



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

JANICE DE FÁTIMA FACCO

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MILHO
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS**

Santa Maria - RS

2017

Janice de Fátima Facco

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MILHO
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**.

Orientadora: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS

2017

Janice de Fátima Facco

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MILHO
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS**

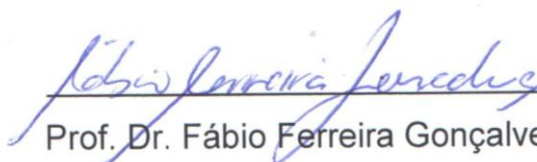
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**.

Aprovada em 22 de setembro de 2017:



Prof. Dr. Renato Zanella (UFSM)

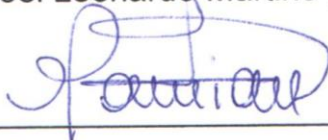
(Presidente/Orientador)



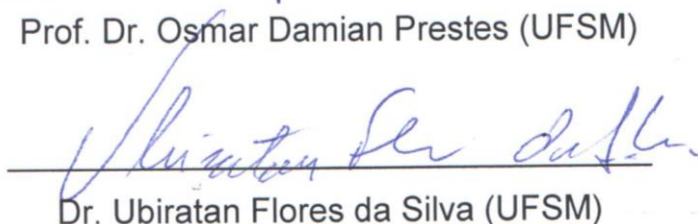
Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)



Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins (FURG)



Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)



Dr. Ubiratan Flores da Silva (UFSM)

Santa Maria, 2017.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FACCO, JANICE DE FÁTIMA
DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MILHO
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS / JANICE
DE FÁTIMA FACCO.- 2017.
97 p.; 30 cm

Orientador: RENATO ZANELLA
Coorientadora: MARTHA BOHRER ADAIME
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2017

1. milho 2. multirresíduo 3. QuEChERS 4. freezing out
5. EMR-Lipid I. ZANELLA, RENATO II. ADAIME, MARTHA
BOHRER III. Título.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a minha família, amo vocês!

Agradeço ao Prof. Dr. Renato Zanella, pela orientação e pela oportunidade de fazer parte do grupo do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), foram oito anos de aprendizado e crescimento pessoal, muito obrigada!

Agradeço a Dr^a Martha Bohrer Adaime pela co-orientação nos trabalhos e pelo aprendizado obtido, muito obrigada!

À banca de defesa da tese, professores Dr. Osmar Damian Prestes, obrigada pela disponibilidade e paciência em ajudar no desenvolvimento do trabalho, ao Dr. Manoel Leonardo Martins, ao Dr. Ubiratan Flores da Silva e ao Dr. Fábio Ferreira Gonçalves, por avaliarem este trabalho e por suas contribuições.

Ao Dr. Gustavo Marck Teló pelas sugestões dadas na qualificação deste trabalho.

Aos meus colegas, integrantes do LARP, em especial ao meu braço direito Nathália e a Lucila, pois sem a ajuda de vocês não teria conseguido. Que Deus ilumine vocês e que tenham muito sucesso na jornada profissional. Ao Nelson e a Pimperelli pela ajuda prestada durante o desenvolvimento do trabalho. Ao Felipe, Gabriel, Gabrieli, Magali, Tieli e aos demais pela convivência e amizade tanto nas horas boas como nas difíceis.

Agradeço de forma muito especial aos meus familiares, pai, mãe e irmãos pelo apoio, paciência e palavras de incentivo.

Aos meus amigos e colegas de trabalho que tornaram esta caminhada mais fácil.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química, Valéria e Ademir, obrigada por toda ajuda prestada durante o curso.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) por proporcionar esta formação.

RESUMO

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MILHO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS

AUTOR: Janice de Fátima Facco

ORIENTADOR: Renato Zanella

O milho é um cereal utilizado na alimentação humana e animal e, além disso, é empregado como fonte de matéria prima para outros subprodutos, adquirindo assim uma importância mundial. Por apresentar uma composição bem distinta, quando comparada a outros cereais, a determinação de resíduos de agrotóxicos torna-se bastante complexa, exigindo métodos e ferramentas mais eficientes. Este estudo tem como objetivo validar o método QuEChERS modificado, empregando como etapa de limpeza o congelamento e o sorvente EMR-Lipid com determinação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS). Neste método avaliou-se diferentes classes de agrotóxicos em diferentes níveis de concentração. O método foi validado para 45 agrotóxicos com percentuais de recuperação de 69,1 a 120,4% e RSD \leq 20,6%, respectivamente. Os Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método foram de 3 a 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de 10 a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi aplicado em amostras reais, entre elas grãos de milho inteiros e quebrados, farinha de milho e uma de pipoca a fim de avaliar seu desempenho. Nas amostras analisadas, apenas uma amostra apresentou carbendazim e fipronil em concentração inferior ao LOQ do método estabelecido. O método mostrou-se eficiente para a determinação de resíduos dos agrotóxicos em amostras de milho podendo ser utilizado em análises de rotina.

Palavras chave: milho, multirresíduos, QuEChERS, *freezing out*, EMR-Lipid, LC-MS/MS

ABSTRACT**MULTIRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN CORN BY MODIFIED
QuEChERS METHOD AND LC-MS/MS**

AUTHOR: Janice de Fátima Facco

ADVISOR: Renato Zanella

Corn is a cereal used in human and animal food, and moreover, as a source of raw material for other by-products, acquiring global importance. By presenting a distinct centesimal composition when compared with others cereals, the residue analysis becomes more complex, requiring methods and tools more efficient to reach the objective. This study has as goal the validation of a modified QuEChERS method employing a clean-up step with freezing out and EMR-Lipid sorbent with determination by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In this method, different classes of pesticides in different levels of concentration were evaluated. The method was validated for 45 pesticides with recovery and RSD results between 70 and 120% and $\leq 20\%$, respectively. The method limits of detection and quantification were 3 to 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 10 to 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The proposed method was applied in real samples, including whole and broken corn seed, corn flour and popcorn in order to evaluate the performance. In the analyzed samples, carbendazim and fipronil were found in a unique sample in concentrations below method LOQ. The proposed method showed to be efficient for the determination of pesticide residues in corn samples.

Keywords: corn, multiresidue, QuEChERS, freezing out, EMR-Lipid, LC-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do grão de milho e suas partes.....	19
Figura 2 - Processamento do grão de milho através da moagem por via seca e os produtos obtidos.	21
Figura 3 - Processamento do grão de milho através da moagem por via úmida. .	22
Figura 4 - Produção em milhões de toneladas do grão de milho na safra 2015/2016 no Brasil.....	23
Figura 5 - Resultado das análises de resíduos de agrotóxicos realizadas pelo PARA em amostras de fubá de milho.....	26
Figura 6 - Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo.	41
Figura 7 - Número de compostos com recuperação entre 70 e 120% e RSD \leq 20% obtido em cada ensaio.	65
Figura 8 - Número de compostos obtido com recuperação e RSD aceitáveis nos testes T ₄ e T ₅	66
Figura 9 - Média das áreas normalizadas obtida em diferentes tempos de resfriamento.	67
Figura 10 - Fluxograma do procedimento de extração para avaliação da etapa de limpeza do extrato.	68
Figura 11 - Número de compostos com recuperação entre 70 e 120% com valores de RSD \leq 20% em cada ensaio de limpeza do extrato.	68
Figura 12 - Comparação do RSD (%) entre os ensaios com PSA + C18 e EMR/Polish.....	70
Figura 13 - Fluxograma do procedimento de extração validado para o grão de milho utilizando EMR e Polish.	71
Figura 14 - Cromatogramas obtidos por QuEChERS modificado e LC-MS/MS para (A) fortificação na amostra “branco” no nível de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, (B) amostra “branco” de milho.....	72
Figura 15 - Sobreposição do ponto na matriz (CTM) 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ com a amostra contendo fipronil em concentração menor que o LOQ _m	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Oferta e demanda do milho no Brasil em valores de mil toneladas.	24
Tabela 2 - Oferta e demanda mundial de milho.	25
Tabela 3 - Classificação toxicológica das formulações de agrotóxicos.	26
Tabela 4 - Técnicas de preparo de amostra e determinação de agrotóxicos em milho e outros cereais.	30
Tabela 5 - Parâmetros avaliados na validação de um método analítico.	45
Tabela 6 - Agrotóxicos selecionados no desenvolvimento do método.	49
Tabela 7 - Gradiente de fase móvel utilizado para a eluição dos analitos.	53
Tabela 8 - Ensaio de avaliação de diferentes métodos QuEChERS, quantidade de solvente extrator e amostra.	55
Tabela 9 - Testes de limpeza variando quantidades e o tipo de sorvente por mL de extrato.	57
Tabela 10 - Condições no sistema LC-MS/MS.	62
Tabela 11 - Agrotóxicos com seus respectivos tempos de retenção, íon precursor, íon produto, energia de colisão, energia do cone e modo de ionização.	63
Tabela 12 - Resultados do teste t de <i>Student</i> para a comparação entre as massas residuais obtidas no teste gravimétrico.	65
Tabela 13 - Equação da reta e coeficientes de determinação (r^2) e efeito matriz para cada agrotóxico estudado.	73
Tabela 14 - Valores obtidos de LOQ e LOD do método para cada agrotóxico estudado.	75
Tabela 15 - Resultados de recuperação, precisão na validação e na precisão intermediária.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABIMILHO	Associação Brasileira das Indústrias do Milho
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
ASE	Extração acelerada por solvente, do inglês <i>Accelerated Solvent Extraction</i>
C18	Sílica modificada com hidrocarboneto linear C ₁₈ , octadecilsilano
CI	Ionização Química, do inglês <i>Chemical Ionization</i>
CV	Coeficiente de variação
DIC	Dissociação induzida por colisão, do inglês <i>collision-induced dissociation</i>
DL ₅₀	Dose letal 50% da população
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
DMAE	Dynamic Microwave-Assisted Extraction
DMF	Dimetilformamida
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva, do inglês <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
EI	Ionização por elétrons, do inglês <i>Electron Ionization</i>
EMR-Lipid	Enhanced matrix removal
ESI	Ionização por Eletronebulização, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
EU	União européia, do inglês <i>European Union</i>
EUA	Estados Unidos
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GC	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GCB	Carbono Grafitizado, do inglês <i>Graphitized Carbon Black</i>
GC-ECD	Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétrons, do inglês <i>Gas Chromatography - Electron Capture Detector</i>
FID	Detector por ionização em chama, do inglês <i>Flame Ionization Detector</i>
GC-FPD	Cromatografia Gasosa com Detector Fotométrico de Chama, do inglês <i>Gas Chromatography - Flame Photometric Detector</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>
GC-MS/MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
GC-NPD	Cromatografia Gasosa com Detector de Fósforo e Nitrogênio, do inglês <i>Gas Chromatography - Nitrogen Phosphorus Detector</i>
GC-TOFMS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas com Analisador por Tempo de Voo, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry "time-of-flight analyser"</i>
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel, do inglês <i>Gel Permeation Chromatography</i>

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LARP	Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês <i>Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
LLE	Extração Líquido-Líquido, do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOD _i	Limite de Detecção do instrumento, do inglês <i>Limit of Detection of the Instrument</i>
LOD _m	Limite de Detecção do método, do inglês <i>Limit of Detection of the Method</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
LOQ _i	Limite de Quantificação do Instrumento, do inglês <i>Limit of Quantification of the Instrument</i>
LOQ _m	Limite de Quantificação do método, do inglês <i>Limit of Quantification of the Method</i>
M. M.	Massa Molecular
m/z	Razão massa/carga
MA-NPS-DME	Medium-Assisted Non-polar Solvent Dynamic Microwave Extraction
MAE	Extração Assistida por Microondas, do inglês <i>Microwave Assisted Extraction</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeCN	Acetonitrila
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas, do inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i> .
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de Massas em Série, do inglês <i>Tandem Mass Spectrometry</i>
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês <i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i>
n	Número de replicatas
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBT	Precipitação em baixa temperatura, do inglês <i>Low Temperature Precipitation</i> .
PC	Padrão de controle
PI	Padrão Interno
PLE	Extração com Líquido Pressurizado, do inglês <i>Pressurized Liquid Extraction</i>
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	Amina primária secundária, do inglês <i>Primary Secondary Amine</i>

PTFE	Politetrafluoretileno
PTV	Temperatura Programada de Vaporização, do inglês <i>Programmed Temperature Vaporization</i>
QqQ	Triplo Quadrupolo
QuEChERS	Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
QuPPE	Método rápido para análise de pesticidas altamente polares na EU, do inglês <i>quick method for analysis of highly polar pesticide in EU</i>
r^2	Coefficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
RSD _{pi}	Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária
RSD _r	Desvio Padrão Relativo para Repetitividade
S/R	Sinal/ruído
SANTE	Guia de Saúde e Proteção do Consumidor, do francês Santé et Protection des Consommateurs
SBSE	Extração Sortiva com Barra Magnética, do inglês <i>Stir-Bar Sorptive Extraction</i>
SFC-MS/MS	Cromatografia fluídica supercrítica / espectrometria de massa em tandem, do inglês <i>Supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry</i> .
SFE	Extração por Fluido Supercrítico, do inglês <i>Supercritical Fluid Extraction</i>
SFO	Solidification of Floating Organic Drop
SHLLE	Extração Homogênea Líquido-Líquido com salting-out, do inglês, <i>Salting-Out Homogeneous Liquid-Liquid Extraction</i>
SIM	Monitoramento do Íon Seleccionado, do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i>
SLE-LTP	Extração Sólido-Líquido com Precipitação a Baixa Temperatura, do inglês <i>solid-liquid extraction with low temperature purification</i>
SOX	Extração por Soxhlet, do inglês <i>Soxhlet Extraction</i>
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	Microextração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Micro Extraction</i>
SRM	Monitoramento de Reação Seleccionada, do inglês <i>Selected Reaction Monitoring</i> .
SSE	Extração com Solvente Supercrítico, do inglês <i>Subcritical Solvent Extraction</i>
TPP	Trifenilfosfato, do inglês <i>triphenylphosphate</i>
TQ	Triplo Quadrupolo
t _R	Tempo de retenção
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
UHPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
USDA	Departamento da Agricultura dos Estados Unidos, do inglês <i>United States Department of Agriculture</i>
v/v	Volume por volume

APÊNDICE

Apêndice A – Estruturas dos agrotóxicos avaliados.....	97
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 O milho	19
2.2. Processamento e derivados do milho	20
2.3. A cadeia produtiva do milho no Brasil e no mundo	22
2.4 Agrotóxicos, definição, classificação e toxicidade	25
2.4.1 Controle e uso de agrotóxicos na cultura do milho e derivados.....	26
2.5. Técnicas de preparo de amostras empregadas na determinação de resíduos de agrotóxicos em milho	27
2.5.1. Preparo de amostra utilizando QuEChERS	36
2.6 Métodos de determinação de agrotóxicos em cereais e derivados.....	39
2.6.1. Cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MSMS).....	40
2.6.2 Aplicação do método QuEChERS e LC-MS/MS na análise de agrotóxicos em milho e seus derivados.....	42
2.7 Validação de métodos cromatográficos.....	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1 Instrumentação.....	46
3.2 Materiais e reagentes utilizados	47
3.3 Processamento da amostra.....	47
3.4 Seleção do padrão interno e do padrão de controle.....	48
3.5 Agrotóxicos selecionados.....	48
3.6 Preparo das soluções analíticas.....	52
3.7 Otimização do sistema LC-MS/MS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em milho	52
3.7.1 Escolha da fase móvel	53
3.7.2 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS.....	53
3.8 Desenvolvimento do método para determinação de resíduos de agrotóxicos em milho.....	54
3.8.1 Teste gravimétrico	57

3.9 Validação do método QuEChERS para a análise de resíduos de agrotóxicos em milho.....	58
3.9.1 Seletividade	58
3.9.2 Curva analítica e faixa de trabalho	58
3.9.3 LOD e LOQ do instrumento e do método	59
3.9.4 Ensaio de recuperação para avaliação da exatidão	59
3.9.5 Precisão (repetitividade) e precisão intermediária	60
3.9.6 Efeito matriz.....	60
3.10 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS.....	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
4.1. Condições do sistema LC-MSMS empregado para a determinação de agrotóxicos em milho	62
4.2 Otimização do método QuEChERS para análise de agrotóxicos em milho	64
4.3 Validação do método otimizado	70
4.3.1 Seletividade	71
4.3.2 Curva analítica, faixa linear e efeito matriz	72
4.3.3 Limite de detecção (LOD), Limite de quantificação (LOQ) do método	74
4.3.4 Exatidão (ensaio de recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	76
4.4 Aplicação do método em amostras reais	79
5 CONCLUSÕES	80
6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	81
7 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO LABORATÓRIO	82
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9 ANEXOS	94

1 INTRODUÇÃO

Os cereais são os alimentos mais produzidos e consumidos em todo mundo e são uma importante fonte de energia, fibras, ácidos graxos, minerais e vitaminas na alimentação humana e animal (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2012).

O milho é um cereal considerado uma importante fonte de proteínas, carboidratos, que variam de 60 a 80% e ainda de lipídeos que pode variar de 3 a 5% no grão (REGITANO-d'ARCE e VIEIRA, 2015). Este cereal apresenta vantagens bem significativas quando comparado a outras culturas quando se fala em uma fonte de matéria-prima. Sob esta visão busca-se incentivar o consumo deste, visando aumentar a qualidade nutricional da alimentação, bem como o consumo de seus derivados e assim, estimular o crescimento desta cultura (STRAZZI, 2015).

Em termos de produtividade de uma cultura, o que se deseja é o aumento da quantidade de grãos, porém isso não é possível sem o uso de agrotóxicos. Na cultura do milho, nos diferentes estágios da produção se faz o uso de agrotóxicos, o armazenamento dos grãos é a última etapa antes da obtenção do derivado ou produto final, e neste estágio é necessário garantir a qualidade e a longevidade do produto. Nesta etapa, piretróides, organofosforados e outras classes de agrotóxicos são utilizados a fim de prevenir o ataque de insetos e fungos. O uso de agrotóxicos pode gerar resíduo e aumentar o risco de contaminação para a saúde humana, pois durante esta etapa tendem a penetrar e acumular no grão (MORENO-GONZÁLEZ et al., 2014; GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2017). Deste modo, é necessário assegurar que as aplicações dos agrotóxicos obedeceram às boas práticas agrícolas e, além disso, assegurar que o produto final é seguro para o consumidor. Sendo assim, o monitoramento destes resíduos é uma ferramenta importante para o cumprimento deste objetivo (ANAGNOSTOPOULOS; MILIADIS, 2013).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*) é uma das técnicas amplamente utilizada na determinação de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes, devido a sua elevada detectabilidade e seletividade (PRESTES et al., 2009). Entretanto, análise

cromatográfica de extratos provenientes de amostras complexas exigem métodos de preparo e limpeza de amostra eficientes a fim de evitar o comprometimento dos resultados (KOESUKWIWAT et al., 2010). O método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) é utilizado para uma diversidade de alimentos. A etapa de preparo de amostra torna a análise mais fácil pela diminuição de interferentes da matriz, garantindo resultados mais confiáveis, além de possibilitar a análise de um grande número de compostos (PRESTES et al., 2009).

Este trabalho tem como objetivo validar um método para a determinação multirresíduos de agrotóxicos em milho, incluindo compostos autorizados e não autorizados para a cultura, utilizando o método QuEChERS modificado e posterior análise por LC-MS/MS. Além disso, como objetivos específicos otimizar o tempo ideal para a etapa de *freezing out*, avaliar diferentes sorventes na etapa de limpeza do extrato final e aplicação do método em amostras reais.

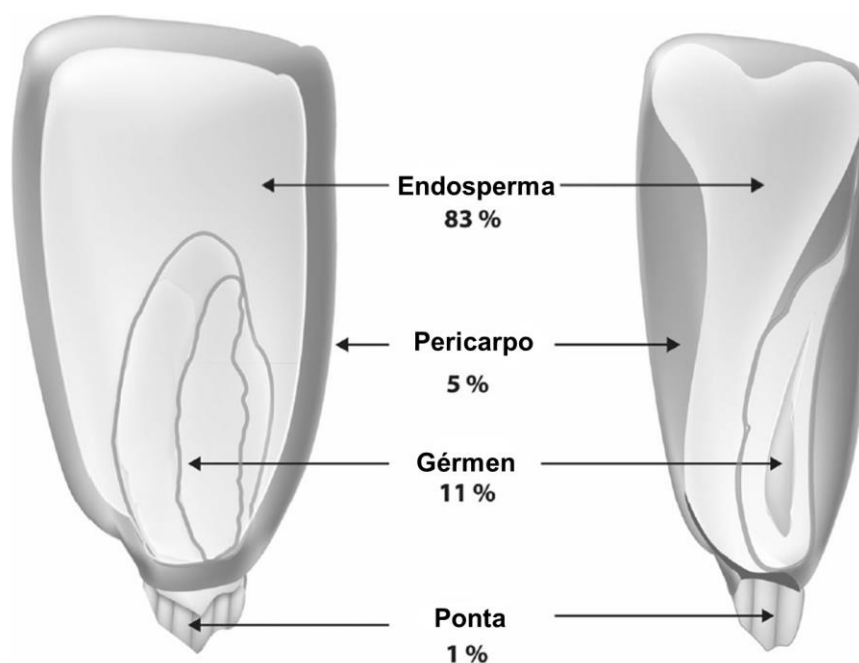
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O milho

O milho, *Zea mays L.*, é uma espécie originária do México. A palavra *Zea* vem do grego e quer dizer “semente ou grão”, e pertence à família das *Poaceae* (FELIPPE, 2007, EMBRAPA, 2002). Este grão é produzido e consumido desde o ano 5.000 a.C como base da alimentação dos mais diferentes povos. Com o passar dos tempos o cultivo do milho foi se expandindo por todo o mundo (ABIMILHO, 2015a).

O grão de milho é formado pelo endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta, como observa-se na Figura 1. De acordo com a USDA (2016) a composição centesimal em 100 gramas é de 10,37 g de água, 9,42 g de proteína, 74,26 g de carboidrato, 7,3 g de fibra total, 0,64 g de açúcares e 4,74 g de lipídios. O gérmen contém 33,3% de gordura, além de vitaminas do complexo B e antioxidantes como a vitamina E. O óleo do gérmen contém 54,7% de ácidos graxos poli-insaturados (GWIRTZ e GARCIA-CASAL, 2014). Destes o linoleico é o mais abundante (59,6%), seguido pelo oleico (25,4%), palmítico (10,9%), esteárico (2%) e linolênico (1,2%) (REGITANO-d'ARCE e VIEIRA, 2015).

Figura 1 - Anatomia do grão de milho e suas partes.



Fonte: Adaptado de Gwartz e Garcia-Casal, 2014.

Este cereal apresenta em sua composição vitaminas A e do complexo B, gorduras, proteínas, carboidratos, amido e sais minerais. Além disso, é um produto bastante utilizado na fabricação de medicamentos, balas, bebidas, alimentos processados, ração animal, entre outros (ABIMILHO, 2015a). Sua utilização é destacada por Strazzi (2015) que diz que, “os derivados de milho são usados em mais de 150 diferentes produtos industriais”.

2.2. Processamento e derivados do milho

O milho em grão é o produto final da colheita e este é destinado ao armazenamento para posteriormente ser processado a derivados e chegar ao consumidor final (REGITANO-d`ARCE; SPOTO; CASTELLUCCI, 2015). Segundo Strazzi (2015) “o consumo per capita brasileiro não atinge 20 kg/habitante/ano, quantidade pequena quando comparada à do México, que tem um consumo de 63 kg/habitante/ano”.

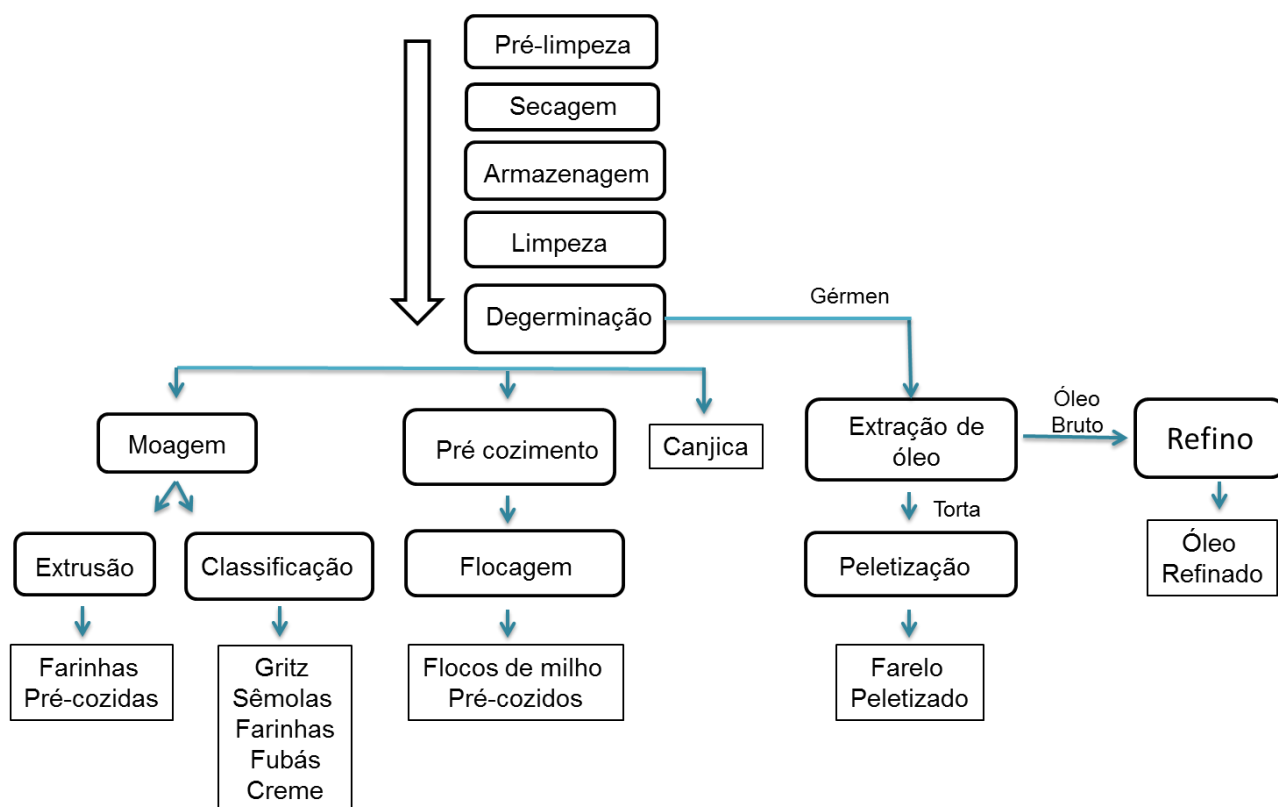
Durante a produção deste cereal o milho “verde” também é consumido pela população sendo industrializado por empresas de enlatados ou utilizado na alimentação animal. Mas, do total da produção mundial somente 15% é destinado à alimentação humana direta (REGITANO-d`ARCE; SPOTO; CASTELLUCCI, 2015).

Geralmente os grãos de milho passam por alguns processos de transformação industrial para que possam ser consumidos pelo ser humano e animais, mas isso vai depender do produto final que se deseja obter (REGITANO-d`ARCE; SPOTO; CASTELLUCCI, 2015; STRAZZI, 2015).

No Brasil, os derivados mais consumidos são o fubá, a farinha e a canjica que são obtidos pelo mesmo processo de transformação. Alguns produtos, como o amido, óleo, grãos, farelo e a farinha, são empregados em molhos, sopas, fermentos, xaropes, alimentos infantis, fonte de fibras e lanches etc (BORÉM e RIOS, 2011). O processamento do milho depende do produto final e pode ser realizado por via úmida e via seca (BORÉM e RIOS, 2011; REGITANO-d`ARCE; SPOTO; CASTELLUCCI, 2015; STRAZZI, 2015). Geralmente a moagem a seco tem como finalidade destinar produtos para a alimentação humana e a moagem por via úmida obter produtos de insumos (BORÉM e RIOS, 2011).

No processamento por via seca, o grão é degerminado, ou seja, o gérmen é removido para a extração do óleo. O endosperma resultante do processo é destinado para a produção da canjica, ou ainda de outros produtos, como pode ser observado na Figura 2. O fubá pode ser produzido por dois modos, pela trituração do milho inteiro ou pela moagem da canjica. Já a farinha de milho ou creme de milho é formada pela fração amilácea do grão a partir do peneiramento com malhas muito finas. Para este processo utiliza-se milhos duros e semiduros, pois o rendimento obtido é maior e de melhor qualidade (BORÉM e RIOS, 2011; STRAZZI, 2015).

Figura 2 - Processamento do grão de milho através da moagem por via seca e os produtos obtidos.

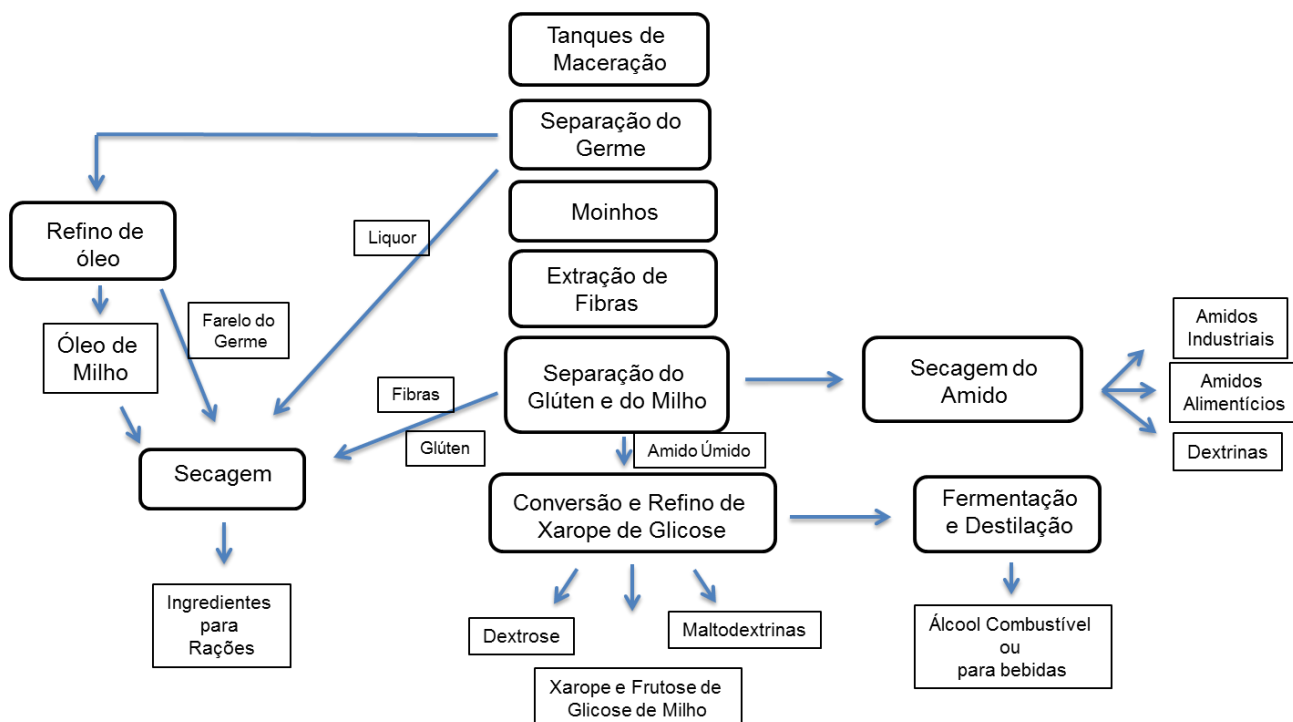


Fonte: Adaptado de MAPA, 2007.

Na moagem por via úmida uma etapa de maceração é realizada em tanques com água aquecida entre 50 e 54 °C, por um tempo de 36 a 48 h, com ácido sulfuroso. O meio ácido tem como finalidade inibir o crescimento de microrganismos de deterioração e promover o rompimento das ligações dissulfeto. Além disso, facilita a liberação do amido durante a moagem e a

purificação final o que possibilita o aumento da recuperação do gérmen. As proteínas recuperadas durante este processo são comercializadas como ração de glúten e destinadas a alimentação de animais (BORÉM e RIOS, 2011; STRAZZI, 2015). A Figura 3 apresenta o esquema do processamento por via úmida.

Figura 3 - Processamento do grão de milho através da moagem por via úmida.



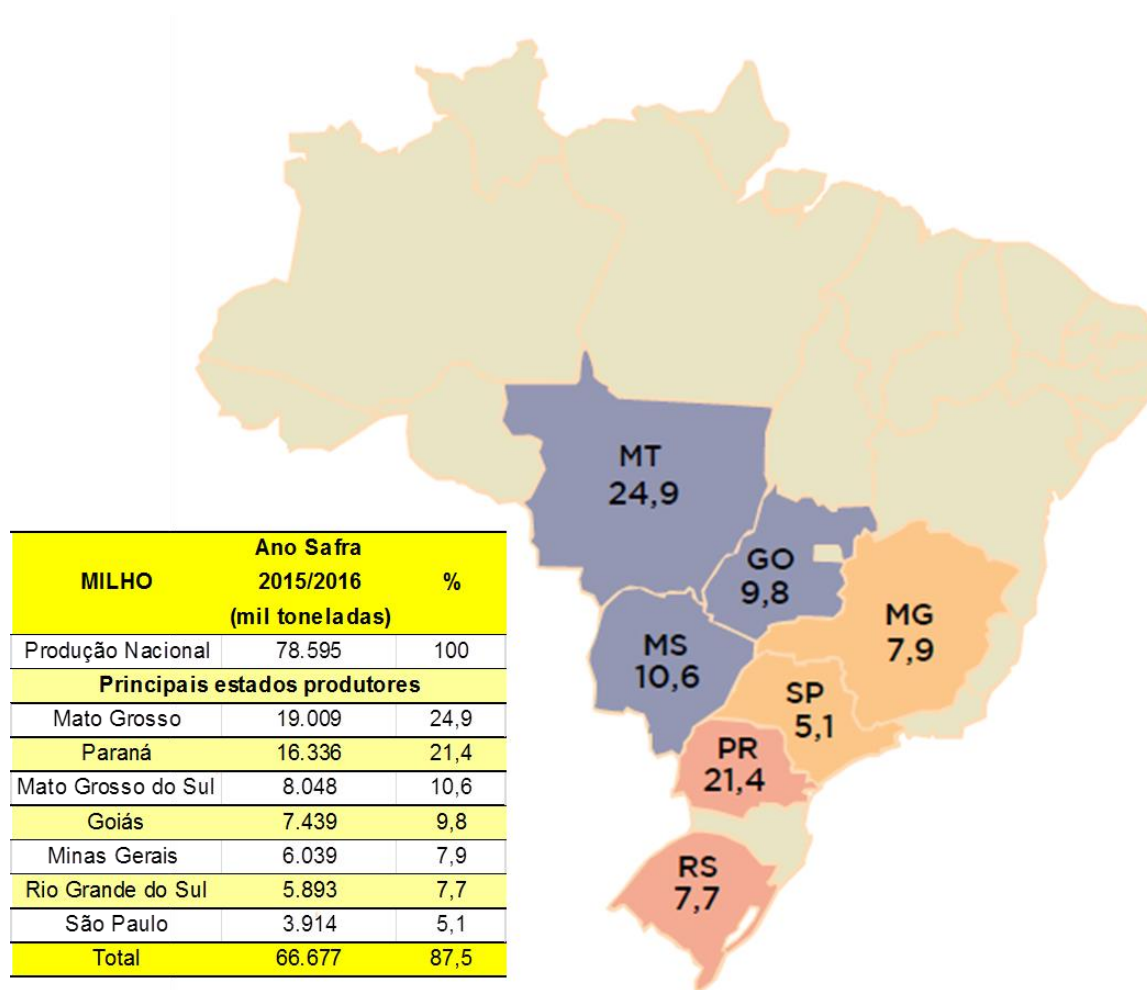
Fonte: Adaptado de MAPA, 2007.

De acordo com dados da Associação Brasileira das Indústrias do Milho, no ano de 2013, o consumo industrial deste cereal em moagem à seco foi de 2,2 milhões de ton, já em moagem à úmido foi de 2,4 milhões de ton e o consumo *in natura* foi de aproximadamente 1,02 milhões de ton (ABIMILHO, 2015b).

2.3. A cadeia produtiva do milho no Brasil e no mundo

No Brasil, a produção nacional da safra 2015/2016, apresenta como os principais estados produtores deste cereal o Mato Grosso, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo. A Figura 4 apresenta a quantidade e o percentual de produção de milho por estado produtor na safra (MAPA, 2016).

Figura 4 - Produção em milhões de toneladas do grão de milho na safra 2015/2016 no Brasil.



Fonte: Adaptado de MAPA, 2016.

Segundo a Abimilho ao avaliar a distribuição da oferta e demanda desta cultura, nos diferentes setores abastecidos no Brasil, analisando-se as safras de 2012/2013 a 2016/2017, conforme Tabela 1, pode-se observar que a maior demanda se dá para o consumo animal, seguido da exportação e posteriormente o consumo industrial e humano (ABIMILHO, 2017).

Tabela 1- Oferta e demanda do milho no Brasil em valores de mil toneladas.

	12/13	13/14	14/15	15/16 mar	16/17 mar
Oferta					
Estoque inicial	11,223	14,078	17,881	14,201	8,063
Produção total	83,462	82,76	87,153	73,887	97,705
Produção 1ª safra	37,126	33,417	30,948	28,851	33,782
Produção 2ª safra	46,336	49,343	56,205	45,037	63,923
Importação	911	791	370	2,902	600
Consumo de substitutos	2,000	2,000	2,000	1,000	1,000
Oferta total	97,597	99,628	107,4	91,99	107,37
Demanda					
Consumo animal	43,453	47,177	49,454	48,067	49,329
Aves de corte	21,479	23,52	24,578	24,086	24,707
Aves de postura	3,661	3,917	4,074	3,992	4,039
Suínocultura	11,648	12,556	13,247	12,584	12,973
Bovinocultura	3,684	3,979	4,158	4,075	4,181
Outros animais	2,981	3,205	3,397	3,329	3,429
Consumo industrial	5,209	5,99	6,589	6,523	6,653
Consumo humano	1,882	1,873	1,863	1,845	1,882
Outros usos	4,257	4,014	4,227	3,584	3,877
Perdas	1,669	1,655	1,743	1,582	1,954
Sementes	425	381	403	443	451
Exportação	26,625	20,655	28,924	21,883	30,000
Demanda total	85,519	81,744	93,203	83,927	94,146
Estoque final	14,077	17,884	14,201	8,063	13,222

Mar: março

Fonte: Adaptado de ABIMILHO, 2017.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016), as projeções para a cultura do milho entre as safras de 2015/2016 a 2025/2026, são de que a produção terá um aumento de 24,2%, a exportação de 52,4% e o consumo de 20,8%.

Dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) demonstram a variação da oferta e a demanda de milho no mundo, em milhões de toneladas, nos meses de março e abril de 2017, correspondentes à safra 2016/2017, conforme a Tabela 2. Observa-se que o Brasil é um país que contribui com uma grande produção deste grão no mercado mundial, pois um aumento significativo da produção pode ser observado quando comparada as produções das safras 2011/2012 a 2016/2017.

Tabela 2 - Oferta e demanda mundial de milho.

	Números Safra 2016/2017					
	Março			Abril		
	Produção	Estoques	Exportações	Produção	Estoques	Exportações
EUA	384,78	58,93	56,52	384,78	58,93	56,52
Brasil	91,5	7,84	31	93,5	8,57	32
Argentina	37,5	2,56	25,5	38,5	2,86	26
Mundo	1.049,24 bilhão t	220,68		1.053,24 bilhão t	222,98	

Fonte: MENDES, 2017.

2.4 Agrotóxicos, definição, classificação e toxicidade

O *Codex Alimentarius* define agrotóxico como toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir, ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição, e processamento do alimento ou ração animal. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladoras de crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes ou inibidoras de brotos, e substâncias aplicadas tanto antes como após a colheita, para proteger a mesma da deterioração durante o armazenamento e transporte dos alimentos (FAO, 2005).

De acordo com Silva e Fay (2004) os agrotóxicos são classificados de acordo com o seu modo de ação: inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, moluscicidas, rodenticidas. Por apresentarem o uso destas substâncias favorecido, deixa largo espectro de ação, com fácil aplicação e a rápida atuação. Consequentemente, são responsáveis pelos diversos efeitos prejudiciais sobre os ecossistemas, dependendo da toxicidade da substância, do tempo de exposição, da dose e da persistência no meio ambiente (SILVA e FAY, 2004).

Os agrotóxicos possuem uma classificação no Brasil, expressa como toxicidade aguda em termos de valor da dose letal 50% (DL₅₀), que é representada pela relação mássica de miligramas do produto tóxico por quilograma de massa viva. A DL₅₀ é a dose ingerida ou administrada, pela mesma via que provoca a morte de 50% da população em estudo. São quatro classes toxicológicas, de acordo com o Ministério da Saúde, onde cada classe é representada por uma cor, como mostra a Tabela 3 (Jardim; Andrade; Queiroz (2009); Barbosa, (2004)).

Tabela 3 - Classificação toxicológica das formulações de agrotóxicos.

Classificação Cor da faixa		DL ₅₀
Classe I	Extremamente tóxico	≤ 5 mg kg ⁻¹
Classe II	Altamente tóxico	5 < DL ₅₀ ≤ 50 mg kg ⁻¹
Classe III	Medianamente tóxico	50 < DL ₅₀ ≤ 500 mg kg ⁻¹
Classe IV	Pouco tóxico	DL ₅₀ > 5000 mg kg ⁻¹

2.4.1 Controle e uso de agrotóxicos na cultura do milho e derivados

O MAPA elaborou a Instrução Normativa SDA N^o 42, de 31 de dezembro de 2008 que apresenta o Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC Vegetal), que tem como objetivo inspecionar e fiscalizar a qualidade dos produtos de origem vegetal produzidos no país, quanto à ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos, que são destinados ao mercado interno e a exportação. A investigação de produtos não conformes e a fiscalização dos ingredientes ativos de uso proibido e não registrados para determinada cultura, bem como a violação dos limites máximos são determinações do PNCRC (MAPA, 2013a).

O relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Anvisa apresenta a quantidade de amostras analisadas e os resultados insatisfatórios por estados e culturas na safra 2012 (Figura 5).

Figura 5 - Resultado das análises de resíduos de agrotóxicos realizadas pelo PARA em amostras de fubá de milho.

Produto	Resultado	AC	AL	AM	AP	BA	CE	DF	ES	GO	MA	MG	MS	MT	PA	PB	PE	PI	PR	RJ	RN	RO	RR	RS	SC	SE	SP	TO
Fubá de Milho	I				2									1	1										2			
	A	10	9	8	2	10	8	10	9	5	6	10	9	10	7	2	2	7	10	9	9	7	1	10	10	8	10	10
Total de amostras insatisfatórias por UF		17	15	18	9	16	18	6	13	10	15	10	14	17	9	6	7	14	15	17	13	11	2	14	15	11	15	20
Total de amostras analisadas por UF		54	58	53	26	59	56	56	57	54	49	58	52	59	54	44	50	54	58	57	58	47	7	59	57	54	54	53

I : N^o de amostras insatisfatórias

A : N^o de amostras analisadas

- : Amostras não coletadas ou análises não realizadas



Fonte: Adaptado de Anvisa, 2014.

Os resultados para 208 amostras de fubá de milho foram avaliadas e seis delas tiveram resultados insatisfatórios. Nestas, foram encontradas resíduos de clorpirifós e bifentrina em concentração acima do LMR permitido e também carbaril ($0,21 \text{ mg kg}^{-1}$) como ingrediente ativo não permitido para a cultura (ANVISA, 2014a).

Segundo a Instrução Normativa Nº 1, de 4 de janeiro de 2013 (MAPA, 2013b), que apresenta os resultados das análises feitas pelo PNCRC realizadas na ano-safra 2011/2012 em algumas culturas, os resultados para grãos de milho, mostram que os estados do Paraná e Bahia apresentaram resultados não conformes para os agrotóxicos bifentrina ($0,162 \text{ mg kg}^{-1}$) e cipermetrina ($0,070 \text{ mg kg}^{-1}$), ou seja, resultados acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR).

Em 2015, através da portaria SDA nº 44, de 12 de maio de 2015 publicou-se os resultados do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes referente ao ano safra 2013/2014 para o milho e outras culturas agrícolas. Para este cereal, apenas uma amostra no estado de Goiás não estava em conformidade com o LMR permitido para o composto cipermetrina que é de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ e a quantidade encontrada foi de $0,0611 \text{ mg kg}^{-1}$ (MAPA, 2015b). No relatório de atividades de 2013 a 2015 do PARA, foi analisado 729 amostras de milho (fubá) e em uma amostra foi detectado pendimetalina com concentração acima do LMR. Outras 12 amostras foram consideradas insatisfatórias devido à presença de diclorvós que não é permitido para uso agrícola. Os agrotóxicos detectados foram clorpirifós, deltametrina, malationa, metomil e pirimifós-metilico em concentração inferior ao LMR estabelecido (ANVISA, 2016).

Neste contexto, é de suma importância a criação de programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos na cultura de milho, bem como de seus derivados com o propósito de garantir o consumo seguro destes alimentos.

2.5. Técnicas de preparo de amostras empregadas na determinação de resíduos de agrotóxicos em milho

O preparo da amostra é uma etapa crucial em um procedimento analítico, principalmente quando se trata de amostras sólidas, como de alimentos. Esta se caracteriza pela extração e enriquecimento dos analitos que geralmente se apresentam a níveis de traços e ultra-traços. Normalmente, problemas no preparo

da amostra como o tempo e o consumo de reagente, perda de compostos e contaminação torna esta etapa mais sujeita a erros (WANG; DING; REN, 2016). Ela depende da eficiência do procedimento de extração, o que a torna uma etapa determinante neste processo. Um procedimento com poucos passos reduz as perdas dos analitos de interesse e fontes de contaminação, eliminando assim, erros e diminuindo o custo deste procedimento (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). O processo de preparo da amostra é necessário, pois assim, favorece a extração destes analitos bem como a remoção dos interferentes da própria matriz (PRESTES et al., 2009; WALORCZYK; DROZDZYNSKI, 2012).

Os cereais são considerados matrizes secas e que contêm grande quantidade de ácidos graxos que podem interferir na análise. Para obter bons resultados analíticos ao se trabalhar com este tipo de matriz alguns cuidados devem ser tomados. A adição de água para promover a hidratação da matriz, a proporção de solvente e amostra ideal, tempo de extração, a combinação e a quantidade de sorvente na etapa de limpeza dispersiva são algumas variáveis que afetam a eficiência do preparo de amostra (MASTOVSKA et al., 2010).

Hoje, muitas técnicas de extração são utilizadas visando a extração de resíduos de agrotóxicos em matrizes como milho ou outras com amido e gordura. Dentre as diferentes técnicas, tem-se a Extração por Soxhlet (SOX), a Extração Líquido-Líquido (LLE), a Extração em Fase Sólida (SPE), a Microextração em Fase Sólida (SPME), a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD), a Extração com Fluido Supercrítico, (SFE), a Extração Acelerada com Solvente (ASE) e a Extração Assistida por Micro-ondas (MAE), a Extração Líquida Pressurizada (PLE), Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) e a Extração Sortiva com Barra Magnética (SBSE) (WU et al., 2011; GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2012; CUNHA; FERNANDES, 2011).

Segundo Cabrera et al., (2012) um método de preparo da amostra que demanda de extração automatizada, muitas vezes, exige um analista treinado e etapas de limpeza entre as extrações, o que torna a análise mais demorada. Sendo assim, estas técnicas apresentam desvantagens quando se trata de análises multirresíduo, pois são eficientes para um determinado escopo de analitos em determinadas condições (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

A precipitação a baixa temperatura (PBT, do inglês *low-temperature precipitation ou freezing out*) foi aplicada em amostras de cereais, como o trigo por Walorczyk e Drozdzyński (2012) onde submeteu o extrato a -26 °C por 2 h em freezer, já Koesukwiwat et al. (2010) utilizou 2 h de freezer a uma temperatura de -20 °C e Wang et al. (2017) submeteu o extrato a uma temperatura de -24 °C por 20 min em freezer ou até um tempo de 12 h como foi adotado por Facco et al. (2015). Como se pode observar esta etapa tem como vantagem a fácil execução e pode ser utilizada para diferentes tipos de amostras.

Em 2003, Anastassiades e colaboradores, propuseram o método de extração denominado QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) que inicialmente foi proposto para extração de agrotóxicos em amostras vegetais e para frutas, e logo se expandiu para uma grande variedade de analitos e distintas matrizes (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015). Segundo Borges; Figueiredo; Queiroz, (2015), esta técnica apresenta a vantagem de ser fácil, rápida, econômica, efetiva, robusta e segura e ainda explora a instrumentação analítica moderna.

A Tabela 4 apresenta diferentes técnicas e métodos de preparo de amostra, que são utilizadas na etapa de extração e limpeza da matriz de cereais, principalmente o milho, para a análise em cromatografia líquida ou gasosa.

Tabela 4 - Técnicas de preparo de amostra e determinação de agrotóxicos em milho e outros cereais.

MATRIZ	PREPARO	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	LIMPEZA	AGROTÓXICOS	TÉCNICA	REFERÊNCIA
milho e feijão	5 g amostra + 30 mL acetona:metanol (1:1) e agita por 3 h a 200 rpm	LLE com DCM e secagem com NaSO ₄ anidro seguido de concentração e rotaevaporação	15 g da mistura de alumina + carvão ativado (12:1) em uma mini coluna de vidro são eluídos com diclorometano e concentrado até 2 mL	37 agrotóxicos	GC-FPD	Akoto et al., (2013)
milho e outros cereais	2 g amostra + 20 mL água + 5 mL DCM e ultrassom por 30 min seguido de centrifugação	Ultrassom	2 mL extrato percolados em cartucho Oasis HLB (60 mg) e o extrato eluído é diluído em água na mesma proporção (1:1) acrescido de 10 µL de uma solução tampão	glifosato	LC-MS/MS	Botero-Coy et al., (2013)
milho e outros	10 g amostra + 5 mL água + 10 mL ACN e agita por 10 min	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	1,5 mL de extrato + 50 mg C18 ou florisil + 150 mg de MgSO ₄ seguido de agitação e centrifugação	isofenfós-metil	SFC-MS/MS	Chen et al., (2016)
milho, palha e solo	10 g amostra (solo e grão, 5 g para a palha) + 5 mL água (10 mL para palha) + 10 mL ACN e agita por 5 min	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	1,5 mL extrato + (30 mg C18 para solo; 30 mg PSA + 20 mg de C18 para grão; 20 mg de GCB + 50 mg de PSA para a palha) + 150 mg MgSO ₄ seguido de agitação e centrifugação (1 min a 3600 rpm)	Fipronil e metabólitos	UPLC-MS/MS	Cheng et al., (2014)

MATRIZ	PREPARO	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	LIMPEZA	AGROTÓXICOS	TÉCNICA	REFERÊNCIA
milho e outros	5 g amostra + 20 mL água	QuPPE-Metódo	1 mL de extrato + 5 mg MWCNTs (5–10 nm) agita por 1 min e centrifuga por 1 min a 4000 rpm e após derivatização	Cyanamide	LC-MS/MS	Cheng et al., (2018)
milho e outros	-	MSPD (10 g amostra)	GPC e SPE com cartucho de florisil	33 agrotóxicos	GC-MS	Chung e Chen (2015)
milho	2,5 g amostra + 10 mL água + 10 mL ACN e agitação por 30 min	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	DLLME com 1 mL de extrato	41 agrotóxicos	GC-MS	Cunha e Fernandes (2011)
milho e cereais	3 g amostra + 12 mL ACN 90:10 v/v ACN–tampão fosfato (pH = 7.5) e agita por 10 min e seguido de centrifugação por 6 min	O sobrenadante é transferido para um frasco e o resíduo foi re-extraído novamente e concentrado em evaporador a 35 °C e redissolvido com 2 mL de ACN	SPE com C18 e eluição com 10 mL de ACN ou 10 mL de ACN a 5% de ác. Fórmico e posteriormente evaporação e redissolução com 0,5 mL de ACN:água (20:80 v/v)	50 agrotóxicos	UPLC-MS/MS	Dong et al., (2016)
milho	2 g amostra + 4 mL água + 8 mL ACN agita por 1 min	O tubo é submetido a SLE/LTP -20 °C por 3 hs	o extrato é filtrado em papel de filtro contendo 2 g de NaSO ₄	bifentrina e pirimifós metílico	GC-ECD	Freitas et al., (2014)
milho e trigo	5 g amostra + 10 mL água + 10 mL ACN 5% aci. fórmico e agita por 1 min	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄ agita por 2 min e segue para ultrassom por 5 min	5 mL extrato + 31 mg C18 + 274 mg GCB + 800 mg PSA + 750 mg MgSO ₄ seguido de evaporação e redissolução	4 agrotóxicos organofosforados	GC-NPD	González-Curbelo et al., (2017)

MATRIZ	PREPARO	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	LIMPEZA	AGROTÓXICOS	TÉCNICA	REFERÊNCIA
milho e cereais	5 g amostra + 5 mL água + 5 mL ACN e agita por 1 min	3 g NaCl agita 1 min e centrifuga	1 mL de extrato + 5 mg MWCNTs + 15 mg PSA + 15 mg C18	124 agrotóxicos	GC-MS/MS	Han et al., (2016)
milho e cereais	5 g amostra + 10 mL de H ₂ O, agita e homogeneiza no tubo (30 min de interação parado) e após + 15 mL de ACN 1% ác. Acético ou 10 mL de ACN	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄ + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O ou 6 g MgSO ₄ + 1,5 g AcNa	6 mL extrato + 150 mg C18 + 150 mg PSA + 900 mg MgSO ₄ 8 mL extrato + 400 mg C18 + 400 mg PSA + 1200 mg MgSO ₄ agita e centrifuga e após, seguido de evaporação e redissolução com 1,5 mL de acetato de etila	200 agrotóxicos	GC-MS/MS	He et al., (2015)
milho e trigo	2,5 g amostra + 10 mL água + 10 mL ACN e agitação por 1 h	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	5 mL extrato + 750 mg PSA + 250 mg C18 + 750 mg MgSO ₄ agita e centrifuga seguindo para SHLLE: H ₂ O + NaCl	8 agrotóxicos	GC-FID	Jia et al., (2014)
milho	1 g amostra	Nanopartícula de ZnO e líquido iônico O sobrenadante é transferido para um frasco e o resíduo foi re-extraído novamente	SPE	5 agrotóxicos	HPLC-UV	Li et al., (2017)
milho e cereais	3 g amostra + 12 mL ACN e agita por 11 min		SPE com cartucho de C18 e o extrato é concentrado em rotaevaporador e redissolvido com 0,5 mL de ACN:água (20:80 v/v)	Atrazina e metabólitos	UPLC-ESI-MS/MS	Liang et al., (2016)

MATRIZ	PREPARO	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	LIMPEZA	AGROTÓXICOS	TÉCNICA	REFERÊNCIA
milho e soja	5 g amostra + 10 mL água + 10 mL ACN e agita por 1 min	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄ + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O O sobrenadante foi submetido a - 20 °C por 8 h	6 mL extrato + C18 + PSA + MgSO ₄ seguido de agitação e centrifugação e após extração líquido-líquido: 5 mL sobrenadante + 15 mL H ₂ O + 1,5 mL de iso-octano	10 agrotóxicos	GC-MS	Marchis et al., (2012)
milho e outros cereais	2,5 g amostra + 10 mL água + 10 mL ACN agita por 1 h	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	1 mL extrato + 50 mg C18 + 150 mg PSA + 150 mg MgSO ₄ 3 mL sobrenadante + 150 mg de MgSO ₄ + 150 mg Z-Sep ⁺ 2 mL extrato é evaporado em N ₂ e redissolvido em 500 µL água:metanol (80:20)	180 agrotóxicos	UHPLC-MS/MS e GC-TOFMS)	Mastovska et al., (2010)
óleo de milho e outros	3 g amostra + 7 mL água + 10 mL ACN e agita por 10 min	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	3 mL sobrenadante + 150 mg de MgSO ₄ + 150 mg Z-Sep ⁺ 2 mL extrato é evaporado em N ₂ e redissolvido em 500 µL água:metanol (80:20)	31 carbamatos	UHPLC-MS/MS	Moreno-Gonzalez et al., (2014)
milho e outros cereais	10 g amostra + 10 g celite 545 foram extraídas com acetonitrila em estado estático por 3 min com 2 ciclos a 1500 psig a 80 °C	Extração acelerada com solvente (ASE)	SPE Envi-18, Envi-Carb e Sep-Pak NH ₂ em série (GC-MS/MS) - Sep-Pak Alumina N e Envi-Carb e Sep-Pak NH ₂ (LC-MS/MS)	405 agrotóxicos	GC-MS/MS e LC-MS/MS	Pang et al., (2006)

MATRIZ	PREPARO	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	LIMPEZA	AGROTÓXICOS	TÉCNICA	REFERÊNCIA
milho	5 g amostra +20 mL ACN e agita por 3 min em vórtex e agitação por mais 30 min seguindo para centrifugação a 5000 rpm/5 min	O sobrenadante foi misturado com ACN:Hexano (1:1) seguido para evaporação e redissolução em 1 mL de ACN	Coluna MISPE e o eluato foi evaporado e redissolvido em fase móvel	3 herbicidas	LC-MS/MS	She et al., (2010)
milho e outros cereais	10 g amostra + 5 mL água e add 10 mL de ACN a 1% ác. Fórmico e agita por 3 min	2 g NaCl + 3 g MgSO ₄ agita por 3 min e centrifuga por 5 min	1, 5 mL extrato + 50 mg C18 + 150 mg MgSO ₄ agita por 3 min e centrifuga por 5 min	4 herbicidas	UHPLC-MS/MS	Tao et al., (2014)
milho e outros	10 g amostra + 5 mL água + 10 mL ACN e agitação por 10 min	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	20 mg PSA+ 30 mg C18 + 150 mg MgSO ₄	penflufen e metabólito	UHPLC–MS/MS	Tian et al., (2016)
milho e outros	5 g amostra + 10 mL água + 15 mL ACN e agita por 5 min	Q. citrato	7,5 mL extrato + 500 mg C18 + 125 mg PSA + 750 mg MgSO ₄ seguido de evaporação de 3 mL de sobrenadante e redissolução com 1,5 mL de tolueno	122 agrotóxicos	GC-MS/MS	Walorczyk (2007)
milho e solo	5 g amostra + 2 mL água + 10 mL ACN agita por 2 min e ultrassom por 20 min	1 g NaCl + 1 g MgSO ₄	6 mL de sobrenadante é concentrado e reconstituído em 3 mL de éter de petróleo para SPE com cartucho de florisil	fipronil e metabólitos	GC–ECD	Wang, Hu e Liu (2014)

MATRIZ	PREPARO	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	LIMPEZA	AGROTÓXICOS	TÉCNICA	REFERÊNCIA
milho e outros cereais	1 g amostra + 10 mL de ACN é agitada por 10 min seguida de centrifugação por 5 min. O sobrenadante é evaporado e redissolvido em 1 mL de ACN	<i>h-MIMs</i>	Uma coluna de SPE com 125 mg de h-MIMs O extrato é diluído em 6 mL de água é eluído com 1,5 mL de ACN com 5% de ác. acético	6 triazinas	LC-MS/MS	Zhao et al., (2015)
milho e trigo	2,5 g amostra + 5 mL água + 20 mL ACN e agita por 30 min	1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	16 mL de extrato foram evaporados e reconstituídos em 2 mL de hexano seguindo para SPE-DLLME	8 piretróides	GC-MS	Zhu et al., (2016)

2.5.1. Preparo de amostra utilizando QuEChERS

O QuEChERS se caracterizou por ser um método multirresíduo fácil e rápido de ser executado, pois após a homogeneização da amostra envolve uma etapa de extração com solvente seguida de partição com sais e uma etapa de extração sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*), que promove a remoção de possíveis interferentes presentes na matriz possibilitando assim a determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais. Como solvente extrator utilizou-se a acetonitrila, pois abrange uma faixa maior de polaridade quando comparada com acetato de etila e acetona, além de extrair menos compostos lipofílicos, gordura e pigmentos (GONZÁLEZ-CURBELO et al; 2015; BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Outra vantagem é que o uso da acetonitrila juntamente com os sais favorece a extração permitindo a separação da fase orgânica e aquosa, tornando-a rápida, de baixo custo e permite se necessário a diluição do extrato final (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Originalmente este método era composto por uma etapa de extração de mesma proporção de amostra:solvente, sulfato de magnésio, que foi utilizado em todas as versões deste método, e cloreto de sódio na etapa de partição. A partir deste método outras versões foram desenvolvidas (ANASTASSIADES et al., 2003). O QuEChERS acetato desenvolvido por Lehotay et al. (2005) utilizou uma quantidade um pouco maior de amostra:solvente que o QuEChERS original, o solvente extrator foi acidificado com ácido acético e o cloreto de sódio foi substituído pelo acetato de sódio para a formação de um tampão. Anastassiades et al., (2007) com o QuEChERS citrato realizou a etapa de partição com cloreto de sódio, citrato de sódio di-hidratado e hidrogenocitrato sesqui-hidratado. Na etapa dispersiva todos utilizaram sulfato de magnésio e PSA. Atualmente, as duas últimas versões são utilizadas como métodos oficiais para a determinação multirresíduos de agrotóxicos em alimentos (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015, PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

O uso de sais na etapa de partição como o sulfato de magnésio se deve pela separação mais completa da fase líquida-líquida e ainda aumenta a eficiência de extração de agrotóxicos não polares devido a reação exotérmica produzida durante sua ação. Já o cloreto de sódio apresenta a vantagem de

melhorar a separação das fases quando introduzido junto ao sulfato de magnésio e, além disso, reduzir a quantidade de componentes co-extraídos da matriz (GONZÁLEZ-CURBELO et al; 2015).

A etapa de extração em fase sólida dispersiva, também conhecida como a etapa de limpeza, consiste em adicionar uma quantidade de extrato em contato com uma mistura de sorventes com o uso de saís secantes (ANASTASSIADES et al., 2003). A escolha do sorvente ideal é avaliada através da remoção de interferentes co-extraídos da matriz no extrato em acetonitrila. Neste sentido, a limpeza do extrato é muito importante na etapa de d-SPE (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015).

Hoje os sorventes mais conhecidos e utilizados com a finalidade de limpeza de extratos de cereais são o florissil, a alumina, GCB, C18 e PSA. Mas os mais utilizados são o C18 e o PSA devido às características que possuem (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

A alumina ou óxido de alumínio (Al_2O_3), dependendo do preparo deste sorvente, pode apresentar característica alcalina, ácida ou neutra, e normalmente é empregada na separação cromatográfica de compostos lipofílicos. Já para compostos de baixa polaridade emprega-se o florissil (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

O GCB ou carbono grafitizado (do inglês *Graphitized Carbon Black*) é um sorvente muito eficiente na remoção de pigmentos como a clorofila e carotenóides, porém apresenta afinidade por compostos polares o que dificulta a recuperação destes, como é o caso de alguns agrotóxicos (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015). O GCB remove pigmentos assim como o PSA e coextrativos apolares como o C18 (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

O PSA ou N-propiletlenodiamine é um sorvente que tem como característica não reter os agrotóxicos, mas sim remover interferentes polares como é o caso de ácidos graxos, açúcares, ácidos orgânicos e pigmentos (GONZÁLEZ-CURBELO et al; 2015). Por ter a capacidade de ligar-se a compostos que contém grupos carboxílicos ácidos torna este sorvente muito importante na remoção de ácidos graxos em extratos de cereais mesmo que possa interagir com agrotóxicos ácidos (HERRMANN; POULSEN, 2015).

O octadecilsilano ou C18 é um sorvente eficiente na remoção de lipídios apolares. Porém, tanto o PSA como C18 podem reduzir a quantidade de co-extrativos em matrizes de cereais (HERRMANN; POULSEN, 2015). O C18 também é utilizado para limpeza em matrizes que contêm gordura (LEHOTAY et al., 2005a).

O sorvente Z-Sep é um sorvente desenvolvido recentemente pela Sigma Aldrich a partir de uma mistura de C18 e sílica revestida com dióxido de zircônio, na proporção 2/5 de $ZrO_2/C18$. O Z-Sep é aplicado para interferentes não polares como é o caso de lipídios (REJCZAK; TUZIMSKI, 2017). Normalmente utilizado em análises de agrotóxicos em amostras com grande quantidade de óleo (LOZANO et al., 2014). Sua utilização pode é evidenciada por Moreno-González et al., (2014) que utilizou este sorvente para a determinação de carbamatos em óleos vegetais. Já Lozano et al., (2014) avaliou a eficiência deste sorvente em amostras de abacate e amêndoas.

Um novo material para limpeza de extrato denominado Bond Elut EMR-Lipid foi recentemente desenvolvido pela Agilent. O EMR-Lipid é um produto utilizado no preparo de amostras com alto teor de gordura para a remoção de lipídios. Normalmente utilizado no tratamento de extratos obtidos pelo método QuEChERS e/ou precipitação de proteínas (ZHAO, 2016). Bond Elut EMR-Lipid consiste em 1 grama de EMR-Lipid em um tubo de polipropileno de 15 mL e o Polish que é 2 g da mistura de $MgSO_4/NaCl$ na proporção 4:1 (m/m) em outro tubo de polipropileno de 15 mL (HAN et al., 2016). Inicialmente, o material (EMR-Lipid) é ativado com água e sua eficiência na remoção de lipídios ocorre através das interações hidrofóbicas e exclusão por tamanho. Sendo assim, os lipídios são retidos pelas partículas devido a grande cadeia de hidrocarbonetos e os demais analitos não interagem devido ao tamanho da partícula (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015).

Em um método multirresíduo, com amplo escopo analítico, é muito difícil obter um extrato livre de interferentes sem reduzir a recuperação de alguns compostos. Porém, a combinação de diferentes sorventes na etapa de limpeza dispersiva torna a remoção de interferentes possível sem que seja necessário reduzir o escopo analítico (LEHOTAY et al., 2010). O método QuEChERS tem como característica a extração de diferentes resíduos e contaminantes como é o

caso, de agrotóxicos, micotoxinas e medicamentos veterinários (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

2.6 Métodos de determinação de agrotóxicos em cereais e derivados

De acordo com Frenich; Romero-Gonzalez; Aguilera-Luiz (2014), atualmente busca-se controlar ou monitorar resíduos e contaminantes através de métodos multi-classes ou multirresíduo, com o uso da Cromatografia Líquida e Gasosa ambas acopladas à Espectrometria de Massas. O acoplamento das técnicas possibilita determinar e quantificar níveis de concentração muito baixos e uma grande quantidade de compostos sem equívocos. Porém, a técnica a ser utilizada deve levar em consideração as características do analito a ser analisado como estabilidade térmica, polaridade e volatilidade (MASIÁ; BLASCO; PICÓ, 2014).

Boa parte dos agrotóxicos utilizados nos dias de hoje possuem características de serem termolábeis ou não serem facilmente vaporizados e ainda apresentam alta polaridade. Por ser uma técnica que abrange um número muito grande de compostos, a cromatografia líquida apresenta-se como preferida ou utilizada atualmente (MASIÁ; BLASCO; PICÓ, 2014).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas demonstrou ser uma técnica robusta, versátil e sensível. Atualmente o grande número de publicações ressalta a sua importância na determinação de compostos não voláteis e/ou instáveis termicamente. As fontes de ionização mais utilizadas são a ionização química (APCI) empregada na análise de moléculas mais voláteis e menos polares e a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray*) que é empregada na análise de moléculas de massa molecular maiores e mais polares (LANÇAS, 2009a).

Conforme a SANTE (2015) (do francês, *Santé et protection des consommateurs*), o milho é classificado como um cereal com grande quantidade de amido, que contém proteínas, gordura e pouca água. Analisar matrizes como cereais e leguminosas não é fácil, pois são matrizes muito complexas e possuem composição bastante característica (HE et al., 2015). Sendo assim, uma alta seletividade se faz necessária para a identificação de resíduos de agrotóxicos e para isso, se faz uso da Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de

Massas (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*) (MORENO-GONZÁLEZ et al., 2014).

2.6.1. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS)

Na cromatografia líquida (LC – *liquid chromatography*), a amostra é introduzida e separada na coluna cromatográfica, através da eluição com fase móvel, e submetida a ionização e posterior determinação em espectrômetro de massas (STACHNIUK; FORNAL, 2016).

Em cromatografia líquida as fontes de ionização geralmente mais empregadas são a ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric pressure chemical ionization*) e a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray ionization*) (ALDER et al., 2006). Na ESI, a ionização é diretamente na solução, o que permite que os compostos sensíveis à temperatura sejam ionizados sem sofrer degradação. Sendo assim, é aplicada a compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares que podem ser facilmente ionizados (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

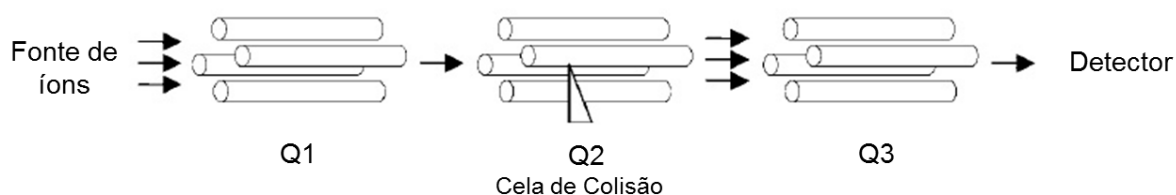
Na eletronebulização, a fase móvel contendo o analito de interesse dissolvido na mesma passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem e forma pequenas gotas altamente carregadas ("*spray*") que são dessolvatadas. A dessolvatação ocorre através de um fluxo contínuo de gás seco, na região do "*spray*", onde o tamanho das gotas é reduzido até que ocorra a "explosão coulômbica". Inúmeras explosões ocorrem até que são produzidos íons do analito e estes são direcionados para o interior do espectrômetro de massa por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

De acordo com Collins; Braga; Bonato (2006) o espectrômetro de massas é um instrumento constituído pela fonte de ionização, analisador de massas e detector. Após a injeção da amostra formam-se íons que são analisados de acordo com sua razão massa/carga (m/z) e a detecção é feita pela intensidade do feixe de elétrons. O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas tem como vantagem ser universal e altamente seletivo, ao operar no

modo de monitoramento de reações selecionadas, permitindo a quantificação de picos sobrepostos, com alta detectabilidade, avaliação da pureza do pico e a confirmação da presença do analito.

O analisador de massas triplo quadrupolo (TQ ou QqQ), utilizado neste trabalho, é um instrumento composto por três quadrupolos em série, onde o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1) geralmente por dissociação induzida por colisão (DIC do inglês *Collision-induced dissociation*) com um gás inerte (geralmente Ar, He ou N_2), direcionando os íons produzidos ao terceiro quadrupolo (Q3), onde os fragmentos são selecionados e enviados ao detector (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008), como pode ser observado na Figura 6:

Figura 6 - Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo.



Fonte: Adaptado de ALDA; KUSTER; BARCELÓ (2006).

De acordo com Chiaradia; Collins; Jardim (2008), “os triplos quadrupolos permitem a obtenção de menores limites de detecção, de forma que podem ser mais adequados em casos de compostos com menores LMRs”.

O acoplamento da cromatografia líquida com o espectrômetro de massas em série permite uma alta seletividade, eficiência na separação, informação estrutural, massa molar e aumentar a detectabilidade em uma única ferramenta de análise (OSHITA e JARDIM, 2015).

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

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

Chen e colaboradores (2011) determinaram resíduos do herbicida bromoxinil em solo e milho (planta e grão) utilizando LC-MS/MS. Para o preparo da amostra de grãos pesou-se 10 g amostra, em tubos de 50 mL, e adicionou-se 5 mL de água destilada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) seguido de 20 mL de ACN e posteriormente agitação por 30 min. A partição foi feita com 3 g de NaCl e agitação em vórtex por 1 min seguida para centrifugação por 5 min. Em seguida 10 mL de sobrenadante foram concentrados em rotaevaporador a 40 °C e o resíduo foi evaporado em nitrogênio e após redissolvido em 1 mL de metanol. A amostra redissolvida foi submetida a uma etapa de limpeza com 30 mg de PSA/mL de extrato, seguido de agitação e centrifugação por 3 min com posterior filtração e injeção no sistema cromatográfico.

Para esta determinação o modo de ionização utilizado foi ESI negativo e MRM. A coluna de separação foi a Zorbax C18 (50 mm, 2.1 mm i.d., 1.8 mm de tamanho de partícula mantida a 30 °C. Como fase móvel ACN:água (70:30, v/v) a uma vazão de 0,2 mL min⁻¹ e 5 µL como volume de injeção. O método validado em LC-MS/MS foi linear na faixa de 0,005 a 0,5 mg L⁻¹ com LOD de 0,025 mg kg⁻¹ e LOQ de 0.01 mg kg⁻¹ para o grão de milho. As recuperações dos diferentes níveis ficaram entre 82,2 a 113,6% e RSD de 3,8 a 10,8%. Com estes resultados os autores consideraram adequados para a análise deste herbicida em solo e diferentes partes da cultura.

Uma variação no tampão foi estudada por Pang, Wang e Hu (2016) utilizando o método QuEChERS original e ultrassom com acetonitrila acidificada com ácido acético para a determinação de quatro herbicidas em solo, grão de milho e palha. Para o preparo da amostra utilizou-se 5 g de amostra de milho e solo cada e 2 g de palha com uma alíquota de 10 mL de acetonitrila acidificada 1% com ácido acético e adições de 2 mL de água para solo e grão de milho e 1 mL para palha de milho, seguido do extração em banho de ultrassom por 15 min.

Para a partição, reduziu-se a quantidade de sulfato de magnésio para 2 g pois, os resultados obtidos foram similares aos do QuEChERS convencional. Na etapa de limpeza, considerando 1 mL de extrato, utilizou-se 25 mg de C18 para todas as amostras e adicionou-se 8 e 15 mg de GCB, respectivamente, para o grão e a palha.

Para a análise destes compostos os autores utilizaram um cromatógrafo líquido acoplado a espectrometria de massas, operando no modo MRM, equipado com uma fonte de ionização por eletronebulização. Para a análise uma coluna Zorbax SB-C18 com 50 mm de comprimento, 2.1 mm de diâmetro interno e 1.8 μm de tamanho de partícula. A fase móvel utilizada foi de ACN 0,1% de ácido fórmico com uma vazão de 0,4 mL min^{-1} com um volume de injeção de 5 μL e a temperatura da coluna a 30 °C.

O método proposto apresentou resultados de recuperação e RSD variando entre 80 a 110% e menor que 14%, respectivamente. Os autores relatam também que o uso de acetonitrila acidificada a 1% com ácido acético demonstrou que tem uma boa sensibilidade e versatilidade quando utilizado com C18. O estudo de dissipação dos agrotóxicos demonstrou que a quantidade de resíduos encontrada foi abaixo do LOQ e LMR estabelecidos para cada analito.

Jiang e colaboradores (2017) determinaram resíduo do fungicida hymexazol em alimentos derivados de planta, entre eles no milho, com o método de QuEChERS e determinação por LC-MS/MS. Para a extração 5 g de milho foi pesada e homogeneizada em tubos com capacidade de 50 mL. Em seguida a amostra foi fortificada e agitada por 30 s sendo deixada em repouso por 30 min para promover a interação do analito com a amostra. Após 10 mL de água foram adicionados seguido de agitação por 15 min e posteriormente adição de 10 mL de ACN com agitação por 3 min. A partição foi feita com 4 g de MgSO_4 e 1 g de NaCl com agitação por 2 min e centrifugação a 5000 rpm por 5 min. Para o milho a etapa de limpeza, foi feita com 50 mg de alumina + 20 mg de GCB + 150 mg de MgSO_4 por mL de extrato, seguida de agitação e centrifugação e após filtração com filtros de membrana de 0,22 μm , e a injeção do extrato no sistema LC-MS/MS. Os autores relatam que a combinação destes sorventes proporcionou um extrato final mais limpo e evitar o entupimento do sistema.

O sistema cromatográfico equipado com bomba binária e *autosampler* utilizou a coluna de separação XBridge HILIC com 150 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 3,5 μm de tamanho de partícula. Como fase móvel foi empregada água com 0,1% de ácido fórmico e 7,5 mM de acetato de amônio, bem como ACN, na vazão de 0,2 mL min^{-1} . O tempo de análise foi de 5 min com a coluna mantida a 30 °C e o volume de injeção de 5 μL . O espectrômetro de massas operando no modo MRM com ionização no modo ESI⁺.

Os níveis de fortificação avaliados foram de 0,02; 0,05; 0,1 e 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com $n=5$ e os percentuais de recuperação variaram de 77,8 a 103,8% e o RSD de 1,5 a 9,8% para o milho. Um efeito matriz de -57,3% foi observado e o LOQ de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Sendo assim, os autores concluíram que o método é sensível e confiável para o monitoramento de rotina de hymexazol em diferentes tipos de amostras e entre elas o milho.

2.7 Validação de métodos cromatográficos

Validar um método cromatográfico é certificar que este vai produzir os resultados ansiados, desde que sigam as condições estabelecidas (Lanças, 2009b). Ainda segundo Lanças (2009b) “validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal-visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado apresentado”.

Para a validação do método alguns parâmetros, devem ser levados em consideração. De acordo com a SANTE (2015) e INMETRO (2011) deve-se avaliar a seletividade, a faixa linear, o efeito matriz, a exatidão, a precisão e o limite de quantificação e de detecção, conforme a Tabela 5. Cabe salientar que os parâmetros a serem validados devem ser avaliados de acordo com o interesse do método, ou seja, o tipo de ensaio (INMETRO, 2011).

Tabela 5 - Parâmetros avaliados na validação de um método analítico.

Parâmetro	Definição	Aplicação	Referência
Seletividade	Capacidade do método de medir exatamente um analito em uma amostra sem a interferência de analitos de interesse e outros componentes presentes na matriz	Extração da matriz "branco"	INMETRO, 2011; SANTE, 2015
Limite de Quantificação	Menor concentração do analito em análise que pode ser medida, com um grau aceitável de confiança, utilizando um determinado método	S/R = 10	INMETRO, 2011; SANTE, 2015
Limite de Detecção	Menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental	S/R = 3	INMETRO, 2011
Faixa Linear	Capacidade de uma técnica analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado como curva analítica	$y = ax + b$	INMETRO, 2011; SANTE, 2015
Exatidão	Indica o grau de concordância entre os resultados individuais obtidos em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro	Ensaio de Recuperação	INMETRO, 2011; SANTE, 2015
Precisão	Descreve a proximidade entre os resultados que foram obtidos exatamente da mesma forma	Repetibilidade e Reprodutibilidade	INMETRO, 2011; SANTE, 2015
Efeito Matriz	Aumento ou diminuição na resposta do detector na presença do analito no extrato da matriz em relação ao solvente	Varição aceita de +20 a -20%	INMETRO, 2011; SANTE, 2015

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. O procedimento experimental constituiu na otimização e validação do método QuEChERS modificado para determinação de resíduos de agrotóxicos em grãos de milho por LC-MS/MS.

Para o processo de validação, os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, efeito matriz, faixa linear, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão, em termos de repetibilidade e precisão intermediária.

3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho estão descritos abaixo:

- ⇒ Sistema LC-MS/MS Varian (USA) equipado com:
 - Cromatógrafo Líquido com bomba binária 212-LC, forno para coluna e sistema de desgaseificação;
 - Amostrador automático ProStar 410;
 - Detector MS 320, triplo quadrupolo (TQ) *Mass Spectrometer*, utilizando o modo de ionização por eletronebulização e sistema de aquisição de dados através do software MS Workstation versão 6.9.2;
 - Sistema gerador de nitrogênio LC/MS 12/2 (Domnick Hunter, Inglaterra).
- ⇒ Agitador vórtex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ⇒ Balança analítica de precisão, modelo SV-200 (AND, Japão);
- ⇒ Balança analítica de precisão, modelo AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ⇒ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ⇒ Centrífuga Centribio, modelo 80-2B (Centribio, Brasil);
- ⇒ Centrífuga refrigerada, modelo NT 825 (Nova técnica, Brasil);
- ⇒ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ⇒ Moinho IKA® Modelo: A11 BS32 (Alemanha);
- ⇒ Ultra-turrax IKA®T25 digital (Alemanha);
- ⇒ Freezer vertical, Consul de capacidade de 100 L (Brasil);

- ⇒ Sistema de evaporação turbo Vap® LV, marca Biotage (USA);
- ⇒ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3® (Millipore, EUA).

3.2 Materiais e reagentes utilizados

- ✓ Acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3® (18,2 MΩ cm);
- ✓ Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, Brasil);
- ✓ Acetato de sódio anidro (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- ✓ Extran® neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Filtros de PTFE de 13 mm e porosidade de 0,2 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ✓ Gás de colisão: Argônio 99,9992% de pureza (Air Products, Brasil);
- ✓ Padrões sólidos dos agrotóxicos estudados, conforme Tabela 6;
- ✓ Sorvente Bondesil C18 com tamanho de partícula de 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Bondesil PSA com tamanho de partícula de 40 µm (Agilent, EUA);
- ✓ Sorvente Z-Sep+ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ✓ Sorvente EMR-Lipid e Polish (Agilent, EUA);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas, 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);

3.3 Processamento da amostra

As amostras "branco" de grãos de milho foram adquiridas no interior da cidade de Nova Palma, no Rio Grande do Sul.

Para o processamento, coletou-se uma porção de 1000 g de amostra, sendo em seguida processada utilizando o moinho a fim de reduzir a granulometria para que este adquirisse um aspecto de farelo. As amostras processadas foram armazenadas em potes com capacidade de 200 g e em temperatura de -20 °C. Para o desenvolvimento do método retirou-se a amostra do freezer e aguardou-se que a mesma atingisse a temperatura ambiente.

O procedimento de preparo do *slurry* foi o mesmo utilizado por Cabrera (2012) que pesou uma determinada quantidade de amostra triturada e adicionou-se a mesma quantidade de água ultrapura (m/v), seguindo para homogeneização em ultra-turrax até formar uma fase homogênea da mistura. A amostra seca foi hidratada com 5 mL de água ultrapura, seguido de agitação por 1 min e deixada em repouso por 30 min, conforme He et al., (2015).

3.4 Seleção do padrão interno e do padrão de controle

Para este trabalho selecionou-se como padrão interno, para avaliação do instrumento LC-MS/MS, o composto trifenilfosfato (TPP, do inglês *triphenylphosphate*), onde ao extrato destinado à análise adicionou-se 20 µL de padrão interno na concentração de 1 mg L⁻¹. O padrão interno é um composto químico adicionado antes da injeção da amostra no sistema cromatográfico a fim de avaliar se a houve algum problema durante a análise da mesma. Geralmente uma quantidade conhecida deste composto é adicionada e, além disso, compostos deuterados ou isotópicos também podem ser utilizados (SANTE, 2015).

O padrão de substituição ou de controle selecionado foi atrazina deuterada d-5, a fim de verificar a eficiência do procedimento de extração e de limpeza do extrato, portanto o mesmo foi adicionado no momento da fortificação das amostras. Os resultados do padrão de controle não foram utilizados para a correção de recuperação de nenhum analito e sim apenas para a avaliação do procedimento de extração.

3.5 Agrotóxicos selecionados

Os agrotóxicos utilizados no desenvolvimento deste trabalho são de uso autorizado pela ANVISA, juntamente com compostos que não tem autorização e estão apresentados na Tabela 6, com seu grupo químico, classe, fórmula molecular, massa molar, log k_{ow} , pK_a e seu limite máximo permitido na União Europeia e no Brasil. Os compostos selecionados para este estudo foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer (Ausborg, Alemanha).

Tabela 6 - Agrotóxicos selecionados no desenvolvimento do método.

<i>Agrotóxicos</i>	<i>Grupo Químico</i>	<i>Classe</i>	<i>Fórmula Molecular</i>	<i>M. M. (g mol⁻¹)</i>	<i>Log K_{ow}</i>	<i>pKa</i>	<i>LMR</i>	<i>LMR</i>
							<i>EU (mg kg⁻¹)</i>	<i>Anvisa (mg kg⁻¹)</i>
Atrazina	Triazina	H	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,7	2,5	1,7	0,1	0,25
Azinfós-etil	Inseticida e acaricida	O	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	345,4	3,18	-	0,05	NTA
Azoxistrobina	Estrobilurina	F	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,4	2,5		0,05	0,01
Bentazona	Benzotiadiazinona	H	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	240,3	0,77 (pH 5.0) -0,46 (pH 7.0) -0,55 (pH 9.0)	3,3	0,1	0,02
Boscalida	Anilida	F	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343,2	2,96		0,5	-
Bromuconazol	Triazol	F	C ₁₃ H ₁₂ BrCl ₂ N ₃ S	377,1	3,24	2,75	0,2	-
Carbaril	Metilcarbamato de naftila	I	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201,2	1,85	10,4	0,5	-
Carbendazim	Benzimidazol	F	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191,2	1,51	4,2	0,01	0,05
Carbofurano	Metilcarbamato de benzofuranila	I, C, A e N	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221,3	1,8		0,02	0,1
Carboxina	Carboxanilida	F	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S	235,3	2,3	<0,5	0,01	0,05
Cianazina	Triazina	H	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	240,69	2,1	12,9	-	0,02
Clomazone	Isoxazolidinona	H	C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂	239,7	2,5		0,01	0,05
Clorpirifós-etil	Organofosforado	I, Form e A	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NOPS ₃	350,9	4,7		0,05	0,1
Clorpirifós-metil	Organofosforado	I, Form e A	C ₇ H ₇ Cl ₃ NOPS ₃	322,5	4	-	3	-
Deltametrina	Piretróide	I e Form	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	505,2	4,6		2	1
Diclofluanida	Sulfamida	F	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	333,2	3,7	-	-	-
Difenoconazole	Triazol	F	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	406,26	4,36	1,1	0,05	0,01

<i>Agrotóxicos</i>	<i>Grupo Químico</i>	<i>Classe</i>	<i>Fórmula Molecular</i>	<i>M. M. (g mol⁻¹)</i>	<i>Log K_{ow}</i>	<i>pKa</i>	<i>LMR EU (mg kg⁻¹)</i>	<i>LMR Anvisa (mg kg⁻¹)</i>
Fenarimol	Pirimidinilcarbinol	F	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	331,2	3,69	-	0,02	-
Fenpropatrina	Piretróide	I e A	C ₂₂ H ₂₃ NO ₃	349,42	6,04	-	0,01	0,4
Fentiona	Organofosforado	I, Form, A e C	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278,3	4,84	-	0,01	-
Fipronil	Pirazol	I, Form e C	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	437,15	3,75		0,005	0,01
Imidacloprido	Neonicotinóide	I	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255,7	0,57		0,1	0,5
Iprovalicarbe	Carbamato	F	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	320,4	3,2		0,05	-
Linuron	Uréia	H	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	249,1	3		0,05	0,3
Malationa	Organofosforado	I e A	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,3	2,75		8	8
Metalaxil-M	Acilalaninato	F	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	279,3	1,65	0	0,05	0,05
Metamidofós	Organofosforado	I e A	C ₂ H ₈ NO ₂ PS	141,1	-0,79	-	0,01	NTA
Metiocarbe sulfóxido	Metilcarbamato de fenila	I	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃ S				0,1	-
Mevinfós	Organofosforado	I e A	C ₇ H ₁₃ O ₆ P	224,1	0,127	-	0,01	-
Monocrotofós	Organofosforado	I	C ₇ H ₁₄ NO ₅ P	223,2	-0,22	-	0,02	NTA
Paraoxon etil	Organofosforado	I	C ₁₀ H ₁₄ NO ₆ P	275,195			-	-
Piraclostrobina	Estrobilurina	F	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	387,8	3,99		0,02	0,1
Pirazofós	Fosforotioato de heterociclo	F e I	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	373,4	3,8	-	0,05	-
Piridabem	Piridazinona	A e I	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS	364,9	6,37		0,05	-
Piridafentiona	Organofosforado	I e A	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS	340,3	3,2	-	-	0,05
Pirimetanil	Anilinpirimidina	F	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	199,3	2,84	3,52	0,05	-

<i>Agrotóxicos</i>	<i>Grupo Químico</i>	<i>Classe</i>	<i>Fórmula Molecular</i>	<i>M. M. (g mol⁻¹)</i>	<i>Log K_{ow}</i>	<i>pKa</i>	<i>LMR EU (mg kg⁻¹)</i>	<i>LMR Anvisa (mg kg⁻¹)</i>
Pirimicarbe	Dimetilcarbamato	I	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238,3	1,7	4,44	0,2	-
Pirimifós-metil	Organofosforado	I e A	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305,3	4,2	4,3	5	5
Profenofós	Organofosforado	I e A	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	373,6	4,44	0,6	0,01	0,02
Propargito	Sulfito de alquila	A	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	350,5	5,7	>12	0,01	-
Propiconazol	Triazol	F	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	342,22	3,72	1,09	0,05	0,1
Propizamida	Benzimidazol	H	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO	256,1	3,1-3,2	-	-	-
Simazina	Triazina	H	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201,7	2,1	1,62	0,01	0,02
Terbutilazina	Triazina	H	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229,71	3,4	1,9	0,05	0,1
Tetraconazol	Triazol	F	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	372,1	3,56	0,65	0,05	0,05
Tiacloprido	Neonicotinóide	I	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	252,7	1,26	-	0,05	-
Tiametoxam	Neonicotinóide	I	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	291,71	-0,13	-	0,05	0,02
Triadimefom	Triazol	F	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	293,8	3,18	-	0,1	-
Triazofós	Organofosforado	I, A e N	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	313,3	3,55	-	0,02	0,01
Triclorfom	Organofosforado	I	C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P	257,4	0,43	-	0,01	NTA
Trifloxistrobina	Estrobilurina	F	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	408,4	4,5	-	0,02	0,05
Triflumizol	Imidazol	F	C ₁₅ H ₁₅ ClF ₃ N ₃ O	345,7	5,06 (pH 6,5), 5,10 (pH 6,9), 5,12 (pH 7,9)	3,7	0,1	-
Vamidotiona	Organofosforado	I	C ₈ H ₁₈ NO ₄ PS ₂	287,3	-4,21	-	-	NTA

I: Inseticida, H: Herbicida, F: Fungicida, Form: Formicida, N: Nematicida, C: Cupinicida, A: Acaricida, NTA: Não tem autorização no Brasil.

Fonte: IUPAC, 2014; EU Pesticides data base (2014); ANVISA, 2014b

3.6 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoque de 1000 mg L⁻¹ de cada agrotóxico foram preparadas a partir da pesagem da massa do padrão sólido calculada, onde, levou-se em consideração o grau de pureza do padrão sólido, seguindo de diluição em solvente adequado.

A partir da solução de 1000 mg L⁻¹ de cada composto, preparou-se as misturas dos agrotóxicos em solvente na concentração de 10 mg L⁻¹ e após as soluções foram armazenadas em frasco âmbar a - 5 ° C.

A solução de atrazina deuterada foi preparada em um frasco individual assim como, a solução de trifenilfosfato, sendo ambos em acetonitrila. A solução de atrazina deuterada é utilizada para avaliação do método de extração e com ela pode-se verificar se houve algum problema durante a extração. Já a solução de trifenilfosfato é adicionada no extrato final que vai para a análise no sistema cromatográfico e este tem como função avaliar se houve problemas durante a injeção da amostra ou durante a análise.

Com a mistura de 10 mg L⁻¹ realizou-se as fortificações das amostras e também, preparou-se uma mistura na concentração de 1 mg L⁻¹ para que se pudesse fazer as curvas de trabalho na matriz e no solvente.

3.7 Desenvolvimento do sistema LC-MS/MS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em milho

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

Com o método já montado, injetou-se uma solução na concentração de 100 µg L⁻¹ a fim de ajustar o tempo de retenção de cada analito e avaliar a intensidade do sinal dos mesmos.

3.7.1 Escolha da fase móvel

A escolha da fase móvel foi baseada nos trabalhos de Prestes (2011), Friggi (2012) e Donato et al., (2012). As condições empregadas no sistema cromatográfico para a determinação de resíduos de agrotóxicos avaliados neste estudo estão descritas a seguir na Tabela 7:

- ⇒ Fase móvel: solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ (A) e metanol (B);

Tabela 7 - Gradiente de fase móvel utilizado para a eluição dos analitos.

Tempo (min)	% A	% B
0,0	90	10
2,00	55	45
8,00	10	90
11,00	5	95
17,00	5	95
18,00	90	10

- ⇒ Vazão da fase móvel: 150 µL min⁻¹;
- ⇒ Fonte de ionização: ESI;
- ⇒ Analisador: Espectrômetro de massas, do tipo Triplo Quadrupolo, operando no modo MS/MS;
- ⇒ Tempo da análise cromatográfica: 18 min.

3.7.2 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS

Os principais parâmetros do sistema cromatográfico LC-MS/MS foram otimizados previamente no LARP-UFSM e as condições utilizadas para a otimização do método e análise dos agrotóxicos em amostras de milho estão descritas a seguir.

- ⇒ Temperatura da coluna: 30 °C;
- ⇒ Pressão do gás de nebulização: 20 psi;
- ⇒ Volume de injeção: 10 µL;
- ⇒ Temperatura de dessolvatação: 250 °C;

- ⇒ Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 40 psi;
- ⇒ Temperatura da fonte: 50 °C;
- ⇒ Pressão do gás de colisão: 1,8 mTorr.

Os íons característicos de cada composto foram monitorados no modo SIM no quadrupolo (Q₁) e no quadrupolo (Q₃) foi efetuada a varredura do íon produto variando as energias de colisão, a fim de otimizar as melhores condições de detecção. Após avaliou-se as transições no modo SRM, para avaliar a transição a ser utilizada como quantificação (maior intensidade) e de confirmação (de segunda maior intensidade) dos agrotóxicos estudados.

3.8 Desenvolvimento do método para determinação de resíduos de agrotóxicos em milho

Inicialmente, realizou-se testes com os diferentes métodos QuEChERS apresentados no item 2.5.1, mantendo-se a mesma quantidade de amostra, porém avaliando a amostra seca (milho triturado) (AS) ou *slurry* (S) na proporção (1:1), com a finalidade de avaliar as diferentes formas de hidratação/extração da amostra. Ao mesmo tempo avaliou-se a recuperação dos agrotóxicos nos diferentes métodos testados, mas utilizando a quantidade de sorventes adotados por Lehotay et al., (2010), He et al., (2015) e Facco et al., (2015) na etapa de limpeza. O nível de fortificação avaliado foi de 100 µg kg⁻¹ com um n=3 repetições para todos os ensaios. Avaliou-se também a quantidade de co-extrativos obtidos em cada método de extração, através do teste gravimétrico, sem o uso de limpeza no extrato.

Estudou-se também a quantidade de solvente extrator, no caso de acetonitrila acidificada a 1 % com ácido acético (teste T₄ e T₅). Estes testes estão apresentados na Tabela 8, bem como os detalhes de tempo, temperatura de centrifugação e diluição final.

Tabela 8 - Ensaio de avaliação de diferentes métodos QuEChERS, quantidade de solvente extrator e amostra.

Etapa	T₁^a	T₂^b	T₃^c	T₄	T₅
Quantidade de amostra	5 g (AS) ou 10 g slurry (1:1)	5 g (AS) ou 10 g slurry (1:1)	5 g (AS) ou 10 g slurry (1:1)	5 g slurry (1:1)	5 g slurry (1:1)
Hidratação	5 mL água ultrapura	5 mL água ultrapura	5 mL água ultrapura	-	-
Homogeneização	agitação 1 min (vórtex)/ 30 min de repouso	agitação 1 min (vórtex)/ 30 min de repouso	agitação 1 min (vórtex)/ 30 min de repouso	-	-
Extração	10 mL acetonitrila	10 mL acetonitrila 1% ácido acético (v/v)	10 mL acetonitrila	5 mL acetonitrila 1% ácido acético (v/v)	10 mL acetonitrila 1% ácido acético (v/v)
Homogeneização	agitação 1 min (vórtex)	agitação 1 min (vórtex)	agitação 1 min (vórtex)	agitação 1 min (vórtex)	agitação 1 min (vórtex)
Partição	2 g MgSO ₄ + 0,5 g NaCl	2 g MgSO ₄ + 0,5 g CH ₃ COONa	2 g MgSO ₄ + 0,5 g NaCl + 0,5 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O + 0,25g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O	1 g MgSO ₄ + 0,25 g CH ₃ COONa	1 g MgSO ₄ + 0,25 g CH ₃ COONa

Separação I	agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3500 rpm/8min/10 °C	agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3500 rpm/8min/10 °C	agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3500 rpm/8min/10 °C	agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3500 rpm/8min/10 °C	agitação 1 min (vórtex) + centrifugação 3500 rpm/8min/10 °C
Limpeza	1 mL extrato + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	1 mL extrato + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	1 mL extrato + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	1 mL extrato + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	1 mL extrato + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18
Separação II	agitação 30 s (vórtex) + centrifugação 10000 rpm/5min	agitação 30 s (vórtex) + centrifugação 10000 rpm/5min	agitação 30 s (vórtex) + centrifugação 10000 rpm/5min	agitação 30 s (vórtex) + centrifugação 10000 rpm/5min	agitação 30 s (vórtex) + centrifugação 10000 rpm/5min
Filtração	filtração PTFE 0,22 µm	filtração PTFE 0,22 µm	filtração PTFE 0,22 µm	filtração PTFE 0,22 µm	filtração PTFE 0,22 µm
Diluição	1:1 fase móvel	1:1 fase móvel	1:1 fase móvel	1:1 fase móvel	1:1 fase móvel
Análise	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS

^aANASTASSIADES et al., (2003); ^bLEHOTAY et al., (2005); ^cANASTASSIADES et al., (2007).

Com base na literatura diferentes tempos de resfriamento foram testados, o tempo de 1 h (Lehotay et al., 2010; Molognoni et al., 2016), 2 h (Walorczyk, 2008), 3 h (Bernardi et al., 2016), 6 h (Pinho et al., 2010) e 12 h (Facco et al., 2015). Para estes testes uma alíquota de 4 mL do extrato foi transferido para tubos *Falcon* de 15 mL e levados ao freezer pelos tempos determinados a uma temperatura de -20 °C, seguido da etapa dispersiva para a limpeza do extrato final. Avaliou-se a variação da área de cada agrotóxico em cada tempo de resfriamento.

Posteriormente seguiu-se para a avaliação da etapa de limpeza dos extratos, onde quantidades de C18 e PSA foram variadas e a introdução de Z-Sep⁺ e EMR-Lipid foram testadas, conforme a Tabela 9.

Tabela 9 - Testes de limpeza variando quantidades e o tipo de sorvente por mL de extrato.

Teste	C18	PSA	Z-Sep ⁺	EMR/Polish
C ₁	50	50		
C ₂	125	50		
C ₃	75	50		
C ₄	100	50		
C ₅	50	150		
C ₆	50	75		
C ₇			50	
C ₈				200 mg EMR/400 mg Polish

C₁ (LEHOTAY et al., (2010), HE et al., (2015) e FACCO et al., (2015)); C₅ (MASTOVSKA et al., 2010); C₆ (WALORCZYK e DROŹDŹYŃSKI (2012); C₇ (MORENO-GONZÁLEZ et al., 2014); C₈ (HAN et al., 2016; ZHAO e LUCAS, 2015).

Estes testes foram fundamentais para a decisão de qual procedimento de extração e melhor remoção de co-extrativos a ser utilizado na matriz em estudo.

3.8.1 Teste gravimétrico

O teste gravimétrico foi realizado tanto para amostra de grão de milho seco triturado como *slurry* (1:1), a fim de avaliar a quantidade, em termos de massa (g), de co-extrativos extraídos durante a etapa de extração e partição com sais, sem a etapa de limpeza com sorventes.

Para o teste gravimétrico o procedimento se procedeu com a secagem de 5 mL de cada extrato utilizando concentrador TurboVap LV[®], sob fluxo de nitrogênio, utilizando temperatura de 70 °C. Os tubos de vidro, utilizados no equipamento, contendo os resíduos foram pesados para avaliação da remoção de co-extrativos, tendo como base a diferença das massas dos tubos antes e após a secagem dos extratos. Foi feito repetições com um n=3 para cada teste (Bernardi et al. (2016); Han et al. (2016)).

Os resultados deste teste foram avaliados através do teste t de *Student*.

3.9 Validação do método QuEChERS para a análise de resíduos de agrotóxicos em milho

Após definir a melhor condição cromatográfica de separação dos compostos desejados e a otimização mais adequada para o método QuEChERS modificado, realizou-se a validação do método proposto para os seguintes parâmetros: seletividade, curva analítica e faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito matriz

3.9.1 Seletividade

Avaliar a seletividade é necessário para se confirmar que nenhum analito de interesse seja eluído juntamente com algum componente ou interferente presente na matriz estudada (SANTE, 2015). A seletividade foi avaliada pela comparação da injeção de extratos da matriz "branco" e matriz branco fortificada com a solução dos analitos no sistema LC-MS/MS.

3.9.2 Curva analítica e faixa de trabalho

A curva analítica foi avaliada a partir da injeção das soluções preparadas conforme o item 2.7 nas concentrações 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100 e 150 µg L⁻¹, que corresponde a 10,0; 20,0; 40,0; 100; 200; 400 e 500 µg kg⁻¹. As curvas foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz obtido com o método proposto. As curvas na matriz e no solvente foram injetadas em triplicatas e conforme o INMETRO (2011) determinadas de acordo com a equação 1:

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

Onde:

x = concentração.

a = coeficiente angular-inclinação da curva analítica = sensibilidade.

b = coeficiente linear-interseção com o eixo y, quando x= 0.

Após a injeção das mesmas as áreas foram tabeladas e obtido o percentual de recuperação, o RSD (%), o coeficiente de determinação ($r^2 \geq 0,99$) e a faixa de linearidade.

3.9.3 LOD e LOQ do instrumento e do método

Para avaliação do LOQ e LOD, segundo Ribani et al. (2004), o LOQ corresponde à concentração do analito que produz uma relação sinal ruído maior que 10, ou seja, $LOQ = 10S/R$. Já o LOD corresponde a concentração do analito que tem uma relação sinal ruído de 3, ou seja, $LOD = 3 S/R$. Esta relação sinal ruído foi obtida através de software do equipamento (INMETRO, 2011).

Os valores de LOQ_m e o LOD_m são expressos em $\mu\text{g kg}^{-1}$. O LOQ_m foi adotado como o menor nível de fortificação que apresentou recuperações entre 70 e 120%, com $RSD \leq 20\%$. O LOD_m foi determinado através do LOQ_m dividido por 3,33 (INMETRO, 2011; SANTE, 2015).

3.9.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão

Segundo o INMETRO (2011) a recuperação do analito pode ser estimada através de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito em três diferentes níveis de concentração da faixa de aplicação do método, uma baixa, uma média e outra alta. Geralmente a recuperação é expressa em percentagem da quantidade obtida do analito em relação à quantidade do mesmo que foi adicionado a matriz (RIBANI et al., 2004).

A determinação da exatidão foi obtida através de ensaios de fortificação utilizando amostra “branco”, isto é, livre da presença dos agrotóxicos em estudo e para a exatidão do método, avaliando-se, assim, a recuperação dos compostos em estudo (INMETRO, 2011; SANTE, 2015). Os níveis avaliados foram de 10, 20,

50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com sete replicatas para cada nível de concentração. De acordo com o INMETRO (2011) e SANTE (2015), o cálculo de recuperação é feito de acordo com a equação 2:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

3.9.5 Precisão (repetitividade) e precisão intermediária

A precisão pode ser calculada através da fórmula do desvio padrão relativo (RSD), de acordo com a equação 3 (INMETRO, 2011; SANTE, 2015):

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

Onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto;

$$s = \left\{ \sum (x_i - \bar{x}_m)^2 / n - 1 \right\}^{1/2}$$

x_i = valores individuais;

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

N = número de medidas.

A precisão do método foi avaliada, em termos de repetitividade (RSD_r) através da extração de análise das amostras fortificadas, sendo realizadas em replicatas ($n=7$) para cada nível de concentração.

A precisão intermediária (RSD_{pi}) foi avaliada realizando o procedimento analítico em dias diferentes, através da injeção da curva analítica e das amostras branco nos níveis de 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

3.9.6 Efeito matriz

É possível observar o efeito matriz quando existe uma diferença considerável na resposta obtida utilizando padrões preparados no solvente e

padrões preparados no extrato da matriz, com boa precisão (PICÓ; BLASCO; FONT, 2004). Segundo Moreno-González et al., (2014), o efeito matriz pode ser atribuído por muitas causas mas, em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é normalmente observado a supressão/enriquecimento do íon. De acordo com a SANTE (2015) sua determinação se faz pela comparação entre as inclinações das curvas analíticas dos padrões no solvente e as preparadas na matriz, conforme a equação 4:

$$\text{Efeito matriz} = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

x_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas na matriz;

x_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente (acetonitrila).

3.10 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

As 5 amostras de farinha, de diferentes granulometrias (média e grossa) e 1 de pipoca foram adquiridas de redes de supermercados da cidade de Santa Maria, RS. As 3 amostras de grãos foram compradas em estabelecimentos agropecuários desta mesma cidade, onde o grão era comercializado para alimentação animal. Este método foi aplicado em amostras comerciais de milho em grão, farinhas e pipoca durante a avaliação da precisão intermediária.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Condições do sistema LC-MSMS empregado para a determinação de agrotóxicos em milho

A Tabela 10 apresenta as condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação dos agrotóxicos avaliados neste estudo.

Tabela 10 - Condições no sistema LC-MS/MS.

Parâmetros	LC-MS/MS
Coluna analítica	Pursuit XRs Ultra C18 100 x 2.0 mm (d.i.) e 2.8 µm de tamanho de partícula
Pré-coluna	Meta Guard Pursuit, 3 µm, 2,0 mm, C18
Fase Móvel	(A) Solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (B) Metanol
Gradiente	Item 3.7.1
Vazão	0,15 mL min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Detector	Espectrômetro de massas, do tipo triplo quadrupolo, operando no modo de aquisição SRM

Os agrotóxicos avaliados neste trabalho foram determinados pela LC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI (+ e -) no modo de aquisição SRM. As informações de cada agrotóxico estão disponíveis na Tabela 11.

Tabela 11 - Agrotóxicos com seus respectivos tempos de retenção, íon precursor, íon produto, energia de colisão, energia do cone e modo de ionização.

t_R	Agrotóxicos	Íon Precursor	Íon Produto	CE (ev)	Íon Precursor	Íon Produto	CE (ev)	ESI
2,53	Metamidofós	142	93,9	12,5	142	124,8	12,5	+
5,65	Tiametoxan	292	210,9	11	292	181	19,5	+
5,63	Monocrotofós	224	192,9	7	224	126,9	13,5	+
5,70	Bentazona	239	131,7	25,5	239	196,6	19	-
6,02	Imidacloprido	256,1	209	14	256,1	175	17	+
6,02	Metiocarbe sulfóxide	242	185	11	242	170	14	+
6,18	Vamidationa	288	145,9	10	288	117,8	20	+
6,49	Triclorfon	257	108,8	15,5	257	220,8	11	+
6,62	Tiacloprido	252,9	125,8	18	252,9	185,9	12,5	+
6,81	Mevinfós	242,1	126,8	14,5	242,1	192,9	7,5	+
6,90	Carbendazim	192	160	15	192	131,9	27	+
7,37	Cianizina	241	214	14	241	131,9	21,5	+
7,89	Simazina	202	131,9	19,5	202	123,9	18	+
7,74	Carbofuran	222	165	7,5	222	122,9	16,5	+
8,01	Carboxin	236	142,8	10,5	236	86,8	21	+
8,01	Carbaril	202	144,9	8	202	126,9	26,5	+
8,30	Paraoxon etílico	293	219,9	16	293	275,9	8,5	+
8,38	Pirimicarbe	239	182	12,5				+
8,55	Metalaxyl	280	220	12	280	248	9	+
8,60	Atrazina	216	173,9	13,5	216	103,8	24,5	+
8,79	Azoxistrobina	404	372	14,5	404	328,9	30	+
9,09	Clomazone	240	124,9	18	240	88,9	39,5	+
9,26	Boscalida	343	306,9	17,5	343	270,9	30	+
9,29	Linuron	249,1	159,9	16	249,1	181,9	13,5	+
9,43	Terbutilazina	230	174	12	230	131,9	20,5	+
9,43	Malationa	331	284,9	8	331	126,9	9	+
9,55	Pirimetanil	200	106,9	21				+
9,55	Triadimefon	294	224,9	12	294	197	14,5	+
9,55	Piridafentiona	341	189	20	341	204,9	20	+
9,69	Propizamida	255,9	189,9	10,5	255,9	172,9	18	+
9,69	Bromuconazole	378	158,9	23,5	378	160,9	23,5	+
9,64	Triazofós	314	162	16	314	118,9	32	+
9,73	Diclofluanida	350	223,8	14	350	332,8	7,5	+
9,75	Tetraconazol	372	158,9	24				+
9,78	Iprovalicarbe	321	203	8	321	118,8	14	+
9,87	Azinfós etílico	346	131,9	12	346	160	5,5	+

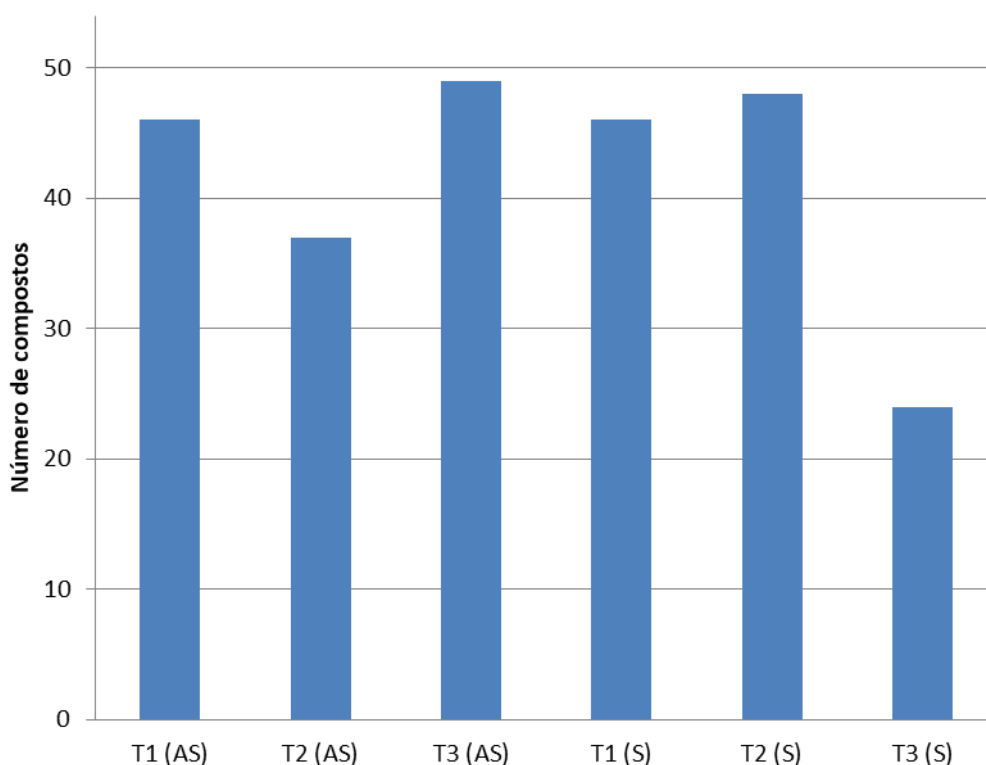
t_R	Agrotóxicos	Íon Precursor	Íon Produto	CE (ev)	Íon Precursor	Íon Produto	CE (ev)	ESI
9,87	Fenarimol	331	267,9	22,5	331	258,9	24,5	+
10,01	Fipronil	435	329,7	15,5	435	249,6	26,5	-
10,40	Atrazina deuterada (PC)	221	179	15	221	79	25	+
10,56	Trifenilfosfato (PI)	327	214,9	20,5	327	152	29	+
10,60	Propiconazol	342	158,9	25,5	342	69	14	+
10,65	Fentiona	279	246,9	11,5	279	169	14,5	+
10,65	Piraclostrobina	388	194	9	388	163	22	+
10,95	Pirazofós	374	222	19	374	194	30	+
11,00	Trifloxistrobina	409	186	14	409	206	11	+
11,01	Pirimifós metil	306	164	19,5				+
11,10	Difenoconazole	406	250,9	24	406	336,9	15,5	+
11,37	Triflumizole	346	278	10,5	346	220,2	13,5	+
11,41	Clorpirifós metílico	322	124,8	15	322	289,7	14,5	+
11,67	Profenofós	375	304,7	19,5	375	346,7	12	+
12,45	Clorpirifós etílico	349,9	197,8	16	349,9	321,7	10,5	+
12,60	Fempropatrina	367,2	124,9	12,5	367,2	350,1	7	+
12,55	Propargito	368	231,1	9,5	368	175,1	12	+
13,06	Deltametrina	523	280,8	15	523	505,9	9	+
13,57	Piridabem	365	309	11,5	365	147	21	+

t_R : tempo de retenção; CE: Energia de colisão.

4. 2 Otimização do método QuEChERS para análise de agrotóxicos em milho

Com a comparação dos testes T_1 , T_2 e T_3 avaliou-se o uso de *slurry* (1:1) de amostra:água ou a amostra seca (AS) seguida da adição da água com posterior agitação e tempo de hidratação da matriz. O percentual de compostos com recuperação e RSD aceitáveis de acordo com a SANTE (2015) em cada ensaio está apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Número de compostos com recuperação entre 70 e 120% e RSD \leq 20% obtido em cada ensaio.



Para avaliar a quantidade de co-extrativos, o teste gravimétrico foi executado de acordo com o item 3.8.1 e com o valor em gramas da massa residual encontrada nos tubos foi aplicado o teste t de *Student*, conforme apresentado na Tabela 12, entre os ensaios com *slurry* e entre os ensaios com amostra seca.

Tabela 12 - Resultados do teste t de *Student* para a comparação entre as massas residuais obtidas no teste gravimétrico.

T1 (AS) x T2 (AS)	T1 (AS) x T3 (AS)	T2 (AS) x T3 (AS)	T1 (S) x T2 (S)	T1 (S) x T3 (S)	T2 (S) x T3 (S)	T2 (S) x T2 (AS)
0,00350	0,21990	0,00055	0,00229	0,09499	0,00105	0,21168

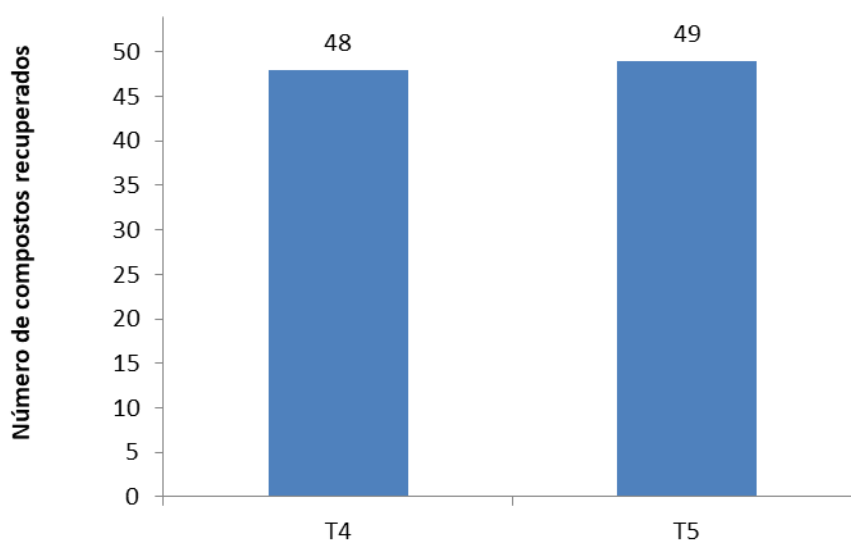
Como os resultados mostraram que a comparação das médias pelo teste t com valores de P calculados superiores ao alfa de 0,05 ($> 0,05$) mostrou não haver diferença significativa entre os ensaios T₁ e T₃, tanto para AS como para S.

Já o ensaio T₂ apresentou diferença significativa quando comparado aos ensaios T₁ e T₃, tanto para amostra seca como *slurry*. Na comparação dos resultados dos ensaios de T₂ não houve diferença significativa e T₂(S) por ter um número de compostos com condição aceitável maior foi escolhido para dar segmento ao trabalho. O uso de *slurry* (1:1) de amostra:água foi adotado por auxiliar a etapa de extração do método pois, de acordo com Walorczyk; Drożdżyński (2012) a adição de água em cereais é realizada devido ao baixo percentual da mesma e também para promover a extração dos compostos desejados pelo solvente.

A quantidade de amostra e solvente extrator são fatores importantes em um método de extração. A massa foi reduzida conforme Mastovska et al., (2010) que ressalta que a quantidade de amostra a ser utilizada se baseia na quantidade de co-extrativos extraídos da matriz, ou seja, uma análise onde a menor porção de interferentes é gerada. Visando a manutenção do sistema cromatográfico a quantidade de amostra foi reduzida pela metade (2,5 g) não deixando de ser representativa, pois, conforme a Tabela 4, outros autores também utilizaram a mesma quantidade de amostra.

O volume de acetonitrila acidificada 1% com ácido acético foi avaliada nos testes T₄ e T₅ e os resultados estão apresentados na Figura 8. Este teste tem por finalidade avaliar se o volume de solvente extrator exerce influência na recuperação, sendo que um total de 53 agrotóxicos foram avaliados.

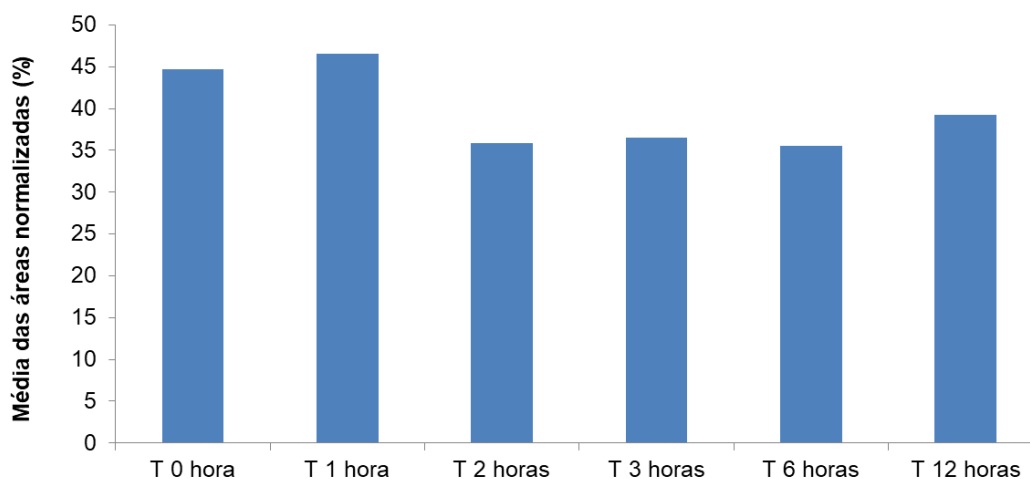
Figura 8 - Número de compostos obtido com recuperação e RSD aceitáveis nos testes T₄ e T₅.



Avaliando-se o número de compostos recuperados em cada teste, observa-se que a variação não foi significativa e a relação amostra/solvente, na proporção 1:2 foi considerada suficiente e adequada para uma determinação quantitativa para extração. Portanto, optou-se pelo método com menor fator de diluição (T₄), a fim de diminuir os limites de quantificação e detecção dos agrotóxicos estudados.

Amostras como o milho apresentam em sua composição ácidos graxos, já destacados (Regitano-d'arce e Vieira (2015) e Mastovska et al., (2010)), e segundo Walorczyk e Drozdzyński (2012) observou que a etapa de *freezing out* seguida da etapa de d-SPE reduz a quantidade de co-extrativos quando comparada a etapa de d-SPE somente. Com isso avaliou-se os tempos de 0, 1, 2, 3, 6 e 12 h a -20 °C, conforme já destacado no item 3.8 e seus resultados foram avaliados através da média das áreas normalizadas em relação a uma solução padrão de mesma concentração sendo demonstrado na Figura 9.

Figura 9 – Média das áreas normalizadas obtida em diferentes tempos de resfriamento.



Koesukwiwat e colaboradores (2010) demonstram que utilizando 1 e 2 h de resfriamento obtiveram uma boa diminuição de co-extrativos lipídicos no extrato de matrizes com alto teor de gordura. Com isso, o tempo de 1 h de resfriamento obteve a maior média de áreas normalizadas quando comparadas com as áreas no solvente o que confirma que este período é suficiente para promover uma pré-

limpeza do extrato assim como para Molognoni et al., (2016) e Lehotay et al., (2010) embora sejam matrizes diferentes.

A Figura 10 apresenta o procedimento executado para avaliação dos diferentes sorventes da etapa de limpeza do extrato, cuja quantidade está apresentada na Tabela 9. Os resultados (Figura 11) foram avaliados em termos de número de compostos com recuperação e RSD aceitáveis pela SANTE (2015).

Figura 10 – Fluxograma do procedimento de extração para avaliação da etapa de limpeza do extrato.

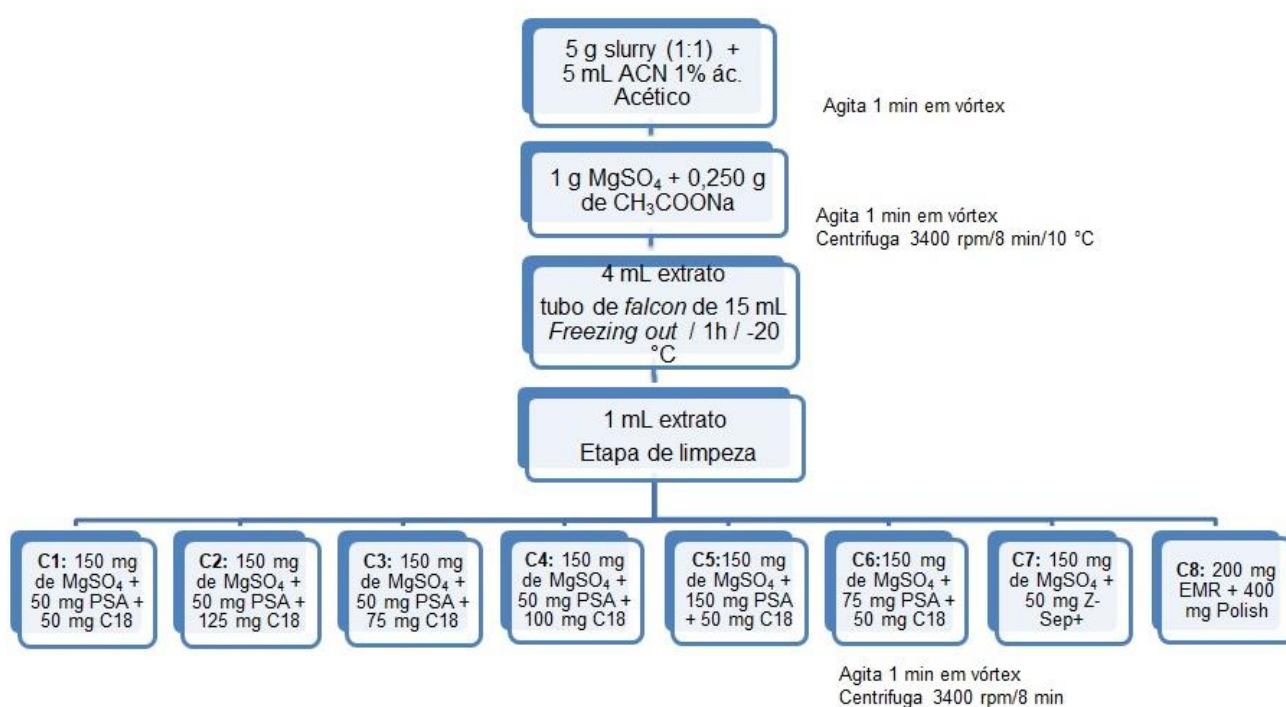
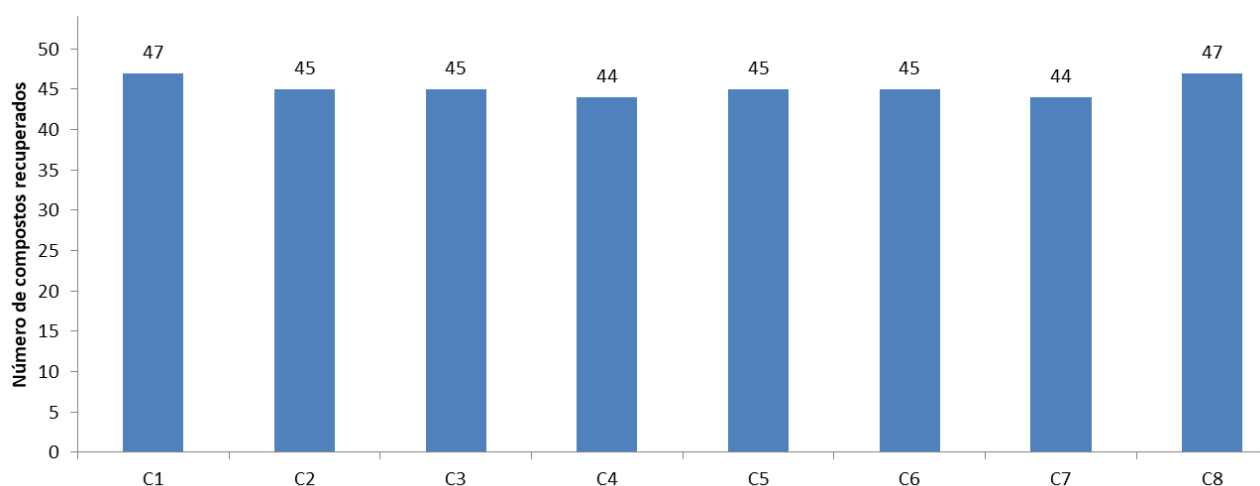


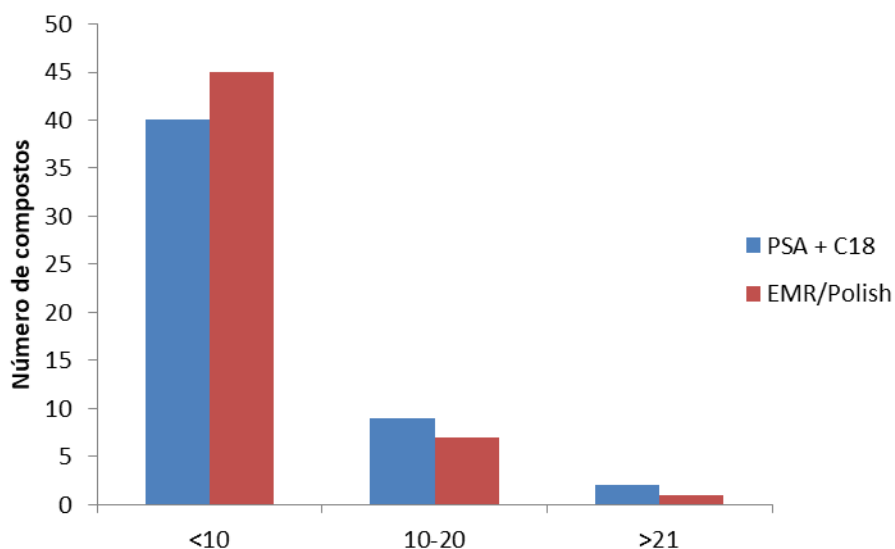
Figura 11 – Número de compostos com recuperação entre 70 e 120% com valores de RSD ≤ 20% em cada ensaio de limpeza do extrato.



Na literatura relata-se que para análise de agrotóxicos em cereais uma quantidade maior de PSA adotada favorece mais a remoção de co-extrativos lipídicos do extrato final. Embora tenha esta vantagem uma desvantagem é que ao aumentar a quantidade deste sorvente, agrotóxicos polares podem ter sua recuperação reduzida (WALORCZYK; DROŹDŹYŃSKI, 2012). O uso de C18 é indicado para matrizes como cereais, para a remoção de lipídios não afetando negativamente a recuperação dos agrotóxicos (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015; GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2012). O ensaio C1 quando comparado com as outras proporções destes sorventes apresenta o maior número de compostos com resultados aceitáveis. Com estes resultados observou-se que os ensaios C1 a C6 não tiveram muita variação em termos de número de compostos recuperados entre si, porém o que se observou é que ao se utilizar a etapa de *freezing out* seguida de d-SPE com PSA e C18 é possível a determinação de agrotóxicos.

O ensaio C7 avaliou Z-Sep⁺ e este é utilizado na determinação de agrotóxicos em amostras com alto teor de gordura como é o caso de óleo de milho (Moreno-Gonzalez et al., 2014) porém, para o grão de milho obteve-se menos agrotóxicos em condições aceitáveis quando comparado aos outros ensaios. Os ensaios de limpeza C1 e C8 foram os que obtiveram o maior número de compostos com resultados de recuperação e RSD aceitáveis. Com isso, avaliou-se o desvio padrão relativo em diferentes percentuais, conforme demonstra na Figura 12. O que se observou é que com EMR-Lipid é possível uma maior número de compostos com RSD mais baixos, ou seja, com um desvio menor. O uso de EMR-Lipid e polish não tem sido muito relatado na literatura para amostras de cereais, sendo assim, optou-se por utilizar este sorvente na determinação de agrotóxicos nesta matriz.

Figura 12 – Comparação do RSD (%) entre os ensaios com PSA + C18 e EMR/Polish.



4.3 Validação do método otimizado

Com os dados obtidos pode-se definir um método de extração. A Figura 13 demonstra o procedimento de extração e limpeza definidos.

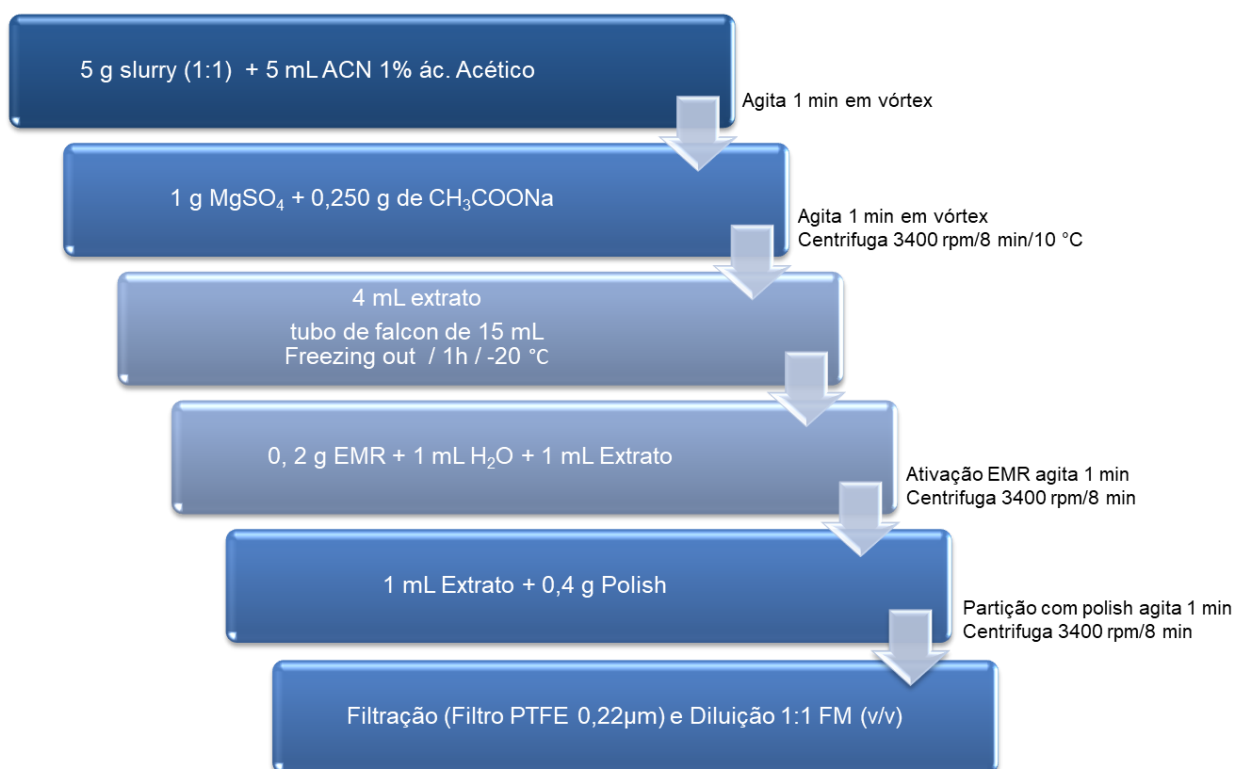
No método de preparo de amostra utilizou-se 5 g de *slurry* na proporção (1:1) de amostra:água seguida de fortificação desta matriz de acordo com os níveis desejados, e extração com 5 mL de acetonitrila acidificada 1 % de ácido acético. A adição de acetonitrila acidificada também foi utilizada por He et al., (2015) afim de melhorar a recuperação de agrotóxicos básicos. A partição foi realizada com sulfato de magnésio (1 g) e acetato de sódio (0,25 g) seguida de agitação e centrifugação.

Uma alíquota de 4 mL de extrato foram transferidos para tubos *Falcon* de 15 mL de capacidade e submetidos a *freezing out* por 1 h a uma temperatura de -20 °C. A etapa de *freezing out* foi adotada pela necessidade de remoção de ácidos graxos presentes no extrato da matriz, pois apresenta vantagens de ser simples, econômica, não necessita adição de solventes e sim apenas de um tempo para o uso do freezer para a exposição do extrato a baixa temperatura (KOESUKWIWAT et al., 2010) e além disso, ajuda na deposição, em parte, de outros possíveis interferentes como o amido, que é o principal componente deste cereal. Após esta etapa 1 mL deste extrato é transferido para um tubo contendo

200 mg de EMR-Lipid, já ativado com 1 mL de água ultrapura, seguindo para agitação e centrifugação. Após esta etapa o volume de 1 mL de extrato é transferido para o tubo contendo 400 mg de polish e rapidamente agitado e após centrifugado. Esta etapa de limpeza se faz necessária, pois diminui a quantidade de co-extrativos, diminuindo assim o efeito matriz e a necessidade de manutenção do equipamento (HAN et al., 2016). O uso de resfriamento e de EMR na etapa de limpeza do extrato também foi utilizado por RIBEIRO (2016).

Após esta etapa o sobrenadante (a fase orgânica) é recolhido e filtrado com filtros de PTFE de 0,22 μm com posterior diluição 1:1 em fase móvel.

Figura 13 - Fluxograma do procedimento de extração validado para o grão de milho utilizando EMR e Polish.

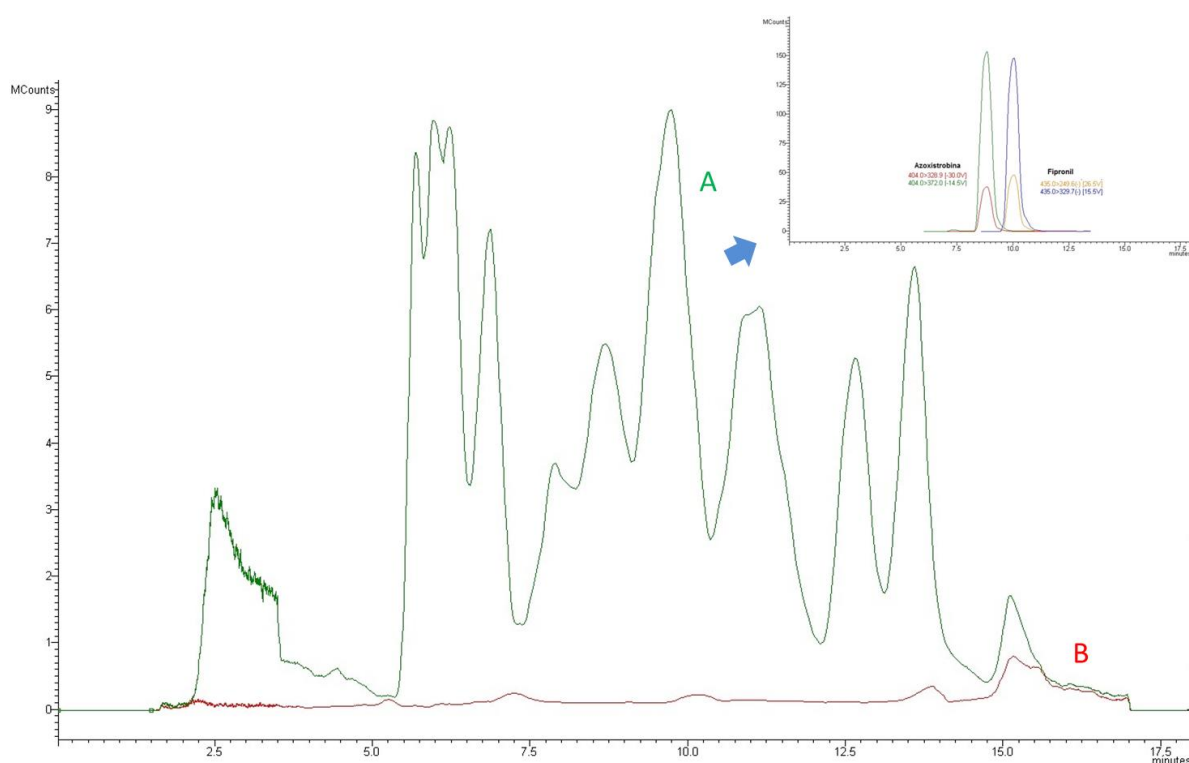


4.3.1 Seletividade

A análise pelo método QuEChERS modificado e LC-MS/MS foi considerada seletiva, uma vez que não apresenta interferentes com os mesmos íons de quantificação e confirmação nos tempos de retenção dos agrotóxicos, confirmando a boa seletividade do método.

A seletividade foi avaliada através da injeção do extrato branco da matriz e na Figura 14, observa-se os cromatogramas da amostra branco e fortificação na concentração de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$. Como não se observaram agrotóxicos de interesse, a amostra “branco” foi utilizada para confecções das curvas analíticas e ensaios de fortificação.

Figura 14 – Cromatogramas obtidos por QuEChERS modificado e LC-MS/MS para (A) fortificação na amostra “branco” no nível de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, (B) amostra “branco” de milho.



4.3.2 Curva analítica, faixa linear e efeito matriz

A Tabela 13 apresenta os coeficientes de determinação (r^2) para a curva analítica extraída da matriz de milho, a equação da reta e o efeito matriz para cada agrotóxico.

Tabela 13 – Equação da reta e coeficientes de determinação (r^2) e efeito matriz para cada agrotóxico estudado.

Compostos	Equação da reta	r^2	Faixa linear	EM
Atrazina	$y = 4e+06x + 7e+06$	0,999	2,5 - 150	-37,7
Azinfós etílico	$y = 1e+06x + 4e+06$	0,999	2,5 - 150	-22,9
Azoxistrobina	$y = 2e+07x + 1e+07$	0,999	2,5 - 150	-15,6
Bentazona	$y = 7e+06x + 8e+06$	0,999	2,5 - 50	66,6
Boscalida	$y = 2e+06x + 5e+06$	0,999	2,5 - 150	-31,9
Bromoconazole	$y = 784121x + 314632$	0,999	5 - 100	-30,0
Carbaril	$y = 5e+06x + 1e+07$	0,999	2,5 - 150	-16,8
Carbendazim	$y = 1e+07x - 8e+06$	0,996	2,5 - 150	-35,6
Carbofurano	$y = 7e+06x + 8e+06$	0,999	2,5 - 150	-18,2
Carboxim	$y = 7e+06x + 7e+06$	0,999	2,5 - 150	-24,5
Cianizina	$y = 1e+06x + 2e+06$	0,998	2,5 - 150	-23,4
Clomazone	$y = 1e+07x + 9e+06$	0,998	2,5 - 150	-15,4
Clorpirifós etílico	$y = 2e+06x + 3e+06$	0,999	2,5 - 150	-7,9
Clorpirifós metil	$y = 386889x + 1e+06$	0,999	10 - 150	-3,7
Deltametrina	$y = 2e+06x - 191529$	0,999	2,5 - 100	-15,7
Diclofluanida				
Difenoconazole	$y = 4e+06x + 6e+06$	0,999	2,5 - 150	-12,5
Fempropatrina	$y = 1e+07x + 9e+06$	0,998	2,5 - 150	-11,1
Fenarimol	$y = 477600x + 2e+06$	0,998	5 - 150	-15,8
Fentiona	$y = 2e+06x + 7e+06$	0,999	2,5 - 100	-13,4
Fipronil	$y = 2e+07x + 2e+07$	0,999	2,5 - 150	4,1
Imidacloprido	$y = 1e+06x + 1e+06$	0,999	2,5 - 150	-42,7
Iprovalicarbe	$y = 9e+06x + 2e+07$	0,999	2,5 - 150	-10,5
Linurom	$y = 2e+06x + 1e+07$	0,999	2,5 - 150	-14,2
Malationa	$y = 4e+06x + 2e+07$	0,998	2,5 - 150	-9,5
Metalaxil	$y = 1e+07x + 1e+07$	0,999	2,5 - 150	-12,6
Metamidofós				
Metiocarbe sulfóxido	$y = 6e+06x - 475469$	0,999	2,5 - 150	-32,9
Mevinfós	$y = 7e+06x + 8e+06$	0,999	2,5 - 150	-17,3
Monocrotofós	$y = 9e+06x + 6e+06$	0,999	2,5 - 150	-21,7
Paraoxon	$y = 4e+06x + 1e+07$	0,999	2,5 - 150	-25,8
Piraclostrobina	$y = 1e+07x + 4e+06$	0,998	2,5 - 150	-12,7
Pirazofós	$y = 9e+06x + 3e+07$	0,996	2,5 - 100	-7,5
Piridabem	$y = 2e+07x - 1e+07$	0,999	2,5 - 100	5,6
Piridafetiona	$y = 7e+06x + 3e+07$	0,997	2,5 - 150	-16,0
Pirimetanil	$y = 7e+06x + 3e+07$	0,999	2,5 - 150	-14,1
Pirimicarbe	$y = 1e+07x + 2e+07$	0,999	2,5 - 150	-19,4
Pirimifós metílico	$y = 2e+07x + 1e+07$	0,999	2,5 - 150	-9,9
Profenofós	$y = 5e+06x + 2e+07$	0,999	2,5 - 150	-6,1
Propargito	$y = 1e+07x + 6e+06$	0,999	2,5 - 150	-9,6
Propiconazole	$y = 2e+06x + 3e+06$	0,999	2,5 - 150	-18,7

Compostos	Equação da reta	r ²	Faixa linear	EM
Propizamida	$y = 2e+06x + 1e+07$	0,997	2,5 - 150	-27,5
Simazina	$y = 927191x + 2e+06$	0,994	5 - 150	-45,2
Terbutilazina	$y = 1e+07x + 3e+07$	0,999	2,5 - 150	-25,7
Tetraconazole	$y = 2e+06x + 6e+06$	0,999	2,5 - 150	-19,1
Tiacloprido	$y = 5e+06x + 2e+06$	0,998	2,5 - 150	-30,5
Tiametoxam	$y = 2e+06x - 120090$	0,998	2,5 - 150	-40,2
Triadimefom	$y = 2e+06x + 5e+06$	0,999	2,5 - 150	-15,9
Triazofós	$y = 2e+07x + 7e+07$	0,998	2,5 - 150	-14,9
Triclorfom	$y = 1e+06x + 5e+06$	0,999	2,5 - 150	-18,9
Trifloxistrobina	$y = 1e+07x + 9e+06$	0,999	2,5 - 150	-15,0
Triflumizole	$y = 3e+07x + 2e+07$	0,999	2,5 - 150	-6,7
Vamidationa	$y = 8e+06x + 3e+06$	0,999	2,5 - 150	-21,7

Os resultados indicam que o método analítico é adequado para o estudo, pois a maioria dos agrotóxicos apresentou coeficiente de determinação (r^2) maiores que 0,994 e faixa de linearidade de 2,5 a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo assim, este parâmetro enquadra-se nos critérios de aceitação. O efeito matriz foi determinado de acordo com o item 3.9.6 com resultados na faixa de -42,7 a 66,6%. Li et al. (2013); Liang et al. (2016); Ferrer et al. (2011) consideram que valores entre $\pm 20\%$ não tenham efeito matriz significativo, pois estes valores seriam próximos dos valores de repetibilidade. Já valores entre $\pm 20\%$ e $\pm 50\%$ demonstram um efeito matriz médio. Valores são menores ou maiores que $\pm 50\%$ são considerados elevados. Para SANTE (2015) o efeito matriz aceitável deve variar entre $\pm 20\%$ e geralmente é calculado levando em consideração a curva no solvente e na matriz.

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

O LOQ e o LOD foram determinados conforme o item 3.9.3 e estão representados na Tabela 14 para cada agrotóxico estudado. O LOQ_m variou de 10 a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o LOD_m de 3 a 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os LMRs não foram atendidos para os agrotóxicos difenoconazole e profenofós.

Tabela 14 - Valores obtidos de LOQ e LOD do método para cada agrotóxico estudado.

Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Atrazina	20	6
Azinfós etílico	50	15
Azoxistrobina	10	3
Bentazona	20	6
Boscalida	10	3
Bromoconazole	20	6
Carbaril	20	6
Carbendazim	20	6
Carbofurano	10	3
Carboxina	10	3
Cianizina	20	6
Clomazone	10	3
Clorpirifós etílico	20	6
Clorpirifós metil	50	15
Deltametrina	20	6
Diclofluanida	-	-
Difenoconazole	20	6
Fempropatrina	20	6
Fenarimol	20	6
Fentiona	50	15
Fipronil	10	3
Imidacloprido	10	3
Iprovalicarbe	20	6
Linurom	50	15
Malationa	50	15
Metalaxil	10	3
Metamidofós	-	-
Metiocarbe sulfóxido	20	6
Mevinfós	10	3
Monocrotofós	10	3
Paraoxon	10	3
Piraclostrobina	20	6
Pirazofós	50	15
Piridabem	20	6
Piridafetiona	50	15
Pirimetanil	50	15
Pirimicarbe	10	3
Pirimifós metílico	20	6
Profenofós	50	15
Propargito	100	30
Propiconazole	20	6

Agrotóxicos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Propizamida	50	15
Simazina	10	3
Terbutilazina	50	15
Tetraconazole	10	3
Tiacloprido	20	6
Tiametoxam	10	3
Triadimefom	10	3
Triazofós	10	3
Triclorfom	10	3
Trifloxistrobina	10	3
Triflumizole	10	3
Vamidationa	10	3

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

Os resultados de recuperação obtidos estão apresentados na Tabela 15. Os agrotóxicos fempropatrina, iprovalicarbe, mevinfós, pirimifós-metil, pirimetanil, propargito não foram considerados validados, pois não obtiveram resultados de recuperação e RSD satisfatórios na precisão intermediária.

Compostos	Rec e RSD (%)				Rec e RSD (%) PI			
	10 µg kg ⁻¹	20 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	100 µg kg ⁻¹	10 µg kg ⁻¹	20 µg kg ⁻¹	50 µg kg ⁻¹	100 µg kg ⁻¹
Metiocarbe sulfóxido	107 (5)	96,4 (7,3)	91,3 (4,4)	89,1 (2,7)	62,7 (0,8)	78,6 (10,9)	70,3 (2,4)	71,9 (6,4)
Mevinfós	111,5 (9,9)	93,8 (4,5)	92,3 (3,4)	93,8 (3,2)	-	-	-	-
Monocrotofós	109 (5,8)	92,6 (3,6)	93,2 (3,9)	92,9 (1,5)	72,8 (10,2)	91 (11,3)	81,8 (5)	88,2 (8,4)
Paraoxon	81,1 (14,6)	83,2 (14,5)	89,6 (7,2)	96,4 (4,7)	92,1 (17,4)	110,9 (6)	75,7 (14,5)	83,4 (12,4)
Piraclostrobina	-	78,7 (7,1)	81,6 (4,8)	77,5 (3,4)	-	75,3 (5,9)	69,1 (4,9)	76,6 (7,9)
Pirazofós	-	-	74,7 (7,4)	91,2 (3,9)	-	-	70,2 (4)	80,1 (5,8)
Piridabem	107,5 (4,5)	91,1 (6,8)	83,2 (5,1)	79,2 (5,3)	86,4 (4,2)	85,6 (4)	79,1 (5,9)	85,6 (8,7)
Piridafetiona	-	-	81,1 (5,5)	97,8 (3,2)	-	-	72,9 (3,4)	84,9 (10,4)
Pirimetaniil	-	-	71,5 (5,1)	73 (1,8)	-	-	-	-
Pirimicarbe	72,7 (5,3)	69,7 (4,4)	77,6 (3,9)	89,9 (5,4)	69,4 (7,9)	81,2 (8,6)	74,5 (4,3)	82,1 (6,8)
Pirimifos metílico	-	77,4 (5,7)	83 (1,9)	81,6 (3,1)	-	70 (16,6)	68,1 (1,8)	71,4 (8,7)
Profenofós	-	-	72,3 (6,8)	83,3 (2,5)	-	-	76,4 (3,7)	80,9 (7,9)
Propargito	-	79 (3,5)	84,6 (4,2)	87,5 (3,1)	-	63 (2,6)	53,3 (9,6)	70,8 (15,2)
Propiconazole	-	71,2 (8,5)	81,5 (8,6)	80,4 (9)	-	70,7 (11,6)	71,9 (4,8)	75,7 (7,8)
Propizamida	-	-	69,6 (4,4)	93,4 (6,8)	-	-	74,2 (11)	82,3 (11,1)
Simazina	-	93,9 (14,4)	92,6 (4,8)	95,5 (9,1)	-	87 (14,7)	77,7 (12,1)	74,5 (10,5)
Terbutilazina	-	-	73,5 (4)	83,5 (3,7)	-	-	75,5 (2,8)	85,2 (5,2)
Tetraconazole	72,8 (12,6)	82,1 (20)	92,3 (5,7)	100,4 (7)	118,4 (9,6)	120,4 (14,3)	70,1 (8,9)	73,5 (15,8)
Tiacloprido	-	86,1 (7,3)	85,6 (4,3)	90,2 (3,4)	-	73,5 (11,2)	70,1 (3,2)	70,1 (8,5)
Tiametoxam	108,5 (4,5)	102,4 (6)	92,6 (6,1)	89,9 (2,8)	70,4 (12,4)	86,7 (8,7)	74,4 (6,2)	70 (4,8)
Triadimefom	70,1 (7,5)	104,9 (8,9)	108,2 (8,1)	111,5 (9,9)	75,2 (14,8)	70,4 (8,8)	78,4 (20,1)	76,2 (15,6)
Triazofós	101,8 (5,2)	95,3 (5,1)	98,3 (4)	100,5 (3)	73,6 (12,4)	93,6 (10,2)	69,5 (3,8)	70,6 (9)
Triclorfom	87,4 (5,7)	80,6 (7,3)	85,6 (14,6)	100,3 (4,5)	111,4 (10,3)	108,7 (10,8)	73,3 (12,5)	72,6 (9)
Trifloxistrobina	74 (6,4)	86,5 (1,3)	87,9 (6,5)	87,1 (2,1)	73,6 (3,4)	88,9 (9,7)	72,5 (3,7)	72,6 (7,9)
Triflumizole	72,9 (3,1)	79,2 (4,8)	85,2 (2,7)	87,2 (2,7)	79,1 (4,8)	85,1 (3,8)	78,7 (4,9)	84,4 (6)
Vamidationa	86,5 (4,5)	86,3 (4,5)	87,5 (4,7)	91,8 (3,1)	71,1 (17,1)	78,8 (10,4)	70,8 (5,2)	71,3 (1,7)

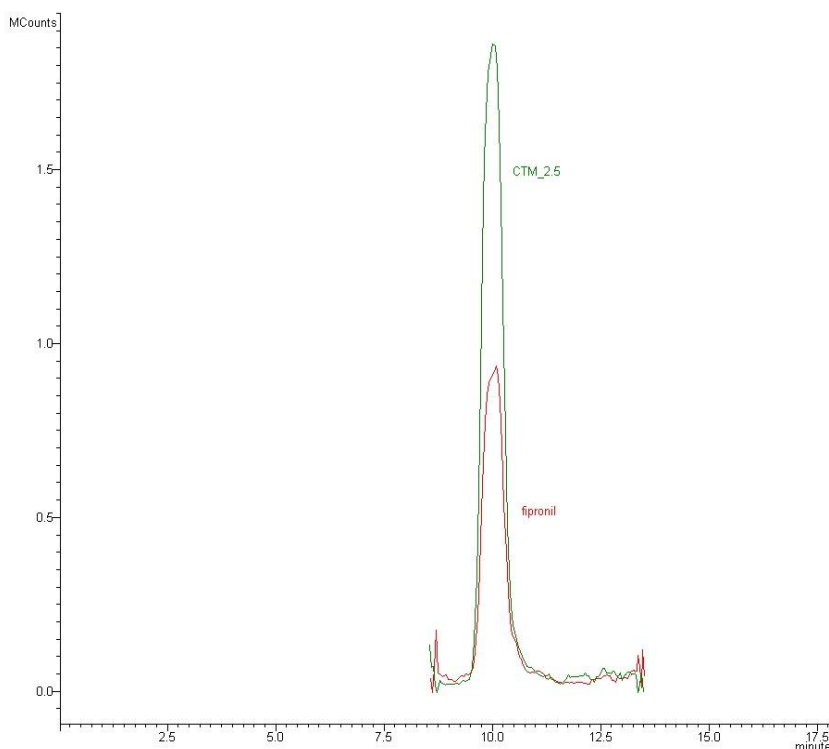
O fungicida diclofuanida é sensível em termos de degradação em acetonitrila conforme Lehotay et al., (2005) e por este motivo não foi recuperada em nenhum nível de fortificação. O metamidofós não pode ser determinado por este método, assim como no trabalho de Han e colaboradores (2016) que não obtiveram bons resultados de recuperação ao utilizar EMR como sorvente de limpeza em matrizes de alto teor de gordura. Observa-se também que na cromatografia este analito não apresenta um bom comportamento.

4.4 Aplicação do método em amostras reais

O método validado foi aplicado em 5 amostras reais de farinha de milho de diferentes marcas e 1 de pipoca obtidas em redes de supermercados e 3 amostras de grãos comerciais de milho de estabelecimentos em Santa Maria, RS.

A análise destas amostras demonstrou que apenas uma amostra de grão se detectou os agrotóxicos carbendazim e fipronil em concentração abaixo do LOQ do método para estes analitos. A Figura 15 demonstra a confirmação da detecção de fipronil em concentração inferior ao LOQ do método.

Figura 15 – Sobreposição do ponto na matriz (CTM) $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ com a amostra contendo fipronil em concentração menor que o LOQm.



5 Conclusões

O método QuEChERS modificado validado demonstrou ser eficaz na extração de 45 agrotóxicos em milho, considerando a grande dificuldade em realizar análises multirresíduo em matrizes complexas como em grãos de milho. A etapa de *freezing out* mostrou ser eficiente no tempo de 1 h, quando comparado com os métodos da literatura, que podem variar de 2 a 12 h, possibilitando assim um método de extração mais rápido. Na etapa de d-SPE o sorvente EMR-Lipid foi considerado eficiente para a determinação dos agrotóxicos estudados.

Os compostos diclofluanida e metamidofós não obtiveram curva e nem recuperações aceitáveis em nenhum nível de fortificação. Os agrotóxicos fempropatrina, iprovalicarbe, mevinfós, pirimifós-metil, pirimetanil e propargito não obtiveram bons resultados de recuperação em alguns níveis durante a avaliação da precisão intermediária do método, logo, estes compostos foram considerados não validados.

A exatidão, precisão e a linearidade do método mostram-se adequadas, uma vez que a recuperação nos níveis de 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ variou entre 69,1 a 120,4% com $\text{RSD} \leq 20,6\%$, para 45 dos 53 agrotóxicos avaliados. O coeficiente de determinação foi maior ou igual a 0,994 para todos os compostos. Os valores de LOQ e LOD do método permaneceram entre 10 a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 3 a 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A linearidade do método foi de 2,5 a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a maioria dos agrotóxicos e o efeito matriz variou de -42,7 a 66,7%. Os LMRs não foram atendidos para os agrotóxicos difenoconazole e profenofós, demonstrando que para os demais o método atinge os limites estabelecidos pela Anvisa.

O uso cromatografia líquida mostrou-se adequada para a detecção dos compostos utilizando o equipamento LC-MS/MS, operando no modo SRM, proporcionou satisfatória detectabilidade, seletividade e precisão do método.

O método proposto foi aplicado em 09 amostras, entre elas farinha de milho, pipoca e grãos de milho provenientes de agropecuárias da cidade de Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul. Em uma amostra foi detectado fipronil e carbendazim em concentração abaixo do LOQ. Sendo assim, o método desenvolvido pode ser utilizado para a determinação de agrotóxicos em milho.

6 Sugestões de trabalhos futuros

As sugestões para trabalhos futuros são as seguintes:

- Otimização da etapa de limpeza do extrato para a obtenção de agrotóxicos que não obtiveram bons resultados neste trabalho;

- Avaliação por GC-MSMS de extratos após diferentes procedimentos de limpeza;

- Avaliação de um escopo maior de agrotóxicos para este método, dando um enfoque maior aos inseticidas;

- Avaliação de interferentes da matriz através do GC-MS/MS. O amido, o principal componente do milho pode estar retendo agrotóxicos de interesse e assim dificultando a análise do mesmo.

- Desenvolvimento do método em um UHPLC-MSMS a fim de obter limites de detecção mais baixos atingindo assim a Legislação para um escopo maior de agrotóxicos e também uma análise mais rápida, possibilitando a redução do tempo de análise de aproximadamente 20 para 10 min.

7 Destinação dos resíduos gerados no laboratório

As atividades laboratoriais geram resíduos líquidos e sólidos provenientes dos ensaios analíticos e estes devem ser tratados e descartados de forma adequada.

Neste trabalho, os resíduos líquidos foram recolhidos, colocados em recipientes separados e rotulados como halogenados e não-halogenados e logo após encaminhados ao setor responsável pelo tratamento final destes resíduos, no Departamento de Química da UFSM. Já os resíduos sólidos, foram colocados em sacos plásticos, devidamente rotulados e identificados e logo em seguida encaminhados ao mesmo local que os resíduos líquidos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO (Associação Brasileira das Indústrias do Milho), **O cereal que enriquece a alimentação humana**. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>. Acessado em: 20 de janeiro de 2015a.

ABIMILHO (Associação Brasileira das Indústrias do Milho). **Consumo**. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/estatistica/consumo>. Acessado em: 20 de janeiro de 2015b.

ABIMILHO (Associação Brasileira das Indústrias do Milho). **Oferta e Demanda**. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/estatisticas>. Acessado em: 26 de junho de 2017.

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

AKOTO O., ANDOH H., DARKO G., ESHUN K., OSEI-FOSU P. Health risk assessment of pesticides residue in maize and cowpea from Ejura, Ghana. **Chemosphere**. v. 92, p. 67-73, 2013.

ALDA, M. L. de; KUSTER, M.; BARCELÓ, D. Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 900– 916, 2006.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 838-865, 2006.

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

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

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

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) relatório de atividades 2012 complementar**, BRASÍLIA, 2014a.

ANVISA; Agrotóxicos e Toxicologia. **Monografias Autorizadas**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>> Acesso em: 06 nov. 2014b.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – PARA. Relatório de atividades de 2013 a 2015**. Brasília, 25 de novembro de 2016.

BARBOSA, L. C. A.; **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004.

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

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

BORÉM, A.; RIOS, S. de A. (Ed). **Milho Biofortificado**, Capítulo em livro técnico-científico (Alice), Disponível em: <www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/889387/1/MilhoBiofortificado003.pdf>, 2011.

BOTERO-COY, A. M; IBÁÑEZ, M; SANCHO, J. V; HERNÁNDEZ, F. Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 157-165, 2013.

CABRERA, L. C., **Estudo do efeito matriz na determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de arroz pelo método QuEChERS modificado e LC-MS/MS**. Tese (Doutorado em Química), UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.

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

CHEN, X., DONG, F., XU, J., LIU, X., CHEN, Z., LIU, N., ZHENG, Y. Enantioseparation and determination of isofenphos-methyl enantiomers in wheat,

corn, peanut and soil with Supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometric method. **Journal of Chromatography B**, v. 1015–1016, p. 13-21, 2016.

CHEN, X., LI, W., WU, Q., ZHI, Y., HAN, L. Bromoxynil residues and dissipation rates in maize crops and soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 74, p. 1659-1663, 2011.

CHENG C., DI S., ZHANG W., CHEN L., TIAN Z., ZHOU Z., DIAO J., Determination of cyanamide residue in 21 plant-derived foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**. v. 239, p. 529-534, 2018.

CHENG, Y.; DONG, F.; LIU, X.; XU, J.; MENG, W.; LIU, N.; CHEN, Z.; TAO, Y.; ZHENG, Y. Simultaneous determination of fipronil and its major metabolites in corn and soil by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1788-1795, 2014.

CHUNG S. W. C., CHEN B. L. S. Development of a Multiresidue Method for the Analysis of 33 Organochlorine Pesticide Residues in Fatty and High Water Content Foods. **Chromatographia**. v. 78, p. 565–577, 2015.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo: Editora da Unicamp, 2006.

CUNHA, S. C., FERNANDES, J. O., Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 7748-7757, 2011.

DONATO, F. F.; KEMMERICH, M.; FACCO, J. F.; FRIGGI, C. A.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Simultaneous determination of pesticide and antibiotic residues at trace levels in water samples by SPE and LC-MSMS. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 7, p. 331-340, 2012.

DONG, X.; LIANG, S.; SHI, Z.; SUN, H. Development of multi-residue analysis of herbicides in cereal grain by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 192, p. 432-440, 2016.

EMBRAPA; Fisiologia do milho. **Circular técnica 22**. Minas Gerais. Disponível em: < <https://docs.agencia.cnptia.embrapa.br/milho/circul22.pdf>>. ISSN 1679-1150, 2002.

FACCO, J. F.; MARTINS, M. L.; DERNARDI, G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization and validation of a multiresidue method for pesticide determination in maize using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, **Analytical Methods**, v. 7, p. 359-365, 2015.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2005. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/379/DesktopDefault.aspx?PageID=379>> Acesso em: 03 nov. 2016.

FELIPPE, G. **Grãos e sementes: a vida encapsulada**. Editora: Senac, São Paulo, 2007.

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

FREITAS, R. S., QUEIROZ, M. E. L. R., FARONI, L. R. D. A., HELENO, F. F., MOURA, V. V., DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE INSETICIDAS EM GRÃOS DE MILHO OZONIZADOS. **Química. Nova**, v. 37, n. 2, p. 238-243, 2014.

FRENICH, A. G.; ROMERO-GONZALEZ, R.; AGUILERA-LUIZ, M.M. Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 158-169, 2014.

FRIGGI, C. A. **Determinação de multiclasse de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes empregando LC-MS/MS**. 2012. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. A.; HERRERA-HERRERA, A. V.; RAVELO-PÉREZ L.; M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. Sample-preparation methods for pesticide-residue analysis in cereals and derivatives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 38, p. 32-51, 2012.

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

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERRERO. M.; HERRERA-HERRERA, A. V.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. Dissipation kinetics of organophosphorus pesticides in milled toasted maize and wheat flour (gofio) during storage. **Food Chemistry**, 229, p. 854-859, 2017.

GWIRTZ J. A., GARCIA-CASAL M. N., Processing maize flour and corn meal food products. **Annals of the new york academy of sciences**. ISSN 0077-8923, 2014. Doi: 10.1111/yas.12299

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

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

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

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, **DOQ-CGCRE-008**, ver.4, 2011.

IUPAC, INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/atoz.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

JARDIN, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JIA, C., ZHU, X., WANG, J., ZHAO, E., HE, M., CHEN, L., YU, P. Combination of dispersive solid-phase extraction and salting-out homogeneous liquid–liquid extraction for the determination of organophosphorus pesticides in cereal grains. **Journal of Separation Science**. v. 37, p. 1862-1866, 2014.

JIANG, Z.; LI, H.; CAO, X.; DU, P.; SHAO, H.; JIN, F.; JIN, M.; WANG, J. Determination of hymexazol in 26 foods of plant origin by modified QuEChERS method and liquid chromatography tandem-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 228, p. 411-419, 2017.

KEMMERICH M., Determinação multirresíduo de agrotóxicos em pimentão utilizando método QuEChERS modificado e UHPLC-MS/MS. Dissertação (Mestrado em Química), UFSM, Santa Maria, RS, 2013.

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.

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

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. São Paulo, Editora: Átomo, 2009b.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 88:615, 2005.

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

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

LI, X., SUN, Y., SUN, Q., LIANG, L., PIAO, H., JIANG, Y., YU, A., SONG, D., WANG, X. Ionic-liquid-functionalized zinc oxide nanoparticles for the solid-phase extraction of triazine herbicides in corn prior to high-performance liquid chromatography analysis. **Journal of Separation Science**. v. 40, p. 2992-2998, 2017.

LIANG, S.; DONG, X.; SU, M.; SUN, H. Analysis of herbicide atrazine and its degradation products in cereals by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, p. 3599-3604, 2016.

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

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), **Cadeia produtiva do milho**. Secretaria de política agrícola. Instituto interamericano de cooperação para a agricultura. Coordenador Luiz Antônio Pinazza-Brasília: IICA:MAPA/SPA, 108 p., 2007.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), **Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal**, Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/qualidade-seguranca-alimentos-bebidas/alimentos/residuos-e-contaminantes> (MAPA), 2013a.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), **Instrução normativa nº 1, de 4 de janeiro de 2013**, 2013b.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), **Histórico de publicações dos resultados – PNCRC/vegetal, instrução normativa nº 44, de 12 de maio de 2015**, 2015.

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

MARCHIS D., FERRO G. L., BRIZIO P., SQUADRONE S., ABETE M. C. Detection of pesticides in crops: A modified QuEChERS approach. **Food Control**. v. 25, p. 270-273, 2012.

MASIÁ, A.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography-mass spectrometry. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 11-24, 2014.

MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K. J.; LEHOTAY, S. J.; WEGSCHEID, J. S.; SZPYLKA, K. A. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58. p. 5959-5972, 2010.

MENDES C. Notícias Agrícolas. **Brasil: USDA aumenta safra de soja para 111 mi de t e de milho, para 93,5 mi**. Disponível em: <<https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/usda/189935-usda-aumenta-estoques-e-mantem-inalteradas-exportacoes-de-soja-dos-eua.html#>>. Acesso em junho de 2017.

MOLOGNONI, L., VALESE, A. C., LORENZETTI, A., DAGUER, H., LINDNER, J. D. D. Development of a LC–MS/MS method for the simultaneous determination of sorbic acid, natamycin and tylosin in Dulce de leche. **Food Chemistry**. v. 211, p. 748-756, 2016.

MORENO-GONZÁLEZ, D.; HUERTAS-PÉREZ, J. F.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology, **Talanta**, v. 128, p. 299-304, 2014.

OSHITA, D., JARDIM, I. C. S. F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. **Química Nova**, v. 38, no. 10, p. 1273-1281, 2015.

PANG, G-F., LIU, Y-M., FAN, C-L., ZHANG, J-J., CAO, Y-Z., LI, X-M., LI, Z-Y., WU, Y-P., GUO, T-T. Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass

spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.** v. 384, p. 1366-1408, 2006. DOI 10.1007/s00216-005-0237-9.

PANG, N; WANG,T; HU, J; Method validation and dissipation kinetics of four herbicides in maize and soil using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 190, p. 793-800, 2016.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and Food Applications of LC-tandem Mass Spectrometry in Pesticide-Residue Analysis: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v .23, p. 45-85, 2004.

PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES A. A.; QUEIROZ M. E. L. R.; STARLING M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**. v. 33, n. 4, p. 909-913, 2010.

PINHO, G. P.; NEVES A. A.; QUEIROZ M. E. L. R.; SILVÉRIO F. O. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**. v. 21, p. 1307-1311, 2010.

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

PRESTES O. D. **Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS.** 2011, Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

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

REGITANO-d'ARCE, M. A. B; SPOTO, M. H. F; CASTELLUCCI, A. C. L. Processamento e industrialização do milho para alimentação humana. Industrialização. **VISÃO AGRÍCOLA**. ISSN 1806-6402, USP, ESALQ, ANO 9 JUL/DEZ 2015.

REGITANO-d'ARCE, M. A. B; VIEIRA T. M. F de S. Considerado nobre pelo consumidor, óleo de milho alcança bons preços no mercado. Industrialização. **VISÃO AGRÍCOLA**. ISSN 1806-6402, USP, ESALQ, ANO 9 JUL/DEZ 2015.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination

of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. **Food Chemistry**, v. 217, p. 225-233, 2017.

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, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, L. C., **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIPARASITÁRIOS EM LEITE BOVINO EMPREGANDO LLE-LTP E LC-MS/MS**. 2016, Dissertação (Dissertação em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

SANTE, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, SANTE/11945/2015.

SHE Y., CAO W., SHI X., LV X., LIU J., WANG R., JIN F., WANG J., XIAO H. Class-specific molecularly imprinted polymers for the selective extraction and determination of sulfonylurea herbicides in maize samples by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 2047-2053, 2010.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Embrapa Informações Tecnológicas - Brasília, 2004.

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

STRAZZI, S. Industrialização. **Visão Agrícola**, n. 13, Disponível em: <www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/VA_13_Industrializacao-artigo4.pdf> Ju/Dez 2015.

TAO, Y.; XU, J.; LIU, X.; CHENG, Y.; LIU, N.; CHEN, Z.; DONG, F.; ZHENG, Y. A quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for the simultaneous detection of four triazolone herbicides in cereals combined with ultrahigh performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 2340-2348, 2014.

TIAN,F.; LIU, X.; WU, Y.; XU, J.; DONG, F.; WU, X.; ZHENG, Y.; Simultaneous determination of penflufen and one metabolite in vegetables and cereals using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**. v. 213, p. 410-416, 2016.

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1165, p. 200-212, 2007.

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

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

WANG, T., HU, J., LIU, C., Simultaneous determination of insecticide fipronil and its metabolites in maize and soil by gas chromatography with electron capture detection. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 186, Issue 5, p 2767-2774, 2014.

WANG, J., GONG, Z., ZHANG, T., FENG, S., WANG, J., ZHANG, Y. Simultaneous determination of 106 pesticides in nuts by LC–MS/MS using freeze-out combined with dispersive solid-phase extraction purification. **Journal of Separation Science**. v. 40, p. 2398-2405, 2017.

WANG, X.; WANG, S.; CAI, Z. The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 170-185, 2013.

WU, G.; BAO, X.; ZHAO, S.; WU, J.; HAN, A.; YE, Q. Analysis of multi-pesticide residues in the foods of animal origin by GC–MS coupled with accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography cleanup. **Food Chemistry**, v. 126, p. 646-654, 2011.

USDA, National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28 slightly revised **Corn grain, yellow**, May, 2016. The National Agricultural Library.

UNIÃO EUROPEIA, **EU Pesticides database**. Disponível em: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=substance.selection. Acesso em: 06 nov. 2014.

ZHAO Q., LI H., XU Y., ZHANG F., ZHAO J., WANG L., HOU J., DING H., LI Y., JIN H., DING L. Determination triazine pesticides in cereal samples based on single-hole hollow molecularly imprinted microspheres. **Journal of Chromatography A**, v. 1376, p. 26-34, 2015.

ZHANG, Y.; XU, J.; DONG, F.; LIU, X.; LI, X.; LI, Y.; WU, X.; LIANG, X.; ZHENG, Y. Simultaneous determination of four neonicotinoid insecticides residues in

cereals, vegetables and fruits using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 5, p. 1449-1455, 2013.

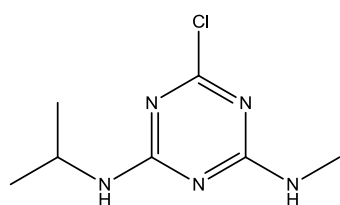
ZHAO, L. Benefits of EMR—Lipid Cleanup with Enhanced Post Treatment on Pesticides Analysis by GC/MS/MS. Agilent Technologies, Inc., **Publication number: 5991-6707EN**, pdf, 2016.

ZHAO, L.; LUCAS, D. **Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Agilent Bond Elut EMR—Lipid by LC/MS/MS**. Application Note, Agilent Technologies, Inc., 2015.

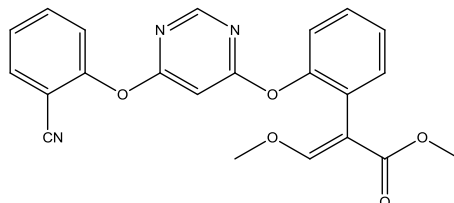
ZHU, X., JIA, C., ZHENG, Z., FENG, X., HE, Y., ZHAO, E. Solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of pyrethroid pesticides in wheat and maize samples. **Journal of Separation Science**. v. 39, p. 4621-4628, 2016.

APÊNDICE

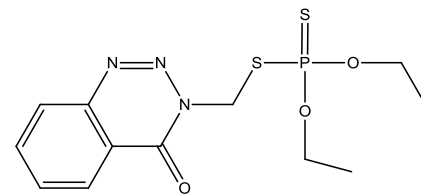
Apêndice A – Estruturas dos agrotóxicos avaliados.



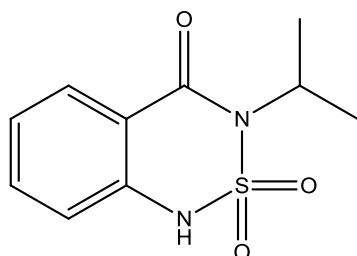
Atrazina



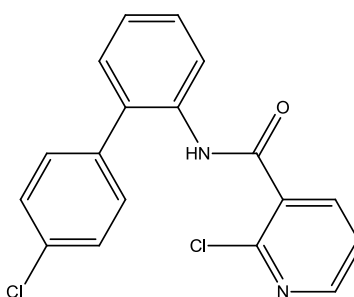
Azoxistrobina



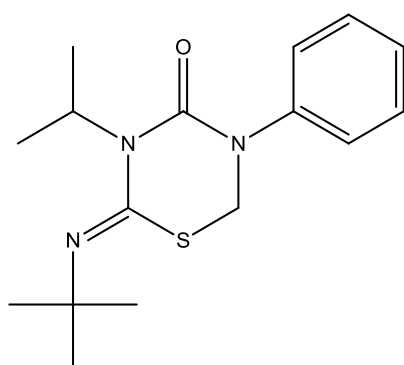
Azinfós etílico



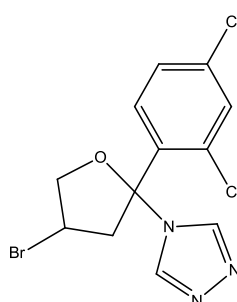
Bentazona



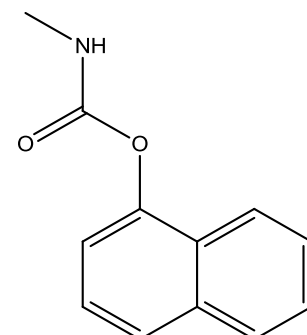
Boscalida



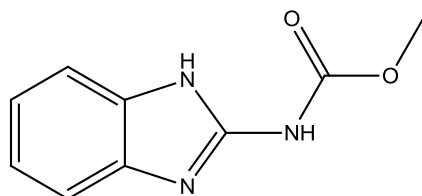
Buprofezina



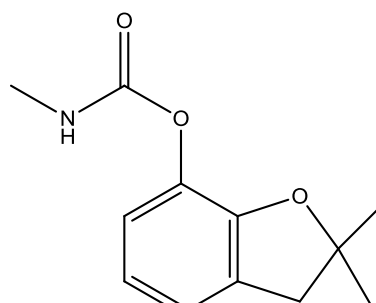
Bromuconazol



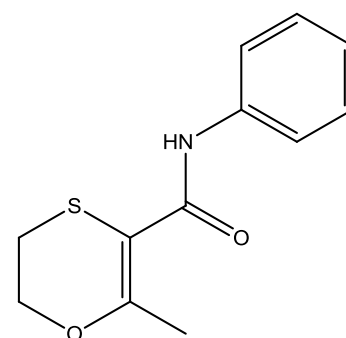
Carbaril



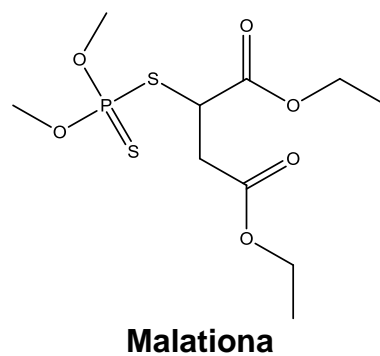
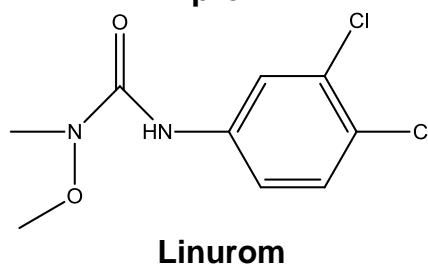
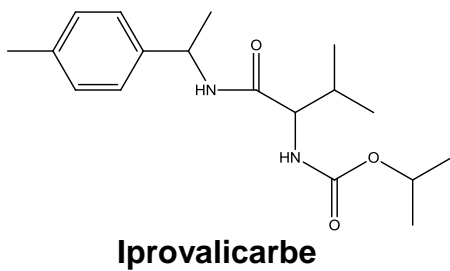
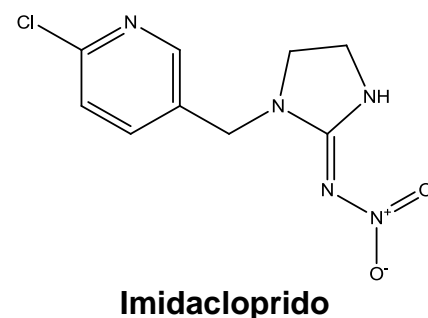
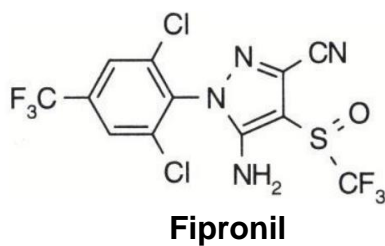
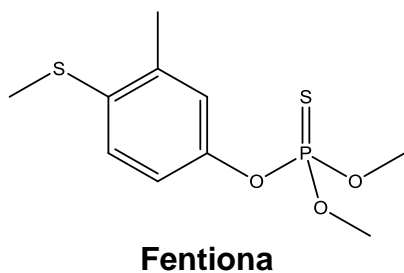
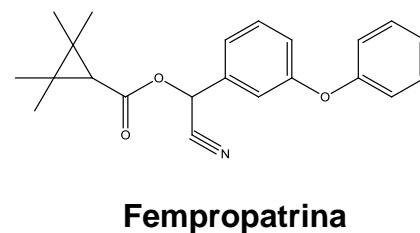
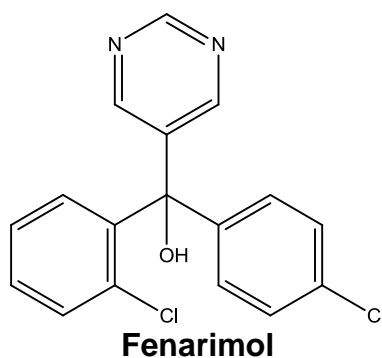
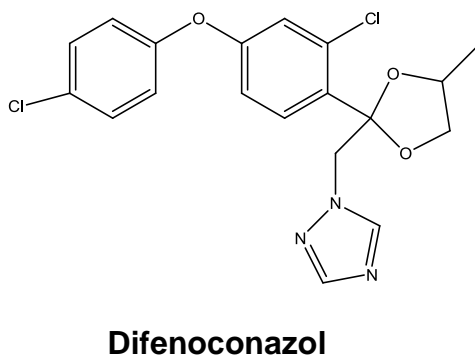
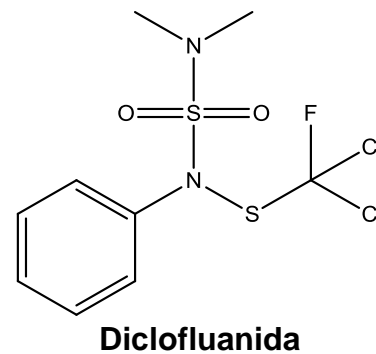
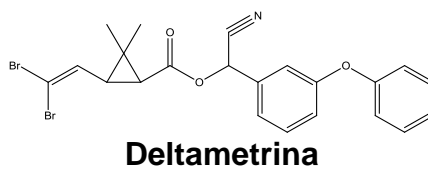
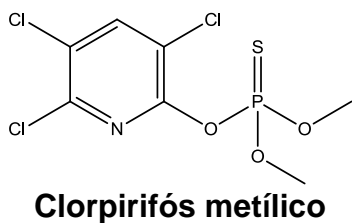
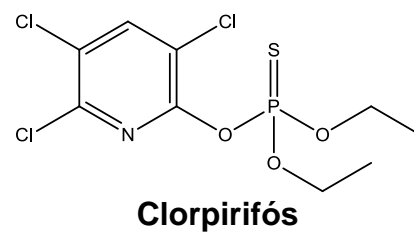
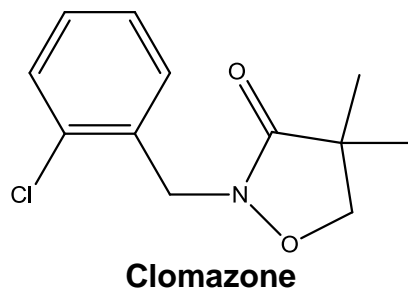
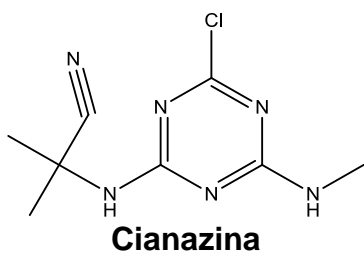
Carbendazim

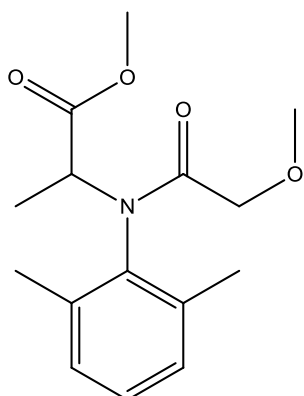
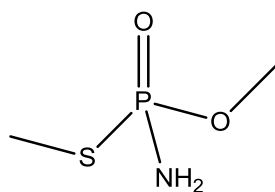
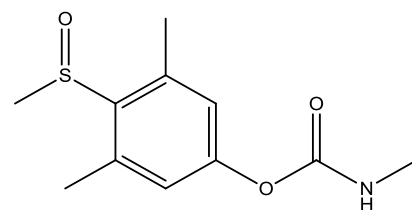
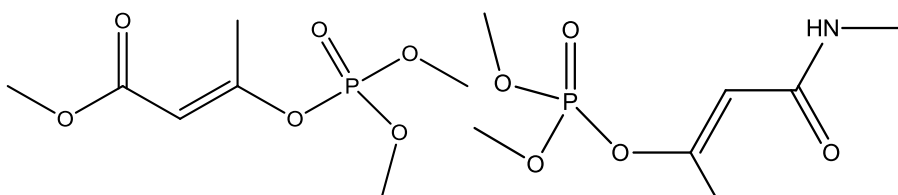
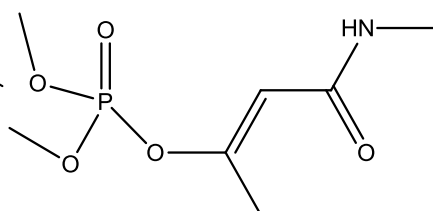
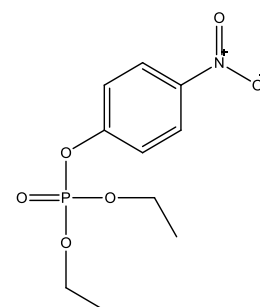
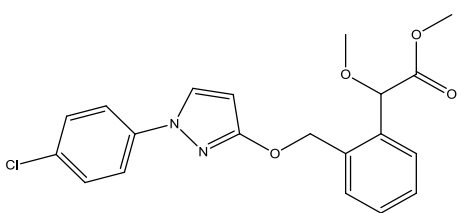
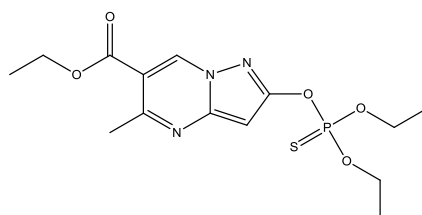
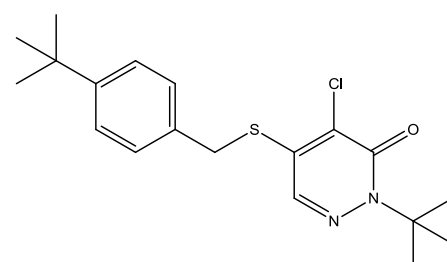
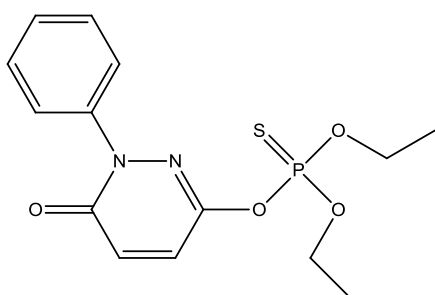
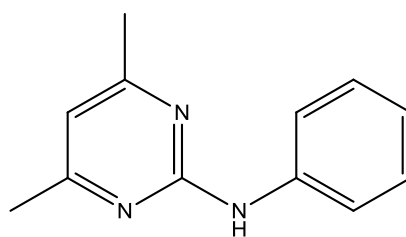
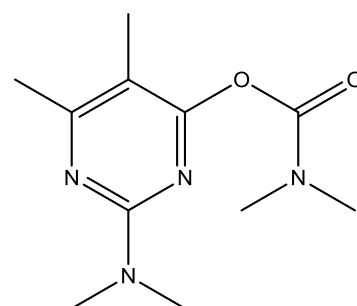
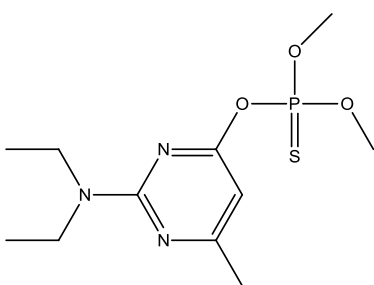
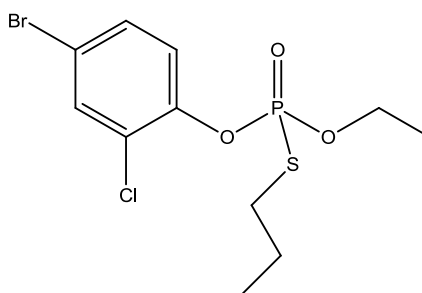
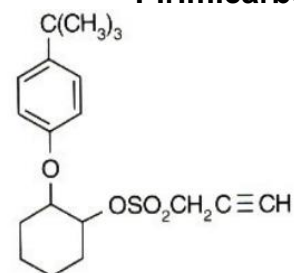


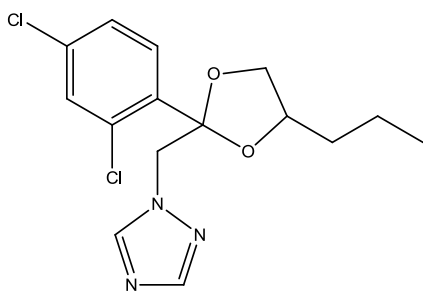
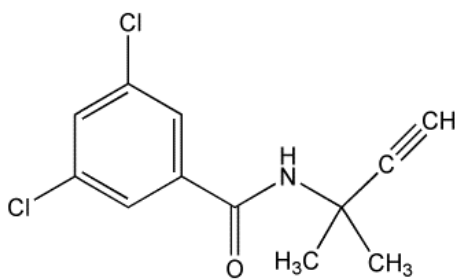
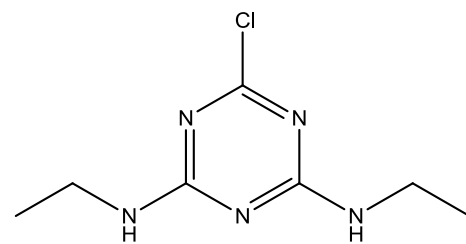
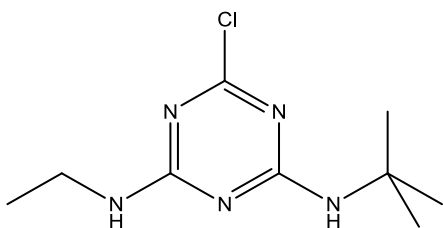
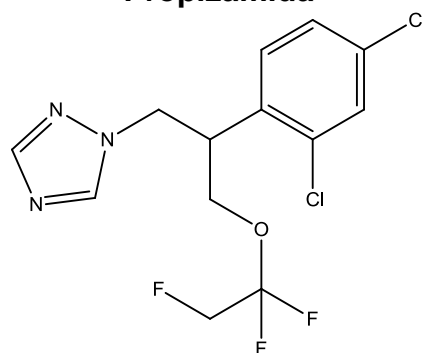
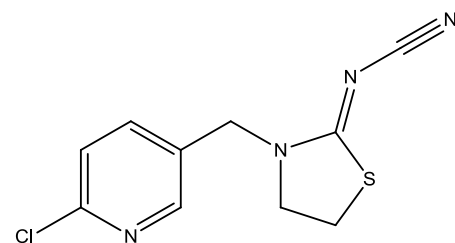
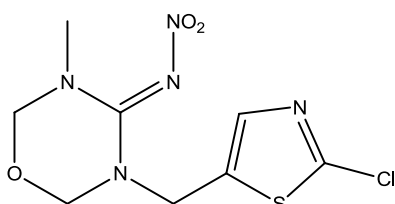
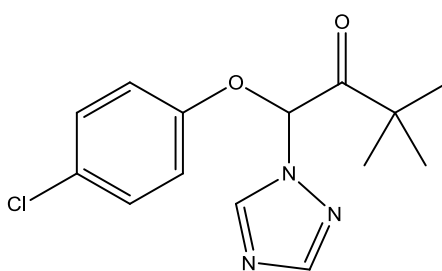
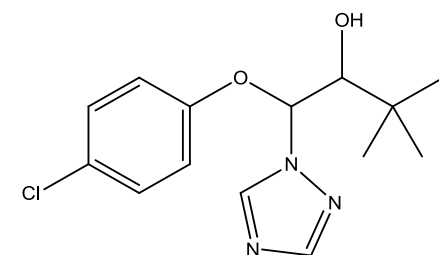
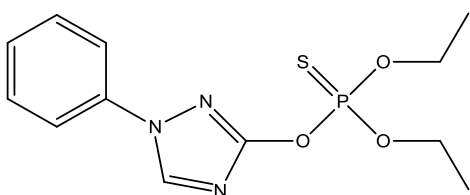
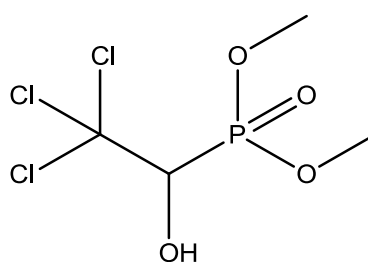
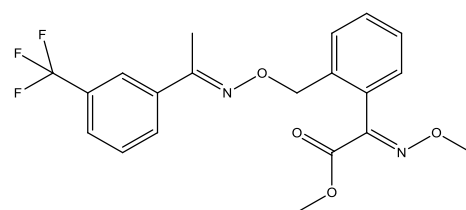
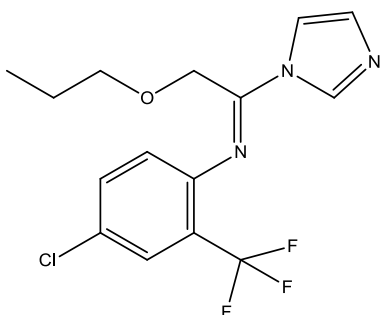
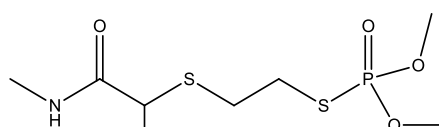
Carbofurano



Carboxina



**Metalaxil****Metamidofós****Metiocarbe sulfóxido****Mevinfós****Monocrotofós****Paraoxom****Piraclostrobina****Pirazofós****Piridabem****Piridafentona****Pirimetanil****Pirimicarbe****Pirimifós metílico****Profenofós****Propargito**

**Propiconazol****Propizamida****Simazina****Terbutilazina****Tetraconazol****Tiacloprido****Tiametoxam****Triadimefom****Triadimenol****Triazofós****Triclorfom****Trifloxistrobina****Triflumizol****Vamidotiona**

Fonte: KEMMERICH (2013).