarimol	58	9	51	6	51	6	10
Fenazaquim	20	23	22	7	22	3	20
Fenexamida	65	5	63	12	56	7	10
Fenoxicarbe	88	6	76	8	79	3	10
Fenpiroximato	48	27	50	6	49	4	20
Fentiona	65	15	75	11	70	10	10
Fentiona sulfóxido	117	4	101	5	93	4	10
Fentoato	93	10	80	9	79	7	10
Fipronil	102	5	103	8	100	2	10
Fluazifope	80	10	72	10	77	3	10
Flubendiamida	102	4	100	3	101	5	10
Fludioxonil	90	3	104	8	90	8	10
Flufenaceto	97	8	91	5	92	2	10
Flufenoxurom	83	8	84	9	79	7	10
Fluopiram	107	6	100	9	93	5	10
Fluquinconazol	85	13	74	9	76	9	10
Flusilazol	84	8	71	7	76	4	10
Flutriafol	63	7	66	4	72	7	10
Formetanato	18	10	19	23	40	13	10
Fosalona	74	16	70	3	80	11	10
Fosmete	123	2	106	3	91	5	10
Fostiazato	101	6	94	9	93	5	10
Foxim	89	11	83	11	88	6	10
Haloxifope	83	8	76	9	87	11	10
Hexaconazol	36	16	41	5	45	9	10
Hexitiazoxi	35	18	38	7	36	3	10
Imazalil	23	12	27	25	46	15	10
Imidacloprido	116	5	94	7	96	3	10
Indoxacarbe	100	6	100	8	97	9	10
Ixonil	68	4	63	6	60	4	10
Iprovalicarbe	92	8	85	7	88	7	10
Isofenfós metílico	93	7	86	5	79	3	10
Isoprocarbe	101	4	86	3	75	2	10

(continuação)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	
Isoxaflutol	118	4	117	8	104	6	10
Linurom	78	5	82	8	68	7	10
Lufenuro	72	26	86	9	84	3	20
Malationa	108	5	94	7	101	4	10
Mandipropamida	125	10	115	6	104	3	10
MCPA	25	14	0	30	21	18	10
Mepanipirim	65	15	62	7	58	3	10
Meptildinocape	16	42	18	15	38	9	20
Metalaxil	91	8	86	8	95	5	10
Metamidofós	57	8	56	9	48	4	10
Metconazol	52	9	49	5	51	6	10
Metidationa	100	6	93	5	72	7	10
Metiocarbe	82	4	79	7	72	7	10
Metiocarbe sulfóxido	94	4	88	7	90	4	10
Metobromurom	83	1	78	5	71	2	10
Metomil	106	5	98	7	100	3	10
Metoxifenoazida	109	6	92	12	95	5	10
Miclobutanil	85	7	82	7	82	3	10
Monocrotofos	120	6	96	6	77	5	10
Nitempiram	29	5	24	13	34	7	10
Ometoato	64	14	55	7	63	5	10
Oxadixil	106	3	100	5	108	2	10
Oxamil	134	6	102	10	89	5	10
Paclobutrazol	75	6	71	6	73	6	10
Paraoxom metílico	112	10	104	9	100	6	10
Pencicuron	65	11	61	5	59	4	10
Penconazol	59	7	56	10	62	5	10
Pendimetalina	42	18	46	7	47	5	10
Pimetrozina	n.d.		n.d.		3	17	50
Piraclostrobina	87	7	80	9	75	5	10
Piretrina	56	27	64	7	56	4	20
Piridabem	33	34	36	6	38	5	20
Piridato	31	43	29	25	20	16	50
Pirimetanil	53	4	41	8	47	6	10
Pirimicarbe	80	5	76	6	81	3	10
Pirimicarbe desmetílico	50	10	48	5	57	5	10
Pirimifós metílico	67	6	64	7	63	4	10
Piriproxifem	41	18	44	7	43	3	10
Procloráz	53	7	54	6	57	4	10
Profenofós	58	9	54	4	49	6	10
Propamocarbe	2	20	3	52	6	26	n.a.c
Propaquizafope	69	20	71	7	73	3	10
Propargito	64	36	79	7	66	11	20
Propiconazol	66	15	66	6	65	4	10
Propizamida	82	5	82	8	72	4	10
Propoxur	110	3	94	9	92	3	10
Proquinazida	17	20	18	6	17	5	10
Protioconazol	2	65	4	48	4	23	n.a.c
Protiofós	31	34	38	35	30	11	50
Quinoclamina	147	16	90	22	68	7	10
Quinoxifen	23	16	24	6	22	5	10
Quizalofope etílico	65	11	64	7	63	3	10
Rotenona	84	5	90	9	77	5	10

(conclusão)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	
Tebuconazol	51	10	57	6	56	7	10
Tebuempirado	46	13	50	4	44	4	10
Tebufenozida	103	5	93	6	92	4	10
Teflubenzurom	60	11	65	7	68	4	10
Terbutilazina	60	4	62	4	58	4	10
Tetraconazol	93	5	92	5	94	5	10
Tiabendazol	32	7	33	9	44	9	10
Tiacloprido	109	2	98	3	101	2	10
Tiametoxam	112	7	94	8	96	4	10
Tiobencarbe	49	6	51	9	44	5	10
Tiodicarbe	111	5	103	5	104	4	10
Tolclofós metílico	63	7	58	17	56	11	10
Triadimenol	67	6	69	7	69	7	10
Triazofós	105	5	87	5	88	7	10
Triclorfom	102	4	94	5	93	5	10
Trifloxistrobina	100	8	95	4	93	5	10
Triflumuron	77	7	77	8	75	5	10
Triticonazol	48	5	48	7	56	10	10
Zoxamida	84	6	78	3	70	3	10

n.a.c.: não atendeu os critérios para quantificação.

Tabela 3 – Limite de quantificação, percentual de recuperação e desvio padrão relativo (n=5) dos agrotóxicos fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras “branco” de óleo de soja.

(continua)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	
2,4-D	13	12	29	11	12	11	10
Acefato	56	19	38	9	50	7	10
Acetamiprido	120	3	112	2	106	5	10
Aldicarbe	120	4	96	9	106	7	10
Aldicarbe sulfona	123	4	104	8	106	12	10
Aldicarbe sulfóxido	77	12	57	10	67	9	10
Azinfós metílico	90	17	88	15	80	17	10
Azoxistrobina	128	8	101	10	107	8	10
Bifenazato	33	6	78	5	83	9	10
Bitertanol	62	4	44	2	58	7	10
Boscalida	79	11	64	13	73	15	10
Bromuconazol	56	10	46	20	51	18	10
Bupirinato	64	8	56	9	70	8	10
Buprofezina	56	6	49	5	50	3	10
Carbaril	110	3	96	10	92	2	10
Carbendazim	34	4	24	9	35	4	10
Ciazofamida	97	14	92	9	90	9	10
Cimoxanil	138	13	114	10	119	7	10
Ciproconazol	50	8	45	7	46	4	10
Ciprodinil	35	4	33	9	35	6	10
Ciromazina	n.d.		n.d.		n.d.		n.a.c
Clofentezina	53	8	53	6	51	6	10
Clomazona	86	12	77	18	79	14	10
Clorantraniliprol	91	9	84	5	82	7	10
Clorfenvinfós	89	16	70	2	79	8	10
Clorpirifós	39	1	44	2	36	9	10
Clorpirifós metílico	83	3	58	7	59	11	10
Coumafós	85	18	73	12	83	13	10
Cresoxim metílico	101	5	91	9	92	7	10
Demeton-S-metil sulfona	125	5	108	3	107	7	10
Demeton-S-metil sulfóxido	13	8	8	10	13	9	10
Diazinona	57	5	49	5	54	10	10
Diclorvós	101	5	84	11	89	12	10
Dicrotofós	85	9	61	5	75	8	10
Dietofencarbe	99	7	86	12	81	6	10
Difenoconazol	59	6	50	6	60	4	10
Diflubenzuron	69	4	69	5	64	7	10
Dimetoato	133	15	104	18	115	13	10
Dimetomorfe	92	7	78	9	87	9	10
Diniconazol	51	3	39	9	44	4	10
Dodine	n.d.		n.d.		n.d.		n.a.c
Emamectina B1a	6	19	3	30	4	43	10
EPN	51	11	59	2	61	8	10
Epoxiconazol	105	6	79	13	80	11	10
Espinosina A	60	4	53	9	64	16	10
Espinosina D	54	3	52	5	59	7	10

(continuação)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	
Espirodiclofeno	26	6	46	13	37	8	10
Espiromesifeno	44	9	71	17	53	10	10
Espirotetramato	110	12	82	15	94	11	10
Espiroxamina	73	17	72	10	83	8	10
Etiona	49	5	62	6	47	4	10
Etimol	11	7	8	10	10	8	10
Etoprofos	74	9	74	15	68	16	10
Fembuconazol	91	8	81	11	87	7	10
Fempirazamina	104	7	78	13	95	11	10
Fempropimorfe	82	3	90	5	81	9	10
Fenamidona	86	5	76	20	79	1	10
Fenamifós	86	3	86	5	83	8	10
Fenamifós sulfona	112	6	89	7	95	3	10
Fenamifós sulfóxido	10	5	8	9	10	4	10
Fenarimol	55	14	43	5	50	12	10
Fenazaquim	9	19	14	21	11	17	10
Fenexamida	68	3	60	9	58	7	10
Fenoxicarbe	90	2	79	8	70	6	10
Fenpiroximato	22	4	41	6	32	9	10
Fentiona	79	6	60	10	79	10	10
Fentiona sulfóxido	125	12	94	16	102	14	10
Fentoato	102	9	93	10	81	12	10
Fipronil	135	16	95	18	110	11	10
Fluazifope	113	9	109	5	88	8	10
Flubendiamida	107	6	105	4	115	9	10
Fludioxonil	97	7	90	7	92	8	10
Flufenaceto	102	8	92	9	87	7	10
Flufenoxurom	29	20	61	10	39	14	10
Fluopiram	114	2	103	9	101	8	10
Fluquinconazol	76	5	65	5	67	8	10
Flusilazol	87	6	78	2	76	9	10
Flutriafol	66	13	51	4	59	4	10
Formetanato	73	19	49	10	48	14	10
Fosalona	90	6	74	5	88	3	10
Fosmete	95	7	90	2	115	2	10
Fostiazato	118	4	97	7	99	6	10
Foxim	81	8	69	6	80	4	10
Haloxifope	119	9	89	8	85	7	10
Hexaconazol	36	6	26	4	37	9	10
Hexitiazoxi	23	6	30	6	25	8	10
Imazalil	55	7	45	8	49	4	10
Imidacloprido	119	5	110	4	104	6	10
Indoxacarbe	93	9	91	10	105	10	10
Ioxonil	68	10	51	11	54	15	10
Iprovalicarbe	93	7	75	9	81	8	10
Isofenfós metílico	98	6	82	2	84	7	10
Isoprocarbe	106	15	94	17	91	11	10
Isoxaflutol	116	12	91	10	111	8	10
Linurom	115	4	68	4	68	6	10
Lufenurom	49	12	78	4	53	7	10
Malationa	119	9	120	6	107	9	10
Mandipropamida	109	6	95	13	105	8	10
MCPA	20	8	49	7	15	9	10

(continuação)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	
Mepanipirim	47	3	47	2	54	6	10
Meptildinocape	13	28	22	22	15	22	n.a.c
Metalaxil	103	7	86	4	95	8	10
Metamidofós	43	15	31	19	37	14	10
Metconazol	40	13	41	10	42	14	10
Metidationa	122	8	102	7	74	3	10
Metiocarbe	86	8	70	6	83	7	10
Metiocarbe sulfóxido	133	12	104	5	108	6	10
Metobromurom	91	8	84	7	74	2	10
Metomil	117	10	109	10	108	11	10
Metoxifenoazida	120	6	97	8	94	7	10
Miclobutanil	88	2	92	1	88	4	10
Monocrotofós	101	4	74	9	86	3	10
Nitempiram	46	6	28	4	35	18	10
Ometoato	47	5	40	9	42	7	10
Oxadixil	125	9	114	2	107	8	10
Oxamil	118	11	91	12	104	5	10
Paclobutrazol	77	12	64	9	64	8	10
Paraoxom metílico	155	9	101	5	115	6	10
Pencicuron	56	15	56	18	59	12	10
Penconazol	56	7	55	7	50	6	10
Pendimetalina	30	10	37	10	34	16	10
Pimetrozina	n.d.		n.d.		n.d.		n.a.c
Piraclostrobina	86	5	70	4	74	6	10
Piretrina	36	8	55	7	42	9	10
Piridabem	13	15	29	11	17	14	10
Piridato	6	39	14	24	5	22	n.a.c
Pirimetanil	42	9	40	10	40	6	10
Pirimicarbe	94	5	86	9	83	7	10
Pirimicarbe desmetílico	38	6	27	5	39	3	10
Pirimifós metílico	67	8	63	2	61	6	10
Piriproxifem	28	10	34	13	32	9	10
Procloráz	45	9	34	4	46	7	10
Profenofós	47	10	43	5	42	3	10
Propamocarbe	6	17	4	18	4	14	10
Propaquizafope	60	15	56	11	60	13	10
Propargito	40	23	66	20	52	18	10
Propiconazol	69	11	63	7	55	4	10
Propizamida	80	15	79	12	74	13	10
Propoxur	122	20	111	9	109	9	10
Proquinazida	11	10	14	8	12	8	10
Protioconazol	52	43	15	56	31	28	n.a.c
Protiofós	14	9	19	12	12	9	10
Quinoclamina	95	12	77	18	82	12	10
Quinoxifen	16	6	18	9	19	4	10
Quizalofope etílico	52	8	55	5	57	7	10
Rotenona	76	5	77	7	81	13	10
Tebuconazol	45	10	34	14	47	16	10
Tebufempirado	42	6	40	6	40	10	10
Tebufenozida	90	9	95	9	89	15	10
Teflubenzurom	71	4	74	3	65	3	10
Terbutilazina	62	7	53	9	57	15	10
Tetraconazol	97	5	90	4	92	8	10

(conclusão)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	
Tiabendazol	37	8	31	7	33	13	10
Tiacloprido	129	6	108	2	114	3	10
Tiametoxam	120	4	106	7	105	9	10
Tiobencarbe	46	9	43	10	47	18	10
Tiodicarbe	129	15	104	5	105	5	10
Tolclofós metílico	44	12	77	18	53	11	10
Triadimenol	66	8	53	7	62	8	10
Triazofós	115	13	102	10	88	10	10
Triclorfom	114	17	89	11	95	15	10
Trifloxistrobina	84	5	94	2	86	9	10
Triflumuron	76	4	64	13	77	10	10
Triticonazol	44	12	37	9	48	14	10
Zoxamida	82	9	69	9	72	7	10

n.a.c.: não atendeu os critérios para quantificação.

Tabela 4 – Limite de quantificação, percentual de recuperação e desvio padrão relativo (n=5) dos agrotóxicos fortificados a 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras “branco” de óleo de girassol.

(continua)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	
2,4-D	12	12	17	11	17	16	10
Acefato	61	35	52	12	72	6	20
Acetamiprido	103	4	104	10	102	5	10
Aldicarbe	105	5	90	6	96	10	10
Aldicarbe sulfona	113	9	117	12	111	9	10
Aldicarbe sulfóxido	81	7	81	8	68	10	10
Azinfós metílico	117	14	118	10	118	8	10
Azoxistrobina	198	7	175	9	152	7	10
Bifenazato	95	11	103	12	112	14	10
Bitertanol	59	9	61	10	64	8	10
Boscalida	79	5	62	7	80	5	10
Bromuconazol	56	8	55	12	54	9	10
Bupirinato	64	9	57	12	63	8	10
Buprofezina	51	15	42	10	46	3	10
Carbaril	98	12	87	9	90	6	10
Carbendazim	33	13	37	6	31	8	10
Ciazofamida	83	3	86	4	83	3	10
Cimoxanil	121	10	115	6	116	7	10
Ciproconazol	55	9	49	10	52	9	10
Ciprodinil	22	14	23	8	21	6	10
Ciromazina	n.d.		n.d.		n.d.		n.a.c
Clofentezina	32	10	38	8	37	3	10
Clomazona	90	5	79	10	78	6	10
Clorantraniliprol	98	7	99	5	92	5	10
Clorfenvinfós	94	9	88	15	82	4	10
Clorpirifós	25	16	24	7	19	6	10
Clorpirifós metílico	56	15	47	9	38	6	10
Coumafós	67	7	68	6	69	8	10
Cresoxim metílico	92	4	101	9	98	8	10
Demeton-S-metil sulfona	125	5	120	16	107	10	10
Demeton-S-metil sulfóxido	18	16	17	18	20	19	10
Diazinona	59	7	55	10	55	8	10
Diclorvós	106	9	94	7	92	3	10
Dicrotofós	93	10	81	12	86	5	10
Dietofencarbe	148	8	147	9	135	7	10
Difenoconazol	44	7	47	4	43	6	10
Diflubenzuron	55	12	64	9	55	8	10
Dimetoato	117	9	111	9	112	4	10
Dimetomorfe	102	7	97	8	99	6	10
Diniconazol	48	6	40	6	45	9	10
Dodine	1	38	1	80	0	52	n.a.c
Emamectina B1a	5	14	4	16	6	20	10
EPN	27	20	24	11	29	9	10
Epoxiconazol	91	3	81	7	73	7	10
Espinosina A	30	14	27	26	45	10	10
Espinosina D	31	16	30	24	38	12	10

(continuação)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	
Espirodiclofeno	16	8	18	7	14	9	10
Espiromesifeno	25	15	26	12	22	9	10
Espirotetramato	123	8	116	10	117	4	10
Espiroxamina	51	12	49	6	65	10	10
Etiona	28	9	33	3	24	6	10
Etirimol	8	10	7	8	9	12	10
Etoprofós	74	3	79	6	81	5	10
Fembuconazol	85	7	86	3	81	5	10
Fempirazamina	111	9	89	7	84	3	10
Fempropimorfe	50	9	48	10	58	8	10
Fenamidona	95	6	88	4	81	6	10
Fenamifós	88	8	100	3	101	2	10
Fenamifós sulfona	119	9	105	6	111	8	10
Fenamifós sulfóxido	14	12	14	11	19	16	10
Fenarimol	55	10	43	5	47	4	10
Fenazaquim	6	17	7	10	6	8	10
Fenexamida	70	7	57	6	62	9	10
Fenoxicarbe	62	6	75	3	64	4	10
Fenpiroximato	11	8	14	7	12	6	10
Fentiona	58	7	59	9	58	5	10
Fentiona sulfóxido	122	8	114	6	113	8	10
Fentoato	84	14	91	9	78	7	10
Fipronil	200	29	180	18	177	15	20
Fluazifope	106	5	105	8	98	4	10
Flubendiamida	89	4	98	4	91	7	10
Fludioxonil	88	3	93	6	87	8	10
Flufenaceto	97	8	102	7	99	5	10
Flufenoxurom	15	17	16	8	12	9	10
Fluopiram	114	6	121	7	116	5	10
Fluquinconazol	77	8	67	6	68	9	10
Flusilazol	66	9	67	8	67	3	10
Flutriafol	76	6	66	2	75	4	10
Formetanato	44	12	34	9	49	10	10
Fosalona	72	12	73	7	67	14	10
Fosmete	142	21	132	18	162	20	20
Fostiazato	139	9	120	7	122	5	10
Foxim	60	9	67	12	54	4	10
Haloxifope	91	6	79	5	89	8	10
Hexaconazol	41	4	39	5	38	7	10
Hexitiazoxi	11	7	13	9	11	8	10
Imazalil	29	10	27	5	38	9	10
Imidacloprido	114	9	112	7	112	3	10
Indoxacarbe	68	7	68	4	64	2	10
Ioxonil	68	9	58	8	57	6	10
lprovalicarbe	102	8	86	7	94	6	10
Isofenfós metílico	94	7	86	6	86	3	10
Isoprocarbe	82	4	88	9	88	7	10
Isoxaflutol	112	3	100	8	93	4	10
Linurom	101	5	75	6	81	7	10
Lufenurom	21	28	22	9	19	5	20
Malationa	149	18	159	15	134	4	50
Mandipropamida	209	26	198	20	158	21	n.a.c
MCPA	19	16	22	21	21	19	10

(continuação)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	
Mepanipirim	31	16	29	10	28	6	10
Meptildinocape	6	30	7	19	7	22	20
Metalaxil	119	9	103	4	106	8	10
Metamidofós	45	12	48	10	44	14	10
Metconazol	37	9	38	3	41	7	10
Metidationa	100	19	118	8	114	3	10
Metiocarbe	92	7	85	3	84	5	10
Metiocarbe sulfóxido	135	21	115	8	107	6	20
Metobromurom	90	7	88	3	79	10	10
Metomil	112	7	103	4	105	5	10
Metoxifenoazida	106	8	119	14	119	3	10
Miclobutanil	84	11	87	3	80	4	10
Monocrotofós	100	19	95	8	89	3	10
Nitempiram	31	9	32	15	35	17	10
Omatoato	46	13	56	10	52	9	10
Oxadixil	141	14	119	5	118	9	10
Oxamil	120	9	119	13	109	10	10
Paclobutrazol	81	8	73	7	73	9	10
Paraoxom metílico	102	9	96	7	107	5	10
Pencicuron	36	12	44	15	39	11	10
Penconazol	49	13	55	10	44	7	10
Pendimetalina	20	15	23	10	18	9	10
Pimetrozina	n.d.		n.d.		n.d.		n.a.c
Piraclostrobina	72	6	69	7	71	5	10
Piretrina	22	25	29	8	23	12	20
Piridabem	40	26	43	8	44	18	20
Piridato	2	40	3	21	2	12	50
Pirimetanil	30	6	30	9	30	7	10
Pirimicarbe	84	5	79	9	80	13	10
Pirimicarbe desmetílico	48	13	42	5	45	2	10
Pirimifós metílico	62	10	54	12	56	14	10
Piriproxifem	34	14	36	4	34	6	10
Procloráz	46	7	41	5	48	3	10
Profenofós	37	8	42	3	32	9	10
Propamocarbe	3	30	3	41	4	36	n.a.c
Propaquizafope	45	7	46	9	41	10	10
Propargito	20	20	34	9	23	12	10
Propiconazol	54	12	59	7	53	3	10
Propizamida	65	3	74	10	67	8	10
Propoxur	102	2	95	8	93	6	10
Proquinazida	6	20	8	23	7	15	50
Protioconazol	52	47	55	40	49	25	n.a.c
Protiofós	7	28	8	30	6	27	n.a.c
Quinoclamina	91	14	69	19	65	8	10
Quinoxifen	9	18	11	4	9	9	10
Quizalofope etílico	44	9	49	5	45	2	10
Rotenona	85	7	91	11	81	3	10
Tebuconazol	47	5	49	7	50	4	10
Tebufempirado	29	10	30	6	26	9	10
Tebufenozida	92	8	96	6	97	3	10
Teflubenzurom	36	8	47	10	39	6	10
Terbutilazina	45	8	42	7	40	10	10
Tetraconazol	79	7	84	9	84	3	10

(conclusão)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	
Tiabendazol	32	8	32	10	38	7	10
Tiacloprido	115	5	110	6	111	4	10
Tiametoxam	112	9	123	7	111	6	10
Tiobencarbe	38	7	37	12	35	9	10
Tiodicarbe	129	15	118	9	116	6	10
Tolclofós metílico	58	12	60	14	54	10	10
Triadimenol	74	8	63	4	67	2	10
Triazofós	118	13	120	6	115	4	10
Triclorfom	110	11	102	9	98	8	10
Trifloxistrobina	37	8	41	7	37	5	10
Triflumuron	47	10	44	9	44	6	10
Triticonazol	45	7	46	8	54	10	10
Zoxamida	72	8	75	3	69	4	10

n.a.c.: não atendeu os critérios para quantificação.

4.3.2 Curva analítica e linearidade

O estudo da linearidade das curvas analíticas foi realizado empregando-se a técnica de PSC. Para isso, as curvas analíticas foram preparadas através da fortificação da matriz “branco” dos óleos em estudo (n=5) com diferentes volumes da solução mistura para que se obtivessem concentrações de 10, 20, 50, 100 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Após fortificação, essas porções foram submetidas ao procedimento de extração como descrito na Figura 6 e analisadas por UHPLC-TQ-MS/MS. A Tabela 5 apresenta os dados de linearidade em termos de coeficiente de determinação para todos os óleos estudados. Como pode ser observado na Tabela 5, 10 agrotóxicos apresentaram r^2 menor do que 0,99, porém maiores do que 0,98 para azeite de oliva. Já para óleo de soja, oito agrotóxicos apresentaram r^2 menor do que 0,99. Nos resultados das curvas analíticas para óleo de girassol, observa-se que oito agrotóxicos apresentaram r^2 menor do que 0,99. Na análise dos resíduos (indicativo de linearidade) os valores determinados foram menores do que 20% para todos os agrotóxicos nas três matrizes estudadas.

Para todos os agrotóxicos em todas as matrizes, a faixa linear dinâmica ficou definida entre 10 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$, ou seja, todo o intervalo estudado.

Tabela 5 – Coeficiente de determinação (r^2) para as curvas analíticas preparadas via PSC para azeite de oliva, soja e girassol na faixa de 10 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Agrotóxico	Coeficiente de determinação (r^2)		
	Azeite de oliva	Óleo de soja	Óleo de girassol
	2,4-D	0,9988	0,9968
Acefato	0,9977	0,9990	0,9978
Acetamiprido	0,9982	0,9997	0,9978
Aldicarbe	0,9995	0,9960	0,9938
Aldicarbe sulfona	0,9878	0,9954	0,9923
Aldicarbe sulfóxido	0,9932	0,9916	0,9955
Azinfós metílico	0,9994	0,9992	0,9939
Azoxistrobina	0,9952	0,9999	0,9992
Bifenazato	0,9936	0,9987	0,9965
Bitertanol	0,9983	0,9996	1,0000
Boscalida	0,9994	0,9998	0,9977
Bromuconazol	0,9998	0,9999	0,9994
Bupirimato	0,9997	0,9999	1,0000
Buprofezina	0,9990	0,9985	0,9990
Carbaril	0,9998	0,9996	0,9976

(continua)

(continuação)

Agrotóxico	Coeficiente de determinação (r ²)		
	Azeite de oliva	Óleo de soja	Óleo de girassol
Carbendazim	0,9983	0,9984	0,9988
Ciazofamida	0,9989	0,9988	0,9994
Cimoxanil	0,9993	0,9999	0,9999
Ciproconazol	0,9997	0,9995	0,9988
Ciprodinil	0,9997	0,9999	0,9995
Ciromazina	0,9940	0,9969	0,9766
Clofentezina	0,9966	0,9991	0,9998
Clomazona	0,9999	0,9999	0,9986
Clorantraniliprol	0,9992	0,9995	0,9987
Clorfenvinfós	0,9994	0,9996	0,9994
Clorpirifós	0,9989	0,9995	0,9986
Clorpirifós metílico	0,9969	0,9999	0,9990
Coumafós	0,9982	0,9991	1,0000
Cresoxim metílico	0,9984	0,9997	0,9978
Demeton-S-metil sulfona	0,9981	0,9999	0,9993
Demeton-S-metil sulfóxido	0,9946	0,9982	0,9876
Diazinona	0,9998	0,9996	0,9998
Diclorvós	0,9985	0,9999	0,9993
Dicrotofós	0,9999	0,9997	0,9999
Dietofencarbe	0,9968	1,0000	0,9993
Difenoconazol	0,9995	1,0000	0,9996
Diflubenzuron	0,9984	0,9996	0,9997
Dimetoato	0,9984	0,9992	0,9963
Dimetomorfe	0,9995	0,9999	0,9994
Diniconazol	0,9993	0,9995	0,9984
Dodine	0,9831	0,8877	0,9709
Emamectina B1a	0,9943	0,9953	0,9774
EPN	0,9924	0,9999	0,9964
Epoxiconazol	0,9993	0,9999	1,0000
Espinosina A	0,9982	0,9962	0,9918
Espinosina D	0,9983	0,9961	0,9921
Espirodiclofeno	0,9924	0,9952	0,9972
Espiromesifeno	0,9946	0,9969	0,9990
Espirotetramato	0,9994	0,9997	0,9995
Espiroxamina	0,9993	0,9981	0,9965
Etiona	0,9962	0,9982	0,9994
Etirimol	0,9975	0,9997	0,9788
Etoprofós	0,9996	0,9999	0,9977
Fembuconazol	0,9963	0,9996	0,9998
Fempirazamina	0,9984	0,9962	0,9982
Fempropimorfe	0,9983	0,9977	0,9976
Fenamidona	0,9995	0,9998	0,9996
Fenamifós	0,9990	0,9992	0,9997
Fenamifós sulfona	0,9998	0,9999	0,9998
Fenamifós sulfóxido	0,9931	0,9942	0,9844
Fenarimol	0,9980	0,9999	1,0000
Fenazaquim	0,9981	0,9988	0,9976
Fenexamida	0,9993	0,9999	0,9996
Fenoxicarbe	0,9901	0,9999	0,9977
Fenpiroximato	0,9960	0,9980	0,9980
Fentiona	0,9908	0,9979	0,9994
Fentiona sulfóxido	0,9997	1,0000	0,9996

(continuação)

Agrotóxico	Coeficiente de determinação (r ²)		
	Azeite de oliva	Óleo de soja	Óleo de girassol
Fentoato	0,9993	0,9998	0,9995
Fipronil	0,9961	0,9987	0,9900
Fluazifope	0,9994	0,9997	0,9999
Flubendiamida	0,9956	0,9956	0,9990
Fludioxonil	0,9952	0,9963	0,9972
Flufenaceto	0,9985	1,0000	0,9990
Flufenoxurom	0,9921	0,9869	0,9982
Fluopiram	0,9961	0,9990	0,9986
Fluquinconazol	0,9998	0,9999	0,9999
Flusilazol	0,9993	1,0000	0,9998
Flutriafol	0,9994	0,9997	0,9988
Formetanato	0,9992	0,9995	0,9952
Fosalona	0,9973	0,9996	0,9994
Fosmete	0,9862	0,9995	0,9956
Fostiazato	0,9976	0,9995	0,9946
Foxim	0,9939	1,0000	0,9998
Haloxifope	0,9987	0,9998	0,9998
Hexaconazol	0,9970	0,9998	0,9961
Hexitiazoxi	0,9986	0,9991	0,9985
Imazalil	0,9995	0,9956	0,9922
Imidacloprido	0,9998	1,0000	0,9990
Indoxacarbe	0,9993	1,0000	0,9997
Ioxonil	0,9989	0,9989	0,9979
Iprovalicarbe	0,9993	0,9996	0,9991
Isofenfós metílico	0,9988	0,9992	0,9997
Isoprocarbe	0,9999	0,9998	0,9976
Isoxaflutol	0,9966	0,9988	0,9991
Linurom	0,9992	0,9999	0,9979
Lufenurom	0,9883	0,9879	0,9997
Malationa	0,9980	0,9992	0,9966
Mandipropamida	0,9988	0,9999	0,9994
MCPA	0,9974	0,9911	0,9985
Mepanipirim	0,9992	0,9996	0,9996
Meptildinocape	0,9912	0,9697	0,9956
Metalaxil	0,9991	0,9995	0,9988
Metamidofós	0,9989	0,9985	0,9997
Metconazol	0,9973	0,9999	0,9980
Metidationa	0,9993	1,0000	0,9979
Metiocarbe	0,9990	0,9999	0,9985
Metiocarbe sulfóxido	0,9996	0,9999	0,9999
Metobromurom	0,9989	1,0000	0,9986
Metomil	0,9955	0,9957	0,9908
Metoxifenzida	0,9993	0,9997	0,9976
Miclobutanil	0,9989	0,9999	0,9995
Monocrotofós	0,9976	0,9993	0,9999
Nitempiram	0,9995	0,9978	0,9943
Ometoato	0,9985	0,9980	0,9996
Oxadixil	0,9981	0,9999	0,9990
Oxamil	0,9912	0,9954	0,9963
Paclobutrazol	0,9996	0,9998	1,0000
Paraoxom metílico	0,9988	0,9999	0,9989
Pencicuron	0,9987	0,9998	0,9999

(conclusão)

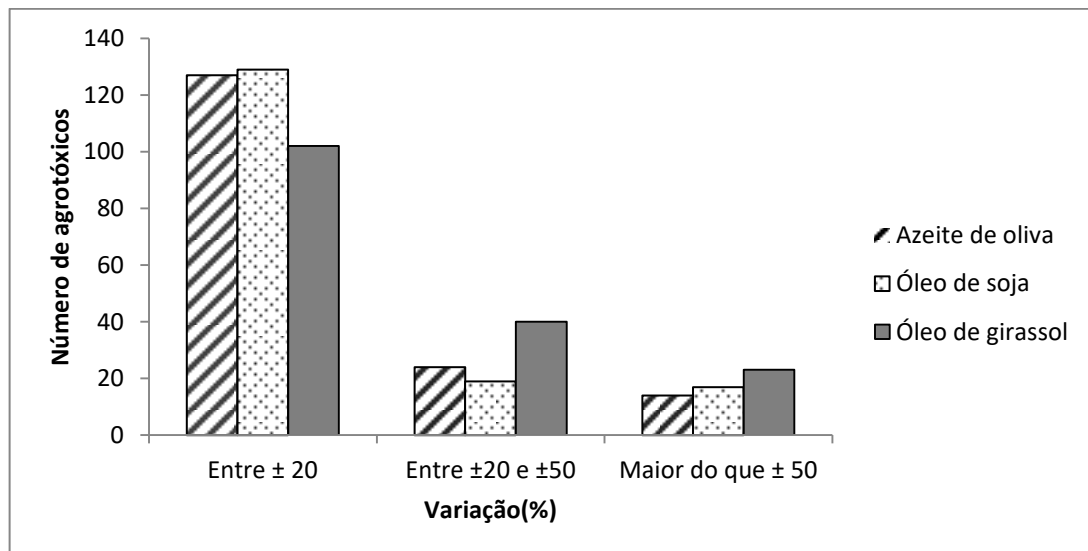
Agrotóxico	Coeficiente de determinação (r ²)		
	Azeite de oliva	Óleo de soja	Óleo de girassol
Penconazol	0,9860	0,9999	0,9998
Pendimetalina	0,9973	0,9985	0,9991
Pimetrozina	0,9816	0,9895	0,9733
Piraclostrobina	0,9951	0,9996	0,9991
Piretrina	0,9895	0,9984	0,9981
Piridabem	0,9866	0,9888	0,9978
Piridato	0,9776	0,9611	0,9977
Pirimetanil	0,9996	1,0000	1,0000
Pirimicarbe	0,9998	1,0000	0,9998
Pirimicarbe desmetílico	0,9997	0,9994	0,9939
Pirimifós metílico	0,9993	1,0000	0,9988
Piriproxifem	0,9986	0,9994	0,9990
Procloráz	0,9998	0,9999	0,9977
Profenofós	0,9994	0,9998	0,9995
Propamocarbe	0,9956	0,9970	0,9780
Propaquizafope	0,9993	0,9997	0,9996
Propargito	0,9969	0,9972	0,9980
Propiconazol	0,9988	0,9999	0,9999
Propizamida	0,9992	0,9998	1,0000
Propoxur	0,9996	0,9990	0,9974
Proquinazida	0,9989	0,9996	0,9987
Protioconazol	0,9842	0,9948	0,9994
Protiofós	0,9843	0,9715	0,9992
Quinoclamina	0,9969	0,9994	0,9977
Quinoxifen	0,9997	0,9998	0,9992
Quizalofope etílico	0,9986	0,9999	0,9998
Rotenona	0,9981	0,9995	0,9998
Tebuconazol	0,9995	0,9993	0,9984
Tebufempirado	0,9987	0,9997	0,9992
Tebufenozida	0,9996	0,9999	0,9974
Teflubenzurom	0,9971	0,9989	0,9996
Terbutilazina	0,9993	0,9999	0,9999
Tetraconazol	0,9996	0,9997	1,0000
Tiabendazol	0,9997	0,9997	0,9975
Tiacloprido	0,9999	0,9998	0,9985
Tiametoxam	0,9991	0,9998	0,9978
Tiobencarbe	0,9994	0,9997	0,9996
Tiodicarbe	0,9983	1,0000	0,9995
Tolclofós metílico	0,9955	0,9998	0,9978
Triadimenol	0,9999	0,9999	0,9994
Triazofós	0,9991	1,0000	0,9949
Triclorfom	0,9999	0,9999	1,0000
Trifloxistrobina	0,9970	0,9993	0,9999
Triflumuron	0,9993	0,9995	0,9999
Triticonazol	0,9994	0,9993	0,9979
Zoxamida	0,9987	0,9995	1,0000

4.3.3 Avaliação da sensibilidade das curvas analíticas (“efeito matriz”)

A sensibilidade das curvas analíticas foi avaliada nesse estudo através da comparação da inclinação das curvas analíticas preparadas empregando PSC em amostras dos três óleos comestíveis a fim de avaliar as similaridades entre as curvas analíticas e possibilidade de uso de amostra branco de um único tipo de óleo para quantificar agrotóxicos em amostras de qualquer óleo.

Como pode ser observado na figura 8, para azeite de oliva e soja, o número de agrotóxicos que apresentaram diferenças entre $\pm 20\%$ foi de aproximadamente 130, já para o óleo de girassol esse número foi de 102. Já o número de agrotóxicos que apresentaram efeito matriz entre ± 20 e $\pm 50\%$ foi de aproximadamente 20 para azeite de oliva e óleo de soja e de 40 para o óleo de girassol. O número de agrotóxicos com efeito matriz maior do que $\pm 50\%$ foram de 14, 17 e 23 para os óleos de oliva, soja e girassol, respectivamente.

Figura 8 – Percentual de variação da inclinação das curvas analíticas preparadas via PSC para azeite de oliva e óleos de soja e girassol.



Como pode ser observado através da análise da Figura 8, o comportamento do efeito matriz nos diferentes tipos de óleo é bastante similar, o que leva a concluir que a curva analítica pode ser preparada empregando-se qualquer um dos três óleos estudados nesse trabalho. Essa abordagem foi empregada na aplicação do

método desenvolvido e validado para análise de amostras de óleos, onde uma curva analítica foi preparada em azeite de oliva empregando a técnica de PSC na faixa de 10 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e foi utilizada na quantificação dos agrotóxicos tanto nas amostras de azeite de oliva quanto nas amostras de óleo de soja e girassol. Na Tabela 6 é possível observar as inclinações das curvas analíticas obtidas para os três tipos de óleos comparadas com a inclinação de uma curva analítica preparada via PSC para uma segunda amostra “branco” de azeite de oliva considerada como referência. Como é possível observar na tabela, para 89 agrotóxicos a diferença nas inclinações das curvas analíticas foram inferiores a 20% para os três óleos quando comparadas com a inclinação da curva analítica obtida para o azeite de oliva empregado como referência. Para os demais agrotóxicos observa-se, ainda, duas situações distintas.

A primeira são aqueles agrotóxicos que apresentaram grandes diferenças nas inclinações quando comparadas com o azeite de oliva empregado como referência, porém essa diferença é bastante similar entre os diferentes óleos, é o caso dos agrotóxicos Isoprocarbe, Tiacloprido e Tiodicarbe.

A segunda situação é daqueles agrotóxicos que apresentaram grande diferença na inclinação quando comparadas com o azeite de oliva referência além de grande diferença entre si, como é o caso dos agrotóxicos 2,4-D, Bifenazato, Ciromazina, Protiocanazol, entre outros. Para esses agrotóxicos, caso fossem detectados em amostras reais, a quantificação deveria ser feita empregando a técnica de PSC na matriz específica do óleo avaliado, já que o comportamento das inclinações varia dependendo do tipo de óleo.

Tabela 6 – Inclinações (*slopes*) das curvas analíticas preparadas através da técnica de PSC para os diferentes tipos de óleos estudados comparadas com uma curva analítica referência preparada em azeite de oliva.

Agrotóxico	Inclinação (<i>slope</i>)				Diferença (%)		
	Azeite de oliva (Ref)	Azeite de oliva	Óleo de soja	Óleo de girassol	Oliva	Soja	Girassol
2,4-D	10,8	15,6	9,9	11,4	45	-8	6
Acefato	727,3	789,0	776,6	817,4	8	7	12
Acetamiprido	2327,6	2277,4	2244,5	2129,2	-2	-4	-9
Aldicarbe	280,6	810,0	983,0	943,6	189	250	236
Aldicarbe sulfona	130,9	139,8	140,4	147,5	7	7	13
Aldicarbe sulfóxido	301,9	353,4	315,7	335,9	17	5	11
Azinfós metílico	113,0	131,2	129,0	150,7	16	14	33
Azoxistrobina	5784,4	6183,6	6517,8	9673,9	7	13	15
Bifenazato	1689,6	2008,3	2590,1	3071,4	19	53	82
Bitertanol	410,7	368,6	400,9	396,7	-10	-2	-3
Boscalida	461,9	474,3	473,4	497,6	3	2	8
Bromuconazol	453,9	469,0	456,0	482,6	3	0	6
Bupirimato	2446,0	2515,8	2705,4	2660,2	3	11	9
Buprofezina	7804,5	8631,8	7806,7	7816,6	11	0	0
Carbaril	245,2	429,1	487,4	470,5	75	99	92
Carbendazim	6618,7	4262,9	5591,7	5849,5	-20	-16	-12
Ciazofamida	400,8	464,3	383,6	399,4	16	-4	0
Cimoxanil	76,4	87,2	99,6	98,1	14	30	28
Ciproconazol	2771,5	2720,4	2927,8	3081,6	-2	6	11
Ciprodinil	1209,0	1302,7	1566,8	1129,9	8	30	-7
Ciromazina	86,5	41,9	17,2	108,5	-52	-80	25
Clofentezina	111,0	119,8	99,8	101,3	8	-10	-9
Clomazona	2219,8	2483,6	2599,6	2613,9	12	17	18
Clorantniliprol	433,7	486,5	467,3	531,5	12	8	23
Clorfenvinfós	726,0	766,2	756,9	812,8	6	4	12
Clorpirifós	47,8	56,9	48,0	40,8	19	0	-15
Clorpirifós metílico	24,3	28,7	24,6	24,4	18	1	1
Coumafós	281,5	296,0	269,8	262,0	5	-4	-7
Cresoxim metílico	272,7	319,6	306,3	323,3	17	12	19
Demeton-S-metil sulfona	1663,9	1596,4	1946,8	1939,1	-4	17	17
Demeton-S-metil sulfóxido	1544,3	1175,2	1249,3	1902,7	-24	-19	23
Diazinona	8574,6	9094,1	7841,4	8763,5	6	-9	2
Diclorvós	242,1	284,4	263,9	276,7	17	9	14
Dicrotofós	4392,9	4729,0	4889,2	5076,3	8	11	16
Dietofencarbe	1319,2	1494,8	1427,3	2098,8	13	8	59
Difenoconazol	1616,0	1703,7	1633,9	1387,5	5	1	-14
Diflubenzuron	92,5	132,4	99,9	118,3	43	8	28
Dimetoato	2509,8	2696,8	2928,6	2887,5	7	17	15
Dimetomorfe	1340,6	1444,0	1467,3	1695,0	8	9	26
Diniconazol	1929,8	1763,0	1919,0	1854,2	-9	-1	-4
Dodine	26,3	2,5	1,4	8,6	-90	-95	-67
Emamectina B1a	579,6	234,8	144,8	659,6	-59	-75	14
EPN	9,0	11,3	11,5	7,6	25	28	-16
Epoxiconazol	2309,0	2376,6	2434,9	2489,2	3	5	8
Espinosina A	1981,1	1766,8	1283,8	2311,0	-11	-35	17
Espinosina D	255,1	220,5	155,1	273,1	-14	-39	7

(continua)

(continuação)

Agrotóxico	Inclinação (<i>slope</i>)				Diferença (%)		
	Azeite de oliva (Ref)	Azeite de oliva	Óleo de soja	Óleo de girassol	Oliva	Soja	Girassol
Espiroadiclofeno	72,4	81,3	69,7	34,2	12	-4	-53
Espiromesifeno	102,8	111,3	116,4	62,6	8	13	-39
Espirotetramato	1342,0	1109,3	1252,4	1664,7	-17	-7	24
Espiroxamina	13757,4	13360,6	11107,7	16240,3	-3	-19	18
Etiona	289,4	354,3	296,9	183,1	22	3	-37
Etirimol	1219,4	672,1	460,6	1426,4	-45	-62	17
Etoprofós	1643,0	1735,0	1771,8	1734,6	6	8	6
Fembuconazol	1300,6	1427,9	1422,7	1471,6	10	9	13
Fempirazamina	5631,7	6816,0	5947,7	6686,8	21	6	19
Fempropimorfe	7267,5	7772,5	6234,7	8543,1	7	-14	18
Fenamidona	3969,7	4241,7	3952,7	4419,2	7	0	11
Fenamifós	3070,2	3337,1	2958,9	3879,4	9	-4	26
Fenamifós sulfona	1407,4	1140,7	1166,4	1258,2	-19	-17	-11
Fenamifós sulfóxido	739,5	294,5	266,8	461,4	-60	-64	-38
Fenarimol	260,7	275,4	274,3	268,2	6	5	3
Fenazaquim	1042,9	1179,0	796,8	538,6	13	-24	-48
Fenexamida	366,3	366,9	357,6	369,4	0	-2	1
Fenoxicarbe	502,3	593,7	549,5	475,6	18	9	-5
Fenpiroximato	2024,3	2325,5	2268,2	950,5	15	12	-53
Fentiona	52,8	66,3	58,4	49,0	26	11	-7
Fentiona sulfóxido	1314,6	1913,9	1807,9	2096,6	46	38	59
Fentoato	125,1	155,4	118,2	125,5	24	-6	0
Fipronil	2794,8	2697,6	2544,7	3857,0	-3	-9	38
Fluazifope	541,8	691,1	657,7	709,3	28	21	31
Flubendiamida	893,5	894,7	867,8	855,7	0	-3	-4
Fludioxonil	99,2	110,1	103,6	101,8	11	4	3
Flufenaceto	1190,9	1292,0	1279,2	1379,6	8	7	16
Flufenoxurom	84,1	89,5	90,8	29,1	6	8	-65
Fluopiram	3022,3	3180,0	2953,6	3565,1	5	-2	18
Fluquinconazol	132,3	136,8	143,2	133,7	3	8	1
Flusilazol	1980,4	2061,0	2154,1	2085,1	4	9	5
Flutriafol	3145,5	3140,8	3322,6	3734,3	0	6	19
Formetanato	5082,2	4560,4	3117,6	5823,8	-10	-39	15
Fosalona	61,1	63,1	58,1	55,5	3	-5	-9
Fosmete	241,9	277,4	270,9	271,0	15	12	12
Fostiazato	4848,6	4845,3	5225,7	5741,5	0	8	18
Foxim	82,6	92,2	88,7	68,3	12	7	-17
Haloxifope	144,7	196,6	160,4	162,7	36	11	12
Hexaconazol	2241,6	2061,4	2043,7	2498,7	-8	-9	11
Hexitiazoxi	118,5	128,6	111,2	61,7	9	-6	-48
Imazalil	467,6	943,1	739,5	1389,2	102	58	197
Imidacloprido	442,3	476,4	483,4	518,7	8	9	17
Indoxacarbe	194,4	199,3	246,2	168,7	3	27	-13
Ixonil	1521,5	1419,1	1358,8	1452,7	-7	-11	-5
Iprovalicarbe	3918,2	4197,5	4489,4	4289,7	7	15	9
Isofenfós metílico	3179,5	3647,2	3461,1	3791,8	15	9	19
Isoprocarbe	299,2	678,6	716,8	687,0	127	140	130
Isoxaflutol	331,1	364,0	327,6	381,8	10	-1	15
Linurom	132,7	153,7	153,2	154,1	16	15	16
Lufenurom	190,3	191,0	168,3	80,0	0	-12	-58
Malationa	745,9	822,6	799,6	1008,6	10	7	35
Mandipropamida	952,0	1079,5	1086,8	1813,9	13	14	91
MCPA	20,2	27,5	16,8	19,9	36	-17	-2
Mepanipirim	39,6	38,7	46,0	35,3	-2	16	-11

(continuação)

Agrotóxico	Inclinação (slope)				Diferença (%)		
	Azeite de oliva (Ref)	Azeite de oliva	Óleo de soja	Óleo de girassol	Oliva	Soja	Girassol
Meptildinocape	1,7	1,6	1,5	0,6	-8	-10	-62
Metalaxil	2061,0	1915,7	2034,6	2156,4	-7	-1	5
Metamidofós	745,2	706,6	779,3	821,5	-5	5	10
Metconazol	3093,3	3071,7	2972,0	3169,8	-1	-4	2
Metidationa	72,6	76,3	82,3	96,6	5	13	33
Metiocarbe	305,8	327,8	370,7	371,7	7	21	22
Metiocarbe sulfóxido	4207,3	4602,9	4896,5	5308,8	9	16	26
Metobromurom	173,6	341,7	364,7	389,9	97	110	125
Metomil	318,8	391,1	395,9	380,1	23	24	19
Metoxifenzida	2251,0	2428,7	2559,8	2824,4	8	14	25
Miclobutanil	2330,6	2489,7	2565,3	2487,6	7	10	7
Monocrotofós	2163,2	2207,6	2206,4	2159,0	2	2	0
Nitempiram	1835,1	1529,5	1258,2	2227,5	-17	-31	21
Ometoato	1149,3	1166,7	1177,5	1320,2	2	2	15
Oxadixil	2639,0	2758,5	1917,6	2110,5	5	-27	-20
Oxamil	1424,2	1419,7	1468,5	1603,6	0	3	13
Paclbutrazol	3579,5	3836,3	3488,3	3747,7	7	-3	5
Paraoxom metílico	86,1	94,6	106,8	109,4	10	24	27
Pencicuron	4266,0	4779,8	4527,2	3677,8	12	6	-14
Penconazol	2451,8	2282,0	2386,1	2234,1	-7	-3	-9
Pendimetalina	113,5	137,5	126,0	76,5	21	11	-33
Pimetrozina	175,0	54,1	64,5	182,6	-69	-63	4
Piraclostrobina	2104,3	2365,2	2248,9	2251,3	12	7	7
Piretrina	37,6	41,6	43,6	27,6	11	16	-27
Piridabem	475,6	581,9	480,9	246,3	22	1	-48
Piridato	101,8	94,2	79,5	31,5	-8	-22	-69
Pirimetanil	617,0	680,8	846,7	697,9	10	37	13
Pirimicarbe	12041,5	13279,3	13627,5	14159,8	10	13	18
Pirimicarbe desmetílico	9369,9	7167,3	7897,9	10068,4	-24	-16	7
Pirimifós metílico	9050,1	9834,9	9291,1	8582,9	9	3	-5
Piriproxifem	2506,5	2880,3	2655,0	2385,1	15	6	-5
Procloráz	1341,5	1164,2	1155,1	1330,9	-13	-14	-1
Profenofós	209,1	236,7	201,9	197,2	13	-3	-6
Propamocarbe	1292,4	765,6	315,6	1686,0	-41	-76	30
Propaquizafope	604,8	672,4	627,0	500,7	11	4	-17
Propargito	34,7	43,8	39,0	20,4	26	13	-41
Propiconazol	1081,0	1080,8	1060,7	1090,7	0	-2	1
Propizamida	295,8	336,2	341,6	346,1	14	15	17
Propoxur	1143,4	1751,3	1941,8	1722,9	53	70	51
Proquinazida	443,4	503,0	445,9	310,7	13	1	-30
Protioconazol	5,8	25,9	88,0	90,1	346	1415	1452
Protiofós	3,3	4,2	3,0	1,3	28	-9	-60
Quinoclamina	58,1	108,1	127,2	116,7	86	119	101
Quinoxifen	502,8	552,9	520,4	305,1	10	3	-39
Quizalofope etílico	227,3	249,3	213,3	198,0	10	-6	-13
Rotenona	245,8	265,2	275,7	266,5	8	12	8
Tebuconazol	2117,8	2042,3	2241,3	2283,7	-4	6	8
Tebufempirado	379,2	405,4	377,5	294,5	7	0	-22
Tebufenozida	1900,2	1965,3	1994,4	2136,2	3	5	12
Teflubenzurom	370,5	355,5	313,1	252,0	-4	-16	-32
Terbutilazina	8501,4	8661,6	9641,6	7631,6	2	13	-10
Tetraconazol	2665,0	2724,3	2741,9	2774,9	2	3	4
Tiabendazol	4597,4	3793,4	4617,2	5338,7	-17	0	16

Agrotóxico	(conclusão)				Diferença (%)		
	Inclinação (<i>slope</i>)				Oliva	Soja	Girassol
	Azeite de oliva (Ref)	Azeite de oliva	Óleo de soja	Óleo de girassol			
Tiacloprido	1173,7	2524,5	2804,7	2719,1	115	139	132
Tiametoxam	621,1	645,3	681,3	695,3	4	10	12
Tiobencarbe	365,1	411,3	394,9	374,8	13	8	3
Tiodicarbe	1445,0	833,7	770,5	858,1	-42	-47	-41
Tolclofós metílico	24,2	29,4	25,3	20,3	22	5	-16
Triadimenol	1301,7	1204,4	1282,2	1447,8	-7	-1	11
Triazofós	7539,4	8296,8	7873,0	8586,5	10	4	14
Triclorfom	385,2	401,4	433,4	453,3	4	12	18
Trifloxistrobina	3973,1	4489,3	4081,1	2138,2	13	3	-46
Triflumuron	95,0	97,6	93,4	63,6	3	-2	-33
Triticonazol	2068,1	2013,1	2097,8	2385,7	-3	1	15
Zoxamida	681,6	744,9	703,1	774,7	9	3	14

É importante salientar que para o uso de calibração por *procedural standard calibration*, uma série de requisitos foram cumpridos: boa relação linear na faixa estudada ($r^2 \geq 0,99$) para a grande maioria dos agrotóxicos; quantificação precisa mesmo para os agrotóxicos com baixos percentuais de recuperação (RSD $\leq 20\%$, na grande maioria $\leq 10\%$); mesmo no caso de baixos percentuais de recuperação, amostras fortificadas a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (LOQm para a grande maioria dos analitos nas três matrizes) estavam dentro do intervalo linear e a relação sinal ruído da transição de quantificação (1ª transição da Tabela 1) foi maior ou igual a 10.

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE ÓLEOS COMESTÍVEIS

O método desenvolvido foi aplicado na análise de amostras adquiridas nas cidades de Almería e Múrcia, sudeste da Espanha. Foram coletadas nove amostras de azeite de oliva extra virgem, três amostras de óleo de soja e três amostras de óleo de girassol em supermercados da cidade de Almería. Além de amostras de supermercado, duas amostras de azeite de oliva, uma da cidade de Almería e uma da cidade de Múrcia, foram adquiridas de produtores locais que produzem azeite para seu próprio consumo.

A Tabela 7 exhibe os resultados das análises de amostras de azeite de oliva e óleo de soja e girassol comparando com os limites máximos de resíduo estabelecidos pela comunidade europeia. Como não há limites máximos estabelecidos para nenhum dos óleos estudados, os LMR dessa tabela são aqueles

definidos para azeitona e grãos de soja. Como nenhum agrotóxico foi determinado nas amostras de óleo de girassol, nenhum valor de LMR foi exibido.

Das nove amostras de azeite de oliva extra virgem coletadas em supermercados (amostras de 1 a 9), quatro não apresentaram contaminação por nenhum dos agrotóxicos estudados. Nas outras cinco amostras ao menos um agrotóxico foi encontrado, sendo que uma amostra apresentou contaminação por clorpirifós a $11 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os demais agrotóxicos determinados nessas amostras estavam abaixo do limite de quantificação do método ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$). É importante salientar que nessas cinco amostras, o agrotóxico dimetoato foi encontrado em todas, porém abaixo do LOQm.

Das amostras adquiridas de produtores locais, aquela da cidade de Almería (amostra 10) apresentou contaminação por clorpirifós metílico, além de diazinona, dimetoato e piriproxifeno. A amostra adquirida da cidade de Múrcia (amostra 11) apresentou contaminação por clorpirifós, fluopiram, fosmete, tetraconazol e tebuconazol. Conforme pode ser observado na tabela, apenas os agrotóxicos Fluopiram e Tetraconazol determinados na amostra 11 apresentaram concentrações acima do LMR estabelecido para azeitonas.

Das três amostras de óleo de soja, duas apresentaram contaminação por azoxistrobina, porém abaixo do LOQm. Já as amostras de óleo de girassol não apresentaram contaminação por nenhum dos agrotóxicos estudados.

Tabela 7 – Resultados das análises de amostras de óleos de oliva soja e girassol e comparação com os valores de limite máximo de resíduo estabelecidos na união europeia para azeitonas e soja.

Amostra	Tipo de óleo	Agrotóxico(s) encontrado(s)	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR ^{a,b} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	Oliva	Clorpirifós	11	50
		Dimetoato	<LOQ	2000
2	Oliva	Dimetoato	<LOQ	2000
3	Oliva	Dimetoato	<LOQ	2000
		Terbutilazina	<LOQ	50
4	Oliva	Dimetoato	<LOQ	2000
5	Oliva	nd		
6	Oliva	nd		
7	Oliva	Clorpirifós	<LOQ	50
8	Oliva	nd		
9	Oliva	nd		
10	Oliva	Clorpirifós metílico	25	50
		Diazinona	<LOQ	20
		Dimetoato	<LOQ	2000
		Piriproxifem	<LOQ	50
11	Oliva	Clorpirifós	23	50
		Fluopiram	22	10
		Fosmete	194	3000
		Tebuconazol	<LOQ	50
		Tetraconazol	32	20
12	Soja	nd		
13	Soja	Azoxistrobina	<LOQ	500
14	Soja	Azoxistrobina	<LOQ	500
15	Girassol	nd		
16	Girassol	nd		
17	Girassol	nd		

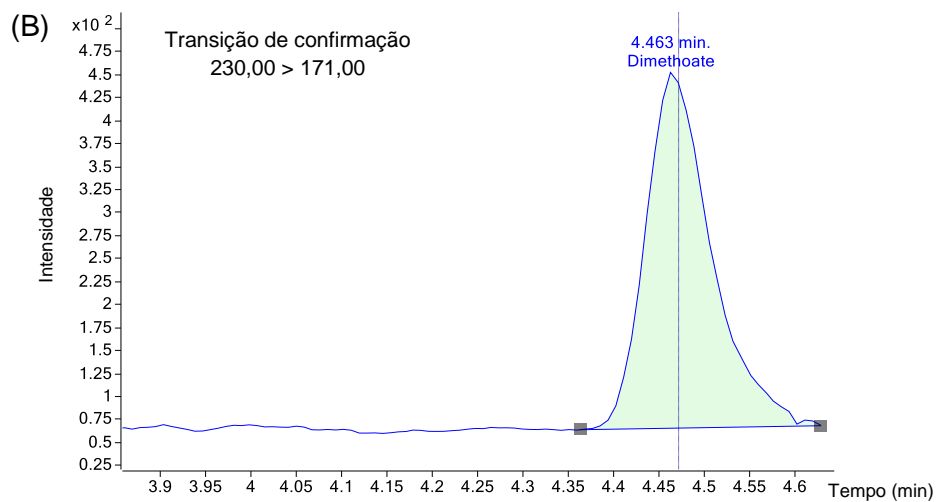
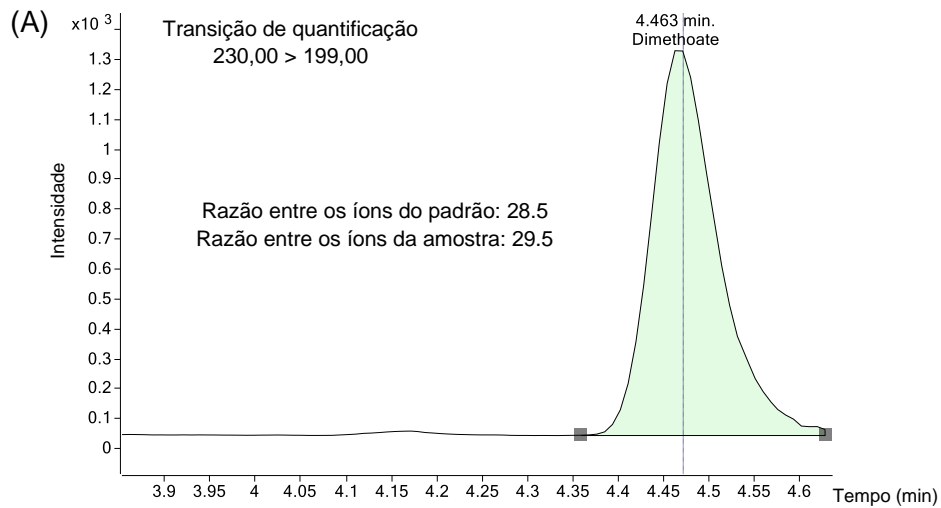
^aValores de LMR para azeitonas empregadas no preparo de azeite de oliva; ^bValores de LMR para grãos de soja. O LMR para Dimetoato é expresso como a soma de Dimetoato e Ometoato; O LMR para Fosmete é expresso como a soma de Fosmete e Fosmete oxom; nd: não detectado.

A Figura 9 mostra o cromatograma para o agrotóxico dimetoato que foi determinado em todas as amostras em concentrações menores do que o LOQm ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$). Nessa figura é possível perceber que, mesmo em concentrações inferiores ao LOQm, formato do pico, tempo de retenção e a razão entre os íons de quantificação e confirmação atendem aos critérios de quantificação, demonstrando o bom desempenho do método.

Além disso, nessa figura é possível observar que a relação sinal ruído indica que o método é seletivo, uma vez que não se observa qualquer sinal de outros

componentes nas imediações do sinal cromatográfico, situação comum a todos os agrotóxicos estudados neste trabalho.

Figura 9 – Sinais das transições de quantificação (A) e confirmação (B) do agrotóxico dimetoato determinado em amostras de azeite de oliva.



5 CONCLUSÃO

Atualmente os métodos mais empregados para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos baseiam-se na extração dessas substâncias fazendo uso de um único solvente orgânico ou misturas de solventes. Além disso, alguns métodos empregam, ainda, etapas de purificação de extratos necessárias para matrizes complexas, como o caso dos óleos comestíveis.

A determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes com alto teor de gordura torna-se um desafio no sentido de que as técnicas empregadas nesse tipo de determinação suportam uma quantidade limitada de substâncias lipídicas, fazendo com que o procedimento de extração envolva técnicas de purificação de extratos a fim de que os componentes da matriz não comprometam a coluna cromatográfica empregada e/ou detectores.

Nesse sentido, e observando a importância dos óleos comestíveis na alimentação humana, esse trabalho teve como objetivo principal desenvolver um procedimento de extração baseado no método QuEChERS citrato combinado com técnicas de purificação de extratos para a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes de azeite de oliva e óleo de soja e girassol.

A técnica de precipitação em baixas temperaturas (*freezing out*), se mostrou como sendo uma importante ferramenta na remoção de pelo menos parte dos constituintes lipídicos dos extratos de óleos comestíveis uma vez que a análise por espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-QTOF-MS) demonstrou uma redução de 10% no número de coextrativos.

Durante a etapa de purificação dos extratos, quatro diferentes técnicas foram avaliadas empregando os adsorventes mais modernos desenvolvidos para auxiliar na remoção de gordura dessas matrizes, sendo eles PSA, Z-sep e EMR-Lipid, onde o adsorvente Z-sep foi empregado na forma de d-SPE e SPE em cartucho. Os resultados da avaliação dos diferentes tipos de purificação demonstraram que o EMR-Lipid fornece resultados melhores do que as outras técnicas, visto que nenhum dos 165 agrotóxicos estudados foi totalmente perdido durante essa avaliação.

A partir dos dados obtidos nas etapas preliminares, o método foi validado por UHPLC-TQ-MS/MS, para as três matrizes empregadas nesse estudo seguindo as

recomendações do guia de controle de qualidade para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (SANTE, 2015).

O estudo de fortificação e recuperação demonstrou que para alguns agrotóxicos o percentual de recuperação foi menor do que 70% nas três concentrações estudadas, porém com RSD% menor do que 20% e, por esse motivo, a quantificação dos agrotóxicos foi realizada empregando a técnica *procedural standard calibration*, PSC, onde a curva analítica é preparada pela fortificação de porções de matrizes “branco” em diferentes concentrações.

Após avaliação da linearidade e sensibilidade das curvas analíticas, chegou-se a conclusão que uma única curva analítica preparada com qualquer um dos tipos de óleo comestível pode ser empregada na quantificação da maioria dos agrotóxicos estudados em qualquer matriz de óleo.

O método desenvolvido e validado mostrou-se eficiente na determinação de resíduos de 161 agrotóxicos em azeite de oliva, 159 agrotóxicos em óleo de soja e 158 agrotóxicos em óleo de girassol e foi aplicado na avaliação de 17 amostras de azeite de oliva e óleos de soja e girassol, adquiridas nas cidades de Almería e Múrcia, na Espanha.

REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO/IEC 17025**. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.
- ABRASCO. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 – Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro, 2012.
- ALBANO, F. M.; RODRIGUEZ, M. T. R. **Validação e Garantia da Qualidade de Ensaio Laboratoriais – Guia Prático**. 1ª ed. Porto Alegre. Rede de Metrologia e Ensaio do Rio Grande do Sul, 2009.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412–431, 2003.
- ANVISA. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005.
- ANVISA. **Nota Técnica de Esclarecimento sobre o Risco de Consumo de Frutas e Hortaliças Cultivadas com Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 de março de 2016. Publicado em 2010.
- ANVISA. Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) – Relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012. Disponível em: <<http://www.portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 05 de fevereiro de 2015. Publicado em outubro de 2014.
- ANVISA. Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) – Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. Disponível em: <<http://www.portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 28 de novembro de 2016. Publicado em 25 de novembro de 2016.
- ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. Huddersfield. John Wiley & Sons, Ltd. 2003.
- BECKER, V. G. Gaschromatographische simultanbestimmung von chlorierten Kohlenwasserstoffen und phosphorsäureestern in pflanzlichem material. **Deutsche Lebensmittel Rundschau Journal**, v. 4, p. 125-126, 1971.
- BORSOI, A.; DOS SANTOS, P. R. R.; TAFFAREL, L. E.; JÚNIOR, A. C. G. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, v. 3, p. 86-100, 2014.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos agrotóxicos. **Química nova na escola**, v. 34, p. 10-15, 2012.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. 1ª edição. São Paulo, UNICAMP, 2010.

COOK, J.; BECKETT, M. P.; RELIFORD, B.; HAMMOCK, W.; ENGEL, M. Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables using procedure developed by the Florida Department of Agriculture and Consumer Services. **Journal of AOAC International**, v. 82, p. 1419-1435, 1999.

CUNHA, S. C.; LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. **Sample preparation Approaches for the analysis of pesticide residues in olives and olive oils**. In: Olives and olive oil in health and disease prevention. Elsevier, p. 653-666, 2010.

FAO. The International Code of Conduct on Pesticide Management. Roma, 2014.

FERNANDEZ-ALBA, A. R.; VALVERDE, A.; AGÜERA, A.; CONTRERAS, M. Gas chromatographic determination of organochlorine and pyrethroid pesticides of horticultural concern. **Journal of Chromatography A**, v. 686, p. 263-274, 1994.

FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Chromatographic Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues. Amsterdã, Holanda. Elsevier, 2005.

FERRER, C.; GÓMEZ, M. J.; GARCÍA-REYES, J. F.; FERRER, I.; THURMAN, E. M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1069, p. 183-194, 2005.

GARCÍA-REYES, J. F.; FERRER, C.; GÓMEZ-RAMOS, M. J.; MOLINA-DÍAZ, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 239-251, 2007.

GENERAL INSPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION. Analytical methods for pesticides residues in foodstuffs, 6^a Ed., Ministry of Health, Welfare and Sport, Haia, The Netherlands, 1996.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. **Talanta**, v. 79, p. 109-128, 2009.

GIMENO, E.; FITÓ, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; CASTELLOTE, A. I.; COVAS, M.; FARRÉ, M.; DE LA TORRE-BORONAT, M. C.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition, **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 114-120, 2002.

HIEMSTRA, M.; DE KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 3-25, 2007.

HOLSTEGE, D. M.; SCHARBERG, D. L.; TOR, E. R.; HART, L. C.; GALEY, F.D. A rapid multiresidue screen for organophosphorus, organochlorine and N-methyl carbamate insecticides in plant and animal tissues. **Journal of AOAC International**, v. 77, p. 1263-1274, 1994.

INMETRO. **Orientação sobre a validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008**. Revisão 4, 2011.

Inpev. Instituto Nacional de Processamento de Embalagens Vazias. Dados do descarte de embalagens vazias de agrotóxicos. Disponível em: <www.inpev.gov.br>. Acesso em: 20 dez. 2016

INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL, Estatísticas sobre o azeite de oliva safra 2014/2015. Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=es_ES>. Acesso em: 20 out. 2016

JANSSON, C.; PIHLSTROM, T.; OSTERDAHL, B.; MARKIDES, K. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 93-104, 2004.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food – Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, p. 607-616, 2012.

KASSUMI, T. A. **Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de pesticidas benzimidazóis, carbamatos e triazinas em milho por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem e sua certificação**. Dissertação de Mestrado, USP, São Paulo, 2007.

KOESUKWIWAT, U.; LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K. J.; LEEPIPATPIBOON, N. Extension of the QuEChERS method for pesticide residues in

cereals to flaxseeds, peanuts and doughs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5950-5958, 2010.

KOINECKE, A.; KREUZIG, R.; BAHADIR, M.; SIEBERS, J. NOLTING, H. G. Investigations on the substitution of dichloromethane in pesticide residue analysis of plant materials. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 349, p. 301-305, 1994.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 27-46, 2013.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

LEE, S. M.; PAPATHAKIS, M. L.; FENG, H. M. C.; HUNTER, G. F.; CARR, J. E. Multi pesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**. V. 339, p. 376-383, 1991.

LEHOTAY, S. J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 485–520, 2007.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 630-638, 2005.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Assessoria e serviços a projetos em agricultura alternativa. Rio de Janeiro, 2011.

LOZANO, A.; KIEDROWSKA, B. A.; SCHOLTEN, J.; DE KOK, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. Miniaturisation and optimization of the Dutch mini-Luke extraction method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 192, p. 668-681, 2016.

LUKE, M. A.; FROBERG, J. E.; DOOSE, G. M.; MASUMOTO, H. T. Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors. **Journal of AOAC International**, v. 64, p. 1187-1195, 1981.

LUKE, M. A.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 58, p. 1020-1026, 1975.

MAPA. Portaria SDA nº 44, de 8 de Maio de 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em 05 de setembro de 2016.

MASTOVSKA, K.; WORSFOLD, P.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C. Encyclopedia of Analytical Science. 2. ed. Amsterdam. 2005. 10 p.

MILLS, P. A.; ONLEY, J. H.; GAITHER, R. A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. **Journal of AOAC International**, v. 46, p. 186-191, 1963.

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**, v. 95, p. 113-119, 2010

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**. 2^a ed. Nova Iorque, Estados Unidos. Marcel Dekker, 1999.

OBANA, H.; AKUTSU, K.; OKIHASHI, M.; KAKIMOTO, S.; HORI, S. multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits using high capacity absorbent polymer for water. **Analyst**, v. 124, p. 1159-1165, 1999.

OHAKAWA, H.; MIYAGAWA, H.; LEE, P. W. Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety. 11. ed. Weinheim, 2007. 542 p.

PEREIRA, J. L. G. F. S. C. Validação de métodos analíticos: determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de métodos multirresíduo de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS**. Tese de Doutorado, UFSM, Santa Maria, 2006.

PIZZUTTI, I. R.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.; DE KROON, M.; RENSEN, P.; PRESTES, O. D.; DE KOK, A. Fully integrated sample preparation Method for the GC-MS (MS) and LC-MS/MS multi-residue analysis of 221 pesticides and 26 mycotoxins in rice. In: 1st Latin American Pesticide Residue Workshop, **Anais**, Santa Maria, 2007.

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

RAJSKI, L.; LOZANO, A.; UCLÉS, A.; FERRER, C.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-up followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, p. 109-120, 2013.

REICHERT, B.; PIZZUTTI, I. R.; COSTABEBER, I. H.; UCLÉS, A.; HERRERA, S.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Validation and applicaiton of micro flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams. **Talanta**, v. 134, p. 415-424, 2015.

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

RODRIGUES, L. **Estudo de agrotóxicos usados em agricultura através da técnica de difração de raios X**. Dissertação de Mestrado, UFRJ, Rio de Janeiro, 2012.

ROSS, A. H.; VAN MUNSTEREN, A. J.; NAB, F. M.; TUINSTRAN, L. G. M. Universal extraction/clean-up procedure for screening of pesticides by extraction with ethyl acetate and size-exclusion chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 196, p. 95-102, 1987.

SANTE. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**. Documento No. SANTE/11945/2015, 2015.

SPECHT, W.; TILLKES, M. Gaschromatographische bestimmung von rückständen an pflanzenbehandlungsmitteln nach clean-up über gel-chromatographie undminikieselgel-säulen-chromatographie, 3. Mitt.: method zur aufarbeitung von lebensmitteln und futtermitteln pflanzlicher und tierischer herkunft für die multirückstandsbestimmung lipoid und wasser löslicher pflanzenbehandlungsmittel. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 301, p. 300-307, 1980.

STORHERR, R. W.; OTT, P.; WATTS, R. R. A general method for organophosphorus pesticide residues in nonfatty foods. **Journal of AOAC International**, v. 54, p. 513-516, 1971.

TERRA, F. H. B. **A indústria de agrotóxicos no Brasil**. Dissertação de Mestrado, UFPR, Curitiba, 2008.

TERRA, F. H. B.; PELAEZ, V. A História da indústria de agrotóxicos no Brasil: das primeiras fábricas na década de 1940 aos anos 2000. In: Estrutura, evolução e dinâmica dos sistemas agroalimentares e cadeias agroindustriais, **Anais**, Curitiba, 2008.

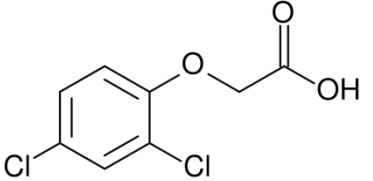
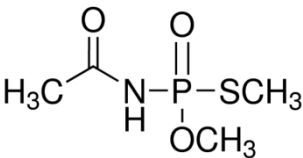
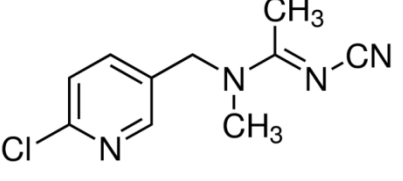
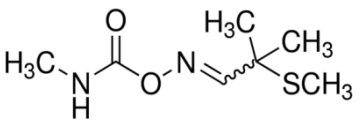
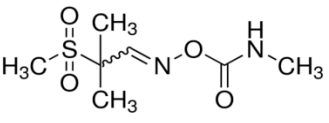
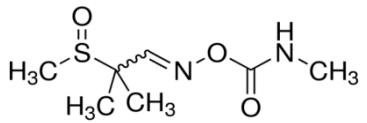
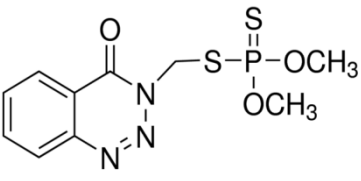
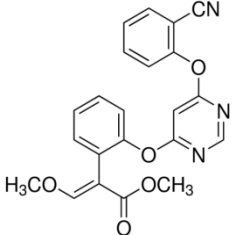
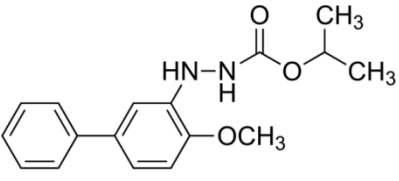
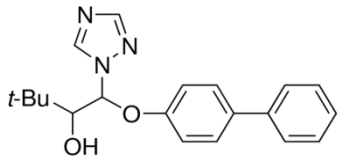
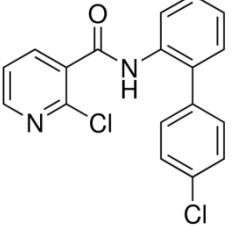
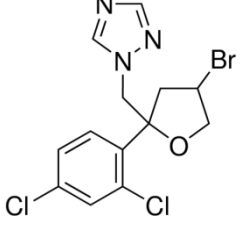
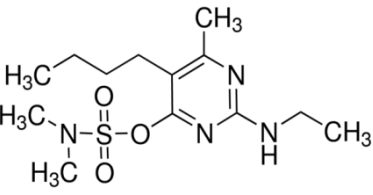
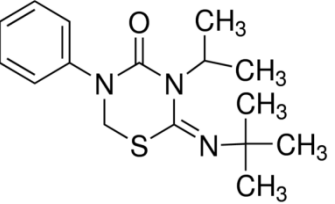
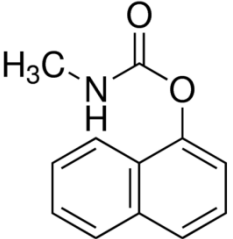
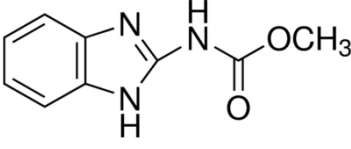
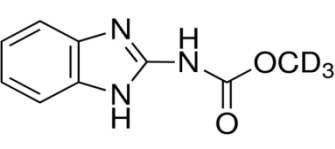
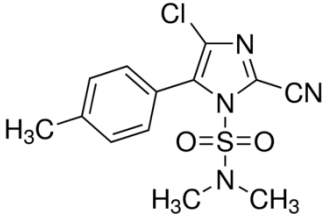
TON JOE, W. L.; CUSICK, W. G. Multiresidue screening for fresh fruits and vegetables with gas chromatography/mass spectrometry detection. **Journal of AOAC International**, v. 74, p. 554-565, 1991.

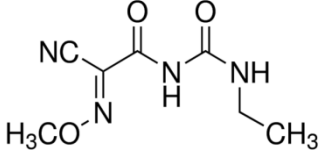
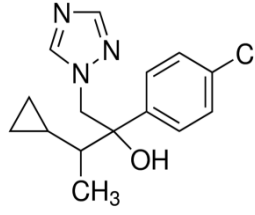
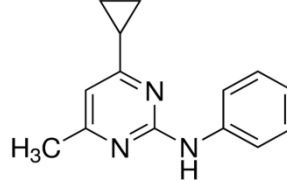
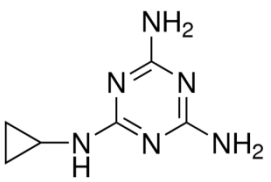
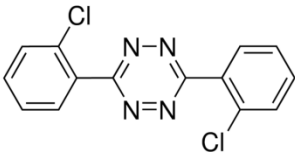
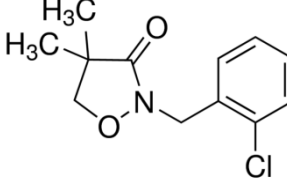
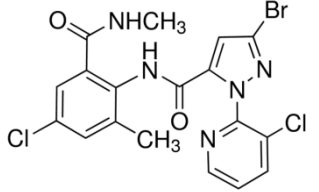
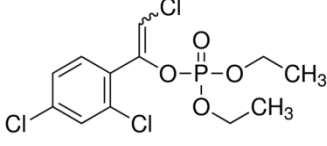
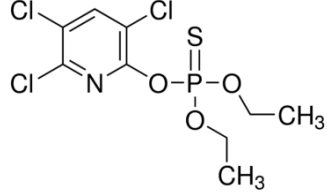
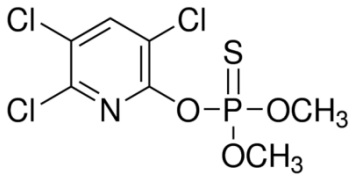
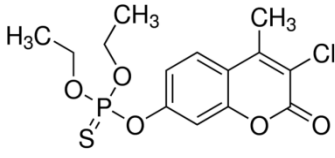
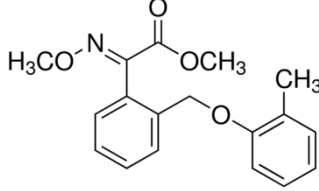
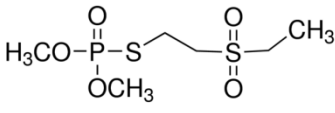
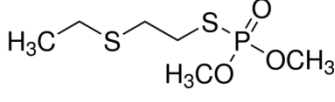
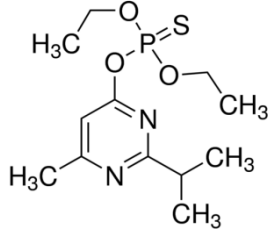
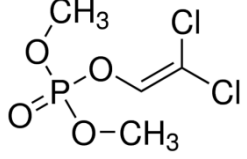
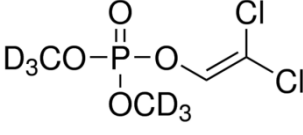
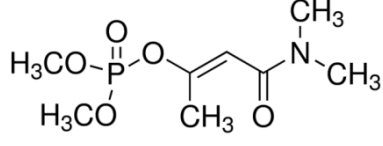
TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G.; CAPIELLO, A. Na overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p. 491-509, 2011.

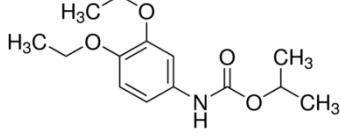
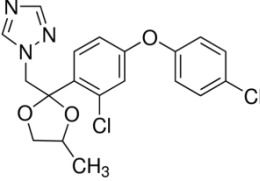
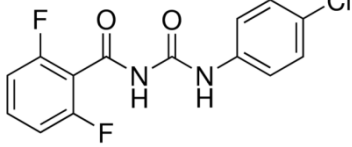
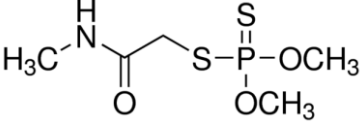
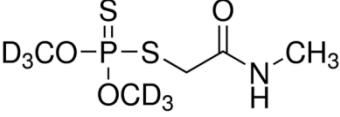
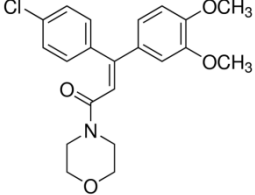
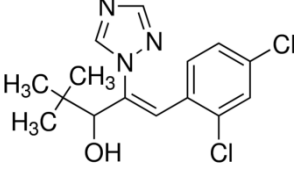
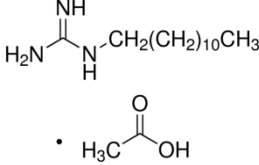
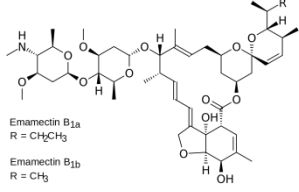
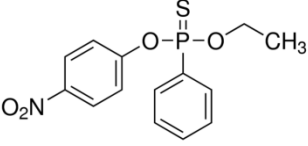
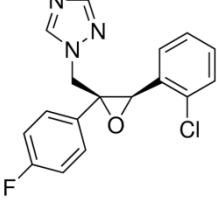
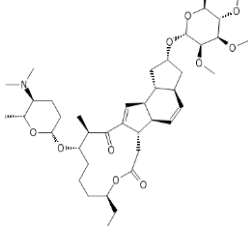
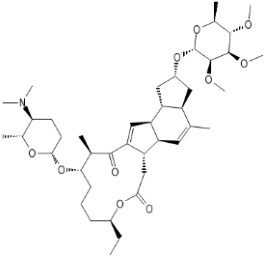
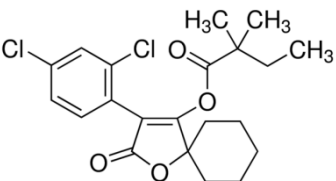
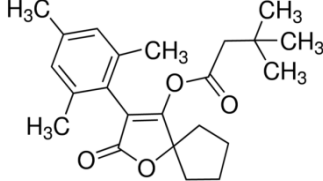
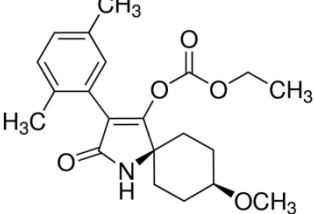
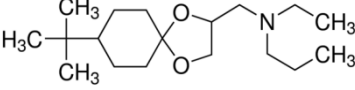
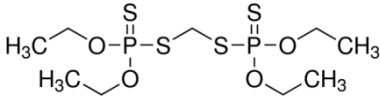
VEIGA, M, M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça sócio ambiental. **Ciência e Saúde coletiva**, v. 12, p. 145-152, 2007.

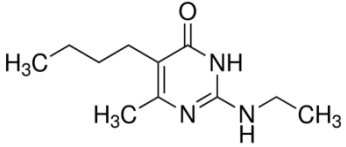
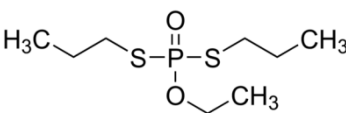
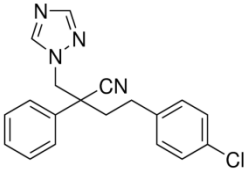
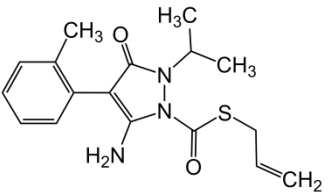
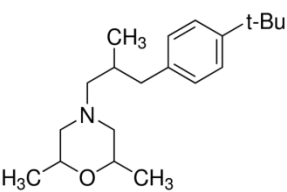
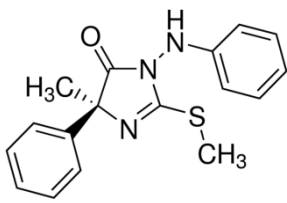
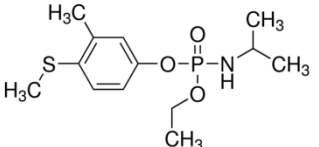
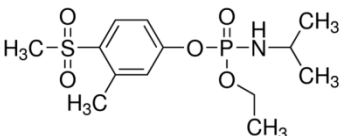
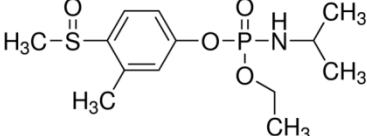
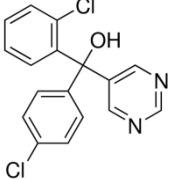
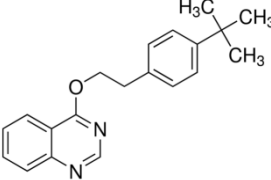
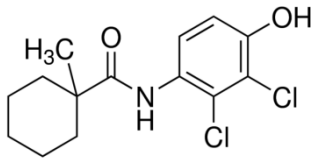
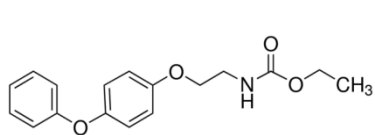
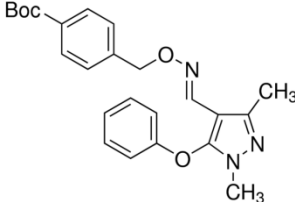
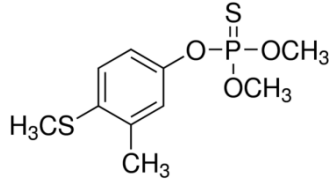
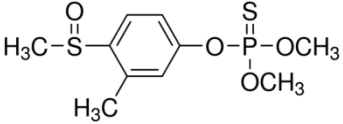
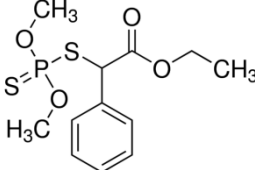
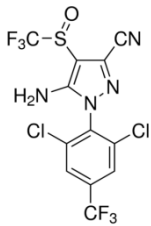
WATTS, R. R.; STORHERR, R. W.; PARDUE, J. R.; OSGOOD. Charcoal column cleanup method for many organophosphorus pesticide residues in crop extracts. **Journal of AOAC International**, v. 52, p. 522-526, 1969.

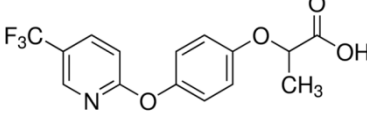
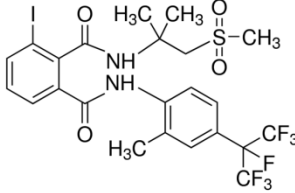
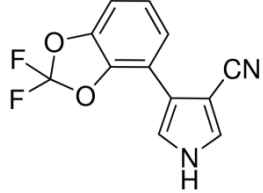
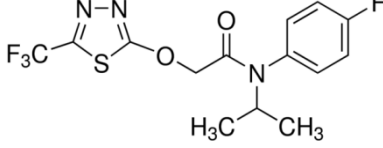
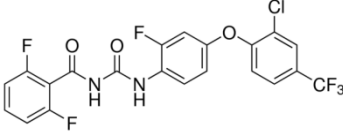
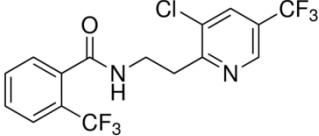
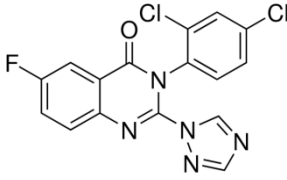
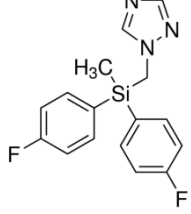
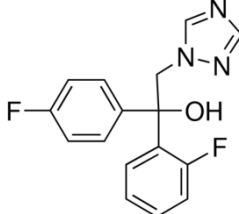
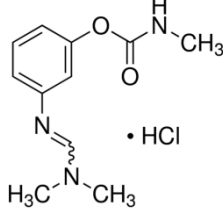
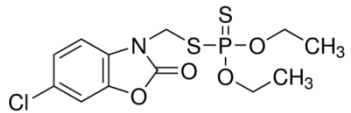
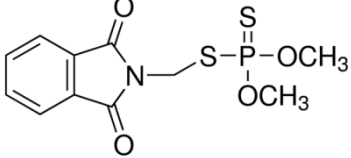
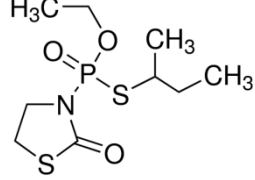
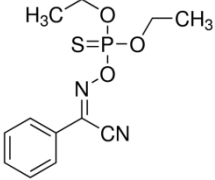
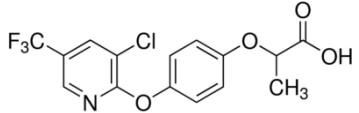
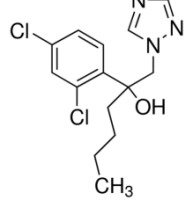
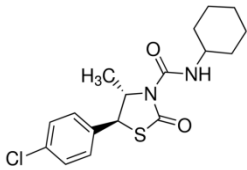
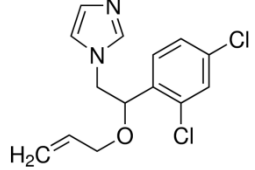
APÊNDICE A – Fórmulas estruturais dos agrotóxicos estudados (Fonte: Sigma-Aldrich)

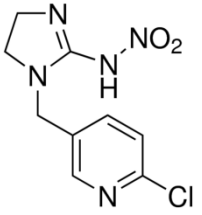
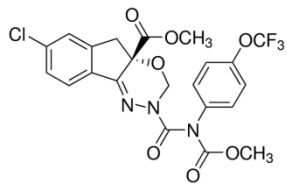
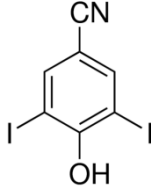
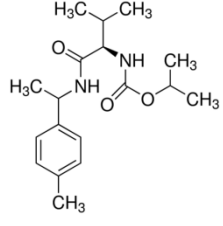
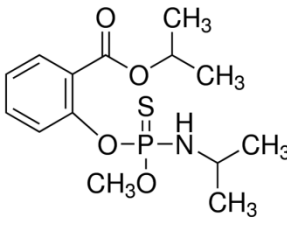
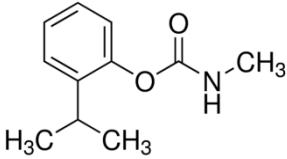
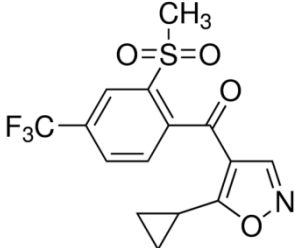
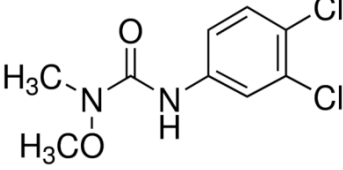
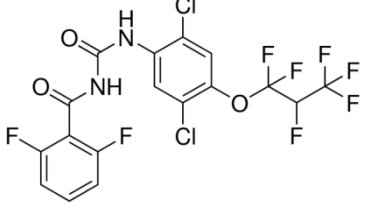
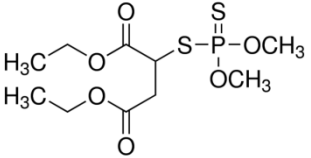
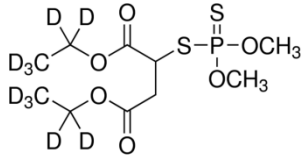
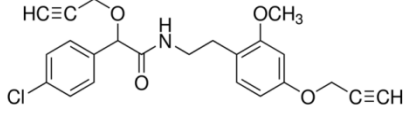
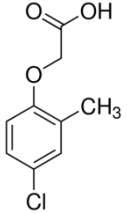
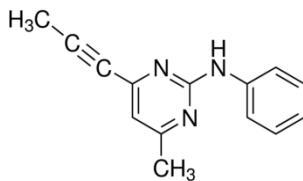
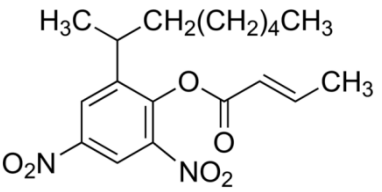
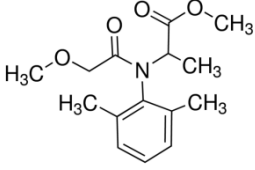
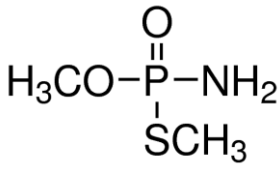
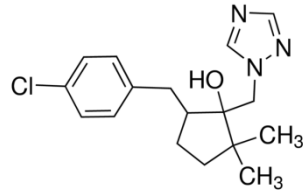
 <p>2,4-D</p>	 <p>Acefato</p>	 <p>Acetamiprido</p>
 <p>Aldicarbe</p>	 <p>Aldicarbe sulfona</p>	 <p>Aldicarbe sulfóxido</p>
 <p>Azinfós metílico</p>	 <p>Azoxistrobina</p>	 <p>Bifenazato</p>
 <p>Bitertanol</p>	 <p>Boscalida</p>	 <p>Bromuconazol</p>
 <p>Bupirimato</p>	 <p>Buprofezina</p>	 <p>Carbaril</p>
 <p>Carbendazim</p>	 <p>Carbendazim-d3</p>	 <p>Ciazofamida</p>

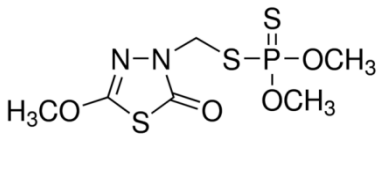
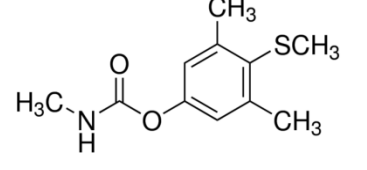
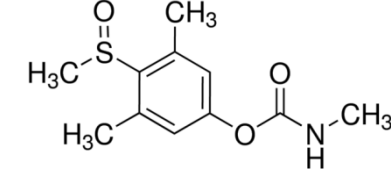
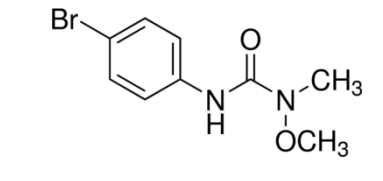
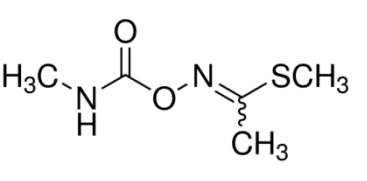
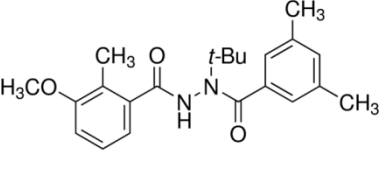
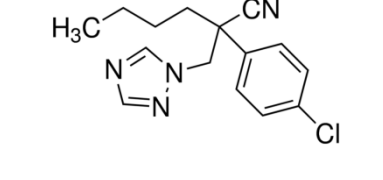
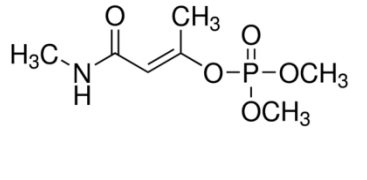
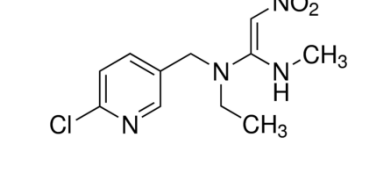
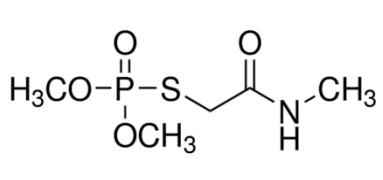
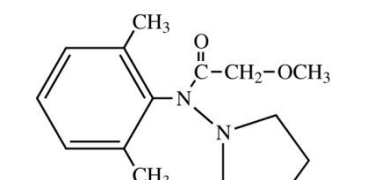
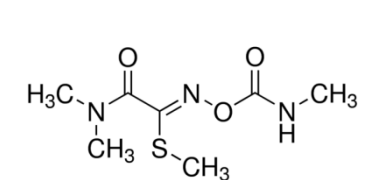
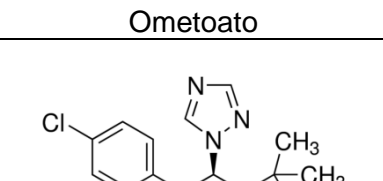
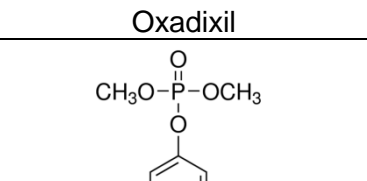
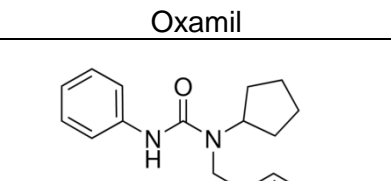
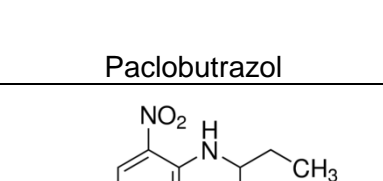
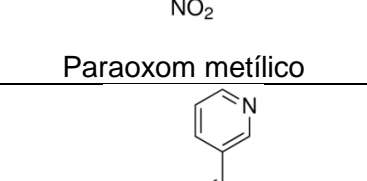
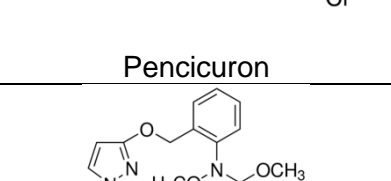
 <p>Cimoxanil</p>	 <p>Ciproconazol</p>	 <p>Ciprodinil</p>
 <p>Ciromazina</p>	 <p>Clofentezina</p>	 <p>Clomazona</p>
 <p>Clorantraniliprol</p>	 <p>Clorfenvinfós</p>	 <p>Clorpirifós</p>
 <p>Clorpirifós metílico</p>	 <p>Coumafós</p>	 <p>Cresoxim metílico</p>
 <p>Demeton-S-metil sulfona</p>	 <p>Demeton-S-metil sulfóxido</p>	 <p>Diazinona</p>
 <p>Diclorvós</p>	 <p>Diclorvós-d6</p>	 <p>Dicrotofós</p>

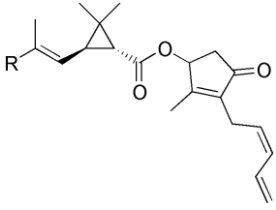
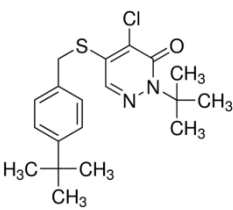
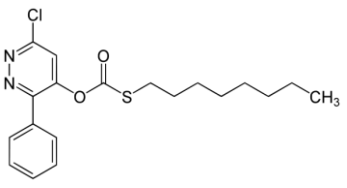
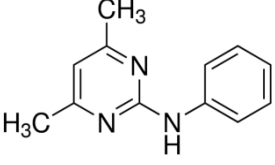
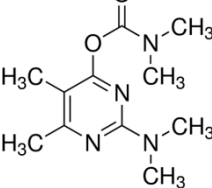
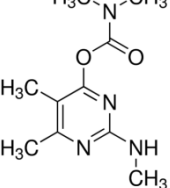
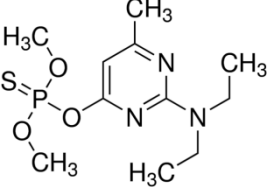
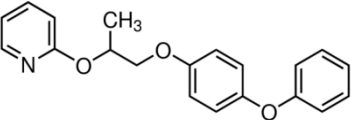
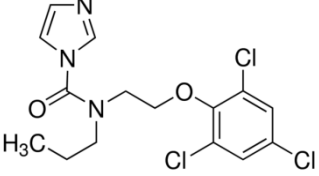
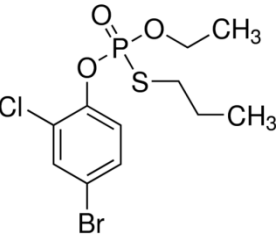
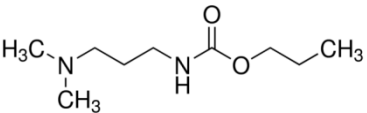
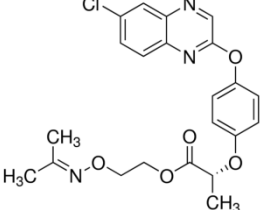
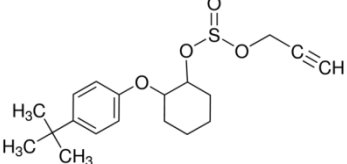
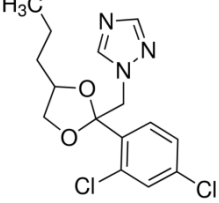
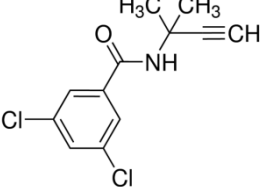
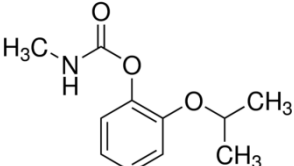
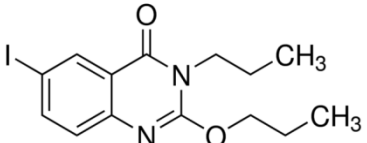
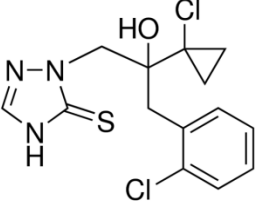
 <p>Dietofencarbe</p>	 <p>Difenoconazol</p>	 <p>Diflubenzurom</p>
 <p>Dimetoato</p>	 <p>Dimetoato-d6</p>	 <p>Dimetomorfe</p>
 <p>Diniconazol</p>	 <p>Dodine</p>	 <p>Emamectina B1a R = CH₂CH₃</p> <p>Emamectina B1b R = CH₃</p>
 <p>EPN</p>	 <p>Epoxiconazol</p>	 <p>Espinosina A</p>
 <p>Espinosina D</p>	 <p>Espirodiclofeno</p>	 <p>Espiromesifeno</p>
 <p>Espirotetramato</p>	 <p>Espiroxamina</p>	 <p>Etiona</p>

 <p>Etrimol</p>	 <p>Etoprofos</p>	 <p>Fembuconazol</p>
 <p>Fempirazamina</p>	 <p>Fempropimorfe</p>	 <p>Fenamidona</p>
 <p>Fenamifós</p>	 <p>Fenamifós sulfona</p>	 <p>Fenamifós sulfóxido</p>
 <p>Fenarimol</p>	 <p>Fenazaquim</p>	 <p>Fenexamida</p>
 <p>Fenoxicarbe</p>	 <p>Fempiroximato</p>	 <p>Fentiona</p>
 <p>Fentiona sulfóxido</p>	 <p>Fentoato</p>	 <p>Fipronil</p>

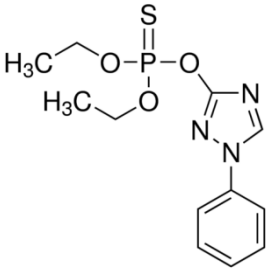
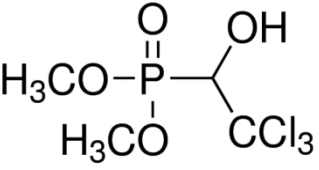
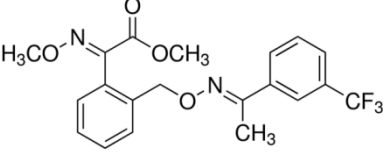
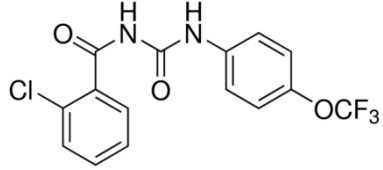
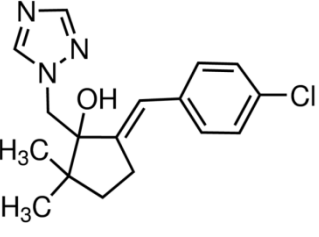
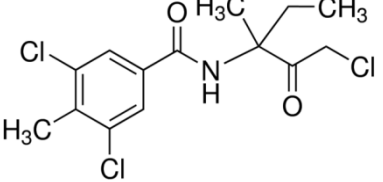
 <p style="text-align: center;">Fluazifope</p>	 <p style="text-align: center;">Flubendiamida</p>	 <p style="text-align: center;">Fludioxonil</p>
 <p style="text-align: center;">Flufenaceto</p>	 <p style="text-align: center;">Flufenoxurom</p>	 <p style="text-align: center;">Fluopiram</p>
 <p style="text-align: center;">Fluquinconazol</p>	 <p style="text-align: center;">Flusilazol</p>	 <p style="text-align: center;">Flutriafol</p>
 <p style="text-align: center;">Formetanato</p>	 <p style="text-align: center;">Fosalona</p>	 <p style="text-align: center;">Fosmete</p>
 <p style="text-align: center;">Fostiazato</p>	 <p style="text-align: center;">Foxim</p>	 <p style="text-align: center;">Haloxifope</p>
 <p style="text-align: center;">Hexaconazol</p>	 <p style="text-align: center;">Hexitiazoxi</p>	 <p style="text-align: center;">Imazalil</p>

 <p>Imidacloprido</p>	 <p>Indoxacarbe</p>	 <p>Ioxonil</p>
 <p>Iprovalicarbe</p>	 <p>Isofenfós metílico</p>	 <p>Isoprocarbe</p>
 <p>Isoxaflutol</p>	 <p>Linurom</p>	 <p>Lufenurom</p>
 <p>Malationa</p>	 <p>Malationa-d10</p>	 <p>Mandipropamida</p>
 <p>MCPA</p>	 <p>Mepanipirim</p>	 <p>Meptildinocape</p>
 <p>Metalaxil</p>	 <p>Metamidofós</p>	 <p>Metconazol</p>

 <p>Metidationa</p>	 <p>Metiocarbe</p>	 <p>Metiocarbe sulfóxido</p>
 <p>Metobromurom</p>	 <p>Metomil</p>	 <p>Metoxifenozida</p>
 <p>Miclobutanil</p>	 <p>Monocrotofós</p>	 <p>Nitempiram</p>
 <p>Ometoato</p>	 <p>Oxadixil</p>	 <p>Oxamil</p>
 <p>Paclobutrazol</p>	 <p>Paraoxom metílico</p>	 <p>Pencicuron</p>
 <p>Pendimetalina</p>	 <p>Pimetrozina</p>	 <p>Piraclostrobina</p>

 <p style="text-align: center;">Piretrina</p>	 <p style="text-align: center;">Piridabem</p>	 <p style="text-align: center;">Piridato</p>
 <p style="text-align: center;">Pirimetanil</p>	 <p style="text-align: center;">Pirimicarbe</p>	 <p style="text-align: center;">Pirimicarbe desmetílico</p>
 <p style="text-align: center;">Pirimifós metílico</p>	 <p style="text-align: center;">Piriproxifem</p>	 <p style="text-align: center;">Procloráz</p>
 <p style="text-align: center;">Profenofós</p>	 <p style="text-align: center;">Propamocarbe</p>	 <p style="text-align: center;">Propaquizafope</p>
 <p style="text-align: center;">Propargito</p>	 <p style="text-align: center;">Propiconazol</p>	 <p style="text-align: center;">Propizamida</p>
 <p style="text-align: center;">Propoxur</p>	 <p style="text-align: center;">Proquinazida</p>	 <p style="text-align: center;">Protoconazol</p>

<p>Protiofós</p>	<p>Quinoclamina</p>	<p>Quinoxifem</p>
<p>Quizalofope etílico</p>	<p>Rotenona</p>	<p>Tebuconazol</p>
<p>Tebufempirado</p>	<p>Tebufenozida</p>	<p>Teflubenzurom</p>
<p>Terbutilazina</p>	<p>Tetraconazol</p>	<p>Tiabendazol</p>
<p>Tiacloprido</p>	<p>Tiametoxam</p>	<p>Tiobencarbe</p>
<p>Tiodicarbe</p>	<p>Tolclofós metílico</p>	<p>Triadimenol</p>

 <p>Triazofós</p>	 <p>Triclorfom</p>	 <p>Trifloxistrobina</p>
 <p>Triflumurom</p>	 <p>Triticonazol</p>	 <p>Zoxamida</p>

APÊNDICE B – Agrotóxicos estudados e suas classificações, agrupados de acordo com o grupo químico.

Agrotóxico	Classificação	Grupo químico
Mepanipirim	Fungicida	Anilinopirimidina
Pirimetanil	Fungicida	
Ciprodinil	Fungicida	
Fluazifope	Herbicida	Ariloxifenoxipropionato
Haloxifope	Herbicida	
Propaquizafope	Herbicida	
Quizalofope etílico	Herbicida	
Emamectina B1a	Inseticida	Avermectina
Proquinazida	Fungicida	Azol
Pimetrozina	Inseticida	Piridina azometina
Fluopiram	Fungicida	Benzamida
Propizamida	Herbicida	
Zoxamida	Fungicida	
Carbendazim	Fungicida	Benzimidazol
Tiabendazol	Fungicida	
Diflubenzuron	Inseticida	Benzoiluréia
Flufenoxurom	Inseticida	
Lufenurom	Inseticida	
Teflubenzurom	Inseticida	
Triflumuron	Inseticida	
Rotenona	Inseticida	Natural
Fenoxicarbe	Inseticida	Carbamato
Aldicarbe	Inseticida	
Aldicarbe sulfona	-	
Aldicarbe sulfóxido	-	
Carbaril	Inseticida	
Formetanato	Inseticida	
Iprovalicarbe	Fungicida	
Isoprocarbe	Inseticida	
Metiocarbe	Inseticida	
Metiocarbe sulfóxido	-	
Metomil	Inseticida	
Oxamil	Inseticida	
Pirimicarbe	Inseticida	
Pirimicarbe desmetílico	-	
Propoxur	Inseticida	
Tiodicarbe	Inseticida	
Bifenazato	Inseticida	
Boscalida	Fungicida	Carboxamida
Dimetomorfe	Fungicida	Ácido cinâmico
Cimoxanil	Fungicida	Cianoacetamida oxima
Metoxifenoazida	Inseticida	Diacilhidrazina
Tebufenozida	Inseticida	
Flubendiamida	Inseticida	Diamida
Pendimetalina	Herbicida	Dinitroanilina
Meptildinocape	Fungicida	Dinitrofenol
Dodine	Fungicida	Guanidina
Fenexamida	Fungicida	Hidroxianilida
Ioxonil	Herbicida	Hidroxibenzonitrila
Ciazofamida	Fungicida	Imidazol
Imazalil	Fungicida	
Procloráz	Fungicida	
Isoxaflutol	Herbicida	Isoxazol
Clomazona	Herbicida	Isoxazolidinona

Espirotramato	Inseticida	Ceto-enol
Espirodiclofeno	Inseticida	
Espiromesifeno	Inseticida	
Spinosina A	Inseticida	Lactona macrocíclica
Spinosina D	Inseticida	
Mandipropamida	Fungicida	Éter mandelamida
Fempropimorfe	Fungicida	Morfolina
Espiroxamina	Fungicida	
Tiacloprido	Inseticida	Neonicotinoide
Tiametoxam	Inseticida	
Acetamiprido	Inseticida	
Imidacloprido	Inseticida	
Nitempiram	Inseticida	
Clorantraniliprol	Inseticida	
Tolclofós metílico	Fungicida	Nitrofenila
Dietofencarbe	Fungicida	N-fenil carbamato
Isofenós metílico	Inseticida	Organofosforado
Paraoxom metílico	Inseticida	
Acefato	Inseticida	
Azinfós metílico	Inseticida	
Clorfenvinfós	Inseticida	
Clorpirifós metílico	Inseticida	
Clorpirifós	Inseticida	
Coumafós	Inseticida	
Demeton-S-metil sulfona	Inseticida	
Demeton-S-metil sulfóxido	Inseticida	
Diazinona	Inseticida	
Diclorvós	Inseticida	
Dicrotofós	Inseticida	
Dimetoato	Inseticida	
EPN	Inseticida	
Etiona	Inseticida	
Etoprofós	Inseticida	
Fenamifós	Nematicida	
Fenamifós sulfona	-	
Fenamifós sulfóxido	-	
Fentiona	Inseticida	
Fentiona sulfóxido	-	
Fostiazato	Inseticida	
Malationa	Inseticida	
Metamidofós	Inseticida	
Metidationa	Inseticida	
Monocrotofós	Inseticida	
Ometoato	Inseticida	
Fentoato	Inseticida	
Fosalona	Inseticida	
Fosmete	Inseticida	
Foxim	Inseticida	
Pirimifós metílico	Inseticida	
Profenofós	Inseticida	
Propamocarbe	Fungicida	
Protiofós	Inseticida	
Triazofós	Inseticida	
Triclorfom	Inseticida	
Indoxacarbe	Inseticida	Oxadiazina
Flufenaceto	Herbicida	Oxiacetamida
2,4-D	Herbicida	Ácido fenoxi carboxílico
MCPA	Herbicida	
Pencicuron	Fungicida	Fenoilureia
Metalaxil	Fungicida	Fenilamina
Oxadixil	Fungicida	
Piridato	Herbicida	Fenilpiridazina

Fludioxonil	Fungicida	Fenilpirrol
Fempirazamina	Fungicida	Pirazol
Fenpiroximato	Inseticida	
Fipronil	Inseticida	
Tebufempirado	Acaricida	
Piretrina	Inseticida	Piretróide
Piridabem	Inseticida	Piridazinona
Piriproxifem	Inseticida	Piridina
Fenarimol	Fungicida	Pirimidina
Etirimol		Pirimidinol
Bupirimato	Fungicida	
Fenazaquim	Acaricida	Quinolina
Quinoxifen	Fungicida	
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina
Fenamidona	Fungicida	
Cresoxim metílico	Fungicida	
Piraclostrobina	Fungicida	
Trifloxistrobina	Fungicida	
Clofentezina	Inseticida	Tetrazina
Buprofezina	Inseticida	Tiadiazinona
Tiobencarbe	Herbicida	Tiocarbamato
Ciromazina	Inseticida	Triazina
Terbutilazina	Herbicida	
Bitertanol	Fungicida	Triazol
Bromuconazol	Fungicida	
Ciproconazol	Fungicida	
Difenoconazol	Fungicida	
Diniconazol	Fungicida	
Epoxiconazol	Fungicida	
Fembuconazol	Fungicida	
Fluquinconazol	Fungicida	
Flusilazol	Fungicida	
Flutriafol	Fungicida	
Hexaconazol	Fungicida	
Metconazol	Fungicida	
Miclobutanil	Fungicida	
Paclobutrazol	Fungicida	
Penconazol	Fungicida	
Propiconazol	Fungicida	
Protioconazol	Fungicida	
Tebuconazol	Fungicida	
Tetraconazol	Fungicida	
Triadimenol	Fungicida	
Triticonazol	Fungicida	
Hexitiazoxi	Inseticida	Sem classificação
Propargito	Inseticida	
Quinoclamina	Herbicida	Ureia
Metobromurom	Herbicida	
Linurom	Herbicida	

APÊNDICE C – Artigo referente ao trabalho da tese publicado na revista *Journal of Chromatography A*, volume 1462, páginas 8 – 18, 2016. Fator de impacto 3,926. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.07.072.

Journal of Chromatography A, 1462 (2016) 8–18



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up



Jonatan V. Dias^a, Victor Cutillas^b, Ana Lozano^b, Ionara R. Pizzutti^a, Amadeo R. Fernández-Alba^{b,*}

^a Federal University of Santa Maria (UFSM), Chemistry Department, Center of Research and Analysis of Residues and Contaminants (CEPARC), 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^b European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues in Fruit & Vegetables (EURL-FV), University of Almeria, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Almeria, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 April 2016

Received in revised form 16 June 2016

Accepted 26 July 2016

Available online 27 July 2016

Keywords:

Edible oils

Pesticides

Multi-residue method

UHPLC-MS/MS

ABSTRACT

The goal of this work was to evaluate the efficiency of several sorbents on removal fats from edible oils (olive, soya and sunflower) during the clean-up step for posterior determination of 165 pesticides by UHPLC-QqQ-MS/MS system. The extraction procedure employed in this work was the citrate version of QuEChERS method followed by a step of freezing out with dry ice and clean-up evaluation using i) PSA with magnesium sulfate (d-SPE); ii) magnesium sulfate and Z-sep sorbent (d-SPE); iii) Z-sep (column SPE) and iv) Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid). After evaluation of the recovery results at 10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, the EMR-Lipid showed important advantages comparing to the other sorbents evaluated, such as better recovery rates and RSD%. The method was validated at the three concentrations described above. Analytical curves linearity was evaluated by spiking blank oil samples at 10, 20, 50, 100 and 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The method demonstrated good recoveries values between the acceptable range of 70–120% and RSD% < 20 for most of evaluated pesticides. In order to evaluate the performance of the method, this same procedure was employed to other oils such as soya and sunflower with very good results.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Olive oil is the principal source of lipids in the Mediterranean diet, and its consumption in the world is increasing due to related potential health benefits, such as a lower incidence of cardiovascular diseases, neurological disorders, breast and colon cancers, as well as its hypolipidemic and antioxidant properties [1]. According to the data published in November 2015 by International Olive Oil Council, Spain is the main producer of olive oil in Europe with about 840 thousand tons during 2014/2015 production. Related to consumption in Europe, Italy is the main consumer with circa 520 thousand tons in 2014/2015 and in second place Spain with approximately 490 thousand tons [2].

Pesticides are chemical substances applied to crops at various stages of cultivation and post-harvest storage of crops. The use of

pesticides is intended to prevent the destruction of food crops by controlling agricultural pests or unwanted plants and to improve plant quality. The widespread use of pesticides for improving agricultural productivity has raised public concern about the possible presence of residues in crops and its byproducts. In agricultural practice for olive groves, the use of insecticides and herbicides provides an unquestionable benefit for crop protection. However, these pesticides can persist up to the harvest and processing stage, making the contamination of olives, and consequently of olive oil, possible [3,4].

The large number of pesticides to be monitored associated with low concentration of the maximum residue limits (MRL) established and non-registered residues in food require sensitive and selective methods for their identification and quantification. However, olive oil contains high level of lipid substances which can cause problems during pesticide residue analysis because they are soluble in many organic solvents used for extraction. The lipids must be removed from the extracts prior to analysis or the chromatographic and detection system can be damaged [5].

* Corresponding author.

E-mail address: amadeo@ual.es (A.R. Fernández-Alba).

In the last few years many studies were published aiming the development of sensitive and accurate methods for pesticide residues determination in high fat content matrices. The most common sorbent employed in these works during clean-up step was PSA [6–10] which was also evaluated in combination with other sorbents such as C18 [6,7] and GCB [8,9], due to the well known power of PSA in removing lipid content. Some methods employing Oasis Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) were also reported [11]. Most recently, a new sorbent based on zirconium dioxide has been employed instead of PSA due to its higher ability on removing fat content from olive oil [12,13].

These clean-up methods were applied, in most of the cases, in combination with QuEChERS methodologies and its variations [6,7,10,13,14]. Mini-Luke was also evaluated in combination with UPLC–MS/MS in order to determine residues of 169 pesticides in soya grain [15].

Taking all these points into account and considering the importance of olive oil in Europe, the goal of this study was to develop and validate an analytical method for pesticides residue determination in olive oil by UHPLC–QQQ–MS/MS employing new sorbents for clean-up step. Four different methods using different sorbents were employed: i) PSA with magnesium sulfate (d-SPE); ii) Z-Sep sorbent with magnesium sulfate (d-SPE); iii) Z-Sep (cartridge SPE) and iv) Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid). Furthermore, a step of low temperature precipitation (freezing-out) was evaluated before SPE clean-up. The method was fully validated in olive oil and applied for sunflower oil and soya oil in order to compare the results and check the possibility of employing only one kind of oil to quantify all of them. The method was applied in oil real samples of olive, sunflower and soya collected in local supermarkets of Almería city, in the southeastern of Spain.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Acetonitrile, HPLC grade (99.9%), formic acid, analytical grade (>96%) and magnesium sulfate (98%) were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Water, Optima®, HPLC grade was supplied by Fisher Scientific (New Jersey, USA). Sodium chloride was obtained from J. T. Baker (Deventer, Netherlands). Sodium citrate tribasic dihydrate (≥99%) and disodium hydrogen citrate sesquihydrate (99%) were obtained from Fluka (Steinheim, Germany). PSA and Z-Sep were purchased from Supelco (Bellefonte, USA). Bond Elut Enhanced Matrix Removal d-SPE and Bond Elut Final Polish from Agilent Technologies (Santa Clara, USA). Pesticides standards were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) and from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2. Pesticides standards solutions

Individual pesticide standard stock solutions were prepared in acetonitrile and stored in amber screw-capped glass vials at –20 °C. A standard mixture solution of the pesticides was prepared in acetonitrile at 10 mg L⁻¹. This solution was used as spike solution for recovery experiments and also to prepare the analytical curves solution for linearity studies.

2.3. Final extraction procedure

The final extraction procedure employed was the citrate version of QuEChERS method [16] using the EMR-Lipid from Agilent Technologies. An amount of 15 g of olive oil was weighed in a 50 mL PTFE centrifuge tube and 15 mL of acetonitrile was added plus 15 µL of procedure internal standard solution at 10 mg L⁻¹ in

acetonitrile containing triphenyl phosphate (TPP), dichlorvos-d6, malathion-d10 and carbendazin-d3. The tubes were shaken in an automatic axial extractor (AGYTAX®, Cirta Lab. S.L., Spain) during 4 min. Thereafter, 6 g of magnesium sulfate, 1.5 g of sodium chloride, 1.5 g of sodium citrate tribasic dihydrate and 0.75 g of disodium hydrogen citrate sesquihydrate were added and the samples were again shaken during 4 min in the automatic axial extractor. The extracts were centrifuged at 3500 rpm for 5 min and 8 mL were transferred to a 15 mL PTFE centrifuge tube. The tubes containing the extract were allowed to stand in dry ice during approximately 6 min in order to precipitate the fat content. The upper acetonitrile extract (5 mL) was collected and transferred to an EMR-Lipid d-SPE 15 mL tube already containing the adsorbent for clean-up step (1 g) and 5 mL of water. The mixture were homogenized in vortex during 1 min, centrifuged (3500 rpm, 5 min) and 5 mL of extract was transferred to an EMR-Lipid polish tube containing 2 g of a mixture of sodium chloride and magnesium sulfate (1:4, w/w). The mixture was homogenized during 1 min in vortex and centrifuged. Hereafter, 2 mL of extract were transferred to a vial and acidified with 20 µL of formic acid (5% in acetonitrile). Before UHPLC–MS/MS analysis, the extracts (100 µL) were diluted 5-fold with water HPLC grade and 10 µL of injection internal standard solution at 2.5 mg L⁻¹ containing dimethoate-d6 was added to the vials.

2.4. Instrumentation

An Agilent UHPLC 1290 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to an Agilent Technologies 6490 TripleQuad LC/MS was used for this study. Data acquisition and processing were developed by using Agilent MassHunter QQQ Acquisition and Quantitative Analysis B.07.00 software using Dynamic MRM software features with a retention time window of 0.8 min. The injection volume was 5 µL, and the chromatographic separation was carried out with a Zorbax Eclipse Plus C8 column (Agilent), 1.8 µm × 2.1 mm × 100 mm, maintained at 35 °C. The mobile phases employed was a solution of formic acid 0.1% in milliQ water (mobile phase A) and 0.1% formic acid and 5% water in acetonitrile (mobile phase B) at a constant flow rate of 0.3 mL min⁻¹, with the following gradient: 20% of B for 2 min, a linear gradient up to 100% of B in 13 min and finally an isocratic mode at 100% of B for 2 min. Afterwards, an equilibration step coming back to 20% of B (2.5 min) was performed. The system was provided with a Jet-Stream electrospray ion source, employing nitrogen as nebulizer gas. This ion source was configured as follows: 120 °C for drying gas temperature, 13 L min⁻¹ for drying gas flow, 45 psi for pressure of the nebulizer, 375 °C for sheath gas temperature and 10 L min⁻¹ for the sheath gas flow. The MS used nitrogen as collision gas (99.999% purity), 380 V for the fragmentor and 3000 V for the capillary voltage both in positive and negative mode.

For the optimization of the MS parameters, all pesticides at 100 µg L⁻¹ (acetonitrile:water, 1:1, v/v) were injected directly in the MS system in full scan mode with a mass range of 50–800 *m/z*. From this injection the precursor ion was selected and one more injection in product ion mode was needed to choose two fragment ions and the optimum collision energy (CE) for each transition. Retention times, transitions and CEs for each compound are collected in Table 1. The most intense transition was selected as the quantifier transition (SRM1), while the second most intense was chosen as the qualifier transition (SRM2).

2.5. Validation of the analytical procedure

Validation study was performed in order to evaluate accuracy (recovery), precision, linearity, limit of quantification, matrix effects and repeatability in accordance with the Document No. SANTE/11945/2015 [17]. Recovery and precision were determined

Table 1

Acquisition conditions for mass spectrometer: retention time, precursor ion, quantifier and qualifier transition and polarity of acquisition.

Compound	Retention time (min)	Precursor Ion	1st transition		2nd transition		Polarity
			Product ion	CE ^a	Product ion	CE ^a	
2,4-D	7.8	218.96/220.96	160.96	15	162.95	15	Negative
Acephate	1.1	184.00	143.00	5	125.00	15	Positive
Acetamidrid	4.4	223.00	126.00	20	56.00	15	Positive
Aldicarb	5.7	213.00	116.00	10	89.00	15	Positive
Aldicarb-sulfone	1.7	223.00	148.00	5	86.00	10	Positive
Aldicarb-sulfoxide	1.2	207.00	132.00	5	89.00	10	Positive
Azinphos-methyl	9.1	318.00	261.00	0	132.10	8	Positive
Azoxystrobin	9.6	404.00	372.00	10	344.00	20	Positive
Bifenazate	10.2	301.10	198.20	10	169.90	20	Positive
Bitertanol	10.2	338.20	269.20	5	99.10	10	Positive
Boscalid	9.7	343.00	307.10	16	272.10	32	Positive
Bromuconazole	9.5	378.00	159.00	20	70.00	20	Positive
Bupirimate	8.6	317.00	272.00	20	166.00	20	Positive
Buprofezin	10.1	306.00	201.00	10	116.00	15	Positive
Carbaryl	7.4	202.00	145.00	10	127.00	20	Positive
Carbendazim	1.2	192.00	160.00	15	132.00	20	Positive
Carbendazim-d3 (I.S)	1.2	195.10	159.80	20	131.90	20	Positive
Chlorantraniliprol	8.6	483.90	452.90	16	285.90	8	Positive
Chlorfenvinphos	10.8	358.90	155.00	8	99.20	28	Positive
Chlorpyrifos-methyl	11.7	321.90	289.90	14	125.00	16	Positive
Chlorpyrifos	12.9	352/349.93	200.00	20	198.00	20	Positive
Clofentezin	11.4	303.00	138.00	12	102.00	40	Positive
Clomazone	8.6	240.10	127.80	10	124.90	20	Positive
Coumaphos	11.4	363.00	307.00	20	227.00	28	Positive
Cyazofamid	11.1	325.00	261.20	10	108.10	15	Positive
Cymoxanil	5.0	199.10	128.00	4	110.90	12	Positive
Cyproconazole	9.1	292.10	125.00	32	70.00	16	Positive
Cyprodinil	8.0	226.20	92.90	40	76.90	40	Positive
Cyromazine	0.9	167.00	125.00	15	59.90	20	Positive
Demeton-S-methylsulfone	2.3	263.02	169.00	12	109.00	24	Positive
Demeton-S-methylsulfoxide	1.4	247.00	169.00	8	109.00	24	Positive
Diazinon	11.4	305.00	169.00	15	153.00	20	Positive
Diclorvos	6.5	220.80	108.80	15	78.90	30	Positive
Diclorvos-d6 (I.S)	7.8	226.90	132.90	20	115.00	20	Positive
Dicrotophos	2.0	238.09	112.10	8	72.10	28	Positive
Diethofencarb	9.2	268.00	226.00	5	180.00	15	Positive
Difenoconazole	10.9	406.00	337.00	15	251.00	20	Positive
Diflubenzuron	10.1	311.00	158.00	8	141.00	32	Positive
Dimethoate	4.2	230.00	199.00	5	171.00	10	Positive
Dimethoate-d6 (I.S)	4.2	236.00	205.00	4	131.00	16	Positive
Dimethomorph	8.7	388.00	301.00	20	165.00	20	Positive
Diniconazole	10.5	326.10	159.00	28	70.00	28	Positive
Dodine	8.6	228.20	60.10	20	57.20	20	Positive
Emamectin B1a	9.6	886.50	158.10	40	81.80	50	Positive
EPN	12.0	324.05	296.01	10	156.99	20	Positive
Epoxiconazole	9.6	330.10	121.00	16	101.20	52	Positive
Ethion	13.3	385.10	199.00	5	171.00	10	Positive
Ethirimol	2.5	210.16	140.10	20	43.10	52	Positive
Ethoprophos	9.8	243.10	130.90	15	97.00	30	Positive
Fenamidone	9.7	312.00	92.20	28	65.10	56	Positive
Fenamiphos	9.5	304.10	234.00	12	217.10	20	Positive
Fenamiphos-sulfone	6.9	336.10	266.00	16	188.00	24	Positive
Fenamiphos-sulfoxide	5.8	320.11	292.10	8	108.10	44	Positive
Fenarimol	9.3	331.00	268.00	20	259.00	20	Positive
Fenazaquin	12.5	307.30	161.30	15	147.20	15	Positive
Fenbuconazole	10.1	337.10	125.10	40	70.00	33	Positive
Fenhexamid	9.7	302.00	97.00	25	55.00	30	Positive
Fenoxycarb	10.3	302.20	116.20	5	88.20	20	Positive
Fenpropimorph	7.6	304.30	147.10	30	130.00	25	Positive
Fenpyrazamine	10.0	332.20	272.10	10	230.20	20	Positive
Fenpyroximate	13.1	422.21	366.20	12	107.00	64	Positive
Fenthion	11.2	279.00	247.10	8	169.10	12	Positive
Fenthion-sulfoxide	7.1	295.02	280.00	16	109.00	32	Positive
Fipronil	11.2	434.90	329.90	12	249.90	28	Negative
Fluazifop	9.2	328.20	282.20	15	254.20	20	Positive
Flubendiamide	11.1	680.90	273.90	15	254.00	20	Negative
Fludioxonil	9.3	247.00	169.00	32	152.00	32	Negative
Flufenacet	10.6	364.10	194.10	15	152.00	15	Positive
Flufenoxuron	12.9	489.10	158.00	20	140.90	56	Positive
Fluopyram	10.1	397.10	208.00	20	173.10	20	Positive
Fluquinconazole	9.7	376.00	307.10	24	108.00	56	Positive
Flusilazol	10.1	316.10	247.10	12	165.00	24	Positive
Flutriafol	7.6	302.10	95.00	56	70.10	16	Positive
Formetanate	1.0	222.13	165.10	8	65.10	52	Positive

Table 1 (Continued)

Compound	Retention time (min)	Precursor Ion	1st transition		2nd transition		Polarity
			Product ion	CE ^a	Product ion	CE ^a	
Fosthiazate	7.6	284.00	227.80	10	103.80	20	Positive
Haloxypop	10.3	362.10	316.20	12	288.10	24	Positive
Hexaconazole	10.2	314.10	159.00	30	70.10	20	Positive
Hexythiazox	13.0	353.10	228.20	10	168.20	20	Positive
Imazalil	6.4	297.00	255.00	15	159.00	20	Positive
Imidacloprid	3.8	256.00	209.00	15	175.00	15	Positive
Indoxacarb	12.2	528.10	218.00	20	203.00	45	Positive
Ioxonil	8.4	369.80	214.80	30	126.80	30	Negative
Iprovalicarb	9.5	321.20	202.90	0	119.00	16	Positive
Isofenfos-methyl	11.6	231.00	199.00	15	121.00	15	Positive
Isoprocarb	8.2	194.10	152.00	5	95.10	15	Positive
Isoxalutole	9.7	360.00	250.90	15	219.70	50	Positive
Kresoxim-methyl	11.0	314.10	267.00	0	222.10	10	Positive
Linuron	9.1	249.02	160.10	20	133.00	36	Positive
Lufenuron	12.6	508.90	339.00	10	325.90	10	Negative
Malathion	10.4	331.00	127.00	10	99.00	20	Positive
Malathion-d10 (1.5)	10.3	341.11	132.00	12	100.00	24	Positive
Mandipropamid	9.8	412.13	356.10	4	328.10	8	Positive
MCPA	7.9	199.00	154.60	5	140.70	10	Negative
Mepanpyrim	9.7	224.10	206.80	10	190.60	20	Positive
Meptyldinocap	13.8	295.10	193.00	42	163.00	50	Negative
Metalaxyl	7.8	280.30	220.00	5	192.40	10	Positive
Metconazole	10.3	320.10	125.00	48	70.10	24	Positive
Methamidophos	1.1	142.10	125.00	10	94.10	10	Positive
Methidathion	9.1	302.90	145.00	0	85.10	15	Positive
Methiocarb	9.0	226.10	121.10	12	169.00	5	Positive
Methiocarb-sulfoxide	2.8	242.00	185.00	10	170.00	20	Positive
Methomyl	2.0	163.10	106.00	4	88.00	0	Positive
Methoxyfenozide	10.2	369.30	149.00	15	133.00	20	Positive
Metobromuron	8.1	259.00	170.00	15	148.00	10	Positive
Monocrotophos	1.7	224.20	193.10	5	127.00	10	Positive
Myclobutanil	9.6	289.20	125.10	20	70.20	15	Positive
Nitempyram	1.5	271.00	225.00	10	99.00	10	Positive
Omethoate	1.2	214.10	183.00	5	125.00	20	Positive
Oxadixyl	6.2	279.10	219.20	5	132.30	32	Positive
Oxamyl	1.7	237.00	90.00	5	72.00	10	Positive
Paclbutrazol	8.9	294.10	125.20	36	70.10	16	Positive
Paraoxon-methyl	6.3	247.80	201.90	15	108.70	30	Positive
Penconazole	10.2	284.00	159.00	20	70.00	15	Positive
Pencycuron	11.7	329.10	125.10	24	89.10	60	Positive
Pendimethalin	13.0	282.10	212.10	4	194.10	16	Positive
Phenthoate	11.4	321.00	247.10	4	79.10	44	Positive
Phosalone	11.8	368.00	182.00	8	110.90	44	Positive
Phosmet	9.4	317.99	160.00	8	133.00	36	Positive
Phoxim	11.9	299.00	129.10	4	77.10	24	Positive
Pirimicarb	2.5	239.20	182.10	15	72.20	20	Positive
Pirimicarb-desmethyl	1.4	225.10	168.10	8	72.10	20	Positive
Pirimiphos-methyl	11.2	306.20	164.20	20	108.20	20	Positive
Prochloraz	8.8	376.00	308.00	10	266.00	15	Positive
Profenofos	12.0	374.90	347.00	5	304.90	15	Positive
Propamocarb	1.1	189.20	144.10	10	102.10	15	Positive
Propaquizafop	12.2	444.10	371.00	15	99.90	20	Positive
Propargite	13.5	368.10	231.20	0	175.20	8	Positive
Propiconazole	10.4	342.10	159.00	32	69.10	16	Positive
Propoxur	7.0	210.11	168.10	5	111.10	10	Positive
Propyzamide	9.8	256.00	190.00	10	173.00	20	Positive
Proquinazid	13.2	373.00	331.00	20	289.10	20	Positive
Prothioconazole	10.4	341.90	306.10	15	99.80	20	Negative
Prothiofos	14.2	345.00	241.00	20	161.00	40	Positive
Pymetrozine	0.9	218.11	105.00	20	51.00	60	Positive
Pyraclostrobin	11.4	388.11	193.80	8	163.10	20	Positive
Pyrethrin	13.6	329.21	161.00	5	143.00	20	Positive
Pyridaben	13.8	365.20	309.20	10	147.30	20	Positive
Pyridate	14.6	379.10	351.10	5	206.80	10	Positive
Pyrimethanil	6.3	200.00	183.00	20	107.00	20	Positive
Pyriproxyfen	12.6	322.00	185.00	20	96.00	10	Positive
Quinoclamine	6.1	208.00	105.10	25	77.00	40	Positive
Quinoxifen	11.7	308.10	271.90	25	196.90	35	Positive
Quizalofop-ethyl	12.1	373.09	271.20	24	255.10	36	Positive
Rotenone	10.4	395.00	213.10	20	192.10	20	Positive
Spinosyn A	8.7	732.50	142.00	20	98.00	20	Positive
Spinosyn D	9.1	746.50	142.00	20	98.00	20	Positive
Spirodiclofen	14.2	411.10	313.00	5	71.20	15	Positive
Spiromesifen	14.1	371.00	273.00	5	255.00	20	Positive

Table 1 (Continued)

Compound	Retention time (min)	Precursor ion	1st transition		2nd transition		Polarity
			Product ion	CE ^a	Product ion	CE ^a	
Spirotetramat	9.3	374.20	330.30	15	270.10	20	Positive
Spiroxamine	7.6	298.00	144.00	20	100.00	20	Positive
Tebuconazole	9.9	308.00	125.00	20	70.00	20	Positive
Tebufenozide	10.9	353.20	296.90	5	133.10	15	Positive
Tebufenpyrad	12.1	334.20	145.10	20	117.00	47	Positive
Teflubenzuron	11.7	379.00	359.00	0	339.00	4	Negative
Terbutylazine	9.0	230.00	174.00	15	146.00	20	Positive
Tetraconazole	10.0	372.00	159.00	36	70.00	20	Positive
Thiabendazol	1.3	202.00	175.00	30	131.00	40	Positive
Thiacloprid	5.5	253.00	186.00	10	126.00	20	Positive
Thiamethoxam	2.4	292.00	211.00	10	181.00	20	Positive
Thiobencarb	11.5	258.00	124.70	15	99.90	10	Positive
Thiodicarb	6.9	355.06	108.10	8	88.10	8	Positive
Tolclofos-methyl	11.7	300.90	269.00	10	125.00	15	Positive
Triadimenol	9.0	296.00	227.00	5	70.00	10	Positive
Triazophos	10.4	314.10	286.20	10	162.20	20	Positive
Trichlorfon	3.0	256.90	221.00	4	109.00	12	Positive
Trifloxystrobin	12.2	409.20	206.20	10	186.20	20	Positive
Triflumuron	11.1	359.00	156.00	8	139.00	32	Positive
Triticonazole	9.0	318.10	125.20	41	70.20	33	Positive
Zoxamide	11.3	336.00	187.00	16	159.00	44	Positive

^a CE: collision energy (V).

as average peak areas of five replicates of spiked blank olive oil samples at 10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The mixture solution containing all the pesticides was added to the blank olive oil sample and shaken during 30 min in order to obtain a homogeneous sample due to insolubility of the acetonitrile in the oil. The linearity was evaluated by assessing signal responses of the target analytes from procedural standard calibration by spiking blank samples of olive oil at five concentration levels from 10 to 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Matrix effect was calculated by comparison of the slopes obtained from analytical curves prepared in acetonitrile and in blank olive oil using the following equation:

$$\text{Matrix effect (\%)} = \left[\left(\frac{\text{slope analytical curve in matrix}}{\text{slope analytical curve in matrix acetonitrile}} \right) - 1 \right] \times 100$$

The linearity was accessed also for other two oils, sunflower and soya, and compared with the results obtained from olive oil. This procedure was done to verify the behavior of analytes in different types of oil in order to evaluate if it is possible to quantify residues of different oils with the same calibration curve.

The limit of quantification (LOQ) for each pesticide was settled as the lowest fortified concentration in blank olive oil samples that could be quantified with acceptable accuracy and precision as preconized by Document No. SANTE/11945/2015 [17].

3. Results and discussion

3.1. Clean-up evaluation

In this study a procedure of low temperature precipitation (freezing-out) was evaluated before clean-up employing various sorbents and combination of sorbents.

Primary–secondary amine (PSA) is a well know clean-up sorbent employed when removal of fat content is necessary. The chemical structure of PSA provides high retention of free fatty acids and other polar matrix compounds [18]. Z-sep is a mixture of two sorbents, C18 and silica, coated with zirconium dioxide. Distinct classes of active sites make the lipid removal efficient when this sorbents is used [19]. Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal Lipid (EMR-Lipid) is the new generation of sample preparation products for dispersive solid phase extraction (d-SPE) employed for highly selective matrix removal without impacting analyte recovery, especially for high-fat samples [20].

Blank samples of olive oil were spiked with the mixture of analytes at 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, extracted, allowed to freezing out procedure and submitted to clean-up step. For clean-up using PSA, 2 mL of the extract was purified using 300 mg of magnesium sulfate and 50 mg of PSA; for clean-up employing Z-sep (d-SPE), 2 mL of extract were mixed with 500 mg of magnesium sulfate and 50 mg of Z-sep sorbent; for clean-up using Z-sep (cartridge SPE), 1 mL of extract was passed through a cartridge containing 40 mg of Z-sep solid and the collected fraction in acetonitrile was analyzed; for clean-up employing EMR-Lipid, the purification was done as described in Section 2.3. Fig. 1 shows the recoveries and mean relative standard deviation obtained for all clean-up methods evaluated at 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In terms of recovery Z-sep using cartridges SPE showed the worst results with almost 40% of the pesticides no recovered properly followed by Z-sep using dispersive clean-up. When PSA and EMR were employed the best results were obtained, but PSA showed a mean RSD of 15%. For the EMR method none of the pesticides was completely lost and more compounds showed recovery percentage between 70 and 120% and mean RSD of 7%.

To evaluate the effectiveness of clean-up procedure the blank sample of olive oil was extracted employing EMR-Lipid clean-up and analyzed in a LC-QToF system (6530 Accurate Mass QTOF-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) in full scan mode. To obtain the number of co-extractives present in the matrix the data were processed employing MassHunter software. The results can be accessed by visual comparison of full scan chromatograms in Fig. 2, where is possible to see the differences between the full scan chromatograms for each clean-up procedure. Fig. 3 shows the matrix components present in olive oil extract related to its retention times when evaluated the different clean-up procedures employed. As can be seen in Fig. 3, the EMR is the clean-up procedure where more co-extractives are present, but with the best recoveries results as well as acceptable levels for routine analysis. Taking these results into account, the EMR method was chosen as clean-up procedure for pesticide determination in olive oil.

3.2. Validation

3.2.1. Accuracy (recovery), precision and repeatability

In order to assess accuracy and precision, blank samples of olive oil were spiked with the pesticide mixture at 10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ with five replicates of each concentration. Table 2 shows the

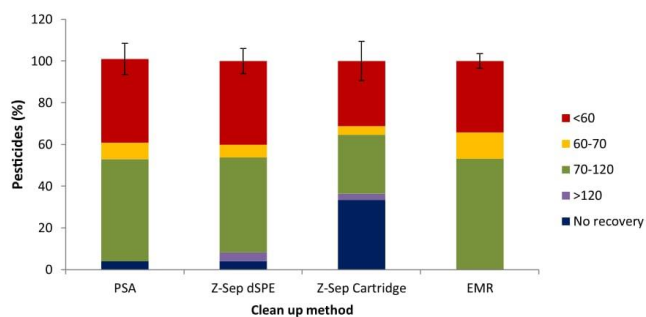


Fig. 1. Recovery (%) and RSD (%) for the pesticides determined by LC-QqQ-MS/MS employing four different clean-up methods.

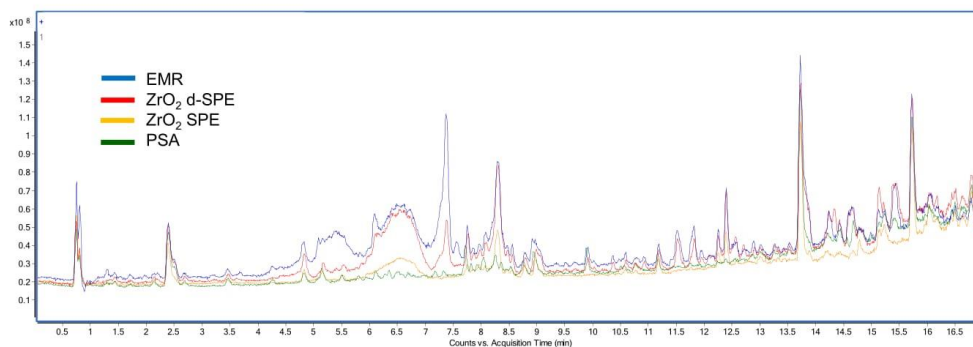


Fig. 2. LC-QToF full scan chromatograms from olive oil extracts employing different clean-up procedures.

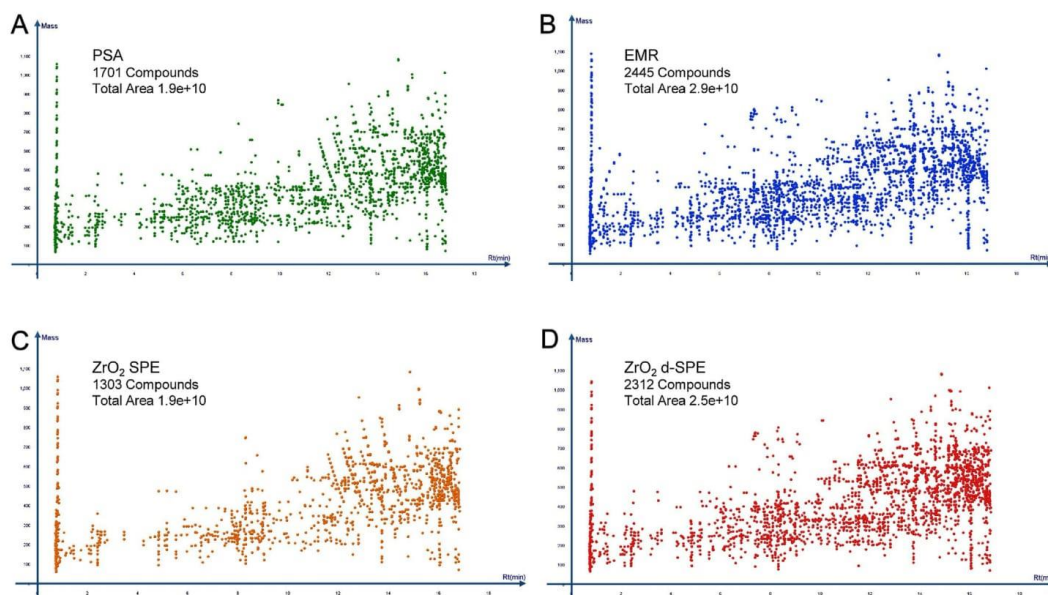


Fig. 3. Matrix components of olive oil when extracted employing PSA (A), EMR-Lipid (B), ZrO₂ cartridges SPE (C) and ZrO₂ dispersive SPE. Each point corresponds to one matrix component.

Table 2Recoveries, relative standard deviation at 10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (n=5) and LOQ for the pesticides spiked in blank olive oil sample.

Compound	Spike level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	
2,4-D	19	11	18	18	14	15	10
Acephate	48	47	46	7	69	6	20
Acetamiprid	116	2	94	8	91	2	10
Aldicarb	97	2	102	4	102	6	10
Aldicarb sulfone	144	7	100	13	90	5	10
Aldicarb sulfoxide	91	6	73	9	74	8	10
Azinphos-methyl	95	12	87	12	79	5	10
Azoxystrobin	100	8	103	8	110	3	10
Bifenazate	40	23	53	9	63	11	20
Bitertanol	59	11	61	7	61	8	10
Boscalid	89	4	74	5	85	3	10
Bromuconazole	60	10	60	7	57	7	10
Bupirimate	76	8	73	6	73	5	10
Buprofezin	51	6	50	9	48	4	10
Carbaryl	97	11	88	6	80	4	10
Carbendazim	37	11	38	6	41	6	10
Chlorantraniliprol	95	8	85	6	84	3	10
Chlorfenvinphos	92	6	82	10	83	7	10
Chlorpyrifos-methyl	76	13	58	11	57	4	10
Chlorpyrifos	57	13	48	6	51	2	10
Clofentezin	61	10	54	5	57	4	10
Clomazone	82	5	83	7	71	4	10
Coumaphos	87	8	87	8	80	7	10
Cyazofamid	108	10	94	5	119	3	10
Cymoxanil	101	3	104	6	101	3	10
Cyproconazole	56	4	53	7	58	6	10
Cyprodinil	34	7	37	5	37	4	10
Cyromazine	0	17	1	56	1	33	50
Demeton-S-methylsulfone	105	6	100	6	113	3	10
Demeton-S-methylsulfoxide	17	19	16	14	24	15	10
Diazinon	68	7	65	7	67	5	10
Diclorvos	84	7	104	6	93	5	10
Diclotophos	70	10	75	5	80	7	10
Diethofencarb	92	8	89	5	87	4	10
Difenoconazole	70	7	69	5	66	5	10
Diflubenzuron	96	11	72	15	82	6	10
Dimethoate	115	5	105	8	95	3	10
Dimethomorph	107	6	88	7	86	6	10
Diniconazole	43	9	49	7	49	7	10
Dodine	2	17	2	74	1	54	50
Emamectin B1a	2	16	3	46	7	31	10
EPN	56	20	70	11	62	14	10
Epoxiconazole	89	5	85	8	78	8	10
Ethion	67	21	73	4	69	4	10
Ethirimol	7	11	10	38	17	24	50
Ethoprophos	74	3	72	9	68	4	10
Fenamidone	86	6	88	5	91	4	10
Fenamiphos	87	8	87	6	85	6	10
Fenamiphos – sulfone	93	3	89	7	95	5	10
Fenamiphos – sulfoxide	15	13	13	12	18	17	10
Fenarimol	58	9	51	6	51	6	10
Fenazaquin	20	23	22	7	22	3	10
Fenbuconazole	90	8	78	12	85	8	10
Fenhexamid	65	5	63	12	56	7	10
Fenoxycarb	88	6	76	8	79	3	10
Fenpropimorph	51	13	50	19	72	8	10
Fenpyrazamine	102	7	96	6	92	4	10
Fenpyroximate	48	27	50	6	49	4	10
Fenthion	65	15	75	11	70	10	10
Fenthion sulfoxide	117	4	101	5	93	4	10
Fipronil	102	5	103	8	100	2	10
Fluazifop	80	10	72	10	77	3	10
Flubendiamide	102	4	100	3	101	5	10
Fludioxonil	90	3	104	8	90	8	10
Flufenacet	97	8	91	5	92	2	10
Flufenoxuron	83	8	84	9	79	7	10
Fluopyram	107	6	100	9	93	5	10
Fluquinconazole	85	13	74	9	76	9	10
Flusilazol	84	8	71	7	76	4	10
Flutriafol	63	7	66	4	72	7	10
Formetanate	18	10	19	23	40	13	10
Fosthiazate	101	6	94	9	93	5	10

Table 2 (Continued)

Compound	Spike level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	
Haloxyfop	83	8	76	9	87	11	10
Hexaconazole	36	16	41	5	45	9	10
Hexythiazox	35	18	38	7	36	3	10
Imazalil	23	12	27	25	46	15	10
Imidacloprid	116	5	94	7	96	3	10
Indoxacarb	100	6	100	8	97	9	10
Ioxonil	68	4	63	6	60	4	10
Iprovalicarb	92	8	85	7	88	7	10
Isofenfos methyl	93	7	86	5	79	3	10
Isoprocab	101	4	86	3	75	2	10
Isoxaflutole	118	4	117	8	104	6	10
Kresoxim methyl	100	4	92	9	85	5	10
Linuron	78	5	82	8	68	7	10
Lufenuron	72	26	86	9	84	3	10
Malathion	108	5	94	7	101	4	10
Mandipropamid	125	10	115	6	104	3	10
MCPA	25	14	0	30	21	18	50
Mepanpyrim	65	15	62	7	58	3	10
Meptydinocap	16	42	18	15	38	9	20
Metalaxyl	91	8	86	8	95	5	10
Metconazole	52	9	49	5	51	6	10
Methamidophos	57	8	56	9	48	4	10
Methidathion	100	6	93	5	72	7	10
Methiocarb	82	4	79	7	72	7	10
Methiocarb sulfoxide	94	4	88	7	90	4	10
Methomyl	106	5	98	7	100	3	10
Methoxyfenozide	109	6	92	12	95	5	10
Metobromuron	83	1	78	5	71	2	10
Monocrotophos	120	6	96	6	77	5	10
Myclobutamil	85	7	82	7	82	3	10
Nitempyram	29	5	24	13	34	7	10
Omethoate	64	14	55	7	63	5	10
Oxadixyl	106	3	100	5	108	2	10
Oxamyl	134	6	102	10	89	5	10
Pacllobutrazol	75	6	71	6	73	6	10
Paraoxon methyl	112	10	104	9	100	6	10
Penconazole	59	7	56	10	62	5	10
Pencycuron	65	11	61	5	59	4	10
Pendimethalin	42	18	46	7	47	5	10
Phenthoate	93	10	80	9	79	7	10
Phosalone	74	16	70	3	80	11	10
Phosmet	123	2	106	3	91	5	10
Phoxim	89	11	83	11	88	6	10
Pirimicarb	80	5	76	6	81	3	10
Pirimicarb, desmethyl-	50	10	48	5	57	5	10
Pirimiphos-methyl	67	6	64	7	63	4	10
Prochloraz	53	7	54	6	57	4	10
Profenofos	58	9	54	4	49	6	10
Propamocarb	2	20	3	52	6	26	50
Propaquizafop	69	21	71	7	73	3	10
Propargite	64	36	79	7	66	11	20
Propiconazole	66	15	66	6	65	4	10
Propoxur	110	3	94	9	92	3	10
Propyzamide	82	5	82	8	72	4	10
Proquinazid	17	20	18	6	17	5	10
Prothioconazole	2	65	4	48	4	23	50
Prothiofos	31	34	38	35	30	11	50
Pymetrozine	0	0	0	0	3	17	50
Pyraclostrobin	87	7	80	9	75	5	10
Pyrethrin	56	27	64	7	56	4	20
Pyridaben	33	34	36	6	38	5	20
Pyridate	31	43	29	25	20	16	50
Pyrimethanil	53	4	41	8	47	6	10
Pyriproxyfen	41	18	44	7	43	3	10
Quinoclamine	147	16	90	22	68	7	10
Quinoxifen	23	16	24	6	22	5	10
Quizalofop-ethyl	65	11	64	7	63	3	10
Rotenone	84	5	90	9	77	5	10
Spinosyn A	23	12	26	29	44	17	10
Spinosyn D	24	16	26	28	45	17	10
Spirodiclofen	59	5	60	6	56	6	10
Spiromesifen	75	25	77	10	69	5	10
Spirotetramat	98	7	86	8	90	6	10

Table 2 (Continued)

Compound	Spike level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	
Spiroxamine	50	9	46	16	68	10	10
Tebuconazole	51	10	57	6	56	7	10
Tebufenozide	103	5	93	6	92	4	10
Tebufenpyrad	46	13	50	4	44	4	10
Teflubenzuron	60	11	65	7	68	4	10
Terbutylazine	60	4	62	4	58	4	10
Tetraconazole	93	5	92	5	94	5	10
Thiabendazol	32	7	33	9	44	9	10
Thiacloprid	109	2	98	3	101	2	10
Thiamethoxam	112	7	94	8	96	4	10
Thiobencarb	49	6	51	9	44	5	10
Thiodicarb	111	5	103	5	104	4	10
Tolclofos-methyl	63	7	58	17	56	11	10
Triadimenol	67	6	69	7	69	7	10
Triazophos	105	5	87	5	88	7	10
Trichlorfon	102	4	94	5	93	5	10
Trifloxystrobin	100	8	95	4	93	5	10
Triflumuron	77	7	77	8	75	5	10
Triticonazole	48	5	48	7	56	10	10
Zoxamide	84	6	78	3	70	3	10

recovery, RSD% and method LOQ results for the pesticides quantified by matrix matched calibration. As can be seen in the Table 2, the mean recovery for all spike levels was about 70% with mean RSD% of 11, 10 and 7 for the levels 10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The majority of compounds that did not fulfill the requirements for recovery demonstrated good RSD values, most of them lower than 10%. Taking these results into account, the linearity studies as well as evaluation of real samples were done applying procedural standard calibration approach (PSC), an alternative type of calibration that can compensate for low extraction recoveries and matrix effects [17].

Repeatability was evaluated by preparing standards solutions in olive oil blank extract at 10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and injected 5 times. As can be observed in Table S1 (see in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.072>), all pesticides showed a RSD $\leq 20\%$ for the three evaluated concentrations and excellent reproducibility making the use of procedural standard calibration feasible.

3.2.2. Calibration curves, linearity and matrix effect

Linearity of analytical curves was evaluated via procedural standard calibration (PSC) by spiking blank olive oil portions at 10, 20, 50, 100 and 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. From the 165 evaluated pesticides, 154 (93%) showed correlation coefficient (r^2) ≥ 0.99 for analytical curves evaluated using procedural standard calibration approach. However, the other 11 compounds showed $r^2 \geq 0.98$ demonstrating the good linearity of the method in the range from 10 to 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. For analytical curves solutions in acetonitrile, just prothioconazole and pymetrozine showed $r^2 < 0.99$, both had $r^2 = 0.98$.

The same procedure (PSC) was applied for sunflower and soya oil in order to check the behavior of the analytes in different oils. For soya oil only six compounds showed $r^2 < 0.99$ but higher than 0.98. For sunflower oil, six compounds showed r^2 between 0.97 and 0.99 and all other compound demonstrated correlation coefficient > 0.99 . For all analytical curves evaluated in all oils the residuals were $< 20\%$.

For matrix effect evaluation, results obtained for analytical curves prepared in matrix extract by PSC for all oils studied were compared. As expected, the matrix effect was very similar among all oils studied as can be seen in Fig. 4 and in Table S1 (see in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.072>). In the Table S1 (see in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.072>), the pesticides were grouped according to their chemical group in order to demonstrate the behavior of the different pesticides classes when evaluated in different oils. Taking the results obtained is possible to see the similarities of signals among all different oils and, with this, the quantification of pesticides is possible to be done with the same analytical curve for any oil.

org/10.1016/j.chroma.2016.07.072), the pesticides were grouped according to their chemical group in order to demonstrate the behavior of the different pesticides classes when evaluated in different oils. Taking the results obtained is possible to see the similarities of signals among all different oils and, with this, the quantification of pesticides is possible to be done with the same analytical curve for any oil.

3.2.3. Analysis of real samples

In order to apply the developed method in real samples, 15 samples (9 of olive oil, 3 of soya oil and 3 of sunflower oil) were purchased from local markets in Almería city, southeastern of Spain. Two samples of olive oil came from farmers that produce their own oil. From 9 olive oil samples from supermarket (extra virgin oil), four showed no contamination by any evaluated pesticide. In the other five at least one pesticide was found being dimethoate found in five samples. With exception of one sample that was contaminated with chlorpyrifos at 11 $\mu\text{g kg}^{-1}$ all the other five olive oil samples showed contamination below the method limit of quantification (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$). From the domestic olive oil samples, one of them showed contamination by phosmet at 194 $\mu\text{g kg}^{-1}$, tetraconazol at 31 $\mu\text{g kg}^{-1}$, chlorpyrifos at 23 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and fluopyran at 22 $\mu\text{g kg}^{-1}$, besides tebuconazol where the residue was found below the limit of quantification of 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The other domestic olive oil was contaminated with chlorpyrifos methyl at 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

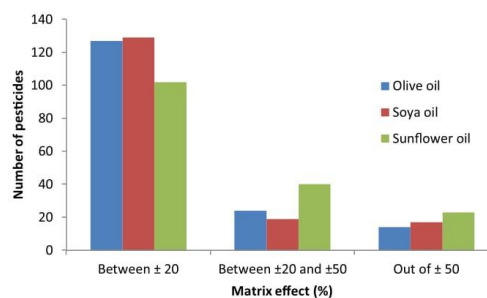


Fig. 4. Matrix effect evaluated by comparing slopes obtained from analytical curves prepared in acetonitrile and in matrix extract by procedural standard calibration.

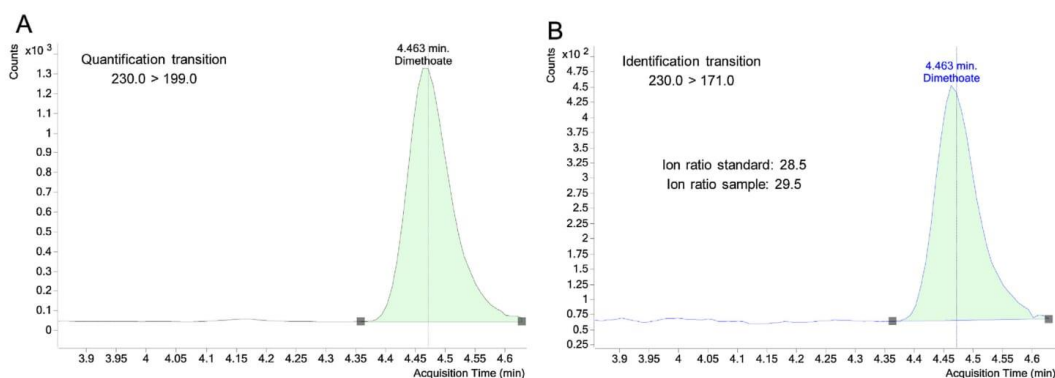


Fig. 5. SRM transitions peaks for dimethoate found in samples showing (A) quantification transition and (B) identification transition as well as ion ratio.

besides diazinon, dimethoate and pyriproxyfen below the LOQ. Dimethoate was the most found compound in olive oil samples but below the LOQ. Despite of that, in Fig. 5 is possible to see that despite the signal was below the LOQ the peak shape, quantification and confirmation transitions, retention time and ion ratio matched the criteria for quantification, demonstrating the good performance of the method.

For sunflower oil (three samples) no contamination was registered by any of the evaluated pesticides. On the other hand for soya oil, from three evaluated samples two of them showed contamination by azoxystrobin below the LOQ. For the other sample, no contamination was observed.

4. Conclusions

A multiresidue method for the determination of 165 pesticides in edible oils (olive oil, sunflower oil and soya oil) employing low temperature precipitation procedure and clean-up using Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) was developed and validated allowing quantification levels of $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ for 91% of studied compounds. The use of EMR-Lipid in combination with freezing-out showed important advantages such as more pesticides with recovery between 70 and 120% range and no pesticide losses when compared with other clean-up procedures evaluated in this study such as PSA and Z-sep sorbent. The EMR-Lipid showed as the only drawback the use of more extract (5 mL) for clean-up procedure when compared to the other approaches. Validation was done using procedural standard calibration approach (PSC), an alternative type of calibration that compensate for recovery losses, showing good results. The method was employed to analyze 15 samples of oils sold in supermarkets as well as two domestic olive oil samples.

Acknowledgements

The authors acknowledge funding support from the European Commission, DG SANTE (Specific Agreement No. 7 to Framework Partnership Agreement No. SANCO/2005/FOOD SAFETY/0025-Pesticides in fruit and vegetables)

References

- [1] E. Gimeno, M. Fitó, R.M. Lamuela-Raventós, A.I. Castellote, M. Covas, M. Farré, M.C. de la Torre-Boronat, M.C. López-Sabater, Effect of ingestion of virgin olive

oil on human low-density lipoprotein composition, *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 (2002) 114–120.

- [2] International olive oil council, Olive Oil Statistics in Europe, 2015, <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=es.ES> (accessed 02.03.16).
- [3] M.D. Hernando, C. Ferrer, M. Ulaszewska, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba, 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.
- [4] B. Reichert, I.R. Pizzutti, I.I. Costabeber, A. Uclés, S. Herrera, A.R. Fernández-Alba, Validation and application of micro flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams, *Talanta* 134 (2015) 415–424.
- [5] S.C. Cunha, S.J. Lehotay, K. Mastovska, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, Sample preparation approaches for the analysis of pesticide residues in olives and olive oil, in: V.R. Preedy, R.R. Watson (Eds.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Elsevier Inc., Oxford, 2010, pp. 653–666.
- [6] S.J. Lehotay, K. Mastovska, S.J. Yun, Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrices, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 630.
- [7] M. Castillo, C. Gonzalez, A. Miralles, An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC–MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 1315.
- [8] O. Shimelis, Y. Yang, K. Stenerson, T. Kaneko, M. Ye, Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 18.
- [9] T.D. Nguyen, M.H. Lee, G.H. Lee, 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, *Microchem. J.* 95 (2010) 113–119.
- [10] P. Deme, T. Azmeera, B.L.A.P. Devi, P.R. Jonnalagadda, R.B.N. Prasad, U.V.R.V. Sarathi, An improved dispersive solid-phase extraction clean-up method for the gas chromatography–negative chemical ionization tandem mass spectrometric determination of multiclass pesticide residues in edible oils, *Food Chem.* 142 (2014) 144–151.
- [11] F. Hernández, O.J. Pozo, L. Bijlsma, M. Barreda, E. Pitarch, Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 242–252.
- [12] D. Moreno-González, J. Huertas-Pérez, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, 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.
- [13] T. Tuzimski, T. Rejczak, Application of HPLC–DAD after SPE/QuEChERS with ZrO_2 -based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils, *Food Chem.* 190 (2016) 71–79.
- [14] M.D. Hernando, C. Ferrer, M. Ulaszewska, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba, 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.
- [15] I.R. Pizzutti, A. de Kok, R. Zanella, M.B. Adaimo, M. Hiemstra, C. Wickert, O.D. Pestes, Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

- using positive and negative electrospray ionization, *J. Chromatogr. A* 1142 (2007) 123–136.
- [16] H. Ohakawa, H. Miyagawa, P.W. Lee, *Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, 2007.
- [17] European Commission DG-SANTE, *Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed*, No. SANTE/11945/2015, 2016.
- [18] O. Shimelis, Y. Yang, K. Stenerson, T. Kaneko, M. Ye, Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 18–25.
- [19] L. Rajsiki, A. Lozano, A. Uclés, C. Ferrer, A.R. Fernández-Alba, Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1304 (2013) 109–120.
- [20] Agilent Technologies, *Enhanced Matrix Removal Lipid*, 2015, <https://www.agilent.com/en-us/products/sample-preparation/sample-preparation-methods/quechers/enhanced-matrix-removal-lipid> (accessed 02.03.16).

ANEXO A – Principais solventes utilizados em cromatografia e suas características (Adaptado da Farmacopéia Brasileira 5ª ed. 2005)

Solvente	Índice de Polaridade	Fórmula	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Índice de refração	Ponto de Ebulição (°C)	Pressão de vapor (mbar 20 °C)	Constante dielétrica	Momento Dipolo
n-Heptano	-	C ₇ H ₁₆	100,21	1,388	98,4	48	-	-
n-Hexano	0,0	C ₆ H ₁₄	86,18	1,375	58,9	160	1,9	0
Ciclohexano	0,0	C ₆ H ₁₂	84,16	1,427	80,7	104	2,0	0
Isso-octano	0,4	C ₈ H ₁₈	114,23	1,392	99,2	-	1,9	-
Tetracloro de carbono	1,7	CCl ₄	153,82	1,460	76,5	120	2,2	0
Tolueno	2,3	C ₆ H ₅ CH ₃	92,14	1,496	110,6	29	2,4	0,36
Clorofórmio	4,4	CHCl ₃	119,38	1,446	61,7	210	4,8	1,01
Dicloreto de etileno	3,7	ClCH ₂ CH ₂ Cl	98,96	1,445	83,5	87	10,6	-
Cloreto de metileno	3,4	CH ₂ Cl ₂	84,93	1,424	40,0	453	9,1	1,60
1-Butanol	3,9	CH ₃ (CH ₂) ₃ OH	74,12	1,399	117,2	-	17,8	1,66
Acetonitrila	6,2	CH ₃ CN	41,05	1,344	81,6	-	37,5	3,92
Álcool Isopropílico	4,3	CH ₃ CH(OH)CH ₃	60,11	1,378	82,4	43	18,3	1,66
Acetato de etila	4,3	CH ₃ COOC ₂ H ₅	88,12	1,372	77,1	97	6,0	1,78
Acetona	5,4	CH ₃ COCH ₃	58,08	1,359	56,2	233	20,7	2,88
Etanol	5,2	C ₂ H ₅ OH	46,07	1,361	78,5	59	24,3	1,70
Dioxano	4,8	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	1,422	101,0	41	2,2	-
Tetraidrofurano	4,2	C ₄ H ₈ O	72,11	1,405	67,0	200	7,4	1,63
Metanol	6,6	CH ₃ OH	32,04	1,329	65,0	128	32,6	1,70
Água	9,0	H ₂ O	18,01	1,333	100,0	23	80,2	1,85