



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

Fernanda Uczay

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS EM SOJA,
FEIJÃO E MILHO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS
MODIFICADO E UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS

2019

Fernanda Uczay

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS EM SOJA, FEIJÃO E MILHO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS

2019

Uczay, Fernanda
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS EM SOJA,
FEIJÃO E MILHO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E
UHPLC-MS/MS / Fernanda Uczay.- 2019.
124 p.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella
Coorientador: Osmar Damian Prestes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

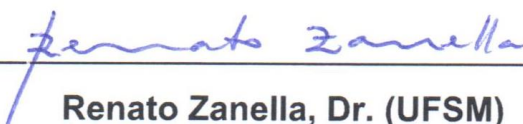
1. Lactonas macrocíclicas 2. Avermectinas 3. Alimentos
4. Preparo de amostra 5. Cromatografia líquida I.
Zanella, Renato II. Damian Prestes, Osmar III. Título.

Fernanda Uczay

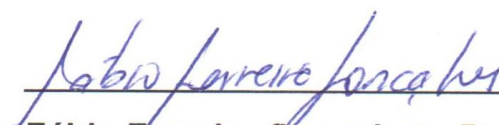
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS EM SOJA, FEIJÃO E MILHO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

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

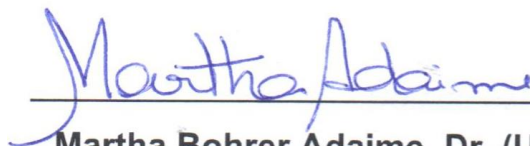
Aprovada em 26 de fevereiro de 2019:



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



Fábio Ferreira Gonçalves, Dr. (FURG)



Martha Bohrer Adaime, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS

2019

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho aos meus pais e a todas as pessoas que contribuíram para tornar esse sonho realidade. Com desejo de que ajude aos próximos colegas, boa leitura!

Passamos por muitas etapas na vida com vários desafios e obstáculos e a partir disso obtemos ensinamentos que nos fazem crescer. Durante a caminhada de dois anos de mestrado convivi com diversas pessoas e ao final desse ciclo, fica apenas a gratidão.

A Deus, sempre! Pelo dom da vida e por guiar meus passos colocando pessoas boas em minha vida.

Ao professor Renato Zanella, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa do LARP, pela orientação durante esses dois anos de mestrado e por compartilhar seu conhecimento a cada problema encontrado no dia-a-dia. Obrigada pela contribuição neste estudo.

À professora Clóvia Marozzin Mistura, pelos inúmeros ensinamentos, cobranças, conversas e conselhos durante a minha graduação na Universidade de Passo Fundo. Obrigada por proporcionar o meu primeiro contato com esse “universo” da pesquisa por meio do programa de extensão. Não tenho palavras para expressar a admiração que sinto pela profissional que és.

À professora Maria Tereza Friedrich, por me apresentar a área de Química Analítica com tanta dedicação, você foi uma das responsáveis por eu seguir os mesmos passos. Obrigada pelo incentivo, pelas explicações e pelo carinho. Sou muito grata por ter sido aluna e orientada de uma grande mulher em minha graduação.

Aos professores Martha Bohrer Adaime e Fábio Ferreira Gonçalves, por terem se disponibilizado a ler meu trabalho com tanta dedicação e pelas contribuições feitas para a melhoria do mesmo.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química pela contribuição na minha formação acadêmica.

À Giovana Ferronato, agradeço pela amiga que se tornou ao decorrer do tempo. Obrigada pelas primeiras explicações e ajuda com o meu trabalho, pelos

conselhos, pelas risadas e por tentar me animar quando o dia não estava
Obrigada pela amizade.

Aos amigos que fiz no LARP, Rômulo, Marisa, Janice, Luana, Mônica e Pedro, muito obrigada pelos vários momentos de descontração que eu tive ao lado de vocês, com muita pizza e Imagem e Ação.

Às minhas colegas e amigas de apartamento Carolina e Jéssica, iniciamos essa etapa de mestrado juntas e sabemos das dificuldades que cada uma passou. Nos mudamos para uma cidade que não conhecíamos nada e ninguém e a companhia de vocês foi fundamental. Obrigada por sempre me escutarem.

Aos meus pais, Jucelane e Hilário Uczay e ao meu irmão Leonardo Uczay, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as minhas decisões e em todos os momentos da minha vida. Obrigada por cada conversa, conselho, carinho e por toda a força que me deram quando eu achava que não conseguiria. Vocês são meus maiores exemplos de caráter, humildade e determinação para ir em busca de um sonho. Amo muito vocês!

Ao Nelson Bandeira, pelas inúmeras explicações no decorrer do meu trabalho. Obrigada pelo companheirismo e pelos momentos que me manteve calma, em meio as minhas crises de ansiedade, me confortando com palavras de carinho ou até mesmo com um abraço. Agradeço por sempre acreditar em mim, me transmitir tranquilidade e me fazer sorrir. Sou grata por você fazer parte da minha vida e te desejo muito sucesso.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS EM SOJA, FEIJÃO E MILHO EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E UHPLC-MS/MS

AUTORA: Fernanda Uczay
ORIENTADOR: Renato Zanella

Soja e feijão são consideradas oleaginosas de grande importância econômica no Brasil. O milho é um cereal que também gera lucratividade para a economia, porém seu uso, em grande parte, é para alimentação animal. Nos últimos anos, essas culturas sofreram com infestações da largata *Helicoverpa Armigera*, sendo o principal problema associado a essa praga, a resistência a maioria dos agrotóxicos. O uso de forma indiscriminada de agrotóxicos e a falta de conhecimento e do emprego das boas práticas agrícolas são as principais causas desse fato, além de prejudicar a segurança alimentar. Prova disso, é o aumento da presença de agrotóxicos em solos e culturas agrícolas. Assim, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar um método baseado na extração pelo método QuEChERS para a determinação de resíduos de avermectinas: abamectina, benzoato de emamectina, eprinomectina, ivermectina e doramectina em amostras de soja, feijão e milho empregando a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). As avermectinas foram selecionadas para o estudo devido a recente liberação do emprego da emamectina como agrotóxico nas três matrizes em estudo. Com isso, desenvolveu-se um método para soja, feijão e milho, onde foi empregado 5 g de amostra e 10 mL de água, além de uma mistura de 10 mL dos solventes acetonitrila:isopropanol na proporção 9:1 (v/v), com posterior adição de sais de partição. Na etapa de limpeza avaliou-se cinco diferentes sorventes, sendo eles: C18+PSA, Florisil[®], sílica, Supel[™] QuE Z-Sep⁺ e EMR-Lipid, em sua forma ativada e não ativada. Com a etapa de limpeza usando EMR-Lipid, foram obtidos os limites de detecção de 1,2 µg kg⁻¹ para abamectina, doramectina, benzoato de emamectina e ivermectina, e de 2,4 µg kg⁻¹ para eprinomectina. Precisão e exatidão avaliadas nos níveis 4, 8, 20, 40 e 80 µg kg⁻¹ apresentaram resultados satisfatórios. O método foi aplicado com sucesso em amostras reais e é uma boa opção para análises de rotina.

Palavras-chave: Lactonas macrocíclicas, avermectinas, alimentos, preparo de amostra, cromatografia líquida

ABSTRACT

DETERMINATION OF AVERMECTINS RESIDUES IN SOYBEAN, BEAN AND MAIZE USING MODIFIED QuEChERS METHOD AND UHPLC-MS/MS

AUTHOR: Fernanda Uczay
ADVISOR: Renato Zanella

Soybeans and beans are considered oleaginous plants of great economic importance in Brasil. Maize is a cereal that also generates profitability for the economy, but its use, to a large extent, is as animal feed. In the last years, this crops suffered with infestations of the caterpillar *Helicoperva Armigera*, being the main problem the resistance of this pest to most pesticides. The indiscriminate use of pesticides and the lack of knowledge and use of good agricultural practices are the main causes of this, as well as undermining food security. Proof of this is the increased presence of pesticides in soil and agricultural crops. The aim of this work was to develop and validate a method based on QuEChERS extraction for the determination of residues of the avermectins: abamectin, emamectin benzoate, eprinomectin, ivermectin and doramectin in soybean, bean and maize samples by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Avemerctins were selected for the study because of the recent release of emamectin as a pesticide in the three matrices under study. Thus, a method for soybean, bean and maize was developed, where 5 g of sample and 10 mL of ultrapure water were used, as well as a 10 mL mixture of acetonitrile:isopropanol solvents in a ratio of 9:1 (v/v), with subsequent addition of partition salts. In the cleaning step five different sorbents were evaluated: C18 + PSA, Florisil[®], silica, Supel[™] QuE Z-Sep⁺ and EMR-Lipid, in their activated and non-activated form. With the clean-up step using EMR-Lipid, limits of detection of 1.2 µg kg⁻¹ for abamectin, doramectin, emamectin benzoate and ivermectin, and of 2.4 µg kg⁻¹ for eprinomectin were achieved. Accuracy and precision evaluated at the levels 4, 8, 20, 40 and 80 µg kg⁻¹ presented satisfactory results. The method was successfully applied in real samples and is a good option for routine analysis

Keywords: Macrocyclic lactones, avermectins, food, sample preparation, liquid chromatography

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Comportamento da produtividade de soja nas safras de 2003/2004 a 2017/2018	25
Figura 2 - Produtividade da cultura de feijão na primeira safra de 2003/2004 a 2017/2018	28
Figura 3 - Imagem representativa das diferentes estruturas do grão de milho	29
Figura 4 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos	33
Figura 5 - Representação da estrutura química das avermectinas	41
Figura 6 - Fluxograma do procedimento de extração para avaliação do solvente de extração no método QuEChERS citrato para soja	74
Figura 7 - Fluxograma do procedimento de extração avaliando a eficiência, em soja, feijão e milho, de diferentes proporções do solvente extrator escolhido	75
Figura 8 - Fluxograma do procedimento de extração para avaliação da etapa de limpeza do método QuEChERS citrato modificado para soja, feijão e milho	76
Figura 9 - Percentual de recuperação e desvio padrão para as avermectinas em soja, obtidos nos primeiros testes.....	82
Figura 10 - Percentual de recuperação e desvio padrão para as avermectinas em feijão, obtidos nos primeiros testes	83
Figura 11 - Percentual de recuperação e desvio padrão para as avermectinas em milho, obtidos nos primeiros testes	84
Figura 12 - Comparação dos ensaios do método QuEChERS citrato modificado empregando diferentes solventes extratores em soja	86
Figura 13 - Curvas analíticas para abamectina ao realizar a extração com os três solventes em soja.....	87
Figura 14 - Curvas analíticas para abamectina ao realizar a extração com os três solventes em feijão.....	88
Figura 15 - Curvas analíticas para abamectina ao realizar a extração com os três solventes em milho.....	88
Figura 16 - Curvas analíticas para eprinomectina ao realizar a extração com os três solventes em soja.....	89
Figura 17 - Curvas analíticas para eprinomectina ao realizar a extração com os três solventes em feijão.....	89

Figura 18 - Curvas analíticas para eprinomectina ao realizar a extração com os três solventes em milho.....	90
Figura 19 - Comparação dos testes de limpeza para cada analito em soja	92
Figura 20 - Comparação dos testes de limpeza para cada analito em feijão	92
Figura 21 - Comparação dos testes de limpeza para cada analito em milho	93
Figura 22 - Comparação, entre EMR-Lipid ativado e EMR-Lipid não ativado, das recuperações e desvios padrões para soja	94
Figura 23 - Extratos de soja, feijão e milho com formação de duas fases após a etapa de limpeza com EMR-Lipid ativado	95
Figura 24 - Fluxograma do procedimento QuEChERS proposto e validado neste estudo para determinação de avermectinas em soja, feijão e milho	96
Figura 25 - Demonstração da ausência de picos cromatográficos de interferentes no tempo total de análise (5 min) nas amostras (a) branco reagente e (b) amostra branco de soja e (c) pico cromatográfico da emamectina fortificada na matriz no nível $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ (corresponde no equipamento a $20 \mu\text{g L}^{-1}$).....	97
Figura 26 - Sobreposição do sinal na matriz "branco" de soja de concentração $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ com a amostra contendo $21,06 \mu\text{g kg}^{-1}$ de abamectina.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo de mercado das classes de inseticidas.....	32
Tabela 2 - LMRs para abamectina e emamectina nas culturas de soja, feijão e milho no Brasil	36
Tabela 3 – LMRs para soja, feijão e milho de acordo com o Codex Alimentarius e a União Europeia.....	37
Tabela 4 - Inseticidas utilizados no combate a <i>H. armigera</i>	38
Tabela 5 - Propriedades físico-químicas das avermectinas	46
Tabela 6 - Exemplos de métodos de preparo de amostra em matrizes com alto teor de gordura para análise de resíduos de avermectinas.....	47
Tabela 7 - Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos	60
Tabela 8 - Métodos testados para a análise de resíduos de avermectinas.....	69
Tabela 9 – Log Kow, tempos de retenção, transições (íons de quantificação e identificação) e energias de colisão (eV) dos compostos em estudo	70
Tabela 10 - Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível	71
Tabela 11 - Ensaios para avaliação e escolha do método QuEChERS mais eficiente para extração de avermectinas em soja, feijão e milho.....	72
Tabela 12 - Gradiente de fase móvel utilizado para determinação de avermectinas em soja, milho e feijão no sistema UHPLC-MS/MS para o método proposto.....	79
Tabela 13 - Avaliação do efeito matriz para os compostos em estudo em soja, feijão e milho.....	97
Tabela 14 - Valores de coeficiente de determinação (r^2) e faixa de trabalho obtidos para as avermectinas a partir da curva de calibração na matriz "branco"	98
Tabela 15 - LOD e LOQ do método e do instrumento para os compostos validados em soja, feijão e milho.....	99
Tabela 16 - Resultados de validação do método QuEChERS citrato modificado para soja, feijão e milho: exatidão (recuperação, %) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA – Abamectina

ACN - Acetonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI - Ionização Química por Pressão Atmosférica, do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

BEH – Sílica híbrida, do inglês, *Ehtylene Bridged Hybrid*

BPA's - Boas Práticas Agrícolas

CAC - Comissão do Codex Alimentarius, do inglês, *Codex Alimentarius Commission*

$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ – Citrato de sódio diidratado

$C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$ – Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado

Da – Dalton

DL50 – Dose Letal 50%

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction*

DORA – Doramectina

d-SPE - Extração em fase sólida dispersiva, do inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction*

EMA – Emamectina (benzoato)

EPRI – Eprinomectina

ESI - Ionização por Electrospray, do inglês, *Electrospray Ionization*

EU - União Européia, do inglês, *European Union*

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FD – Detecção por Fluorescência, do inglês, *Fluorescence Detection*

GABA - Ácido gama-aminobutírico, do inglês, *Gamma Amino Butyric Acid*

GC – Cromatografia a gás, do inglês, *Gas Chromatography*

GCB - Carvão grafitizado, do inglês, *Graphitized Carbon Black*

GC-MS - Cromatografia a gás acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês, *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*

HILIC - Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica, do inglês, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*

HPAs - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HPLC - Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-FD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection*

HPLC-MS/MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de Massas em série, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IVER – Ivermectina

Kow - coeficiente de partição octanol/água

LARP – Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas

LC – Cromatografia Líquida, do inglês, *Liquid Chromatography*

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês, *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em série, do inglês, *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

LLE - Extração líquido-líquido, do inglês, *Liquid-liquid Extraction*

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LMs – Lactonas Macroclílicas

LOD – Limite de detecção, do inglês, *Limit of Detection*

LOD_i – Limite de detecção do instrumento

LOD_m - Limite de detecção do método

LOQ – Limite de quantificação, do inglês, *Limit of Quantification*

LOQ_i – Limite de quantificação do instrumento

LOQ_m - Limite de quantificação do método

m/z – razão massa carga

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

MI – 1-metilimidazol, do inglês, *1-Methyl Imidazole*

MS – Espectrometria de Massas, do inglês, *Mass Spectrometry*

MS/MS - Espectrometria de Massas em série, em inglês, *Tandem Mass Spectrometry*

MSPD - Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês, *Matrix Solid Phase Disp.*

NaCl – Cloreto de sódio

p. a. – grau para análise

PC – Padrão de controle

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI – Padrão interno

PNCRC/Vegetal - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em
Produtos de Origem Vegetal

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

QqQ – Triplo Quadrupolo

QuEChERS – Rápido, Fácil, Econômico, Robusto e Seguro, do inglês, *Quick, Easy,
Cheap, Effective, Rugged and Safe*

r^2 – Coeficiente de determinação

RP-LC – Cromatografia líquida de fase reversa, do inglês, *Reverse Phase in Liquid
Chromatography*

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês, *Relative Standard Deviation*

SBSE - Extração Sortiva com Barra de Agitação, do inglês, *Stir Bar Sortive Extraction*

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

SPME - Microextração em Fase Sólida, do inglês, *Solid Phase Micro Extraction*

SRM - Monitoramento de reação selecionada, do inglês, *Selected Reaction Monitoring*

TACO – Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos

TFAA – Anidrido Trifluoroacético, do inglês, *Trifluoroacetic anhydride*

TPP – Trifenilfosfato

t_R – Tempo de retenção

UHPLC - Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Performance, do inglês, *Ultra High
Performance Liquid Chromatography*

UHPLC-MS/MS - Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a
Espectrometria de Massas em série, do inglês, *Ultra-High Performance Liquid
Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, do inglês, *United States
Department of Agriculture*

UV - Ultravioleta

WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês, *World Health Organization*

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Representação da estrutura química das avermectinas	122
--	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	SOJA: CULTURA E PROPRIEDADES	22
2.1.1	Produção de Soja no mundo e no Brasil	23
2.2	FEIJÃO: ORIGEM E CULTURA	26
2.2.1	Cadeia produtiva do Feijão	27
2.3	MILHO: CONSIDERAÇÕES GERAIS	29
2.4	AGROTÓXICOS	30
2.4.1	Classificação e toxicidade dos agrotóxicos	32
2.4.2	Limite Máximo de Resíduos	33
2.5	LEGISLAÇÃO QUANTO AO USO DE AVERMECTINAS COMO AGROTÓXICO EM SOJA, FEIJÃO E MILHO NO BRASIL	34
2.5.1	Legislação quanto ao uso de avermectinas como agrotóxico em soja, feijão e milho no mundo	36
2.5.2	Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal	37
2.6	LAGARTA <i>HELICOPERVA ARMÍGERA</i>	38
2.7	MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	39
2.7.1	Antiparasitários: anti-helmínticos	40
2.7.1.1	<i>Lactonas macrocíclicas</i>	40
2.7.1.2	<i>Características Físico-Química das Avermectinas</i>	45
2.8	TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE AVERMECTINAS	46
2.9	SORVENTES COMUMENTE UTILIZADOS NA ETAPA DE LIMPEZA	53
2.10	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DE AVERMECTINAS	55
2.10.1	Cromatografia à Líquido com detecção por Fluorescência	57
2.10.2	Cromatografia a Líquido acoplada a Espectrometria de Massas	58
2.11	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	59
2.11.1	Seletividade	61
2.11.2	Efeito Matriz	61
2.11.3	Curva analítica (Linearidade) e faixa de trabalho	62
2.11.4	Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)	62
2.11.5	Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	63
2.11.6	Exatidão	63

3	MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	65
3.2	REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS	66
3.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SOJA, FEIJÃO E MILHO.....	67
3.4	SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE	67
3.5	PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS	68
3.6	SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE AVERMECTINAS 68	
3.7	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS EM SOJA, FEIJÃO E MILHO	70
3.7.1	Testes QuEChERS original, acetato e citrato em soja, feijão e milho 70	
3.7.2	Otimização do método QuEChERS citrato: solvente de extração, slurry, sais de partição e quantidade de amostra	73
3.7.3	Avaliação da etapa de limpeza do método QuEChERS citrato modificado em soja, feijão e milho	75
3.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA SOJA, FEIJÃO E MILHO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS.....	76
3.8.1	Seletividade	77
3.8.2	Curva de calibração e faixa de trabalho	77
3.8.3	Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)	77
3.8.4	Exatidão e precisão	78
3.8.5	Efeito matriz	78
3.9	APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS.....	78
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE AVERMECTINAS EM SOJA, FEIJÃO E MILHO.....	79
4.2	AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QuEChERS CITRATO OTIMIZADO.....	81
4.2.1	Testes iniciais do método QuEChERS original, citrato e acetato em soja, feijão e milho	81
4.2.2	Otimização da quantidade de amostra e sais de partição, proporção de slurry e solvente extrator	84
4.2.3	Otimização dos sorventes da etapa de limpeza	91
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA ANÁLISE DE AVERMECTINAS	95
4.3.1	Seletividade	96
4.3.2	Avaliação do Efeito Matriz	97

4.3.3	Curva analítica e faixa de trabalho.....	98
4.3.4	Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método.....	98
4.3.5	Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método.....	99
4.3.6	Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária).....	100
4.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS.....	102
5	CONCLUSÕES.....	103
6	DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	104
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

A soja está entre as culturas mais importantes no mundo, sendo que, a sua demanda aumenta a cada ano devido a usos variados que incluem desde alimentação animal, fabricação de biodiesel até matéria prima para cosméticos (ROMANATO *et al.*, 2016). O Brasil é o segundo maior produtor desde 2010, com 32,63% de toda produção mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, com 34% desta produção (USDA, 2018).

O feijão, cultura oleaginosa como a soja, possui extrema importância para a sociedade brasileira, uma vez que é uma das fontes de proteína mais utilizada pela população mais carente (FARIA, 2012). O seu consumo é pequeno nos países mais desenvolvidos, com isso, os maiores produtores mundiais são Myanmar, Índia, Brasil, Estados Unidos, México e Tanzânia (COÊLHO, 2018). A cultura de feijão possui como característica a produção familiar, em sua maioria. Logo, este modo de produção implica em baixo emprego de tecnologia e de profissionalização do agricultor (IBGE, 2006).

Em relação ao milho, sua importância econômica está relacionada as várias formas de utilização, da alimentação animal a indústria de alta tecnologia. Seu uso em grão na alimentação animal representa a maior parte do consumo, sendo que no Brasil varia de 70% a 90% da produção total (CRUZ *et al.*, 2011). O Brasil é o terceiro maior produtor de milho no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos e a China (BRASIL, 2013).

Pelo fato de serem culturas globalmente importantes, o uso de tratamentos de sementes ou da planta para evitar a perda de rendimento e lucratividade através do manejo de patógenos, insetos no início da estação e nematoides tornou-se mais comum (ROSSMAN, BYRNE e CHILVERS, 2018). Da classe das avermectinas, inicialmente era permitido apenas o uso da abamectina como agrotóxico nas três culturas em questão. Contudo, em 2013 relatou-se os primeiros ataques da praga quarentenária *Helicoverpa armigera* as culturas de soja e feijão (MAPA, 2013a). Esta é uma lagarta que atinge várias culturas agrícolas, sendo elas, soja, feijão, algodão, grão de bico, tomate, berinjela, canola e girassol. A *H. armigera* é geralmente controlada pelo uso de inseticidas, especialmente carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretróides. Porém, devido ao uso extensivo desses agrotóxicos,

a praga desenvolveu resistência contra os mesmos (BILAL *et al.*, 2018), resultando em grandes estragos nas lavouras.

A partir disso foi declarado no Brasil emergência fitossanitária, sendo liberado em caráter emergencial a importação do princípio ativo benzoato de emamectina para uso, principalmente, nas culturas de soja. No período de 2013 a 2016, monitoramentos foram realizados para a detecção de alelos de resistência em *Helicoverpa armigera* ao benzoato de emamectina, clorantraniliprole e indoxacarbe nas principais regiões agrícolas do leste da Austrália. A resistência ao benzoato de emamectina não foi detectada. Porém, houveram baixos níveis detectados de sobrevivência de clorantraniliprole e indoxacarbe (BIRD, DRYNAN e WALKER, 2017).

A necessidade do emprego do benzoato de emamectina nas culturas agrícolas levaram ao MAPA em 2016 incluir o mesmo na lista de produtos prioritários de análise para registro. Sendo liberado e autorizado oficialmente nas monografias da ANVISA, para uso como agrotóxico em soja, feijão, milho e algodão, em novembro de 2017 (BRASIL, 2017).

Outro problema recorrente em culturas agrícolas, principalmente de pequenos produtores como os de feijão, é o emprego de esterco como fertilizantes como alternativa para diminuir o custo com fertilizantes na lavoura (EDVAN e CARNEIRO, 2011). Normalmente o esterco é coletado, armazenado e espalhado pelo solo sem nenhum tratamento prévio e sem estudos quanto às características físico-químicas, bem como as quantidades a serem aplicadas nas culturas, prejudicando o meio ambiente (PEREIRA *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2008).

Devido ao fato de que, um número crescente de relatórios mostra um aumento na ocorrência e distribuição de medicamentos veterinários nos excrementos e no ambiente em vários países do mundo (WEI *et al.*, 2016; BOXAL *et al.*, 2006), faz-se necessário o desenvolvimento de métodos de análise de resíduos de agrotóxicos e também de medicamentos veterinários que abranjam diversas culturas agrícolas.

Nos últimos anos, a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série tem se destacado como técnica preferencial de análise (MAY, *et al.*, 2017). Porém, a determinação em matrizes complexas (com alto teor de gordura, açúcar e proteínas), como é o caso de grãos de soja, feijão e milho requer atenção especial na etapa de preparo de amostra, para que se obtenha extratos com baixa concentração de interferentes e que contenham os analitos de interesse.

Baseado nisso, esse trabalho teve por objetivo desenvolver e otimizar um único método de preparo de amostras para determinar resíduos de avermectinas (abamectina, benzoato de emamectina, eprinomectina, ivermectina e doramectina) em soja, feijão e milho empregando a UHPLC-MS/MS. Além disso, a partir do método proposto ter a possibilidade de empregar para na quantificação em amostras reais uma curva no extrato branco para as três matrizes em estudo ou então utilizar uma curva no solvente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SOJA: CULTURA E PROPRIEDADES

A soja (*Glycine max* L. Merr.) é um membro da família *Fabaceae*, considerada uma cultura de sementes oleaginosas com alto teor proteico, cultivada principalmente na Ásia, América do Sul e do Norte (PEIRETTI *et al.*, 2018). Sua planta é espessa, com altura entre 0,2 e 2,0 m, e produz um fruto com três a cinco vagens peludas em um cluster. Cada vagem, com 3-8 cm de comprimento, contém duas a quatro sementes que são esféricas ou ovais. Sendo que, a maioria das sementes são amarelas, mas também podem ser verdes, marrom escuro, preta arroxeada ou preta (LIU, 2016). A semente é rica em vários compostos de interesse biológico, como fitoesteróis, saponinas, inibidores de protease e isoflavonas (SILVA *et al.*, 2018).

As isoflavonas têm sido amplamente estudadas devido a seus potenciais benefícios para a saúde. Sendo a ingestão associada a uma menor incidência de certos tipos de câncer e osteoporose. Estes flavonóides também atuam como antioxidantes e compostos anti-inflamatórios. São considerados os principais compostos fenólicos da soja e estão distribuídas em formas agliconas e suas respectivas formas acetil-glicosídeo, malonilglicosídeo e β -glicosídeo (formas glicosiladas) totalizando 12 isoflavonas (FALCÃO *et al.*, 2018; HANDA *et al.*, 2019).

Dependendo do tipo e intensidade das técnicas de processamento da soja durante a fabricação, as quantidades e formas de isoflavonas encontradas no produto final podem variar amplamente. Produtos processados sob condições de alta umidade e temperatura mostram altas concentrações de β -glicosídeos, enquanto produtos submetidos a aquecimento a seco têm mais acetilglicosídeos. Por outro lado, produtos fermentados de soja contêm altas quantidades de isoflavonas agliconas (SILVA *et al.*, 2018).

Em termos de composição da semente de soja, cerca de 60% da massa seca do grão é constituído de óleo e proteínas, sendo geralmente 20% de óleo e 40% de proteínas. Além de ter em torno de 35% de carboidratos e 5% de fibras, o grão de soja contém quantidade considerável de lipídios (18-20%), sendo 15% de ácidos graxos saturados e 85% de ácidos graxos insaturados. Entre os insaturados destacam-se os ácidos linoleico e linolênico (GONÇALVES, 2014).

A soja, que é amplamente cultivada em todo o mundo, é uma das culturas econômicas mais importantes por suas altas concentrações de óleo e proteína (ZHANG *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2018b). A partir do seu grão é possível obter diversos produtos, como leite de soja, leite de soja fermentado em kefir, iogurte, soja germinada, tofu e tempeh, entre outros. As características nutritivas da soja e a sua adaptabilidade a diferentes latitudes, solos e condições climáticas, facilitou sua expansão por todo mundo (FALCÃO *et al.*, 2018).

Seu cultivo iniciou na China há 5000 anos sendo utilizada em diversos tipos de alimentos (LIU, 2016). A introdução do grão de soja na Europa ocorreu em 1712, recebendo o nome científico de *Glycine max* pelo botânico sueco Lineu. No Brasil foi cultivada pela primeira vez em 1901, na Estação Agropecuária de Campinas, sendo que o grão foi trazido também pelos imigrantes japoneses em 1908. Oficialmente, a soja foi introduzida em 1914, no Rio Grande do Sul e sua expansão aconteceu nos anos 70, com o interesse da indústria de óleo e demanda de farelo no mercado internacional (GONÇALVES, 2014).

A produtividade é definida pela interação da planta com o ambiente e o manejo. Altos rendimentos somente serão obtidos quando as condições citadas forem favoráveis, em todos os estágios de crescimento da cultura. Com isto, estudos sobre o manejo de solos se tornam fundamentais para aprimorar o rendimento desta cultura (PEREIRA *et al.*, 2011).

Pelo fato de ser uma cultura oleaginosa globalmente importante o uso de tratamentos de sementes para evitar a perda de rendimento através do manejo de patógenos, insetos no início da estação e nematoides tornou-se mais comum. Os tratamentos de sementes podem proteger de forma eficaz o estado da planta e a saúde. Estudos recentes propuseram que tratamentos de sementes com fungicidas e inseticidas podem ser utilizados para aumentar o rendimento em diversos ambientes, aumentando assim a lucratividade. De 1996 a 2013, o uso de tratamento de sementes aumentou de 8% para 75% da soja plantada nos Estados Unidos (ROSSMAN, BYRNE e CHILVERS, 2018).

2.1.1 Produção de Soja no mundo e no Brasil

A produção de soja é caracterizada pela monocultura extensiva, no entanto, esse tipo de cultura resulta em declínio do rendimento e deterioração da qualidade

que pode ser causada por numerosos fatores bióticos e abióticos, todos inter-relacionados. Especialmente, os nematoides parasitas de plantas, são as mais devastadoras na produção de soja, causando enormes perdas anualmente (LI *et al.*, 2018a).

Está entre as culturas mais importantes no mundo, sendo que, a sua demanda aumenta a cada ano devido a usos variados que incluem desde alimentação animal, fabricação de biodiesel até matéria prima para cosméticos (ROMANATO *et al.*, 2016).

As vantagens e importância desta leguminosa e de produtos originários da mesma para consumo humano são conhecidos e impulsionam a cultura com grande força. É uma das principais fontes de proteína e atualmente, representa uma parte significativa das dietas vegetarianas, além de ser utilizada para formulação de alimentos para recém-nascidos (PÁLENÍKOVÁ *et al.*, 2015). Tanto as sementes e os seus subprodutos têm alta demanda internacional e são componentes importantes da cadeia de abastecimento de vários produtos (RAUCCI *et al.*, 2015).

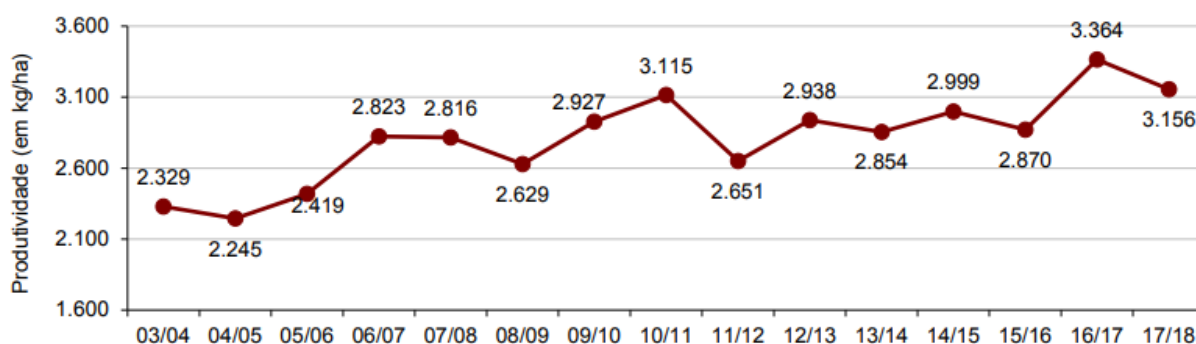
A produção de soja no mundo chega a 336,699 milhões de toneladas com uma área plantada de 124,580 milhões de hectares (EMBRAPA, 2018). De acordo com a USDA – *United States Department of Agriculture* (2018), os Estados Unidos são considerados os maiores produtores, com 34% de toda produção mundial, vindo em seguida o Brasil com 32,63% desta produção mundial e, após a Argentina com 15,43%. Juntos, são responsáveis por 82,65% da safra mundial. Na safra 2015/2016, os Estados Unidos, produziu cerca de 106,86 milhões de toneladas de soja, o que equivale a uma produtividade de 3.051 quilogramas por hectare (kg/há). Exportando cerca de 52,86 milhões de toneladas, os maiores importadores de soja são a China, União Europeia, Japão e México. Em relação a safra 2017/2018 obteve uma produção de 119,518 milhões de toneladas em uma área plantada de 36,228 milhões de hectares, equivalente a 3.299 kg/há.

Como matéria-prima para o óleo de soja e outros produtos à base de soja, como o leite de soja e o tofu, a soja é amplamente consumida na China. Como uma das principais áreas tradicionais de produção de soja na China, a província de Anhui, que pertence à região de Huang-Huai, é uma das maiores produtoras de soja na China. Sendo que, Anhui do Norte é responsável por fornecer soja para Jiangsu, Zhejiang e outras províncias do sul (ZHANG *et al.*, 2019).

O Brasil é o segundo maior produtor desde 2010 segundo a USDA até o ano referido, sendo um dos principais produtores mundiais de *commodities* agrícolas,

especialmente em soja (RAUCCI *et al.*, 2015). Em 2012, 50,9 milhões de hectares foram destinados ao cultivo de grãos, sendo 49,2% dessa área para culturas de soja, havendo uma produção total de 66,4 milhões de toneladas de grãos. A produção de 2013 estimou-se em 82,1 milhões de toneladas, com um aumento na safra de 23,6% em relação a 2012. Em relação a área de soja plantada, o aumento equivaleu a 2,6 milhões de hectares, totalizando 27,6 milhões de hectares cultivados com grãos no Brasil. Na safra brasileira de 2015/2016, a cultura ocupou uma área de 33,17 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 95,63 milhões de toneladas, equivalente a uma produtividade média de 2.882 kg/há. A safra de 2017/2018 obteve uma área plantada de 35,10 milhões de hectares equivalente a uma produção de 116,996 milhões de toneladas, obtendo 3.333 kg/há de produtividade (CONAB, 2018a). A Figura 1 a seguir, mostra o comportamento da produtividade de soja.

Figura 1 - Comportamento da produtividade de soja nas safras de 2003/2004 a 2017/2018



Fonte: CONAB, 2018b.

O USDA (2018) estima que as áreas plantadas no Brasil deverão sofrer uma expansão de quase 7%, passando de 35,10 milhões de hectares da safra 2017/2018, para 37,50 milhões de toneladas na safra 2018/2019. Já a produtividade calculada pela média dos 5 anos será de 3.210 kg/há para a safra 2018/2019.

A cultura de soja no Brasil ocorre principalmente nas regiões do sul e centro-oeste (KAMALI *et al.*, 2018). A região centro oeste do país, compreendendo os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás são responsáveis por 53% da produção brasileira de soja, cultivando 34,9 milhões de toneladas por ano (RAUCCI *et al.*, 2015). O Rio Grande do Sul está em terceiro lugar entre os maiores produtores de soja do país, com uma produção de 16,968 milhões de toneladas, área plantada de 5,692 milhões de hectares e produtividade de 2.981 kg/há (EMBRAPA, 2018).

No Paraná, um dos estados do sul do Brasil, existem dois principais sistemas de cultivo de soja, o sistema de cultivo convencional, que produz soja geneticamente modificada ou não geneticamente modificada e o sistema orgânico de cultivo (KAMALI *et al.*, 2018).

A soja é uma leguminosa cultivada no Brasil desde a década de 1950 (MAY *et al.*, 2017). Sua cultura exige o uso de uma ampla gama de pesticidas, fungicidas e herbicidas (VÁZQUEZ *et al.*, 2016), sendo considerada a responsável por mais de 50% das vendas de pesticidas no país para aplicação na cultura (MAY *et al.*, 2017).

Possui um papel crucial no desenvolvimento da agricultura brasileira, sendo que, recentemente se tornou a mais importante *commodity* do agronegócio brasileiro. O aumento da produção de soja tem sido provocado pela crescente demanda mundial de farelo de soja e óleo de soja (KAMALI *et al.*, 2018).

2.2 FEIJÃO: ORIGEM E CULTURA

O feijão é originário do continente americano e, a exemplo, de outras espécies alimentícias, foi levado à Europa como planta ornamental após o descobrimento da América. Evidências, nas quais se baseiam as afirmações dessa origem, estão fundamentadas em descobertas arqueológicas de restos da cultura no sudoeste dos Estados Unidos, no México e no Peru, cuja antiguidade remonta de 2300, 7000 e entre 7680 a 10000 anos, respectivamente (MEDEIROS, 2004).

É considerado uma planta leguminosa da família das *fabáceas*. Sendo classificado em dois grupos, considerando o gênero e a espécie: Grupo I – feijão Anão (comum), da espécie *Phaseolus vulgaris*, e Grupo II – feijão de corda, do gênero *Vigna*. A composição do feijão varia de acordo com o local do plantio, os fatores ambientais e a cultivar. Após a colheita do feijão, torna-se necessário à sua secagem para que possa obter um teor de umidade adequado para armazenamento, variando de 13% a 14%. O teor de proteína no feijão comum está entre 22 g e 26 g/100 g (MESQUITA, 2005). A quantidade de lipídeos varia de 2% a 3% e os carboidratos ficam em média de 69%, sendo o principal carboidrato armazenado o amido (RIBEIRO, PRUDENCIO-FERREIRA e MIYAGUI, 2005).

São relatados mais de cinquenta ocorrências de espécies do gênero *Phaseolus* nas Américas. No entanto, apenas *P. vulgaris* (feijão comum), *P. polyanthus* Greenman, *P. coccineus* L. (escarlet runner beans), *P. acutifolius* A. Gray (feijão

terapy) e *P. lunatus* L. (feijão de lima) são mais conhecidos por terem sido domesticados (MEDEIROS, 2004).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de extrema importância para a sociedade brasileira, uma vez que é uma das fontes de proteína mais utilizada pela população mais carente. A planta apresenta caule volúvel, folhas trifoliadas, raízes superficiais, flores brancas ou róseas, dependendo da cultivar, e vagens alongadas (FARIA, 2012).

Sua semeadura pode ser feita em três épocas. A primeira, conhecida como “safra das águas”, ocorre de agosto a dezembro e concentra-se na Região Sul; a segunda safra, ou “safra da seca”, abrange todo o país e ocorre de janeiro a abril; a terceira safra, ou “safra de inverno”, concentra-se mais no Centro-Oeste e ocorre entre os meses de maio e agosto, dependendo do estado (ARAÚJO, 2008).

A grande diferença entre cultivares está na cor e formato do grão, podendo variar do preto ao rosado, do arredondado ao alongado, sendo que o formato também pode interferir na massa dos grãos. No Brasil são inúmeras linhagens de feijão cultivados. Sendo, os mais conhecidos o feijão carioca, o preto, o fradinho (também chamado de macassar, caupi ou de corda) e os feijões tipo cores (branco, vermelho, roxo e outros) (ALMEIDA, 2016).

No estado do Rio Grande do Sul, certas regiões do Paraná e Santa Catarina, Rio de Janeiro e Espírito Santo, a preferência é pelo feijão preto. Em São Paulo e algumas regiões de Minas Gerais a preferência é pelo feijão de cor, como por exemplo, o feijão roxo. No estado de Goiás predomina o feijão do tipo carioca (MESQUITA, 2005).

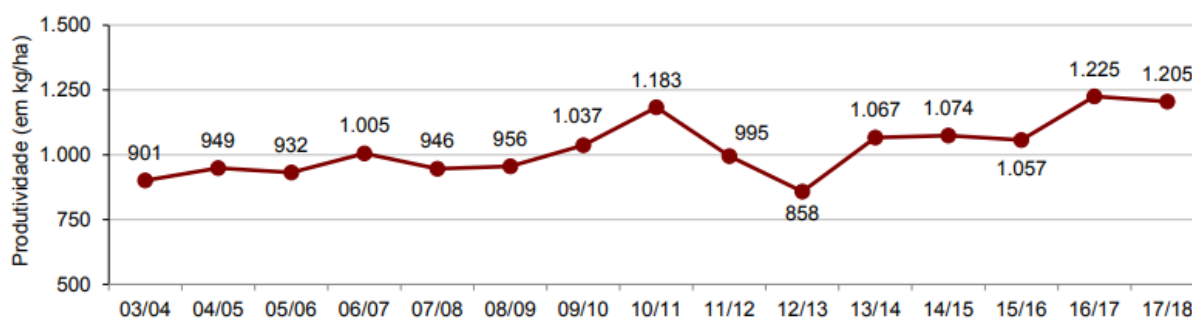
2.2.1 Cadeia produtiva do Feijão

Os maiores produtores mundiais de feijão, em ordem, são Myanmar, Índia, Brasil, Estados Unidos, México e Tanzânia. Mas o consumo é pequeno nos países mais desenvolvidos e o fato dos grandes produtores mundiais serem também os maiores consumidores gera poucos excedentes exportáveis, limita o conhecimento do mercado e, conseqüentemente, o comércio internacional do produto (COÊLHO, 2018).

A produção nacional da safra total (somando as três safras de feijão) de 2017/2018 é de 3,39 milhões de toneladas, mesmo volume da safra anterior, já tendo

sido maior em outros anos, numa área total de 3,24 milhões de hectares, aumento de 2% em relação ao último ano-safra (ou 64 mil hectares). A maior produtora regional passou a ser a Região Centro-Oeste, atingindo 893,3 mil toneladas na safra 2017/2018, aumento de 6,8% sobre a safra 2016/2017. Logo após, vem o Sul com 885,2 mil toneladas, redução de 6,1% e em seguida, o Sudeste com 806,2 mil toneladas, redução de 0,5% em relação ao ano-safra de 2016/2017. No Nordeste, a safra chegou a 710,5 mil toneladas, aumento de 4,6% (ou 31,4 mil toneladas) em relação à safra anterior, que foi melhor devido às boas condições climáticas (CONAB, 2018a). A Figura 2 a seguir, traz o comportamento da produtividade do feijão na primeira safra.

Figura 2 - Produtividade da cultura de feijão na primeira safra de 2003/2004 a 2017/2018



Fonte: CONAB, 2018b.

Segundo informações do censo agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2006), a produção de feijão é principalmente familiar. Este modo de produção implica um baixo emprego de tecnologia e de profissionalização do agricultor tradicional: 84% dos produtores utilizam sementes caseiras, levando à contaminação por patógenos e a danos mecânicos. A baixa produtividade associada vem da ausência de calagem e/ou erosão do solo, da prática de adubação desequilibrada, do uso de semente de origem desconhecida e do manejo inadequado de pragas e doenças, decorrentes de uma assistência técnica deficitária.

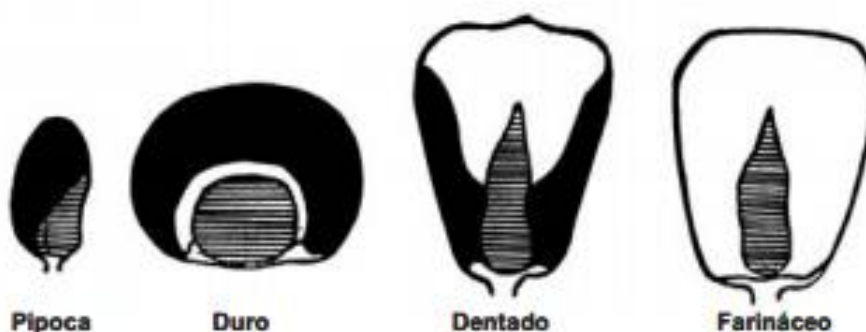
A comercialização do feijão se dá com a venda da safra do produtor para um intermediário, que a revende para um atacadista, que a empacota e vende ao supermercado. Geralmente, o feijão é estocado em silos e armazéns destinados a outras culturas, necessitando aplicação de produtos para evitar a ação de insetos (COELHO, 2018).

2.3 MILHO: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Na classificação botânica, o milho pertence à ordem Gramineae, família Poaceae, tribu Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. Sua origem é relatada no teosinto há mais de 8000 anos. É cultivada em muitas partes do mundo, como Estados Unidos da América, República Popular da China, Índia, Brasil, França, Indonésia e África do Sul (SEVERINO, CARVALHO e CHRISTOFFOLETI, 2005).

Os grãos de milho podem ser encontrados na cor amarela, branca ou variando do preto ao vermelho. Seu peso varia de 250 mg a 300 mg, sendo composto de aproximadamente 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibra e 4% de óleo. É considerado um alimento energético para as dietas humana e animal, por ser composto predominantemente de carboidratos e lipídeos. Seus derivados são utilizados na composição de vários produtos na indústria alimentar como margarinas, molhos de salada, óleos comestíveis, pães, etc. Além disso, também possui propriedades muito utilizadas nas indústrias química, farmacêutica, papéis, têxtil, entre outras. Baseadas nas características do grão, existem cinco classes ou tipos de milho, como mostrado na Figura 3, dentado, duro, farináceo, pipoca e doce. A maioria do milho comercial produzido nacionalmente é do tipo duro ou “flint”, enquanto, nos países de clima temperado, a predominância é do tipo dentado. A principal diferença entre os tipos de milho é a forma e o tamanho dos grãos, definidos pela estrutura do endosperma e o tamanho do gérmen (PAES, 2006).

Figura 3 - Imagem representativa das diferentes estruturas do grão de milho



Fonte: Paes, 2006

Sua importância econômica está relacionada as várias formas de utilização, da alimentação animal a indústria de alta tecnologia. Seu uso em grão na alimentação animal representa a maior parte do consumo, sendo que no Brasil varia de 70% a 90%

da produção total. Embora o percentual destinado a alimentação humana não seja tão grande em relação a sua produção, é um cereal de grande importância, principalmente para a população de baixa renda. Também possui grande importância social, principalmente porque no Brasil grande parte de seus produtores não possuem grandes extensões de terras e dependem de sua produção para viver (CRUZ *et al.*, 2011).

O milho tem duas safras, a primeira sendo a principal (de verão), e a segunda, de inverno, chamada “safrinha”. O plantio é zoneado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e tem alto potencial produtivo, se observada a época correta do plantio, que sofre influência da temperatura (a planta tende a ter a mesma do ambiente que a envolve), da umidade (apesar de ser exigente em água, pode ser cultivada em regiões onde as precipitações vão de 250 mm a 5.000 mm anuais, sendo geralmente uma cultura de sequeiro), do fotoperíodo (tempo de exposição da planta à luz solar) e da radiação solar (em cuja absorção o milho é uma planta muito eficiente, fixando gás carbônico pela fotossíntese) (CÔELHO, 2018).

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos e a China, com projeção de 93,6 milhões de toneladas produzidos para 2022/23. O consumo interno de 2013 foi 66,7% da produção e a exportação de 18 milhões de toneladas devendo aumentar para 24,74 milhões de toneladas em 2022/2023 (BRASIL, 2013).

A safra total de 2016/2017 obteve uma área plantada de 17.591,7 mil hectares, produtividade de 5.562 kg/ha totalizando uma produção de 97.842,8 mil toneladas. Para a safra de 2017/2018 houve uma diminuição na área plantada, sendo 16.664,8 mil hectares utilizados. A produtividade decresceu para 5.101 kg/ha, totalizando uma produção de 85.003,5 mil toneladas (CONAB, 2018b). A previsão de área plantada para a safra de 2018/2019 é de 16.654,0 mil hectares (CONAB, 2018a).

2.4 AGROTÓXICOS

De acordo com o *Codex Alimentarius* (2018a), agrotóxico é 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 (ou que seja fornecido aos animais para

controle de ectoparasitas). O termo inclui substâncias utilizadas como reguladoras do crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes, ou inibidores de brotos, e substâncias aplicadas tanto antes como após a colheita, para proteger a mesma da deterioração durante o armazenamento e transporte.

Já o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA classifica os agrotóxicos de acordo com o decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002. São produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas além de, ambientes urbanos, hídricos e industriais. Visa alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Também são considerados agrotóxicos as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Agrotóxico pode ser classificado como um produto químico usado para prevenir, destruir ou repelir pragas. Geralmente é uma substância tóxica e mata pragas de animais ou plantas que causam danos econômicos à cultura, plantas ornamentais e plantas domésticas (ALAMGIR, 2018).

Para Samsidar, Siddiquee e Shaarani (2018) agrotóxicos representam substâncias designadas para destruir qualquer grupo de pragas, como insetos e plantas. O termo “agrotóxicos” pode ser comumente utilizado como sinônimo de produtos fitofarmacêuticos (GEORGIADIS *et al.*, 2018).

Os agrotóxicos são um componente importante da atual agricultura que impulsionam e mantem a produtividade das culturas. Entre a classe de agrotóxicos mais utilizados estão os inseticidas. Desde a década de 1940, o manejo da resistência a insetos, as restrições regulatórias e o crescimento geral do mercado agroquímico levaram à evolução de quatro grandes classes de inseticidas (STEHLE, BUB e SCHULZ, 2018).

Em 1990, o mercado de agrotóxicos era dominado por organofosforados (43%), carbamatos (16%) e piretróides (18%). No entanto, em 2008, os neonicotinóides já ganharam uma participação de 24%, principalmente à custa de organofosforados e carbamatos (JESCHKE *et al.*, 2011). Geralmente, a pesquisa e o desenvolvimento de inseticidas de geração mais recente, como piretróides e neonicotinóides que substituíram as classes mais antigas de inseticidas, concentraram-se em maior

seletividade e maior toxicidade intrínseca a inseticidas para invertebrados, o que resultou em considerável taxa de aplicação (STEHLE, BUB e SCHULZ, 2018). A Tabela 1 detalha o histórico de mercado das classes de inseticidas citados.

Tabela 1 - Resumo de mercado das classes de inseticidas

Classe de inseticidas	Introdução no mercado (ano)	Participação no mercado de inseticidas (%) 1990/2008	Primeiro relatório de resistência (ano)
Organoclorados	1940	-/-	1946
Organofosforados Carbamatos	1950/1962	59/24,4	1965/1972
Piretroides	1973	18-15,5	1978
Neonicotinoides	1991	0/23,7	1995

Fonte: Adaptado de Stehle, Bub e Schulz, 2018.

2.4.1 Classificação e toxicidade dos agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados de diferentes maneiras, sendo uma delas quanto ao modo de ação do ingrediente ativo no organismo alvo ou a natureza da praga combatida. Desta forma tem-se, os herbicidas que combatem as plantas daninhas, inseticidas utilizados no combate aos insetos, fungicidas que combatem os fungos, acaricidas para combater ácaros, moluscocidas agindo sobre os moluscos, rodenticidas que combatem os roedores e bactericidas que combatem as bactérias (ALAMGIR, 2018).

Quanto ao seu grau de toxicidade, os agrotóxicos são classificados em quatro categorias, sendo atribuída uma cor distinta para cada uma delas. Essa classificação garante a interpretação direta do grau de perigo dos agrotóxicos à saúde humana, facilitando ao consumidor identificar a dimensão do risco na utilização destes compostos. A Figura 4 representa esta classificação (ANVISA, 2018a).

Figura 4 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos

Classe I	Rótulo vermelho - Extremamente tóxico	*DL₅₀ = 0 – 50 mg kg⁻¹
Classe II	Rótulo amarelo - Altamente tóxico	*DL₅₀ = 50 – 500 mg kg⁻¹
Classe III	Rótulo azul - Medianamente tóxico	*DL₅₀ = 500 – 5000 mg kg⁻¹
Classe IV	Rótulo verde - Pouco tóxico	*DL₅₀ > 5000 mg kg⁻¹

Fonte: Vicari, 2013.

A classificação dos agrotóxicos conforme o grau de toxicidade para o ser humano é fundamental, pois fornece a toxicidade desses produtos relacionados com a Dose Letal 50% (DL50). A DL50 representa a quantidade (dose única) da substância necessária para matar 50% dos animais testados nas condições experimentais utilizadas (GARCIA, BUSSACOS e FISCHER, 2008).

2.4.2 Limite Máximo de Resíduos

Existem três pilares importantes na legislação para garantir o controle de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários através da cadeia alimentar. Sendo eles, (i) produtos autorizados; (ii) limite máximo de resíduos (LMRs) e (iii) diretrizes dos métodos analíticos. Os resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários são regulados pelos níveis máximos de resíduos (MASIÁ *et al.*, 2016).

Para o Codex Alimentarius (2018b) Limite Máximo de Resíduos - LMRs é a concentração máxima de um resíduo de pesticida, sendo esse expresso em miligramas por quilogramas (mg kg⁻¹), recomendada para ser legalmente permitido em alimentos ou rações para animais e que sejam toxicologicamente aceitáveis.

De acordo com a União Europeia, conceitua-se como resíduos os vestígios de pesticidas deixados nos produtos tratados. Logo, um nível máximo de resíduos é o nível mais alto que é legalmente tolerado nos alimentos ou rações quando os pesticidas são aplicados corretamente (EUROPEAN COMMISSION, 2018a).

Em outras palavras, o LMRs pode ser conceituado como a quantidade máxima permitida ou reconhecida, como aceitável, estabelecida para cada composto aprovado para uso em um determinado alimento (BRASIL, 2002). Sendo que, o LMRs está correlacionado à ingestão diária aceitável, obtida a partir de ensaios de

experimentação e avaliação da toxicidade e a carcinogenicidade dos compostos não intencionais (MANN, 2017).

Embora o emprego de agrotóxicos na agricultura forneça ajuda, evitando a perda de rendimentos pelo ataque de patógenos, a falta de instruções ou conhecimento das Boas Práticas Agrícolas – BPAs para a utilização destes compostos ocasiona o aparecimento de resíduos acima dos limites estabelecidos, podendo representar risco à saúde humana (PRESTES, ADAIME e ZANELLA, 2011).

A realização de monitoramento em alimentos, especialmente vegetais crus e frutas, se torna necessário e com isso, a maioria dos países estabeleceram regulamentos para os LMRs em vegetais e frutas. A União Europeia (UE) e a Comissão do Codex Alimentarius (CAC) são agências governamentais que estabeleceram para pesticidas em alimento e/ou ração animal. Com o objetivo de estabelecer normas, diretrizes e recomendações relativas aos alimentos, os LMRs estabelecidos para agrotóxicos asseguram a segurança dos alimentos, a fim de proteger a saúde humana (SAMSIDAR, SIDDIQUEE e SHAARANI, 2018).

No Brasil a competência para estabelecer os LMRs fica a cargo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA em conjunto com o MAPA (MASIÁ *et al.*, 2016).

2.5 LEGISLAÇÃO QUANTO AO USO DE AVERMECTINAS COMO AGROTÓXICO EM SOJA, FEIJÃO E MILHO NO BRASIL

Em 1 de abril de 2003, a ANVISA recebeu o primeiro pedido de avaliação toxicológica do Benzoato de Emamectina para fins de registro do produto como agrotóxico. A solicitação foi feita nos termos da Lei 7.802 de 1989, que não contemplava o alvo *Helicoverpa armigera*. Este pedido foi indeferido em 10 de fevereiro de 2010, tendo em vista os efeitos neurotóxicos observados e a existência de outros produtos já registrados e com menor toxicidade utilizados para o mesmo fim (ANVISA, 2018b).

Em 2013, após decretar emergência fitossanitária para conter a praga quarentenária *Helicoverpa armigera* que começou a atacar cultivos de soja, algodão e feijão, o MAPA liberou, em caráter emergencial, o uso do produto por meio da Instrução Normativa nº 13, de 3 de abril de 2013. Na oportunidade foi protocolado pela empresa novo pedido de registro do referido produto (MAPA, 2013a).

A Portaria nº 1.109, de 6 de novembro de 2013 autorizou, em caráter emergencial e temporário, a importação de produtos agrotóxicos, que contivesse como ingrediente ativo a substância benzoato de emamectina para fins de contenção da praga *H. armígera* (MAPA, 2013b).

Com isso, o MAPA por meio do Ato nº 01/2016, incluiu o benzoato de emamectina na lista de produtos prioritários de análise para registro. O fato determinou o início da avaliação toxicológica pela ANVISA. Este novo pedido trouxe outras questões relevantes do ponto de vista técnico-científico para o entendimento dos aspectos toxicológicos do produto em relação à saúde humana. Exemplo disso, foram as novas evidências sobre neurotoxicidade, que afastaram os riscos anteriormente identificados em 2010, quando o produto foi indeferido (MAPA, 2016).

Até então no Brasil os compostos pertencentes à classe das avermectinas que estavam registrados e autorizados para uso, como medicamento veterinário e/ou inseticida, pelo MAPA eram a abamectina (ABA), doramectina (DORA), eprinomectina (EPRI) e ivermectina (IVER) (FERREIRA *et al.*, 2016).

Nas monografias autorizadas da ANVISA até 2017 apenas a abamectina estava registrada para uso como inseticida. Sendo a sua modalidade de aplicação em soja de forma foliar, nas sementes e tratamento de sementes no sulco do plantio. Já para o feijão, o modo de aplicação pode ser realizado de forma foliar ou nas sementes. Para o milho emprega-se apenas através das sementes (ANVISA, 2018c).

Em novembro de 2017, a ANVISA publicou a conclusão da avaliação toxicológica do ingrediente ativo benzoato de emamectina e do respectivo produto formulado Proclaim 50®, para fins de registro junto ao Ministério da Agricultura. A proposta de resolução que incluiu o benzoato de emamectina na relação de monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos passou por 30 dias de Consulta Pública. A partir disso, a Resolução nº 2.939 de 3 de novembro de 2017, inclui o ingrediente ativo B55 - benzoato de emamectina, na Relação de Monografias dos Ingredientes Ativos de Agrotóxicos e Domissanitários autorizados da ANVISA (BRASIL, 2017).

Atualmente, o benzoato de emamectina está liberado pela ANVISA para uso nas culturas de soja, algodão, milho e feijão. A única modalidade de aplicação permitida para soja, feijão e milho é a foliar (ANVISA, 2018d). A Tabela 2 a seguir, traz os LMRs para abamectina e emamectina nas modalidades aplicáveis à soja, ao feijão e ao milho.

Tabela 2 - LMRs para abamectina e emamectina nas culturas de soja, feijão e milho no Brasil

Cultura/Forma de aplicação	Abamectina LMRs (mg kg⁻¹)	Emamectina LMRs (mg kg⁻¹)
Soja/Foliar	0,01	0,01
Soja/Sementes	0,01	*
Soja/Tratamento de sementes	0,01	*
Feijão/Foliar	0,005	0,01
Feijão/Sementes	0,005	*
Milho/Foliar	*	0,01
Milho/Sementes	0,005	*

*Não possui limite máximo de resíduos estabelecido.

Fonte: ANVISA, 2018c, ANVISA, 2018d.

2.5.1 Legislação quanto ao uso de avermectinas como agrotóxico em soja, feijão e milho no mundo

Além da ANVISA que regulariza o uso de agrotóxicos e seus LMRs no Brasil, o *Codex Alimentarius* também possui essa função. O mesmo é um programa em conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (WHO) e conta com 189 membros, composto por 188 países membros e uma organização membro, a União Europeia (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2018c).

Em relação a classe das avermectinas, no *Codex Alimentarius* apenas a abamectina e o benzoato de emamectina são permitidos para uso como agrotóxicos. Porém, ambos não são permitidos para uso em soja e milho. Em relação ao feijão, tanto abamectina e emamectina são liberadas para uso (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2018c).

Já a União Europeia possui uma comissão para assegurar a segurança e saúde alimentar, além de monitorar a implementação de leis relacionadas. A mesma possui sua própria base de dados para agrotóxicos, onde a abamectina e o benzoato de emamectina são permitidos para a utilização em soja, feijão e milho. A Tabela 3 traz um resumo dos compostos e seus LMRs para cada base de dados (*EUROPEAN COMMISSION*, 2018b).

Tabela 3 – LMRs para soja, feijão e milho de acordo com o *Codex Alimentarius* e a União Europeia

Base de dado/ Cultura	Abamectina: LMRs (mg kg⁻¹)	Emamectina: LMRs (mg kg⁻¹)
Codex alimentarius/Feijão	0,08	0,01
Codex Alimentarius/Soja	*	*
Codex alimentarius/Milho	*	*
União Europeia/Feijão	0,01	0,01
União Europeia/Soja	0,01	0,01
União Europeia/Milho	0,01	0,01

*Não possui limite máximo de resíduos estabelecido.

Fonte: Codex Alimentarius, 2018c; European Commission, 2018b.

2.5.2 Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal

Em 2008, a partir da Instrução Normativa nº 42 instituiu-se o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal – PNCRC/Vegetal - MAPA. Sendo definido como um programa de inspeção e fiscalização que objetiva controlar os fatores de qualidade e a segurança higiênico-sanitária dos produtos de origem vegetal, seus subprodutos e derivados de valor econômico por meio de verificação de autocontrole ao longo das etapas da cadeia produtiva por cultura de origem vegetal. Tem como função monitorar a qualidade dos produtos de origem vegetal produzidos em todo o território nacional, em relação à ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos. Além de, evitar o consumo e comercialização de produtos de origem vegetal, seus subprodutos e derivados de valor econômico oriundos de produção na qual se tenha constatado violação dos LMRs e Níveis Máximos de Contaminantes. São monitorados produtos de origem vegetal destinados ao mercado interno e à exportação (MAPA, 2009).

De acordo com o *Codex Alimentarius* (2018e) contaminantes são substâncias que não foram intencionalmente adicionadas aos alimentos. Os processos de produção de alimentos podem levar a substâncias que contaminem os alimentos, por meio da etapa de fabricação, manuseio, armazenamento, processamento ou distribuição.

Resíduo de agrotóxico significa qualquer substância especificada em alimentos, produtos agrícolas ou ração animal resultante do uso de um agrotóxico. O

termo inclui quaisquer derivados de um agrotóxico, tais como produtos de conversão, metabólitos, produtos de reação e impurezas consideradas de significância toxicológica (CODEX ALIMENTARIUS, 2018f).

2.6 LAGARTA *HELICOVERPA ARMÍGERA*

Helicoverpa armígera (Hübner) é uma praga que atinge várias culturas agrícolas, causando muitos problemas econômicos e perdas de rendimento, principalmente soja, feijão, algodão, grão de bico, tomate, berinjela, canola e girassol. A *H. armígera* é geralmente administrada pelo uso de inseticidas, especialmente carbamatos, organoclorados, organofosforados e piretróides. Porém, devido ao uso extensivo desses agrotóxicos, desenvolveu-se resistência contra esses inseticidas convencionais. O desenvolvimento de resistência a inseticidas é o principal problema de surtos dessa lagarta (BILAL *et al.*, 2018). A Tabela 4 a seguir, traz os inseticidas utilizados atualmente para combater esta praga nas culturas agrícolas.

Tabela 4 - Inseticidas utilizados no combate a *H. armígera*

Inseticida	Nome comercial	Grupo químico
Clorpirifós	Lorsban® (40EC), Arysta	Organofosforado
Bifentrina	Talstar® (10 EC), FMC	Piretróide sintético
Lufenurom	Match® (50 EC), Syngenta	Regulador de crescimento
Lambda cialotrina	Karate® (2.5 EC), Syngenta	Piretróide sintético
Emamectina	Proclaim® (1.9EC), Syngenta	Avermectinas

Fonte: Adaptado de Bilal *et al.*, 2018.

Bue`s, Bouvier e Boudinhon (2005) relatam que a *H. armígera* já possui resistência a piretróides, organofosforados e carbamatos em muitos países da Ásia e Austrália. Na África, os primeiros sinais de resistência a piretróides foram detectados em 1996. Esta espécie foi relatada como resistente a piretróides, organofosforados e carbamatos na Espanha e a piretróides na França.

A capacidade de detectar efetivamente mudanças na suscetibilidade a inseticidas é um componente integral das estratégias de gerenciamento de resistência e é altamente dependente da precisão dos métodos implantados. Entre 2013 e 2016, monitoramentos foram realizados para a detecção de alelos de resistência em *Helicoverpa armígera* ao benzoato de emamectina, clorantraniliprole e indoxacarbe

nas principais regiões agrícolas do leste da Austrália. A resistência ao benzoato de emamectina não foi detectada. Porém, houveram baixos níveis detectados de sobrevivência de clorantraniliprole e indoxacarbe (BIRD, DRYNAN e WALKER, 2017).

2.7 MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Os medicamentos veterinários são definidos como quaisquer substâncias aplicadas ou administradas a qualquer animal produtor de alimentos, como carne ou leite, aves, peixes ou abelhas, sejam utilizados para fins terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico. Podem ser utilizados também para fins de modificação de funções ou comportamentos fisiológicos. Dentro das classes de medicamentos veterinários estão os medicamentos com caráter antiparasitário (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2018d).

De acordo com o MAPA, os produtos de uso veterinário são toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo os aditivos, suprimentos promotores, melhoradores da produção animal, medicamentos, vacinas, antissépticos, desinfetantes de uso ambiental ou equipamentos, pesticidas e todos os produtos que, utilizados nos animais ou no seu habitat, protejam, restaurem ou modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas, bem como os produtos destinados ao embelezamento dos animais (BRASIL, 2012).

Entre as diversas classes de medicamentos veterinários pode-se citar os antibióticos, quinolonas e antiparasitários. Neste trabalho, será dado enfoque apenas aos antiparasitários. Ambos desempenham um papel importante no tratamento e prevenção de doenças em animais (JECHALKE *et al.*, 2014). Porém, quando aplicados não são totalmente absorvidos pelo organismo, sendo até 90% excretado como um composto original ou metabólito para a terra diretamente nas fezes ou pela urina do animal (WEI *et al.*, 2016). Ou então de forma indireta através da aplicação de esterco como fertilizante, persistindo no solo por um longo tempo (JECHALKE *et al.*, 2014, WEI *et al.*, 2016).

O esterco, principalmente bovino, é uma alternativa para diminuir o custo com fertilizantes químicos na lavoura (EDVAN e CARNEIRO, 2011). Porém, são pouco estudados, quanto às características físico-químicas, bem como as quantidades a serem aplicadas nas culturas (GOMES *et al.*, 2008). Normalmente o esterco é

coletado, armazenado e espalhado pelo solo sem nenhum tratamento prévio, prejudicando o meio ambiente (PEREIRA *et al.*, 2012).

Os medicamentos veterinários podem ser absorvidos por plantas cultivadas a partir de solos adubados com esterco. Existindo uma preocupação crescente com relação às implicações de segurança alimentar causadas pela contaminação de solos por medicamentos veterinários (WEI *et al.*, 2016). Devido ao fato de que, um número crescente de relatórios mostra um aumento na ocorrência e distribuição de medicamentos veterinários nos excrementos e no ambiente em vários países do mundo (WEI *et al.*, 2016; BOXAL *et al.*, 2006).

2.7.1 Antiparasitários: anti-helmínticos

Antiparasitários são medicamentos de uso frequente na medicina veterinária para o controle de endo e/ou ectoparasitas (FERREIRA *et al.*, 2012). Os mesmos dividem-se em dois grupos: anti-helmínticos e antiprotozoários.

Os anti-helmínticos, de interesse nesse estudo, são um dos grupos de medicamentos veterinários mais utilizados no mundo, amplamente e rotineiramente administrados a animais para controlar nematoides e outros parasitas (COOPER *et al.*, 2012, MANNING, BEYNON e LEWIS, 2017). Sendo as classes mais importantes deste grupo os benzimidazóis, pirimidinas e lactonas macrocíclicas (LMs) (DZHAFAROV *et al.*, 2016).

2.7.1.1 Lactonas macrocíclicas

Em 1979, um grupo de pesquisadores do Instituto Kitasato, do Japão, liderado pelo Dr. Satoshi Omura, com o apoio do laboratório de pesquisa Merck Sharp & Dohme (atualmente Syngenta Crop Protection AG) apresentaram os resultados das atividades antiparasitárias do produto da fermentação do actinomiceto NRRL 8165 isolado do solo da província de Kawana. Nesse trabalho, o fermentado foi fracionado e um grupo de substâncias nomeadas de *avermectins* ou avermectinas, foi identificado nas frações de maior atividade. A partir desse momento, foi atribuído ao microorganismo NRRL 8165 o nome de *Streptomyces avermitilis*. Os extratos de cada fração foram aplicados em ratos contaminados com *Nematospiroides dubius* e como

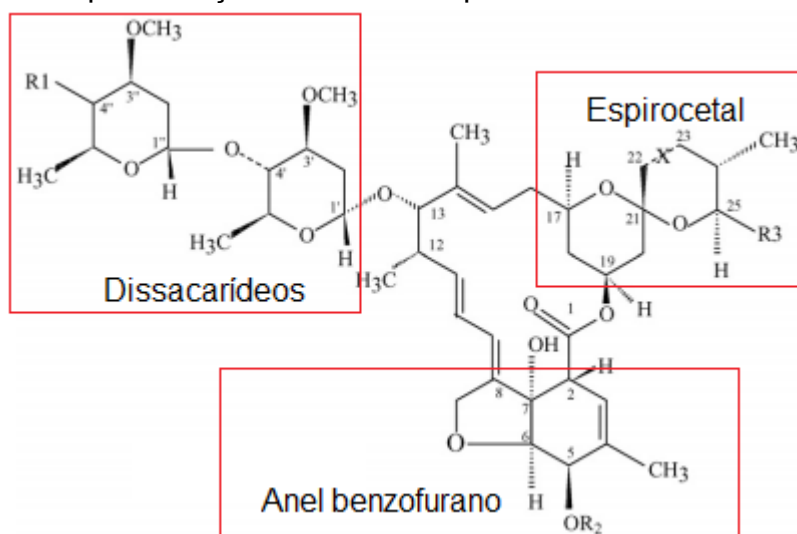
resultado não foi observada a formação de ovos e de larvas no intestino dos animais, sugerindo alta atividade contra a proliferação deste endoparasita (RÜBENSAM, 2010).

As LMs são amplamente utilizadas no tratamento de animais produtores de alimentos, na aquicultura e culturas em geral. Fazem parte deste grupo as avermectinas e as milbemicinas. Ambas são produtos naturais da fermentação de microrganismos do gênero *Streptomyces* no solo (DANAHER *et al.*, 2006). A classe das avermectinas são de interesse neste estudo.

a) Avermectinas

As LMs, em geral, possuem estruturas complexas em anel. Em relação as avermectinas, possuem um anel macrocíclico de 16 membros, contendo um grupo espirocetal, um anel de benzofurano e funcionalidades dissacarídicas (RUBIES *et al.*, 2015). A Figura 5 representa a estrutura química geral das avermectinas e os grupos presentes. A maioria dessas moléculas encontrou aplicação em produtos para animais de estimação ou proteção de cultivos (DANAHER *et al.*, 2012).

Figura 5 - Representação da estrutura química das avermectinas



Onde: ligação C₂₂-x-C₂₃ consiste para ABA (-CH=CH-), DORA (-CH=CH-), EMA (-CH=CH-), EPRI (-CH=CH-) e IVER (-CH₂-CH-).

Fonte: Adaptado de Danaher *et al.*, 2006.

As avermectinas foram introduzidas no mercado veterinário em 1981 e, em 1985 alguns de seus representantes passaram a ser empregados também como agrotóxicos (FERRAZ, 2018). Ou seja, são licenciadas para uso como drogas veterinárias e inseticidas (FERREIRA *et al.*, 2016; VASSILIS *et al.*, 2016) além de alguns serem utilizados como agentes farmacêuticos (BAI e OGBOURNE, 2016).

Desta classe, a ABA e IVER são as mais conhecidas, devido ao longo e amplo uso (DANAHER *et al.*, 2006). A ivermectina foi comercializada pela primeira vez em 1981 e continua a ser o principal agente antiparasitário mundial para a pecuária. No entanto, à medida que a resistência a medicamentos cresce, alternativas ou novos produtos com potencial atividade são urgentemente necessários (FEI *et al.*, 2018).

Outros compostos também são comercializados, como a DORA, emamectina (benzoato) (EMA) e EPRI. A representação da estrutura química de cada um dos compostos encontra-se no Apêndice A. Em sua maioria, esses compostos são lipofílicos, ou seja, possuem baixa solubilidade em água. As LMs de 16 membros usados como potenciais pesticidas e drogas antiparasitárias têm atraído grande interesse devido à alta atividade latente e alta margem de segurança (FEI *et al.*, 2018).

Porém, os compostos de avermectinas são degradados rapidamente no ambiente após a aplicação. No solo, são rapidamente decompostos pelos microrganismos após uma rápida fotólise nas superfícies das plantas (SHOAIB *et al.*, 2018).

Atribui-se uma nomenclatura a estes compostos, conhecida como A_{1a}, A_{1b}, A_{2a}, A_{2b}, B_{1a}, B_{1b}, B_{2a} e B_{2b} (DANAHER *et al.*, 2006). As substâncias do conjunto A diferenciam do conjunto B pela presença de um grupamento metoxila (CH₃-O⁻) na posição C5 ao invés de um grupamento hidroxila (OH). Quanto às subclassificações 1 e 2, a e b, referem-se à presença de uma ligação dupla entre C22 e C23 para 1 e à presença de um grupamento hidroxila no C23 para 2 e, por fim, à presença de um grupamento *s*-butil (metilas ligadas a carbono secundário) em a e um grupamento isopropil (metilas ligadas a carbono terciário) em b (RÜBENSAM, 2010).

Três destes compostos (A_{2a}, B_{1a} e B_{2a}) são os principais produtos de fermentação. A avermectina B_{1a} (genericamente conhecida como abamectina) é produzida naturalmente e considerada a mais importante (DANAHER *et al.*, 2006). A partir de ABA são produzidos outras avermectinas (RÜBENSAM, 2010). IVER, ABA, EMA e EPRI são misturas de compostos, denominados B_{1a} (acima de 80%) e B_{1b} (menos de 20%) (RUBIES *et al.*, 2015).

Em relação ao modo de ação desses compostos, sabe-se que, nos vertebrados o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a glicina bloqueiam a atividade elétrica nas células nervosas e musculares, aumentando a condutância dos íons cloreto. Já nos invertebrados, o GABA e o glutamato bloqueiam a atividade elétrica através de um mecanismo semelhante (DANAHER *et al.*, 2006).

Recentemente, os inseticidas a base de LMs foram registrados em mais de sessenta países em todo o mundo, incluindo Estados Unidos, Canadá, muitos países da União Europeia, Japão, Austrália, Nova Zelândia, Índia, Argentina e Zimbábue (ABDU-ALLAH e PITTENDRIGH, 2018). A popularidade relativa das avermectinas entre agricultores e veterinários pode ser atribuída ao seu amplo espectro de atividade (KOLAR *et al.*, 2008).

1) Abamectina

A abamectina é uma mistura de dois homólogos e contém pelo menos 80% de avermectina B_{1a} e não mais de 20% de avermectina B_{1b} (SINGH *et al.*, 2018). A mesma atua através da ligação do ácido gama-aminobutírico (GABA) e canal de cloro controlado por glutamato (ÇAĞATAY *et al.*, 2018).

Tem sido usada como um anti-helmíntico desde meados de 1985 (SINGH *et al.*, 2018), sendo empregada como medicamento veterinário e como agrotóxico. Além de ser um importante endectocida, administrado principalmente a bovinos, a abamectina é também utilizada como agrotóxico de aplicação foliar com a função de inseticida e acaricida em diversas culturas, como algodão, soja, batata, ervilha, feijão e tomate. Esta pode ser comercializada nas formas de concentrado emulsionável, suspensão concentrada ou granulado dispersível (FERRAZ, 2018). Quanto à sua funcionalidade ela é classificada como um inseticida/acaricida/nematicida de origem biológica, além de ser um agente antiparasitário em animais de criação e estimação (MOREIRA, 2017).

2) Benzoato de Emamectina

A emamectina é um derivado semissintético da abamectina (SHOAIB *et al.*, 2018), formado por 90% de avermectina B_{1a} e 10% de avermectina B_{1b} (SHEN *et al.*, 2017). Geralmente, a EMA é apresentada na forma combinada com o ácido benzóico, que aumenta a sua solubilidade nos meios aquosos (RÜBENSAM, 2010). É estável em soluções aquosas de pH 5-8 (a 20 °C), mas perde facilmente a estabilidade sob luz ultra-violeta (UV). A aplicação deste inseticida é limitada pela sua rápida degradação quando aplicado em solos agrícolas (YIN, ZHU e CHEN, 2018).

EMA juntamente com a ABA são os membros da família avermectina a serem utilizadas na proteção de cultivos (BAI e OGBOURNE, 2016). Em comparação ao inseticida tradicional, EMA apresenta um melhor efeito inseticida. No entanto, devido

à sensibilidade à luz ultravioleta (UV), bem como a condições fortemente alcalinas e ácidas, a atividade biológica é limitada na aplicação (SHEN *et al.*, 2017).

3) Eprinomectina

É um derivado semissintético da avermectina B_{1a} ou abamectina. Constitui-se por dois homólogos, B_{1a} e B_{1b}, que diferem por um grupo metileno, e é definido como não inferior a 90% de B_{1a} e não superior a 10% de B_{1b}. A eprinomectina, desenvolvida exclusivamente para uso em medicina veterinária, é um potente parasiticida e foi empregada como o primeiro endectocida para bovinos, incluindo vacas leiteiras em lactação. Foi registrada como a solução tópica EPRINEX® Pour-On (Merial) para o tratamento e controle de certos vermes gastrintestinais, vermes pulmonares, vermes, piolhos, ácaros e moscas no gado. Mais recentemente, uma formulação injetável, LONGRANGE™ (Merial), foi sintetizada proporcionando eficácia contra parasitas de bovinos por até 150 dias (KVATERNICK *et al.*, 2014).

A eprinomectina é o último membro registrado para bovinos da classe das avermectinas, sendo datado no final dos anos 90. Possui como característica uma atividade de amplo espectro (BRIQUÉ-PELLET *et al.*, 2017).

4) Ivermectina

A ivermectina foi descoberta em 1975 e foi o primeiro anti-parasiticida de amplo espectro comercialmente disponível com capacidade de matar parasitas internos e externos. Foi introduzida como anti-helmíntico pela Merck nos anos 80 (NANDI *et al.*, 2018). É um derivado semissintético da abamectina, produzido pela saturação de uma ligação dupla entre C22 e C23 (DANAHER *et al.*, 2006). Devido a isso possui maior atividade e espectro mais amplo. Foi a primeira droga a matar os estágios larvares migratórios de vermes e adultos e, portanto, outras empresas desenvolveram análogos como a doramectina (ROMERO-GONZÁLEZ, FRENICH e VIDAL, 2014).

É uma molécula lipofílica, que é capaz de se acumular nos tecidos e músculos adiposos, apesar das baixas dosagens utilizadas em bovinos (LIMA *et al.*, 2016).

5) Doramectina

A doramectina é um agente antiparasitário derivado da fermentação, que após administração parenteral exibe atividade potente e persistente contra nematóides em bovinos (PÉREZ *et al.*, 2010). É produzida pela fermentação do *Streptomyces*

avermittilis na presença do ácido ciclohexanocarboxílico, e apresenta hidrocarboneto ciclohexano no C-25 (RÜBENSAM, 2010). A única diferença estrutural entre abamectina e doramectina é o substituinte na posição C-25; ambos os compostos diferem da ivermectina na modificação di-hidro nas posições C-22, C-23 (KOLAR *et al.*, 2006).

É um composto endectocida com potência excepcional e um amplo espectro antiparasitário de atividade contra nematóides e artrópodes. Este composto é amplamente utilizado em todo o mundo para controlar endo e ectoparasitas em animais de criação. Possui alta lipofilicidade, que mostrou extensivamente distribuído a partir do plasma para diferentes tecidos, particularmente aqueles com maior teor de gordura (MAIA *et al.*, 2013).

2.7.1.2 Características Físico-Química das Avermectinas

Mesmo sendo substâncias com atividades biológicas e estruturas químicas semelhantes, as LMs apresentam propriedades físico-químicas diferentes entre si. De uma forma geral, todas as LMs possuem massas moleculares elevadas e elevados valores de coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), que as caracterizam como substâncias lipofílicas. A diferença de lipofilicidade entre as LMs é atribuída basicamente aos seus diferentes grupamentos químicos em sítios específicos. Por exemplo, o grupamento metilamino da EMA, presente na sua subestrutura dissacarídica, está conjugado com o ácido benzóico e pode ser ionizado em diferentes condições de pH, conferindo desde o menor até o maior valor de K_{ow} entre as avermectinas. Além disso, a conjugação com o ácido benzóico proporciona a maior solubilidade entre as LMs (RÜBENSAM, 2010).

Essas substâncias, nas suas formas mais puras são sólidos brancos, em forma de pó. Em solução, apresentam alta sensibilidade à luz e são transformadas rapidamente em seus isômeros. Além disso, não são voláteis e apresentam sensibilidade moderada à temperatura, sendo decompostas próximo aos seus pontos de fusão. Essas substâncias também apresentam estabilidade em condições moderadamente ácidas, porém, há combinações de temperatura, pH e tempo de exposição em que estas substâncias podem sofrer hidrólise na subestrutura no C13 (IMPERIALE *et al.*, 2009; CELESTINA *et al.*, 2010).

A Tabela 5 apresenta algumas propriedades físico-químicas das avermectinas.

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas das avermectinas

LMs	Massa Molecular (g mol⁻¹)	Log K_{ow}	Solubilidade em água (µg L⁻¹)
Abamectina	873,1	4.0	7,8
Doramectina	898,5	4.0	25
Eprinomectina	913,5	5.4	3,5
Ivermectina	874,5	3.2	5,0
Emamectina	885,5	3.0	24000

Fonte: Adaptado de Rübensam, 2010.

2.8 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE AVERMECTINAS

Nos últimos anos, os problemas de segurança envolvendo alimentos de origem vegetal tornaram-se gradualmente o foco do interesse público, sendo realizado a determinação de resíduos de pesticidas como uma forma de controle da qualidade. Porém, devido aos baixos níveis de pesticidas em tecidos vegetais e matrizes complexas faz-se necessário o desenvolvimento de procedimentos eficientes de extração (BARCHANSKA *et al.*, 2018).

Muitos tipos de alimentos têm uma composição de gordura maior que 2% sendo considerados alimentos gordurosos, entre eles tem-se nozes, ovos, abacate e grãos (HAN *et al.*, 2016). No caso dos grãos destaca-se nesse trabalho grãos de soja, feijão e milho, que possuem essa característica.

Em matrizes graxas, tanto contaminantes lipofílicos quanto hidrofílicos podem estar presentes, e métodos analíticos devem ser planejados para abranger uma ampla faixa de polaridade para análise de resíduos de agrotóxicos (HAN *et al.*, 2016).

O preparo de amostra, geralmente, envolve a extração dos analitos e a subsequente limpeza do extrato com a finalidade de isolar os compostos de interesse e remover interferentes da matriz. É considerado uma etapa essencial do processo analítico para obter resultados confiáveis e manter o bom desempenho do instrumento (BANDEIRA, 2015). Portanto, é de grande importância selecionar o preparo de amostra adequado para a matriz desejada, bem como a técnica de determinação final (SAJID, 2018). A Tabela 6 apresenta métodos de preparo de amostra para matrizes com alto teor de gordura para análise de compostos da classe das avermectinas.

Tabela 6 - Exemplos de métodos de preparo de amostra em matrizes com alto teor de gordura para análise de resíduos de avermectinas

Analitos	Amostras	Técnica	Solventes	pH	Partição	Limpeza	Referência
Multirresíduo: Abamectina	Óleo de oliva e abacate	QuEChERS	Acetonitrila	-	Sulfato de magnésio: cloreto de sódio	d-SPE	López-Blanco <i>et al.</i> , 2016
	Cogumelos	QuEChERS	Acetonitrila:água	-	Sulfato de magnésio: cloreto de sódio	d-SPE	Du <i>et al.</i> , 2013
Multirresíduo: Emamectina	Óleo de oliva	QuEChERS citrato	Acetonitrila	Ácido (5% em ACN)	Sulfato de magnésio:cloreto de sódio e sais de citrato	d-SPE	Dias <i>et al.</i> , 2016
	Grãos	QuEChERS	Acetonitrila:água	-	Sulfato de magnésio:cloreto de sódio	d-SPE	Liu <i>et al.</i> , 2017
Multirresíduo: ABA, EMA	Soja	QuEChERS acetato	Acetonitrila	Ácido (ácido acético)	Sulfato de magnésio:acetato de sódio	d-SPE	Wang <i>et al.</i> , 2013
ABA, EMA, IVER	Óleos essenciais	MSPE (Extração em fase sólida com microesferas)	n-hexano/acetato de etila	-	-	Microesferas de Fe ₃ O ₄	Zhang <i>et al.</i> , 2017
ABA, IVER	Óleo de oliva, óleo de soja, óleo de milho, óleo de amendoim, banha	Extração líquido-líquido/Purificação a baixa temperatura	Acetonitrila:n-hexano	-	-	SPE	Huang <i>et al.</i> , 2014
ABA, DORA, IVER	Manteiga	Extração líquido-líquido:ultrassom	Acetonitrila:acetato de etila:água	-	-	-	Macedo <i>et al.</i> , 2015
Abamectina	Maçã	Ultrassom/DLLME	Acetonitrila	-	-	-	Pirsaheb <i>et al.</i> , 2017

Como técnicas de extração pode-se citar a Extração em Fase Sólida (SPE) que é utilizada também apenas como uma etapa de limpeza, o método QuEChERS, Extração líquido-líquido (LLE) e a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD). Como técnicas de microextração tem-se a Microextração em Fase Sólida (SPME), Extração Sortiva com Barra de Agitação (SBSE) (BARCHANSKA *et al.*, 2018), Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (MADEJ *et al.*, 2018) entre outras.

a) Extração líquido-líquido

A LLE baseia-se na partição de substâncias entre solventes imiscíveis (NUCKOWSKI, KACZMARKIEWICZ e STUDZIŃSKA, 2018). Consiste na formação de duas fases imiscíveis, combinando componentes com diferentes propriedades físico-químicas (tradicionalmente constituídas por uma fase aquosa e orgânica). Dependendo do soluto, a molécula-alvo migra, parcial ou completamente, para uma das fases coexistentes do sistema, permitindo sua concentração (SANTOS *et al.*, 2017).

Huang *et al.* (2014) analisaram abamectina e ivermectina em óleos de oliva, soja, milho e amendoim e em banha através da extração líquido-líquido. O solvente extrator utilizado na primeira etapa foi o *n*-hexano com o objetivo de diminuir a viscosidade dos óleos, seguido da adição de acetonitrila mantendo agitação em vórtex e posterior centrifugação. Acetona, metanol, tolueno e acetonitrila podem ser usados para extrair ABA e IVER. No entanto, a acetona e o metanol dissolvem uma grande quantidade de lípidos que podem interferir fortemente na separação cromatográfica e na detecção. Já o tolueno é muito tóxico. Sendo assim, a acetonitrila foi a escolha como solvente de extração. Em relação a limpeza do extrato, a primeira etapa consistiu em uma purificação a baixa temperatura. O extrato orgânico foi retirado e refrigerado a uma temperatura de -30 °C por 16 horas para a remoção dos interferentes gordurosos, considerando que as matrizes selecionadas possuem alto teor de gordura. Ao final o extrato foi evaporado e reconstituído em acetonitrila.

Já Macedo *et al.* (2015) analisaram abamectina, doramectina e ivermectina em manteiga utilizando uma extração líquido-líquido a altas temperaturas. A alta temperatura foi necessária para manter a manteiga no estado líquido. Os solventes extratores testados foram acetonitrila, acetato de etila e água mantendo uma proporção de 90% de acetonitrila e variando os demais, nos testes iniciais. A

proporção para acetonitrila foi mantida alta devido a excelente solubilidade dos analitos na mesma. Ao final a proporção escolhida foi 90:4:6 (v/v/v).

b) QuEChERS

Em 2003, Anastassiades *et al.* (2003) publicaram a metodologia original, combinando a extração de pesticidas de matrizes de alimentos com a limpeza do extrato. O acrônimo QuEChERS criado vem do significado *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*. O método consiste em extração com uma quantidade relativamente pequena de acetonitrila, partição com a utilização de sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio e limpeza do extrato utilizando a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) com sulfato de magnésio e o sorvente amina primária secundária (PSA). Logo após, foi desenvolvido o método tamponado QuEChERS acetato, em que emprega como sais de partição sulfato de magnésio e acetato de sódio e como solvente de extração a acetonitrila acidificada com ácido acético (LEHOTAY *et al.*, 2005). Mais tarde a tamponação com sais de citrato na etapa de partição foi desenvolvida, onde denominou-se de QuEChERS citrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2007).

A d-SPE é uma técnica alternativa a SPE, em que o material sorvente é colocado diretamente em uma amostra global (LAWAL *et al.*, 2018). Essa técnica de limpeza requer apenas equipamentos simples de laboratório, utiliza menos sorvente e menor quantidade de amostra. Além disso, proporciona melhor interação com o extrato do que a SPE convencional (MADEJ *et al.*, 2018).

O método QuEChERS tem sido cada vez mais utilizado nos últimos anos devido à sua simplicidade, número mínimo de etapas de processamento de amostra e eficácia para limpeza de amostras complexas. A técnica foi inicialmente introduzida para a extração de pesticidas a partir de matrizes de alimentos. Em seguida, foi aplicada para outros compostos, tais como micotoxinas, toxinas vegetais e medicamentos veterinários (PÉREZ *et al.*, 2015).

Desde sua primeira publicação, o método QuEChERS tornou-se um dos principais métodos de escolha para análise de alimentos e sofreu várias modificações e aprimoramentos ao longo dos anos. Entre as modificações destaca-se a utilização de diferentes técnicas de limpeza, diversos sorventes na etapa de limpeza além de, combinar o método com precipitação a baixa temperatura, principalmente na determinação de resíduos de pesticidas em óleos comestíveis (MADEJ *et al.*, 2018).

López-Blanco e colaboradores (2016) utilizaram um método QuEChERS modificado para a análise multirresíduo de pesticidas em matrizes com alto teor de gordura. Entre os compostos analisados tem-se a abamectina. A extração foi realizada em amostras de abacate e óleo de oliva, utilizando como solvente extrator a acetonitrila e na etapa de partição os sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio. A principal modificação foi na etapa de limpeza, onde realizou-se testes com diferentes sorventes, sendo eles: PSA+C18, Z-Sep⁺ e EMR-lipid. A performance desses sorventes foram avaliadas levando em consideração os seguintes parâmetros: recuperação, efeito matriz e limpeza do extrato. Primeiramente, estudos preliminares avaliaram a efetividade desses sorventes para as matrizes em questão, realizando um monitoramento no modo '*full scan*', mostrando que ambos sorventes eram eficientes. Para o óleo de oliva os resultados obtidos na etapa de limpeza com os sorventes foi altamente satisfatório. Para as amostras de abacate, concluiu-se que o Z-Sep⁺ recuperou menos compostos que PSA+C18 e EMR-lipid. Por outro lado, valores de reprodutibilidade foram inadequados para muitos compostos quando utilizou-se PSA+C18. Em resumo, o EMR-lipid permitiu recuperar quase todos os pesticidas estudados, ao mesmo tempo em que também removeu a maioria dos coextrativos gordurosos, aumentando o desempenho geral do método por meio da diminuição do efeito matriz sem perda significativa de analitos.

Amostras de óleo de oliva também foram preparadas por uma modificação do método QuEChERS citrato para análise multirresíduo, havendo a emamectina (benzoato) como representante da classe das avermectinas. A acetonitrila foi utilizada como solvente extrator e a partição foi realizada com os sais de sulfato de magnésio, cloreto de sódio e sais de citrato. Novamente, testes com diferentes sorventes foram realizados para a obtenção de um extrato mais limpo, entre eles PSA+C18 e Z-Sep⁺. Em termos de recuperação, Z-Sep⁺ mostrou os piores resultados com quase 40% dos pesticidas não recuperados. Quando PSA+C18 e EMR foram empregados, resultados melhores foram obtidos, mas o PSA mostrou um desvio padrão relativo (RSD) médio de 15%. Para o método empregando EMR, mais compostos apresentaram recuperação entre 70 e 120% e a média de RSD ficou entre 7% (DIAS *et al.*, 2016).

Du *et al.* (2013) analisaram resíduos de avermectinas, piriproxifeno e diflubenzurom em cogumelos, onde o método de preparo das amostras também consistiu no método QuEChERS. O solvente extrator utilizado foi acetonitrila e os sais de partição foram sulfato de magnésio e cloreto de sódio. A otimização do preparo de

amostras deu-se na etapa de limpeza com a avaliação e comparação dos sorventes dispersivos e a recuperação dos extratos. Essa comparação foi entre quatro sorventes (PSA, C18, GCB e Florisil®). Realizou-se a comparação por meio de amostras replicadas no mesmo nível de concentração. O sorvente C18 obteve recuperações maiores que 120% para alguns compostos como a abamectina e o GCB obteve recuperações menores que 60% quando utilizado. O PSA e Florisil® tiveram recuperações satisfatórias e devido a fatores econômicos o PSA foi escolhido para ser utilizado no método proposto.

O método QuEChERS também foi utilizado para análise de compostos multirresíduo em grãos. O composto da classe das avermectinas presente na avaliação foi a abamectina. Por se tratar de matrizes consideradas “secas” antes de iniciar a extração adicionou-se água as amostras e em seguida a acetonitrila como solvente extrator. A partição foi realizada com sulfato de magnésio e cloreto de sódio. Empregou-se Fe₃O₄-PSA e C18 como sorventes na etapa de limpeza por d-SPE. A combinação de PSA e C18 também foi testada. Porém, a utilização de Fe₃O₄-PSA e C18 demonstrou que o método desenvolvido pode economizar a quantidade total (em massa) de sorvente, utilizando apenas 30 mg de Fe₃O₄-PSA e 10 mg de C18. Enquanto que com PSA e C18 utilizou-se 50 mg para ambos. Além disso, as recuperações com Fe₃O₄-PSA e C18 ficaram em uma média de 80% para mais da metade dos compostos analisados. Utilizando PSA e C18 as recuperações ficaram em torno de 70% para menos da metade dos compostos, com a maioria apresentando recuperações abaixo desse valor (LIU *et al.*, 2017).

Wang *et al.* (2013) analisaram abamectina e emamectina (benzoato), além de outros pesticidas em soja, onde o método QuEChERS modificado empregado foi o acetato. Adicionou-se água antes de iniciar a extração, pois a soja é considerada uma matriz “seca”. A acetonitrila acidificada com ácido acético foi utilizada como solvente extrator e o sulfato de magnésio e acetato de sódio como sais de partição. Na etapa final de extração, a camada de acetonitrila foi transferida para um tubo de ensaio e mantida a -20 ° C por 1 h, seguida de centrifugação. Alguns estudos indicaram que o congelamento foi uma abordagem prática e simples para remover ou reduzir os lipídios dos extratos das amostras. Para a etapa de limpeza por d-SPE avaliou-se os sorventes C18 e PSA, onde 89% dos pesticidas analisados obtiveram recuperações entre 81 e 110% e 95% dos compostos avaliados obtiveram RSD ≤20%.

c) Extração em fase sólida (SPE)

O conceito de SPE é baseado na partição de analitos entre a fase líquida e o sorvente sólido. Uma escolha apropriada de sorvente é essencial para melhorar a seletividade, a capacidade de sorção e a eficiência do procedimento de SPE. Vale ressaltar que a seleção do sorvente depende não somente da identidade do analito e sua interação com o sorvente, mas também da natureza da matriz da amostra (HASHEMI, ZOHRABI e SHAMSIPUR, 2018). Esse método permite a recuperação de analitos num pequeno volume de solução de eluição apropriada para proporcionar um fator de pré concentração desejável necessário para a análise dos compostos de interesse, além de garantir recuperações satisfatórias e proporcionar o uso de uma variedade de sorventes (HERRERO-LATORRE *et al.*, 2018). Atualmente, o SPE é uma das técnicas de extração mais populares. No caso de matrizes contendo gordura, o mesmo tem sido utilizado principalmente como etapa de limpeza de um extrato obtido anteriormente (MADEJ *et al.*, 2018).

Zhang *et al.* (2017) analisaram abamectina, emamectina e ivermectina em óleos essenciais através da SPE empregando microesferas. As amostras de óleo foram diluídas com *n*-hexano e em seguida adicionado microesferas de Fe₃O₄. Essas microesferas são magnéticas e preparadas a partir de uma reação de FeCl₃, acetato de sódio e polietileno glicol. As microesferas em contato com o extrato adsorvem os compostos de interesse, no caso, as avermectinas. Em seguida, as mesmas foram lavadas com acetato de etila e *n*-hexano e eluiu-se com metanol. O eluente foi evaporado e posteriormente reconstituído com uma solução de acetonitrila:água. Vários parâmetros, como a quantidade de sorvente, a solução de lavagem, a solução de dessorção e as taxas de fluxo de amostragem e eluição foram investigados.

Huang *et al.* (2014) realizaram a LLE, como mencionado no item a, e utilizaram SPE como segunda etapa de limpeza de suas matrizes (óleo de oliva, óleo de soja, óleo de milho, óleo de amendoim, banha) com alto teor de gordura. O cartucho empregado para a técnica foi Alumina-B, sendo o mesmo condicionado com acetonitrila, limpo com uma solução de *n*-hexano e acetonitrila e eluído com metanol. Ao final é realizado a evaporação do extrato e sua redissolução em acetonitrila. Considerando todo o processo desde o preparo da amostra, o consumo de solvente orgânico foi de apenas 8,5 mL, uma quantidade relativamente pequena em comparação com os métodos relatados com base nos procedimentos LLE-SPE para análise de traços em óleos comestíveis.

d) Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Na técnica de DLLME três fases são usadas: o solvente de extração, o solvente dispersivo e a fase aquosa. O solvente orgânico, usado como um extrator, não é miscível em água. O solvente dispersivo é miscível tanto na água quanto no solvente extrator. Uma mistura adequada de solventes de extração e dispersivo é injetada rapidamente na fase aquosa com uma seringa (GRECCO, SOUZA e QUEIROZ, 2018). O solvente de extração é igualmente espalhado pela fase aquosa pelo solvente dispersivo, e pequenas gotas do solvente de extração levam à turvação da solução da amostra. Nesta situação, a superfície de contato entre o solvente de extração e a fase aquosa é muito grande, favorecendo assim a rápida obtenção do equilíbrio; conseqüentemente, a transferência do analito da fase aquosa para o solvente de extração é rápida. Então, o solvente de extração contendo o analito pode ser facilmente isolado por centrifugação (MOUSAUVI, TAMIJI e KHOSHAYAND, 2018).

Pirsaheb *et al.* (2017) analisaram abamectina em maçã empregando a Microextração líquido-líquido dispersiva baseada na solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFO) com o sobrenadante. Utilizou-se um solvente extrator imiscível em água e como solvente dispersor utilizou-se 1-undecanol. O processo da DLLME até formar a gota ocorreu sem modificações. Ao formar a gota, o tubo foi colocado em banho de gelo para a solidificação da mesma. Em seguida, a gota foi transferida para um tubo cônico onde fundiu-se novamente e então injetada no sistema cromatográfico para análise.

2.9 SORVENTES COMUMENTE UTILIZADOS NA ETAPA DE LIMPEZA

As técnicas de extração normalmente diferem entre si em termos de condições de processo e sorventes utilizados. Com o desenvolvimento de novos preparos de amostra, a classificação de sorventes está se tornando uma tarefa cada vez mais exigente devido à variedade de pesquisas realizadas e inovações (BARCHANSKA *et al.*, 2018).

Entre os sorventes mais utilizados na etapa de limpeza estão os óxidos inorgânicos, a base de sílica (C8, C18), sorventes poliméricos e à base de carbono ou materiais híbridos. A redução de coextrativos lipídicos por QuEChERS permite a utilização de limpeza por d-SPE utilizando sorventes como amina primária secundária

(PSA), octadecilsilano (C18), carvão grafitizado (GCB) e um sorvente à base de zircônia comercial (Supel™ QuE Z-Sep) (HAN *et al.*, 2016).

O PSA é normalmente utilizado na etapa d-SPE na análise de alimentos, pois sua capacidade quelante auxilia na remoção de interferentes, como ácidos graxos livres, açúcares e outros compostos polares da matriz. Entretanto, compostos com características ácidas podem ser retidos, diminuindo assim as taxas de recuperação (ARIAS *et al.*, 2014).

Muitos compostos inorgânicos, como zircônia, alumina e mistura de polímeros inorgânicos são empregados como materiais sortivos (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016). Estes óxidos metálicos exibem comportamentos de sorção anfóteros: eles podem seletivamente ligar-se a ácidos de Lewis e bases de Lewis. Como exemplo dessa classe tem-se o uso de sorventes a base de zircônia, por exemplo Supel™ QuE Z-Sep, que são cada vez mais utilizados no protocolo QuEChERS para a remoção de lipídios dos extratos. O Florisil é outro exemplo de sorvente dessa classe (POOLE, 2003).

Sílica também é um composto inorgânico comumente empregado. A presença de grupos silanol na superfície desse polímero permite a modificação da seletividade deste material (BARCHANSKA *et al.*, 2018).

Sorventes poliméricos são compostos aromáticos e, portanto, exibem interações seletivas com compostos aromáticos devido a interações π - π entre o sorvente e o analito. Maior área de superfície e estabilidade em uma faixa de pH mais ampla em comparação com materiais de sílica, tornam os sorventes poliméricos uma ferramenta versátil para o isolamento de diferentes classes de pesticidas em matrizes. Os exemplos mais utilizados deste tipo de sorventes em SPE são do tipo OASIS de troca catiônica e aniônica e HLB de balanço hidrofílico e lipofílico (WEN *et al.*, 2014).

Outro tipo de sorvente polimérico é o EMR–Lipid, onde sua estrutura é uma propriedade secreta. O modo de ação deste sorvente é baseado em uma combinação de exclusão de tamanho e interação hidrofóbica. É usado em d-SPE, mas também está disponível nos formatos de placa e cartuchos, o que permite que o solvente iniba a precipitação de proteína. Reduz a quantidade de coextrativos com alta recuperação de pesticidas (HAN *et al.*, 2016).

O carvão grafitizado (GCB) é considerado um sorvente de troca reversa e aniônico devido à sua estrutura e superfície positivamente carregada. Sua estrutura planar faz deste sorvente uma ferramenta útil para retenção de moléculas planares.

Combinado com PSA remove coextrativos de matrizes com pigmento, como clorofila de matrizes verdes (por exemplo, alface, espinafre ou folhas). No entanto, sabe-se que o GCB afeta aproximadamente 25% das recuperações de certos pesticidas com funcionalidade planar que tendem a ser retidos em sua superfície (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

Os nanomateriais de carbono são particularmente úteis em técnicas de extração devido suas estruturas únicas e a maneira como interagem com compostos orgânicos, por exemplo, através de forças não covalentes e interações hidrofóbicas. Grafeno, nanotubos de carbono e fulerenos têm sido estudados e amplamente aplicados em técnicas de extração (FUMES *et al.*, 2015).

2.10 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DE AVERMECTINAS

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses compostos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

A escolha da técnica de separação depende principalmente das características dos pesticidas de interesse. Os compostos voláteis, semi-voláteis e termicamente estáveis podem ser determinados por Cromatografia a Gás (GC), enquanto os não voláteis e/ou termicamente instáveis devem ser determinados por Cromatografia a Líquido (LC) (TETTE *et al.*, 2016).

Cromatografia a Gás, que utiliza um gás como fase móvel, é uma técnica com um poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra. Já que a maioria dos compostos não apresenta volatilidade suficiente para ser analisado por Cromatografia a Gás, a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (HPLC), que utiliza um líquido como fase móvel, tem grande destaque, uma vez que o principal requisito para a análise é a solubilidade dos compostos na fase móvel (VICARI, 2013).

A cromatografia é uma parte essencial do procedimento analítico (KUSTER, ALDA e BARCELÓ, 2009). Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse pelo

desenvolvimento de métodos cromatográficos de alta produtividade, ou seja, métodos de análise multirresíduo, robustos e sensíveis. Novos tipos de fases estacionárias, colunas e instrumentações foram desenvolvidos com o objetivo de encurtar os tempos de análise e obter maiores resoluções e detectabilidade (PÉREZ-FERNANDEZ *et al.*, 2017).

A tecnologia da Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Performance (UHPLC), cujo advento data apenas de 2004, pode fornecer fase móvel a pressões de até 1.000 bar. Permite que colunas com partículas muito pequenas (menores que 2 µm) atinjam bons desempenhos com tempos de análises mais curtos resultando em melhor eficiência cromatográfica, resolução e detectabilidade (PÉREZ-FERNANDEZ *et al.*, 2017).

A UHPLC é uma boa alternativa à HPLC convencional, devido às vantagens associadas ao uso de partículas de fase estacionária menores, o que permite uma eficiência extra com uma taxa de fluxo mais alta e tempo de análise mais curto (HUERTAS-PÉREZ *et al.*, 2018).

A separação por cromatografia líquida de pesticidas normalmente é realizada por fase reversa (RP), devido à polaridade desses analitos. As fases estacionárias comuns são baseadas em C8, C18 e fases estacionárias de sílica modificada (KUSTER, ALDA E BARCELÓ, 2009). Em geral, a fase móvel para a análise de pesticidas com RP-LC consiste em misturas de água-metanol e água-acetonitrila (GRIMALT e DEHOUCK, 2016). Recentemente, a Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC) foi testada como alternativa à RP-LC, para melhorar a forma do pico e aumentar a retenção de poluentes polares. Tal técnica é uma variante da LC de fase normal tradicional, com a importante diferença de que emprega fases móveis semi-aquosas: tipicamente 40 e 97% de acetonitrila em água (PÉREZ-FERNANDEZ *et al.*, 2017).

A Cromatografia a Líquido com detecção de fluorescência ou acoplada a Espectrometria de Massa são técnicas de escolha para determinação de LMs, pois apresentam alta detectabilidade e seletividade. Essas características analíticas são necessárias para a análise de traços dessas LMs em matrizes complexas, como amostras ambientais e de alimentos de origem vegetal e animal (LEMOS *et al.*, 2016).

Métodos de HPLC com detecção ultravioleta (UV) já foram relatadas para a determinação de IVER em medicamentos, mas não em alimentos, porque esses métodos são insuficientemente sensíveis (MACEDO *et al.*, 2015).

2.10.1 Cromatografia à Líquido com detecção por Fluorescência

A detecção por fluorescência (FD) é por natureza altamente seletiva e sensível, e seu acoplamento com LC apresenta algumas vantagens, como baixo custo e complexidade, bem como influência insignificante da matriz em comparação com problemas que podem surgir empregando a Espectrometria de Massas (HUERTAS-PÉREZ *et al.*, 2018).

A detecção por fluorescência é uma técnica baseada na emissão de fótons de moléculas excitadas que possuem campos de fluorescência intrínsecos suficientemente grandes para serem detectados. Os compostos fluorescentes por natureza são relativamente raros e incluem aqueles que contêm pelo menos duas ligações conjugadas, ou seja, doadores de elétrons (DEMARCO, 2017).

Em um detector FD, a luz de uma fonte UV atravessa um sistema óptico, composto por lentes e monocromador, que focaliza o feixe e seleciona o comprimento de onda adequado para incidir sobre a amostra e excitá-la. Quando uma substância fluorescente está presente na cela da amostra ao retornar ao estado fundamental, a molécula excitada emite uma luz de comprimento de onda maior ao incidido. Outra lente coleta a energia fluorescente e focaliza-a na fotomultiplicadora, que mede a intensidade da radiação (COLLINS, BRAGA E BONATO, 2006).

Vários métodos bem estabelecidos com detecção por fluorescência existem especialmente para a determinação de compostos com fluorescência natural, por exemplo micotoxinas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e muitos deles foram estabelecidos como os métodos oficiais da AOAC. Para os outros, a derivatização pré ou pós-coluna com reagentes adequados tem sido amplamente aplicada. Usualmente, é utilizada uma fase estacionária de fase reversa, sendo uma coluna C18 mais comumente empregada. A fluorescência é geralmente medida em comprimentos de onda (λ) de excitação entre 330-334 nm e comprimento de onda (λ) de emissão entre 460-464 nm (CIGIÉ e PROSEN, 2009).

A Cromatografia a Líquido com detecção por fluorescência, tem sido proposta como técnica de determinação para a análise de avermectinas. Provou ser sensível o suficiente para permitir a determinação em baixas concentrações, levando em consideração o LMRs das mesmas (RAICH-MONTIU, PRAT e GRANADOS, 2011). As LMs não são fluorescentes por natureza e uma reação de derivatização é um pré-

requisito para a sua determinação usando HPLC-FD (LEMOS *et al.*, 2016). A maioria dos métodos para determinação de LMs baseada em HPLC-FD emprega anidrido trifluoroacético (TFAA) e 1-metilimidazol (MI) como derivatizantes (MACEDO *et al.*, 2015).

2.10.2 Cromatografia a Líquido acoplada a Espectrometria de Massas

Diversos métodos analíticos foram usados para separar e detectar pesticidas em diversas matrizes. Devido à baixa concentração destes compostos e à alta complexidade da maioria das matrizes, o uso de técnicas analíticas que proporcionam alta seletividade e detectabilidade é essencial. Cromatografia à Gás e Cromatografia à Líquido acopladas a Espectrometria de Massas (GC-MS e LC-MS) são as técnicas mais amplamente utilizadas para análise de pesticidas (LLORENT-MARTÍNEZ *et al.*, 2011).

Apesar da cromatografia líquida ser uma excelente técnica de separação, o uso de detectores clássicos, de um modo geral, torna as análises quantitativas mais limitadas, pois a identificação do analito através do seu tempo de retenção (t_R) característico pode gerar um grande problema, visto que vários compostos podem coeluir, ou seja, apresentar o mesmo t_R ou valores muito próximos a este. Por isso, existe a necessidade de uma técnica confirmatória quando a confirmação da estrutura química é também necessária (LANÇAS, 2009).

Há um interesse crescente na utilização de LC-MS/MS devido a universalidade, seletividade, detectabilidade e capacidade de identificação desta técnica de detecção. No entanto, as principais desvantagens estão ligadas ao alto custo e efeito matriz relacionados aos fenômenos de supressão/aumento de íons produzidos pelos componentes da matriz (HUERTAS-PÉREZ *et al.*, 2018).

A espectrometria de massas é a técnica que melhor fornece as informações estruturais necessárias e assim, o acoplamento entre estas duas técnicas dá origem a uma ferramenta versátil e de grande potencial na análise quali e quantitativa (LANÇAS, 2009).

A Espectrometria de Massas é definida como o estudo da matéria pela formação de íons em fase gasosa e posteriormente caracterizados por um Espectrômetro de Massas de acordo com sua massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas. O resultado de uma análise por MS se dá pela forma de

um espectro, onde a abscissa corresponde à razão entre a massa e o número de cargas do íon (m/z) e a ordenada está relacionada à sua intensidade (VICARI, 2013).

Um espectrômetro de massas é constituído basicamente das seguintes partes: sistema de introdução de amostras, fonte de ionização, analisador de massas e detector. A detectabilidade da resposta em espectrometria de massa depende principalmente do tipo de fonte de ionização, analisador e modo de ionização usado. As fontes de Ionização Química por Pressão Atmosférica (APCI) e Ionização por Electrospray (ESI) são as mais utilizadas para a análise de pesticidas. Em geral, tanto o APCI quanto o ESI permitem a ionização eficiente de uma ampla gama de compostos com polaridades variáveis. A seleção da fonte de ionização mais apropriada depende das classes de compostos investigados (KUSTER, ALDA e BARCELÓ, 2009). De acordo com Lanças (2009), a APCI é empregada na análise de moléculas menores e menos polares e a ESI é utilizada na análise de moléculas de maior polaridade e massa molecular. Para o trabalho proposto a ionização ESI foi empregada, devido as avermectinas apresentarem alta massa molecular.

No que diz respeito aos analisadores, os mais frequentemente utilizados na análise de resíduos de pesticidas são do tipo triplo quadrupolo (QqQ). Os analisadores QqQ podem operar em vários modos de varredura MS/MS, entre eles, o modo de monitoramento de reação selecionada (SRM) é o mais empregado porque é o único que oferece a detectabilidade e especificidade necessárias na maioria das aplicações. Os limites de detecção instrumental alcançados no modo SRM são geralmente nas faixas de ng/mL (KUSTER, ALDA e BARCELÓ, 2009).

2.11 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos deve ser realizada para fornecer evidências de que o método é adequado para a finalidade pretendida (AGA *et al.*, 2016). Logo, é considerado um passo crucial no desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis (KIM *et al.*, 2018).

Em 2010, a ANVISA publicou o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, onde traz como o objetivo de uma validação a demonstração da apropriação de uma metodologia analítica para uma finalidade pretendida. Essa apropriação depende da apresentação de resultados experimentais que assegurem, especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, detectabilidade, limite

de quantificação, exatidão e robustez (ANVISA, 2010). Em 2017, a RDC nº 166 foi publicada pela ANVISA estabelecendo critérios atualizados para a validação de métodos analíticos (ANVISA, 2017).

A SANTE (2017) é outro documento de orientação que descreve os requisitos de validação do método e de controle de qualidade analítica para apoiar a validade dos dados utilizados e para verificar a conformidade com os limites máximos de resíduos, além de, avaliar medidas de fiscalização ou avaliação da exposição do consumidor a pesticidas na União Europeia. Este documento é complementar e integral aos requisitos da ISO/IEC 17025.

A Tabela 7 a seguir mostra um resumo dos principais parâmetros da validação de um método analítico para a determinação de resíduos de pesticidas por cromatografia.

Tabela 7 - Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos

Parâmetro	Definição	Aplicação
Seletividade	Distinção de resposta entre analitos.	Extração de matriz "branco"
Linearidade	Correlação entre resposta analítica e concentração	Curva Analítica ($y = ax + b$)
Faixa Linear de Trabalho	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva Analítica ($y = ax + b$)
Efeito Matriz	Influência dos componentes da matriz na resposta (y)	Comparação entre curvas preparadas em solvente e em extrato branco
Limite de detecção Limite de quantificação	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R = 3 S/R = 10
Precisão	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	Repetibilidade e Reprodutibilidade
Exatidão	Proximidade de resultado em relação à uma referência	Ensaio de fortificação

Fonte: ANVISA, 2017; INMETRO, 2011, SANTE, 2017.

2.11.1 Seletividade

A seletividade é definida como a capacidade de um método para diferenciar os analitos de interesse e o padrão interno (PI) de outros compostos que podem estar presentes numa matriz, tais como metabólitos, impurezas, produtos de decomposição ou componentes da matriz. As diretrizes indicam que a seletividade deve ser avaliada em amostras “branco” da matriz, comparando com uma amostra “branco” fortificada (FACHI *et al.*, 2017).

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) sugere o uso do termo “seletividade” para expressar até que ponto outras substâncias interferem na determinação de um analito, enquanto “especificidade” é usada para denotar a seletividade final, o que significa que nenhuma interferência detectável deve ocorrer. A seletividade de um método deve garantir que os efeitos dos interferentes no sinal do analito sejam insignificantes. O interferente pode agir como o analito e pode suprimir ou aumentar o sinal alterando a separação cromatográfica ou a resposta do detector (KRUBE *et al.*, 2015a). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (VICARI, 2013).

2.11.2 Efeito Matriz

Efeito Matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental (BRASIL, 2011). As substâncias interferentes podem não ser visíveis na relação m/z monitorada e podem causar supressão ou aumento do sinal, uma mudança na linha de base ou ter um impacto no tempo de retenção do analito. (GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

É um parâmetro especificamente relacionado aos métodos de espectrometria de massa. Representa, juntamente com a seletividade, a principal razão pela qual um método não pode ser desenvolvido e validado em solução e, posteriormente, aplicado a uma matriz diferente (FACHI *et al.*, 2017).

Logo, para a avaliação desse efeito são preparadas curvas analíticas com os mesmos pontos, sendo uma no solvente e uma no extrato “branco” da matriz (RIMAYI *et al.*, 2015).

A minimização e/ou eliminação do efeito matriz pode ser obtida através da redução da quantidade de componentes da matriz que coeluem com os analitos no detector e, por isso, é necessário o desenvolvimento de métodos de extração mais seletivos e etapas de limpeza dos extratos mais eficientes (GOSETTI *et al.*, 2010).

2.11.3 Curva analítica (Linearidade) e faixa de trabalho

A curva de calibração representa a relação entre quantidades conhecidas do analito na amostra e a resposta do instrumento. Essa relação deve ser contínua e reproduzível (FACHI *et al.*, 2017). Em outras palavras, a curva de calibração é a equação matemática que relaciona a resposta do instrumento aos padrões de calibração para uma faixa de calibração definida (GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Esta relação produz uma equação de regressão linear, $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão a e b que se referem a inclinação e a interceptação da curva analítica, respectivamente, com o eixo y , quando $x = 0$, respectivamente (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 2004).

A partir desta equação é possível calcular o coeficiente de determinação (r^2), que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica, sendo considerados satisfatórios valores a partir de 0,99 (RIBANI *et al.*, 2004).

2.11.4 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2011).

O limite de detecção (LOD) é definido como a menor quantidade ou a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada de forma confiável e identificada com o método. Isto não implica a possibilidade de quantificar o resultado. Além disso, quando se fala em detectar um analito próximo do limite de detecção, dois

tipos de resultados falsos são possíveis - resultados falso-positivos e falso-negativos - que não são totalmente explicados nessa definição (KRUVE *et al.*, 2015a).

O limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração de analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (GONZÁLEZ *et al.*, 2014). O LOQ é apenas um valor indicativo, pois os resultados abaixo do LOQ não são desprovidos de informações e podem ser adequados para o propósito. Caso o resultado de uma medição esteja entre o LOD e o LOQ, pode ser relatado que a presença do analito foi detectada na amostra, mas está abaixo do limite quantificável (KRUVE *et al.*, 2015a).

2.11.5 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Precisão e exatidão estão relacionadas à concordância entre os resultados da medição replicada ou a concordância entre o valor medido e um valor de referência. A precisão diz respeito ao erro aleatório de um sistema de medição e é um componente da incerteza de medição. Em todas as diretrizes, dois tipos de precisão são mencionados que podem ser determinados para um método analítico, são elas: repetibilidade e precisão intermediária (KRUVE *et al.*, 2015b).

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento de medição usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo. A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tais como: dias de análise, analistas e equipamentos (BRASIL, 2011). O objetivo de avaliar a precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá resultados semelhantes (RIBANI *et al.*, 2004).

2.11.6 Exatidão

Medidas analíticas são feitas para obter informações sobre algumas propriedades do objeto amostrado. A interpretação dos resultados e a tomada de

decisões corretas exigem informações sobre a exatidão e a precisão das medições (SOBOLEVA e AMBRUS, 2004).

A exatidão de um resultado de medição refere-se à proximidade da concordância entre o valor medido e o valor real. Ela pode ser aplicada a um resultado individual, não apenas à média de um grande número de resultados. Ou seja, refere-se à capacidade do método para fornecer resultados exatos (KRUIVE *et al.*, 2015b).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão. A recuperação dos analitos pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas desta. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações (ANVISA, 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho proposto consistiu no desenvolvimento e validação de um método de preparo de amostra para extração de resíduos de avermectinas em amostras de soja, feijão e milho, seguida da determinação destes por UHPLC-MS/MS. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3R (Millipore, Bedford, EUA);
- Banho ultrassônico, linha Soniclean (Sanders do Brasil, Brasil);
- Moinho (Tecnal – Tec Mill TE-633);
- Moinho (IKA® A11 Basic);
- Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Cetrífuga (Centribio, Brasil);
- Centrífuga refrigerada para tubos de 15 mL (NT 825 Novatécnica);
- Centrífuga refrigerada para tubos de 50 mL (NT 825 Novatécnica)
- Agitador Vortex – AP56 (Phoenix Luferco);
- Balanças analíticas de precisão AUW-220D e UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Ultraturrax PT 3100 Polytron;
- Ultraturrax IKA® T25 Digital;
- Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Waters, EUA), contendo espectrômetro de massas triploquadropolo e amostrador automático sample manager (Acquity), coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm, 2,1 x 50 mm e sistema de aquisição de dados MassLynx V 4.1 (Waters, EUA);
- Sistema compressor de ar, modelo SF2FF (Atlas Copco, EUA);
- Sistema gerador de nitrogênio, modelo NM30L-MS (Peak, Reino Unido);
- Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS.

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS UTILIZADOS

Os reagentes, solventes e demais materiais utilizados neste trabalho foram:

- Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R;
- Metanol grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- Isopropanol grau HPLC (Sigma-Aldrich, EUA);
- Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- Acetato de etila (J. T. Baker, EUA);
- Sulfato de magnésio anidro p.a. (J. T. Baker, EUA);
- Cloreto de sódio p.a. (Sigma Aldrich, Alemanha);
- Acetato de sódio anidro (J. T. Baker, EUA);
- Citrato de sódio diidratado (Sigma Aldrich, EUA);
- Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma Aldrich, EUA);
- Sorvente Bondesil C18 com diâmetro de partícula de 40 µm (Supelco, EUA);
- Sorvente Bondesil PSA com diâmetro de partícula de 40 µm (Agilent, EUA);
- Sorvente Supel™ QuE Z-Sep+ (Supelco, EUA)
- Sorvente EMR-Lipid (Agilent, EUA)
- Sorvente Florisil (Agilent, EUA);
- Sorvente Sílica (Agilent, EUA);
- Acetona grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- Hexano (95% n-hexano, J. T. Baker, EUA);
- Filtros de nylon de 13 mm e porosidade 0,22 µm (Agilent)
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 mL e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Microtubo, tipo eppendof, capacidade de 2 mL (Axygen Scientific, EUA);
- Frascos de vidro (vial) com capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- Extran® neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- Padrões sólidos dos compostos em estudo;
- Vidraria comum de laboratório.

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SOJA, FEIJÃO E MILHO

Foi empregado o moinho, por 1 min, para o processamento das amostras de soja, feijão e milho, a fim de reduzir a granulometria e adquirir um aspecto de farelo. As amostras processadas foram armazenadas em potes com capacidade de 200 g e em *freezer* a temperatura de -20 °C. Para o desenvolvimento do método, as amostras eram retiradas do *freezer* e aguardava-se que as mesmas atingissem a temperatura ambiente.

Em relação ao procedimento de adição de água às amostras (*slurry*), o mesmo ocorreu de duas formas distintas. Para o teste inicial dos três QuEChERS (original, acetato e citrato), o *slurry* procedeu medindo a massa de cada amostra separadamente e adicionando o volume de água ultrapura, em tubo de teflon, de uma quantidade específica para cada matriz, de acordo com a proporção m/v de *slurry* empregada inicialmente. Após o tubo foi homogeneizado em ultraturrax até formar uma fase homogênea da mistura. Dessa mistura mediu-se a massa de 10 g de cada amostra, em tubo de polipropileno de 50 mL, para iniciar a extração.

A segunda forma de *slurry* consistiu em medir a massa de cada amostra diretamente em tubo de polipropileno de 50 mL e adicionar ao mesmo o volume de água, de acordo com as proporções m/v de *slurry* de soja, feijão e milho. A partir disso, o tubo foi homogeneizado em ultraturrax e posteriormente realizou-se a extração. Esse processo de *slurry* foi escolhido para os testes preparo de amostra, devido a facilidade e rapidez que apresentou.

3.4 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE

Com o objetivo de assegurar a execução correta do procedimento de extração e de análise para cada amostra no sistema cromatográfico, além da localização das fontes de erro, são adicionadas soluções conhecidas como padrão interno (PI) e padrão de controle (PC). Estas substâncias são adicionadas em diferentes estágios do procedimento analítico e possuem diferentes finalidades (SANTE, 2017).

Como padrão de controle utilizou-se a sulfadimetoxina deuterada com concentração de 10 mg L⁻¹, sendo a mesma empregada para avaliação do procedimento de extração na forma de resultados de recuperação, uma vez que é

adicionado à amostra antes de se iniciar a extração dos analitos. Adicionou-se 20 μL da solução para obter uma concentração de 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

O dimetridazol deuterado, de concentração 10 mg L^{-1} , foi empregado como padrão interno, sendo neste trabalho utilizado apenas para a avaliação do instrumento. Foi adicionado 2 μL de P. I. nos vials de injeção para ter uma concentração final de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Ambos padrões escolhidos para serem empregados são medicamentos veterinários.

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS

Inicialmente, preparou-se 10 mL das soluções estoque individuais dos compostos abamectina, benzoato de emamectina, ivermectina, eprinomectina e doramectina, a partir dos padrões sólidos, em uma concentração aproximada de 1000 mg L^{-1} . O preparo ocorreu através do cálculo de massa a ser medida e posterior diluição em solvente acetonitrila, levando em consideração a pureza de cada padrão.

Em seguida, das soluções estoques de 1000 mg L^{-1} preparou-se novas soluções individuais dos compostos com concentrações de 10 mg L^{-1} . Foi levado em consideração a concentração real de cada solução de 1000 mg L^{-1} para o cálculo de preparo das soluções, realizando posterior diluição em acetonitrila.

Para a realização das curvas analíticas em solvente e no extrato “branco” das matrizes preparava-se uma solução de mistura dos compostos, a partir das soluções individuais de 10 mg L^{-1} , de concentrações 0,1 mg L^{-1} (para os níveis 1,2 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 1 mg L^{-1} (para os níveis 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$). As curvas de concentrações finais 1, 2, 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ injetadas no sistema UHPLC-MS/MS correspondem as concentrações por kg na matriz de 4, 8, 20, 40 e 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

3.6 SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE AVERMECTINAS

A etapa após a escolha dos compostos foi a otimização do método. Fez-se o uso da biblioteca “*Quanpedia*” do UHPLC-MS/MS, onde constam os compostos com seus respectivos íons precursores e produtos, além de energias aplicadas no cone e colisão. Para verificação de intensidade do sinal e dos tempos de retenção dos compostos, foi injetada uma curva analítica. A mesma foi feita a partir da solução de

mistura, obtida a partir das soluções individuais de 10 mg L⁻¹ das avermectinas, com concentrações de 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 µg L⁻¹.

Assim, a fim de melhorar a ionização dos compostos analisados neste trabalho, utilizou-se dois aditivos na fase móvel, tanto aquosa quanto orgânica, sendo eles o ácido fórmico e o formiato de amônio.

Um total de seis métodos foram analisados. A fase aquosa (fase móvel A) manteve-se em todos os métodos, sendo a mesma 10 mmol L⁻¹ de formiato de amônio em água. Variou-se apenas a fase móvel orgânica, empregando metanol com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B) ou acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel C), além de utilizar diferentes colunas. A Tabela 8 a seguir, traz um resumo dos métodos otimizados.

Tabela 8 - Métodos testados para a análise de resíduos de avermectinas

	Coluna	F. M. Aquosa (A)	F. M. Orgânica
Método 1	BEH C18*	Sol. Aq. 10 mmol L ⁻¹ formiato de amônio	Metanol 0,1% ácido fórmico (B)
Método 2	BEH C18*	Sol. Aq. 10 mmol L ⁻¹ formiato de amônio	Acetonitrila 0,1% ácido fórmico (C)
Método 3	HSS T3**	Sol. Aq. 10 mmol L ⁻¹ formiato de amônio	Metanol 0,1% ácido fórmico (B)
Método 4	HSS T3**	Sol. Aq. 10 mmol L ⁻¹ formiato de amônio	Acetonitrila 0,1% ácido fórmico (C)
Método 5	Zorbax Eclipse Plus c18***	Sol. Aq. 10 mmol L ⁻¹ formiato de amônio	Metanol 0,1% ácido fórmico (B)
Método 6	Zorbax Eclipse Plus c18***	Sol. Aq. 10 mmol L ⁻¹ formiato de amônio	Acetonitrila 0,1% ácido fórmico (C)

*2,1 x 50 mm, 1,7 µm.

**2,1 x 100 mm, 1,8 µm.

***2,1 x 100 mm, 1,8 µm.

O espectrômetro de massa foi operado usando monitoramento de reação selecionado (SRM). A ionização por electrospray operou em modo positivo (ESI+). A transição com a maior intensidade foi selecionada para quantificação, e a transição com a segunda maior intensidade foi utilizada como identificação. As transições (íons

de quantificação e identificação - m/z), energias de colisão (eV), além do Log Kow e tempos de retenção dos compostos em estudo são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Log Kow, tempos de retenção, transições (íons de quantificação e identificação) e energias de colisão (eV) dos compostos em estudo

Compostos	t_R (min)	SRM transições, m/z (energia de colisão, eV)	
		Quantificação	Identificação
Benzoato de emamectina	2.23	886.6 > 158.0 (37)	886.6 > 126.0 (38)
Abamectina	2.83	890.6 > 567.4 (11)	890.6 > 305.2 (25)
Ivermectina	3.23	892.6 > 569.4 (14)	892.6 > 551.4 (25)
Eprinomectina	2.72	915.6 > 186.0 (35)	915.6 > 154.0 (20)
Doramectina	3.02	916.6 > 331.2 (23)	916.6 > 219.1 (25)

3.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS EM SOJA, FEIJÃO E MILHO

3.7.1 Testes QuEChERS original, acetato e citrato em soja, feijão e milho

O preparo de amostra é uma etapa muito importante para a obtenção de um extrato limpo e sem coextrativos para a análise de analitos de interesse.

Os testes iniciais consistiram na avaliação do método QuEChERS original, citrato e acetato (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; LEHOTAY *et al.*, 2005; ANASTASSIADES *et al.*, 2007), em suas proporções originais, empregando cada método separadamente para as matrizes soja, feijão e milho. Porém, na etapa de limpeza já foi introduzido o sorvente C18, juntamente com PSA e sulfato de magnésio para as três matrizes. A Tabela 11 esquematiza os três métodos avaliados.

Por se tratar de três matrizes com um baixo percentual de umidade, como pode ser visto na Tabela 10 com informações da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), fez-se necessário a realização de *slurry*. Utilizou-se uma proporção de 1:1 (matriz:água, m/v) para a soja baseado em trabalhos para matrizes com baixo percentual de umidade (MARCHIS *et al.*, 2012; KACZYNSKI, 2017; LIU *et al.*, 2017; SINGH, SRIVASTAVA e SINGH, 2018 e HERRMANN e POULSEN, 2015), 2:3 (m/v) para o milho e 1:2 (m/v) para o feijão baseados no método QuEChERS modificado e já validado pelo LARP (VIEIRA *et al.*, 2017).

Tabela 10 - Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível

	Umidade (%)	Proteína (g)	Lipídeos (g)	Carboidratos (g)	Fibra Alimentar (g)
Soja	5,8	23,2	0,8	62,0	16,9
Feijão preto	14,9	21,3	1,2	58,8	21,8
Milho	11,5	7,2	1,9	78,9	4,7

Fonte: TACO, 2011.

Com isso, para a soja, em um tubo de teflon, mediu-se a massa de amostra de 75 g e adicionou-se 75 mL de água ultrapura, após realizou-se a homogeneização em ultraturrax. Ao obter uma mistura homogênea, mediu-se 10 g de *slurry* em tubo de polipropileno de 50 mL para iniciar a etapa de extração. Procedeu-se da mesma maneira com as demais matrizes, onde empregou-se para o feijão 50 g de amostra e 100 mL de água ultrapura e para o milho utilizou-se 60 g de amostra e 90 mL de água ultrapura.

Esses testes preliminares tiveram por objetivo encontrar melhores condições de extração dos compostos em estudo.

Tabela 11 - Ensaio para avaliação e escolha do método QuEChERS mais eficiente para extração de avermectinas em soja, feijão e milho

Etapa	QuEChERS Original	QuEChERS Citrato	QuEChERS Acetato
Quantidade de amostra moída: <i>slurry</i>	Soja: 75 g/Feijão: 50 g/ Milho: 60 g	Soja: 75 g/Feijão: 50 g/ Milho: 60 g	Soja: 75 g/Feijão: 50 g/ Milho: 60 g
Hidratação: água ultrapura	Soja: 75 mL/Feijão: 100 mL/ Milho: 90 mL	Soja: 75 mL/Feijão: 100 mL/ Milho: 90 mL	Soja: 75 mL/Feijão: 100 mL/ Milho: 90 mL
Homogeneização	Ultraturrax: todas as matrizes	Ultraturrax: todas as matrizes	Ultraturrax: todas as matrizes
Quantidade amostra II	Soja, feijão e milho: 10 g	Soja, feijão e milho: 10 g	Soja, feijão e milho: 15 g
Extração	Soja, feijão e milho: 10 mL ACN	Soja, feijão e milho: 10 mL ACN	Soja, feijão e milho: 15 mL ACN 1% HAc
Homogeneização	Agitação 1 min (manual)	Agitação 1 min (manual)	Agitação 1 min (manual)
Partição	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 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	6 g MgSO ₄ + 1,5 g CH ₃ COONa
Separação I	Agitação 1 min (manual) + Centrifugação 3600 rpm/8 min	Agitação 1 min (manual) + Centrifugação 3600 rpm/8 min	Agitação 1 min (manual) + Centrifugação 3600 rpm/8 min
Limpeza	2 mL extrato + 300 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 250 mg C18	2 mL extrato + 300 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 250 mg C18	2 mL extrato + 300 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 250 mg C18
Separação II	Agitação 1 min (vórtex) + Centrifugação 3400 rpm/8 min	Agitação 1 min (vórtex) + Centrifugação 3400 rpm/8 min	Agitação 1 min (vórtex) + Centrifugação 3400 rpm/8 min
Filtração	Filtração PTFE 0,22 µm	Filtração PTFE 0,22 µm	Filtração PTFE 0,22 µm
Diluição	1:1 em fase móvel	1:1 em fase móvel	1:1 em fase móvel

Os ensaios de recuperação foram avaliados com a fortificação da matriz branco no nível de concentração final de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ em triplicata ($n=3$), para cada matriz (soja, feijão e milho) em cada método (original, citrato e acetato), totalizando 27 fortificações. Curvas analíticas no extrato “branco” da matriz foram feitas para cada método, com concentrações de 1, 2, 5, 10 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$, além de realizar um ponto no solvente de concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Ao final das extrações, os extratos foram diluídos duas vezes em fase móvel para posterior injeção. Cabe salientar que todos os ensaios de recuperação foram avaliados empregando essas condições, exceto a etapa de limpeza.

A partir do tratamento dos dados de cada método testado, o método QuEChERS citrato foi escolhido, a partir das recuperações e desvio padrão, para ser otimizado para a extração dos analitos de interesse em soja, feijão e milho.

3.7.2 Otimização do método QuEChERS citrato: solvente de extração, *slurry*, sais de partição e quantidade de amostra

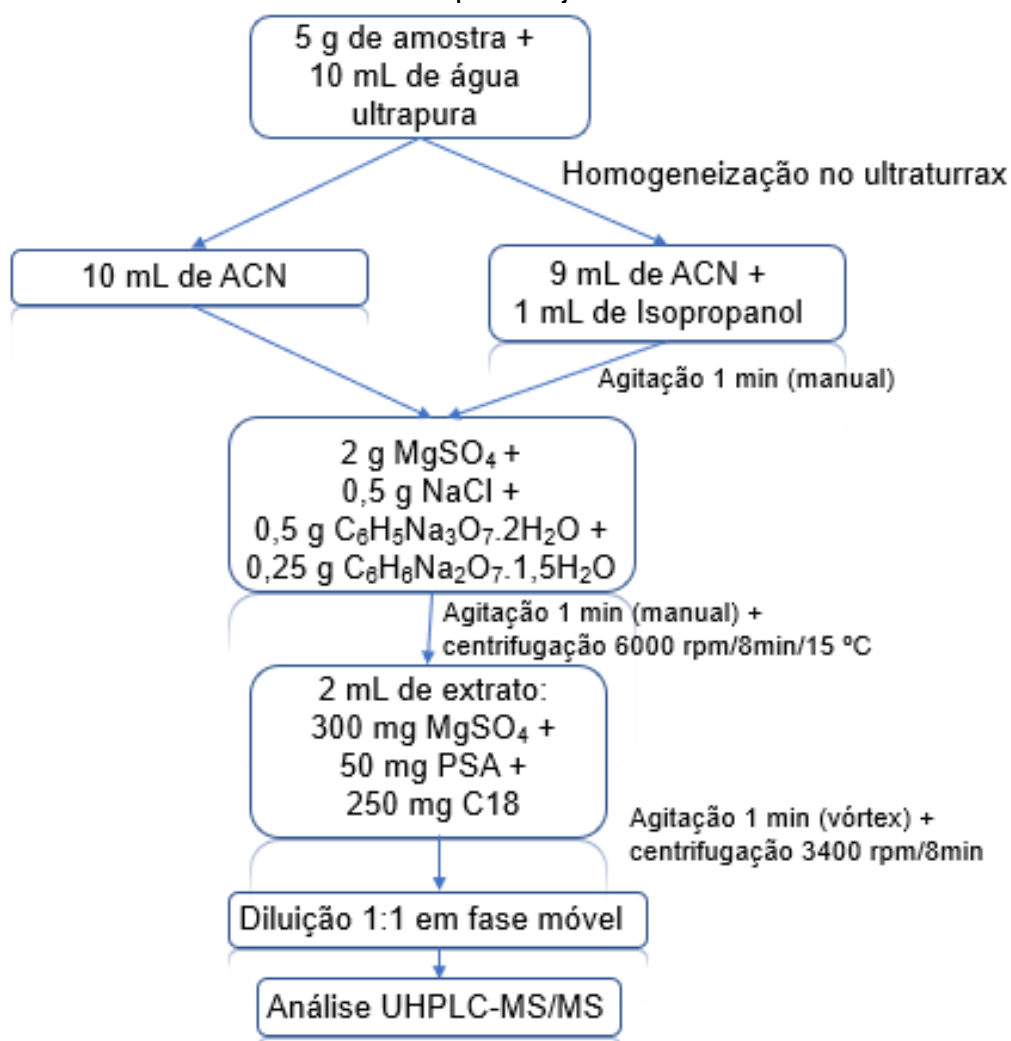
Os primeiros testes de otimização do método QuEChERS citrato, consistiram na modificação do solvente extrator, com o objetivo de obter melhores recuperações e menor desvio padrão para os analitos de interesse, além de uma maior intensidade de sinal.

Inicialmente os testes foram realizados apenas em soja, empregando 10 mL de acetonitrila e uma mistura (9:1, v/v) de acetonitrila e isopropanol, como apresentado na Figura 6, onde esquematiza o procedimento.

A diminuição na massa de amostra também foi avaliada, empregando uma quantidade significativa de 5 g de soja. Com isso, as massas medidas dos sais de partição diminuíram proporcionalmente em relação a massa de amostra, empregando 2 g MgSO_4 , 0,5 g NaCl, 0,5 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,25 g $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$.

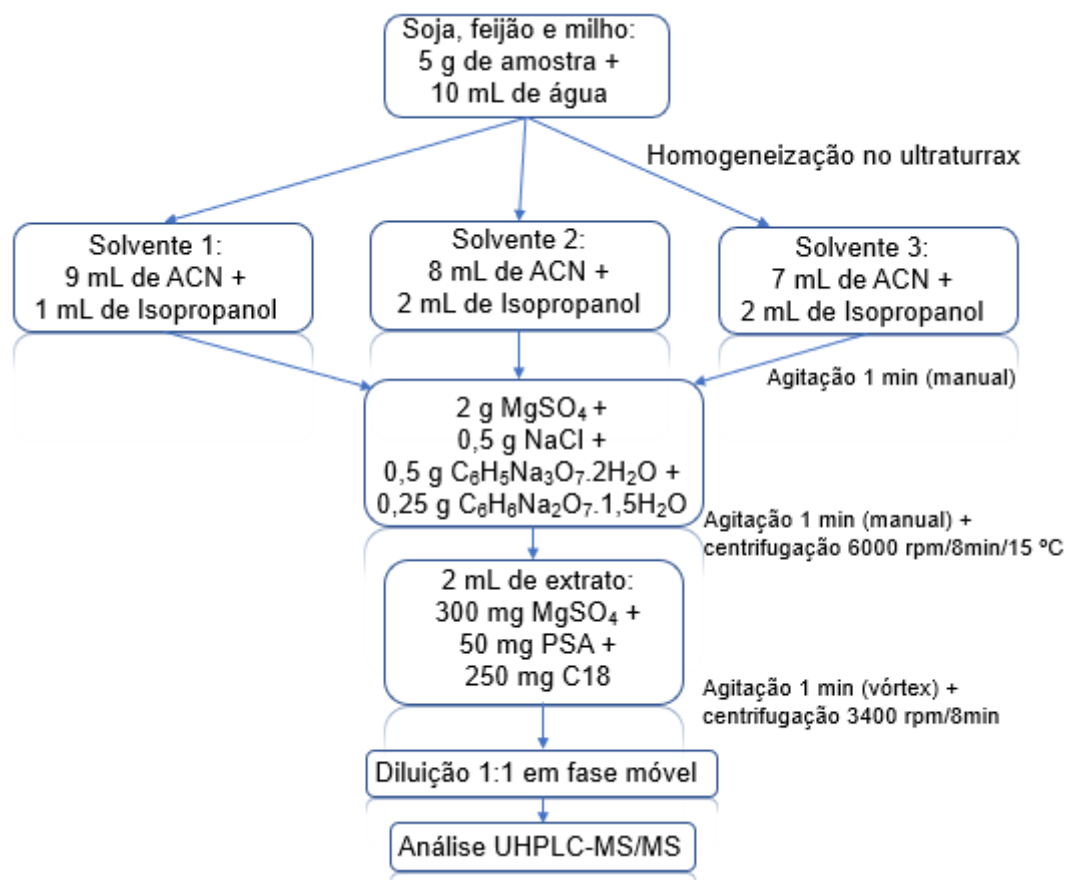
Uma melhoria no *slurry* para a soja também foi realizada, ficando com uma proporção matriz:água de 1:2 (m/v), logo utilizou-se 5 g de amostra e 10 mL de acetonitrila:isopropanol (9:1, v/v). Essa proporção de *slurry*, a massa de amostra e de sais de partição posteriormente também foram empregadas para o milho e o feijão.

Figura 6 - Fluxograma do procedimento de extração para avaliação do solvente de extração no método QuEChERS citrato para soja



A partir da modificação no solvente do método QuEChERS citrato, novas proporções de acetonitrila e isopropanol foram avaliadas, com o objetivo de verificar se haveria um aumento significativo nas recuperações dos compostos. Essas proporções consistiram em: 10 mL acetonitrila:isopropanol (9:1, v/v), 10 mL acetonitrila:isopropanol (8:2, v/v) e 10 mL acetonitrila:isopropanol (7:3, v/v). As mesmas foram denominadas de solvente 1, solvente 2 e solvente 3, respectivamente, para facilitar o entendimento. A Figura 7 demonstra os testes realizados. A avaliação foi feita nas três matrizes em estudo.

Figura 7 - Fluxograma do procedimento de extração avaliando a eficiência, em soja, feijão e milho, de diferentes proporções do solvente extrator escolhido

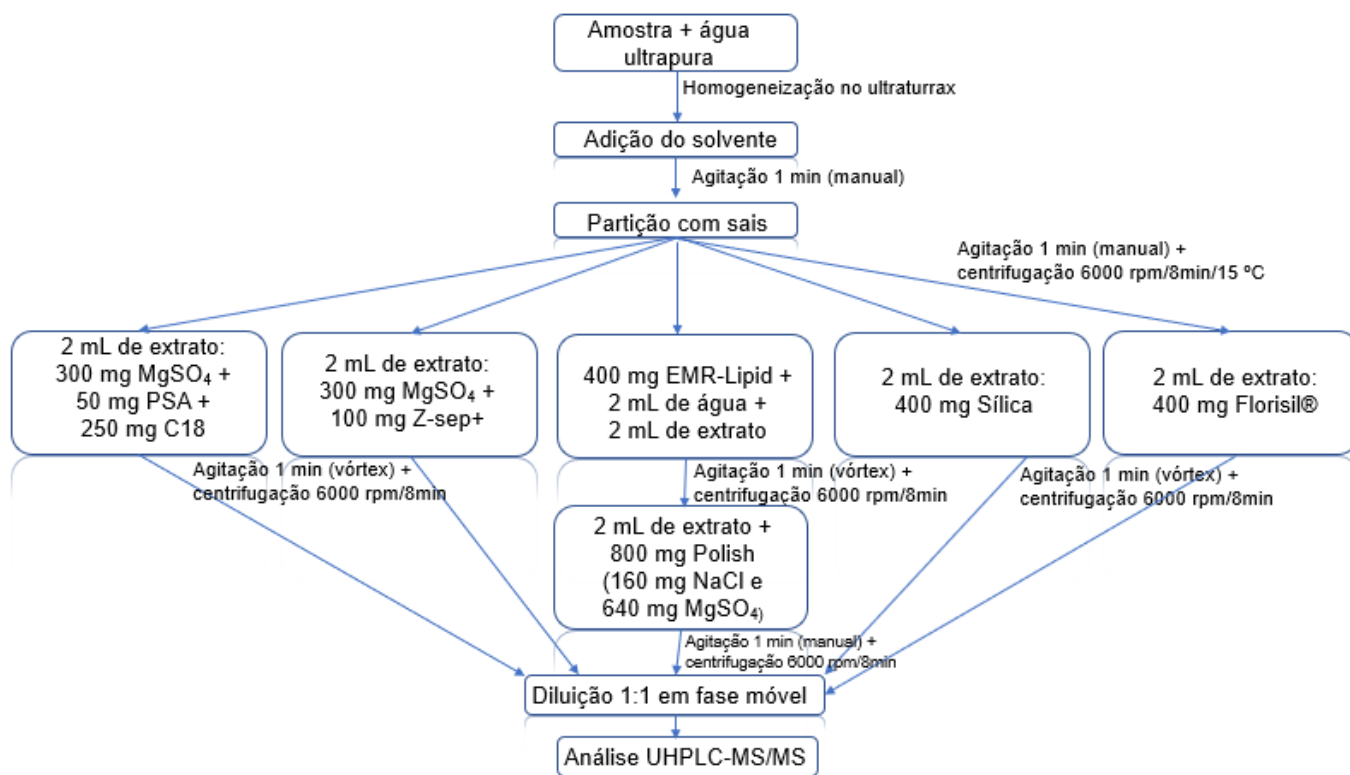


As quantidades de amostra para soja, feijão e milho utilizadas para cada preparo de amostra foram 5 g, o *slurry* para ambas manteve na proporção amostra:água 1:2 (m/v) e as massas medidas dos sais permaneceram proporcionais a massa de amostra.

3.7.3 Avaliação da etapa de limpeza do método QuEChERS citrato modificado em soja, feijão e milho

Foram realizados cinco testes na etapa de limpeza com diferentes sorventes para as três matrizes em estudo, sendo eles: C18 + PSA, EMR-Lipid ativado, Z-Sep⁺, Sílica e Florisil®. A figura das limpezas utilizadas está na Figura 8 a seguir. Lembrando que, a quantidade de amostra empregada foi 5 g para o preparo de amostra de cada matriz, as proporções amostra:água de *slurry* para soja, feijão e milho foram 1:2 (m/v) e o solvente empregado para ambas foi 10 mL acetonitrila:isopropanol (9:1, v/v).

Figura 8 - Fluxograma do procedimento de extração para avaliação da etapa de limpeza do método QuEChERS citrato modificado para soja, feijão e milho



Os ensaios de recuperação também foram realizados em triplicata, onde os “brancos” das matrizes (soja, feijão e milho) foram fortificados para obter uma concentração final de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para o cálculo da recuperação foi utilizado apenas um ponto na curva do extrato “branco” de cada matriz, de concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Ao final, testes em soja com o sorvente EMR-Lipid não ativado também foram realizados, a fim de avaliar se haveria a necessidade da etapa de ativação.

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA SOJA, FEIJÃO E MILHO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AVERMECTINAS

O método QuEChERS citrato modificado foi validado para as matrizes soja, feijão e milho. Ressalta-se que o procedimento de extração e limpeza para as três matrizes são iguais, porém a validação foi realizada para cada uma separadamente.

Para a avaliação do método analítico proposto foram empregados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito matriz, curva analítica e faixa de trabalho, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão.

3.8.1 Seletividade

A seletividade do método foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos, no sistema UHPLC-MS/MS, por injeções dos extratos de amostras “branco” e amostras “branco” fortificadas de cada matriz. Esta avaliação objetivou verificar a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos em estudo.

Os solventes e reagentes também foram avaliados, através do procedimento de extração com branco reagente, onde empregou-se água ultrapura no lugar das amostras de soja, feijão e milho.

3.8.2 Curva de calibração e faixa de trabalho

Foram realizadas curvas de calibração em solvente, no extrato “branco” de cada matriz e em cada matriz “branco” com concentrações de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Essa etapa teve como objetivo a verificação da faixa de trabalho e o comportamento da resposta analítica de cada analito, além de, avaliar a linearidade através do coeficiente de determinação (r^2).

3.8.3 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas e dos ensaios de fortificação, determinou-se os valores de LOD e LOQ do instrumento (expresso em $\mu\text{g L}^{-1}$) e do método ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para cada matriz. Levou-se em consideração também, a relação sinal ruído calculada pelo software do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base, respectivamente.

Considerou-se LOQ do método (LOQ_m) a menor concentração, fortificada na matriz, que apresentasse recuperações entre 70-120%, com RSD menor ou igual a 20%. Já o LOD do método (LOD_m) foi calculado dividindo o LOQ_m por 3,33.

3.8.4 Exatidão e precisão

A exatidão do método foi avaliada através dos ensaios de recuperação, fortificando amostras “branco” de cada matriz nos níveis de concentração 1,0; 2,0; 5,0, 10,0 e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em replicatas (n=5). A precisão do método, em termos de repetibilidade, foi avaliada através do desvio padrão para as 5 replicatas de soja, de feijão e de milho, injetadas em uma única vez. Já a precisão intermediária do método foi avaliada realizando o mesmo procedimento analítico em dia diferente.

3.8.5 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado para as três matrizes em estudo comparando as áreas obtidas das curvas analíticas em solvente e em extrato “branco” da matriz, como é mostrado na Equação 1.

$$Efeito_Matriz = \frac{((X1 - X2) \times 100\%)}{X2} \quad (1)$$

Onde:

X_1 = média das inclinações da curva preparada no extrato da matriz

X_2 = média das inclinações da curva preparada em solvente

Deste modo, foi possível verificar se as matrizes exerceram efeito positivo, ou seja, aumento de sinal sobre o resultado da análise ou efeito negativo, com supressão do sinal.

3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de resíduos das avermectinas em estudo em 18 amostras de soja, 12 amostras de feijão e 5 amostras de milho. As amostras das três matrizes foram obtidas no comércio de Santa Maria - RS, sendo eles, agropecuárias e supermercados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE AVERMECTINAS EM SOJA, FEIJÃO E MILHO

A fase móvel do sistema UHPLC-MS/MS foi otimizada constituindo-se de dois solventes operando em modo gradiente, com vazão de 0,225 mL min⁻¹, volume de injeção de 10 µL e tempo total de análise de 5 minutos. A Tabela 12 representa o gradiente utilizado, onde o solvente A consiste em uma solução aquosa 10 mmol L⁻¹ de formiato de amônio, B é metanol com 0,1% ácido fórmico.

Tabela 12 - Gradiente de fase móvel utilizado para determinação de avermectinas em soja, milho e feijão no sistema UHPLC-MS/MS para o método proposto

Tempo	A (%)	B (%)
0	50	50
1	20	80
3	0	100
3,5	0	100
3,51	50	50
5	50	50

A composição da fase móvel influencia significativamente o sinal analítico e a adequada separação dos analitos (KEMMERICH *et al.*, 2015). A otimização da mesma levou em consideração as condições utilizadas frequentemente no LARP e o que se apresenta na literatura para análise de avermectinas. Para isso, três solventes foram testados, sendo eles: solução aquosa 10 mmol L⁻¹ de formiato de amônio (denominado de solvente A), metanol com 0,1% ácido fórmico (denominado de solvente B) e acetonitrila com 0,1% ácido fórmico (denominado de solvente C).

Autores como Du *et al.* (2013) e López-Blanco *et al.* (2016) utilizaram a LC para análise de abamectina e outras classes de pesticidas, sendo que, ambos empregaram colunas C18. A fase móvel aquosa utilizada por Du *et al.* (2013) consistiu em água com adição de 0,2% ácido metanoico e metanol como fase orgânica em uma vazão de 0,3 mL min⁻¹. López-Blanco *et al.* (2016) empregaram água como fase aquosa e acetonitrila como fase orgânica, ambos com adição de 0,1% de formiato de amônio.

Liu *et al.* (2017) propuseram um método empregando uma coluna C18. A fase móvel aquosa utilizada foi água com 5 mmol L⁻¹ de formiato de amônio e empregou-se metanol como fase orgânica utilizando também formiato de amônio como aditivo.

Pirsaheb *et al.* (2017) propuseram um método para análise de abamectina. A coluna utilizada foi C18. Água e metanol foram utilizadas como fase móvel aquosa e orgânica, respectivamente, em uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

A coluna cromatográfica Acquity UPLC™ BEH C18 ($50 \times 2,1 \text{ mm}$, $1,7 \mu\text{m}$) forneceu alta resolução e boa forma de pico para os compostos em estudo. Esta coluna já foi relatada para a separação de avermectinas por LC-MS/MS (ZHANG *et al.*, 2017). Ainda assim, a coluna cromatográfica escolhida é a mesma utilizada em análises de rotina no LARP.

A curva preparada em solvente com concentrações de 0,5; 1; 2; 5; 10 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$ verificou a intensidade de sinal e dos tempos de retenção de cada composto. Com isso, obteve-se que a concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ não gerava sinal para os cinco compostos, além de razão sinal ruído menor que 10.

O uso de aditivos na fase móvel permite melhora na separação cromatográfica, além de favorecer o processo de ionização dos compostos. A utilização de ácido fórmico em modo positivo forma íons $[M + H]^+$ e com o formiato de amônio ocorre a formação de adutos de amônio $[M + \text{NH}_4]^+$, reduzindo a formação de adutos de sódio provenientes de vidrarias e impurezas de solventes (MOSCOU *et al.*, 2019; CASS e CASSIANO, 2015).

O método 1, que consistiu na utilização das soluções A e B conforme descrito na Tabela 8, foi escolhido por apresentar maior intensidade de sinal (detectabilidade) para os compostos, além de apresentar razão sinal/ruído (s/n) maior que 10 e baixa variação nos tempos de retenção (de 2,40 a 2,43 min), quando comparado com os demais métodos.

O método 2 apresentou maiores variações no tempo de retenção, além de menor intensidade de sinal para os compostos abamectina e emamectina. Nesse método o valor de LOQ obtido para ABA e EMA foi de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Fato este, que afeta, principalmente, a análise de abamectina em feijão e milho, que possuem LMRs de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esses compostos possuem grande interesse neste trabalho, pelo fato de serem empregados como agrotóxicos e são permitidos para uso nas matrizes em questão com LMRs bem estabelecidos pela ANVISA. O mesmo fato se repete com o método 3, 4 e 5, onde não foi possível gerar resposta para ABA e EMA nas concentrações de 1 e $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

O método 6 também obteve boa intensidade de sinal, principalmente para ABA e EMA, na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ porém, foi menor que o obtido no método 1.

Com os seis métodos testados, pode-se concluir que as avermectinas, principalmente ABA, EPRI, DORA e IVER, possuem baixa detectabilidade. A emamectina foi o único composto que gerou uma resposta mais acentuada, em comparação aos demais, empregando as três colunas e fases móveis variadas.

4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QuEChERS CITRATO OTIMIZADO

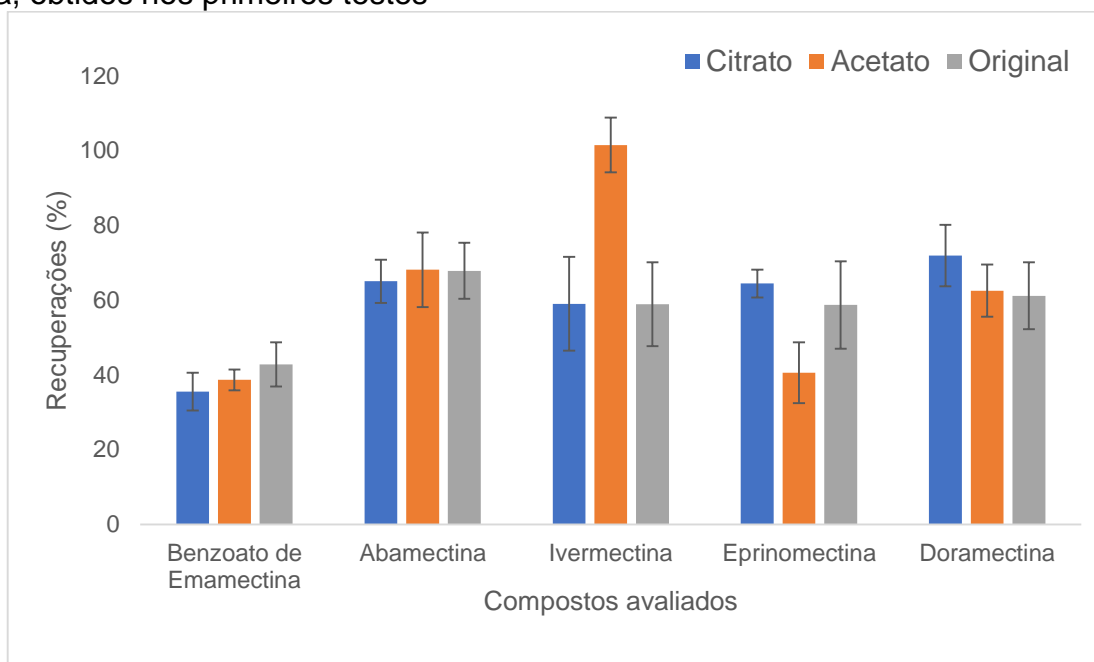
4.2.1 Testes iniciais do método QuEChERS original, citrato e acetato em soja, feijão e milho

O método de preparo de amostras proposto neste trabalho foi desenvolvido com base na literatura para a determinação de avermectinas em amostras com alto teor de gordura (LÓPEZ-BLANCO *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2016; DU *et al.*, 2013 e WANG *et al.*, 2013).

Além disso, a proporção de *slurry* para soja foi baseado em métodos QuEChERS modificado, para matrizes com baixo percentual de umidade, que constam na literatura (MARCHIS *et al.*, 2012; KACZYNSKI, 2017; LIU *et al.*, 2017; SINGH, SRIVASTAVA e SINGH, 2018 e HERRMANN E POULSEN, 2015). A proporção inicial empregada para feijão e milho foi retirada do método QuEChERS modificado e já validado pelo LARP (VIEIRA *et al.*, 2017). As massas de amostra e sais de partição a serem medidas para o método QuEChERS original, citrato e acetato foram mantidas conforme Anastassiades *et al.* (2003), Lehotay *et al.* (2005) e Anastassiades *et al.*, (2007).

Os testes iniciais para a escolha do método de extração com melhor desempenho levaram em consideração, principalmente, o desvio padrão além da recuperação. A Figura 9 a seguir, mostra os resultados obtidos na extração da soja para os três métodos QuEChERS.

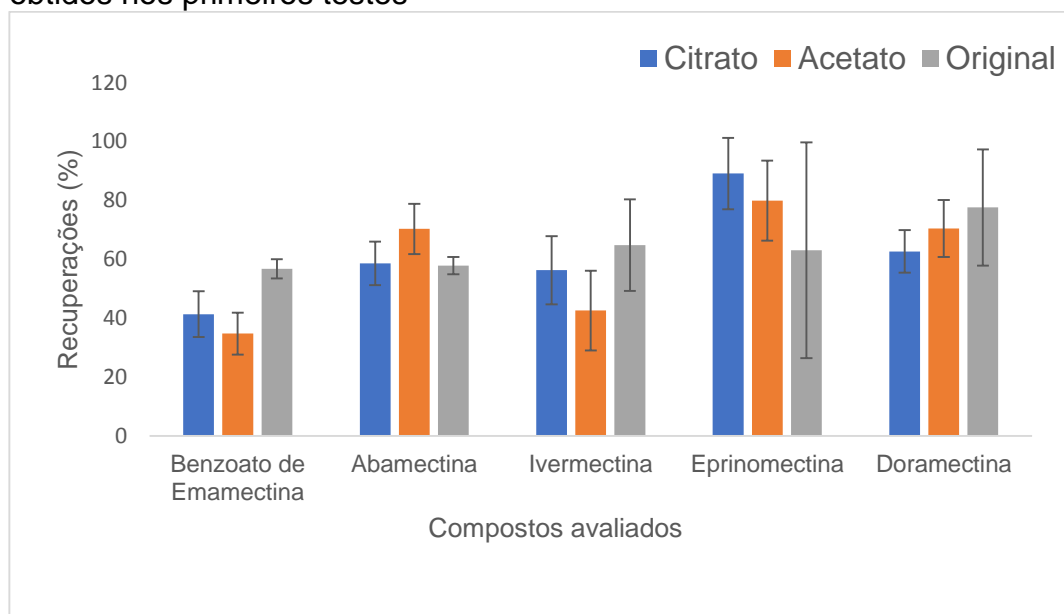
Figura 9 - Percentual de recuperação e desvio padrão para as avermectinas em soja, obtidos nos primeiros testes



Os compostos emamectina, abamectina e doramectina resultaram em valores semelhantes de recuperação e RSD para os três métodos QuEChERS. Logo, para a escolha do melhor método foi levado em consideração os resultados de eprinomectina e ivermectina. O método QuEChERS original foi descartado por apresentar os maiores valores de desvio padrão para esses compostos. Em seguida, aplicou-se o Teste F e Teste T para eprinomectina e ivermectina com o objetivo de avaliar se haveria alguma diferença significativa para os métodos citrato e acetato. Concluiu-se que, em um nível de confiança de 95% havia diferença significativa, em relação as médias de recuperação dos compostos avaliados. Porém, aplicando novamente os testes estatísticos, para os dois compostos nos seus métodos com menores recuperações (para eprinomectina no método acetato e para a ivermectina no método citrato) obteve-se que, em um nível de confiança de 95% não havia diferença significativa entre eles. Com isso, os métodos com menores recuperações para a eprinomectina e ivermectina foram levados em consideração para a escolha do melhor método QuEChERS para a soja. Logo, o método citrato foi escolhido, pois o resultado ruim do composto ivermectina para o método citrato é maior, em termos de recuperação, quando comparado com o resultado ruim do composto eprinomectina para o método acetato. Podendo assim, reverter mais facilmente com a otimização do método os valores insatisfatórios de recuperação.

Para os ensaios com feijão, os três métodos QuEChERS apresentaram desvio padrão relativamente altos, como mostrado na Figura 10, com um desvio maior de 20% para o composto eprinomectina no QuEChERS original. Levando esse fato em consideração, o mesmo já foi descartado.

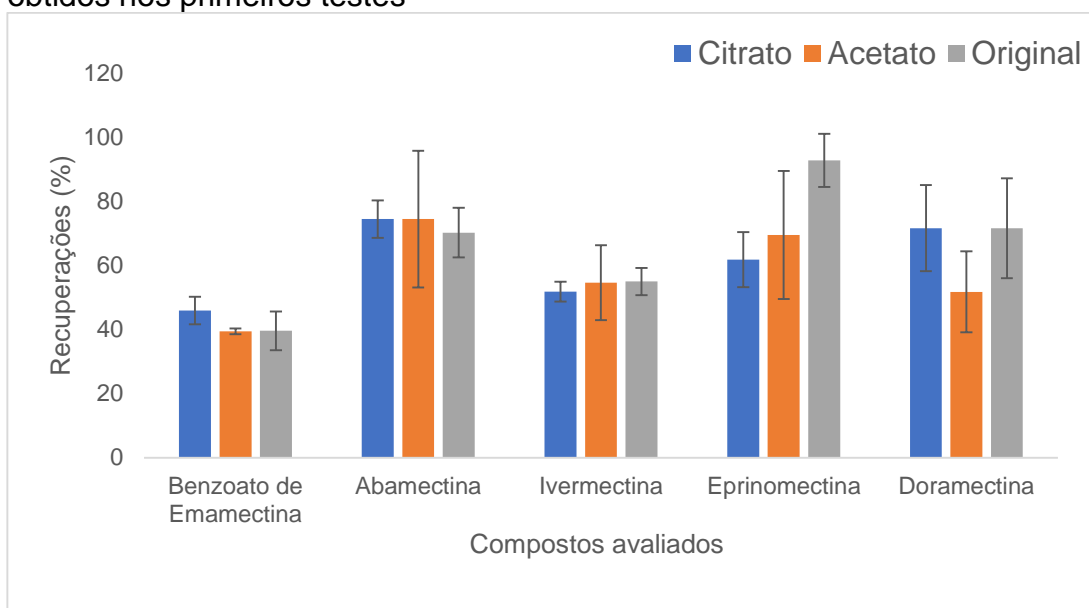
Figura 10 - Percentual de recuperação e desvio padrão para as avermectinas em feijão, obtidos nos primeiros testes



O composto eprinomectina obteve melhores valores com o método citrato, o mesmo ocorre com a ivermectina e a emamectina. Já para a doramectina e abamectina o método mais eficiente é o acetato. Porém, para os cinco compostos os valores dos métodos citrato e acetato não são regulares, havendo a necessidade de aplicar o Teste F e Teste T. Como conclusão, ao empregar os testes estatísticos não há diferença significativa entre os dois métodos para os cinco compostos. Com isso, a escolha do método se dá a partir do desvio padrão, obtendo que o método QuEChERS citrato possui menores valores de desvio. Logo, considera-se que o mesmo possui uma maior eficiência para extração dos compostos em feijão.

Para os ensaios em milho, o método acetato foi descartado, devido a presença de desvio padrão maior que 20% para o composto abamectina (Figura 11).

Figura 11 - Percentual de recuperação e desvio padrão para as avermectinas em milho, obtidos nos primeiros testes



Avaliando os métodos para os compostos, concluiu-se que para emamectina, abamectina e doramectina o QuEChERS citrato é mais eficiente, resultando em maiores recuperações. E para os compostos ivermectina e eprinomectina o QuEChERS original resultou em recuperações mais satisfatórias.

Para a escolha do método mais eficiente novamente foi levado em consideração o desvio padrão dos compostos. E, como nas duas matrizes anteriores, chega-se a conclusão de que o método citrato é o melhor a ser empregado para a extração dos analitos de interesse em milho.

4.2.2 Otimização da quantidade de amostra e sais de partição, proporção de *slurry* e solvente extrator

A partir da escolha do método QuEChERS citrato otimizou-se o solvente extrator, a quantidade de amostra, sais de partição e a proporção de *slurry*, para obtenção de melhores resultados de recuperação.

As avermectinas têm como característica a baixa detectabilidade e o emprego apenas da acetonitrila como solvente extrator não estava sendo eficiente, pois a quantificação dos compostos, como abamectina, nos níveis de concentração 1 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ não era possível. O que geraria um problema na análise em amostras reais, devido ao valor de LMRs estabelecidos para as matrizes em questão.

A partir disso, novas estratégias foram tomadas, em relação ao solvente de extração, para obter uma melhor detectabilidade dessa classe de compostos. Introduziu-se o álcool isopropílico (isopropanol) aos testes seguintes para verificar a eficiência de extração.

Inicialmente esses testes foram realizados apenas com a soja. Reduziu-se a quantidade de amostra empregada na extração para 5 g, visando utilizar uma menor quantidade de amostra e reagentes e sendo esse valor considerado uma quantidade significativa. O *slurry* da soja foi modificado devido ao fato de que, a proporção inicial 1:1 (m/v) não foi suficiente para obter uma amostra com quantidade de água aceitável para uma boa extração. E ao adicionar 10 mL de solvente, o mesmo era absorvido pela amostra.

Em relação aos sais de partição, inicialmente manteve-se os valores originais do QuEChERS citrato às 5 g de amostra, porém, com essa quantidade não se obtia extrato após a partição. Devido a isso, os valores dos sais de partição diminuíram de acordo com a proporção de amostra (2 g MgSO₄; 0,5 g NaCl; 0,5 g C₆H₅Na₃O₇.2H₂O e 0,25 g C₆H₆Na₂O₇.1,5H₂O), conseguindo então, obter uma boa quantidade de extrato para realizar a etapa de limpeza. Com 5 g de amostra, proporção de *slurry* 1:2 (m/v) e redução das quantidades dos sais de partição, os brancos e brancos fortificados foram extraídos com acetonitrila (teste 1) e com uma mistura de acetonitrila e isopropanol (9:1 v/v) (teste 2).

O isopropanol foi empregado juntamente com a acetonitrila, por também ser um solvente de extração, além de, ser comumente utilizado na cromatografia líquida de fase reversa como fase móvel. Filho (2010) em seu trabalho emprega o isopropanol na extração de agrotóxicos em manga, em uma mistura com água (8:2, v/v), mostrando que esta composição obteve resultados satisfatórios para a maior parte dos analitos de interesse, em relação aos outros solventes testados.

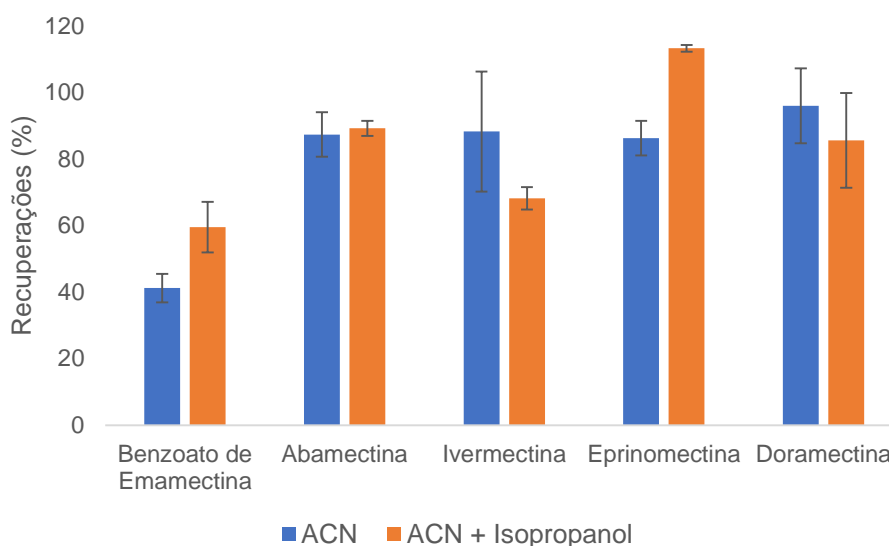
Além disso, Seth *et al.* (2007) considera o isopropanol um solvente de extração eficiente e vantajoso para grãos de soja e outras sementes oleaginosas como uma alternativa atraente aos solventes comumente empregados.

Em relação aos tempos de retenção dos níveis de concentração da curva analítica no extrato “branco” das matrizes e dos brancos fortificados, os mesmos apresentaram variações consideráveis na extração que empregou apenas a acetonitrila como solvente extrator. Para a extração empregando acetonitrila e isopropanol, os tempos de retenção permaneceram constantes.

Ao que se refere a recuperação dos compostos, houve um aumento para ambos os testes, obtendo recuperações acima de 70% para a maioria (ABA, EPRI e DORA). Porém, a emamectina permanece com recuperações abaixo do aceitável.

Levando em consideração a emamectina e sua recuperação, visto que desde os testes iniciais é o analito com menor valor de recuperação, concluiu-se que o método que utiliza a acetonitrila e isopropanol possui maior eficiência. Como mostrado na Figura 12, a EMA obteve recuperação de 60% para a mistura dos dois solventes, já para o teste empregando apenas acetonitrila a recuperação foi de 41%

Figura 12 - Comparação dos ensaios do método QuEChERS citrato modificado empregando diferentes solventes extratores em soja



Em seguida, os testes com os solventes 1 (ACN + isopropanol 9:1), 2 (ACN + isopropanol 8:2) e 3 (ACN + isopropanol 7:3) para soja, feijão e milho foram realizados com o objetivo de avaliar se haveria um aumento significativo nas recuperações dos compostos a medida que aumentasse o volume de isopropanol.

Como resultado, não houve uma variação considerável nas recuperações dos cinco compostos, para as três matrizes, ao empregar diferentes proporções dos solventes de extração. Devido a isso, o parâmetro avaliado para a escolha do solvente, a ser empregado para o método de soja, feijão e milho, foi a intensidade de sinal gerada pelos analitos em cada proporção.

A emamectina é o composto que, ao ser feita a extração com ACN:isopropanol nas três proporções pelo método QuEChERS citrato, obteve as melhores respostas para as três matrizes. Porém, os demais compostos geram sinal extremamente inferior.

Ao realizar os testes de proporções dos solventes de extração para soja, feijão e milho foi observado que os analitos que apresentaram a menor intensidade de sinal para ambos solventes foram a eprinomectina e em seguida, a abamectina. Além disso, notou-se que com o aumento do volume de isopropanol ocorria a diminuição da resposta desses analitos, logo, o solvente 1 obteve as melhores intensidades de sinal para os compostos citados. As Figuras 13, 14 e 15 demonstram a comparação das curvas analíticas dos três solventes para o composto abamectina em soja, feijão e milho, respectivamente.

Figura 13 - Curvas analíticas para abamectina ao realizar a extração com os três solventes em soja

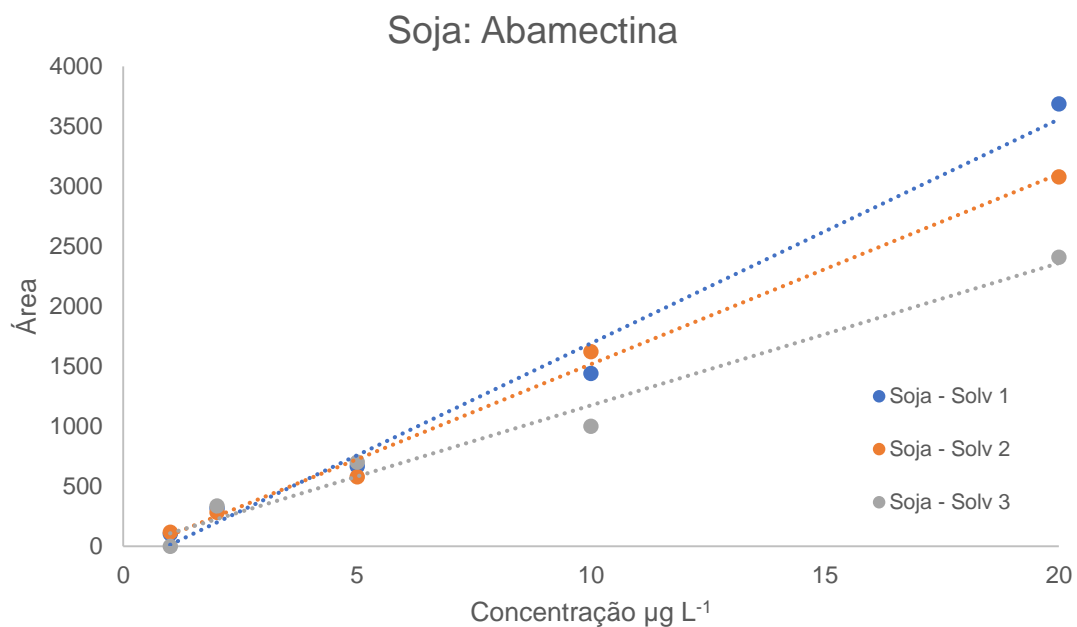


Figura 14 - Curvas analíticas para abamectina ao realizar a extração com os três solventes em feijão

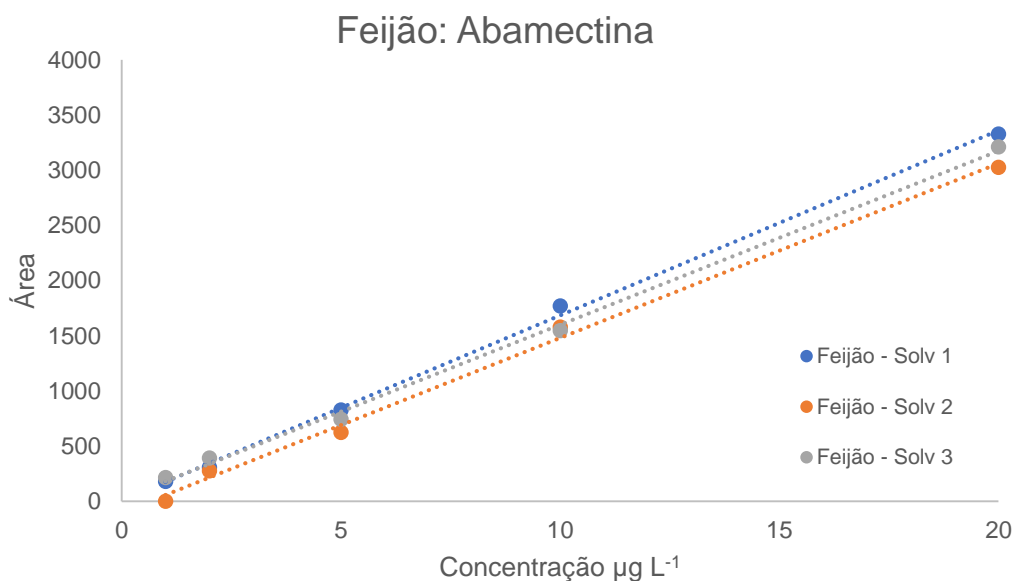
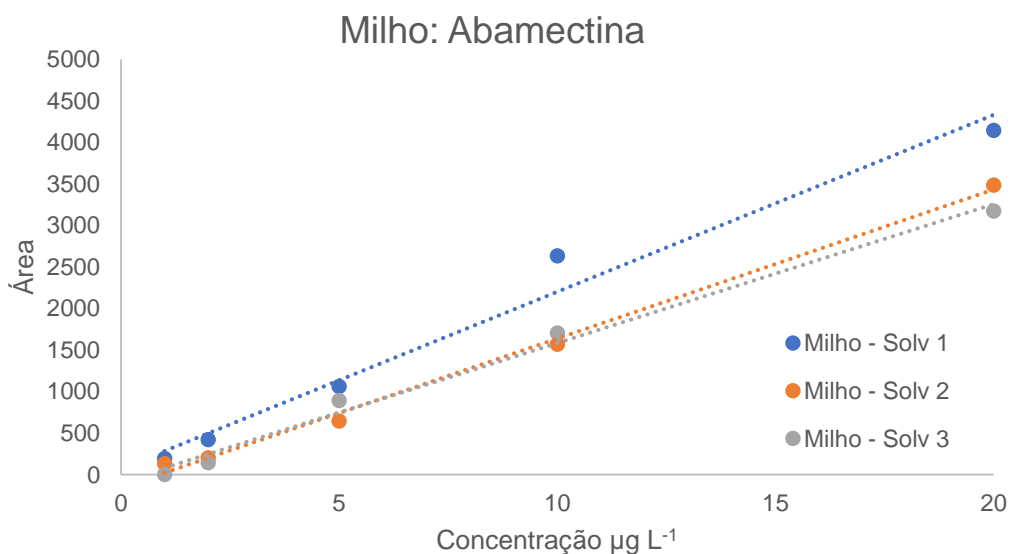


Figura 15 - Curvas analíticas para abamectina ao realizar a extração com os três solventes em milho



Pode-se observar que a inclinação da curva analítica em soja para o solvente 1 é bem mais acentuada para a eprinomectina em relação aos solventes 2 e 3, como mostrado na Figura 16. Para a abamectina a diferença na inclinação das curvas é menor.

Para o feijão o mesmo fato se repete com a ABA, possui uma intensidade de sinal baixa e com o aumento da proporção de isopropanol ocorre a diminuição da

resposta, como pode ser visto na Figura 14. Contudo, a diferença na inclinação das curvas no extrato “branco” da matriz entre os solventes testados é menor, quando comparada com a inclinação da curva analítica da abamectina em soja.

Figura 16 - Curvas analíticas para eprinomectina ao realizar a extração com os três solventes em soja

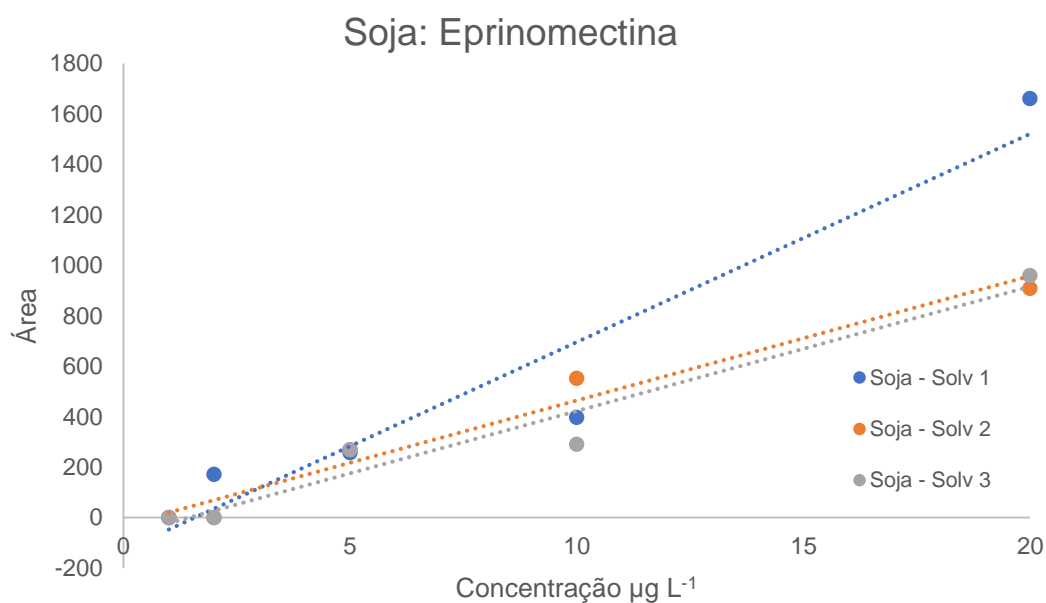


Figura 17 - Curvas analíticas para eprinomectina ao realizar a extração com os três solventes em feijão

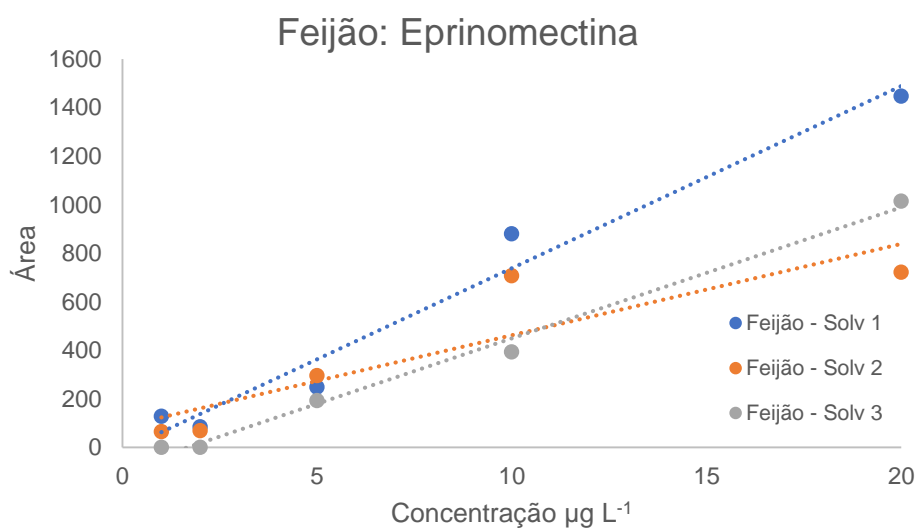
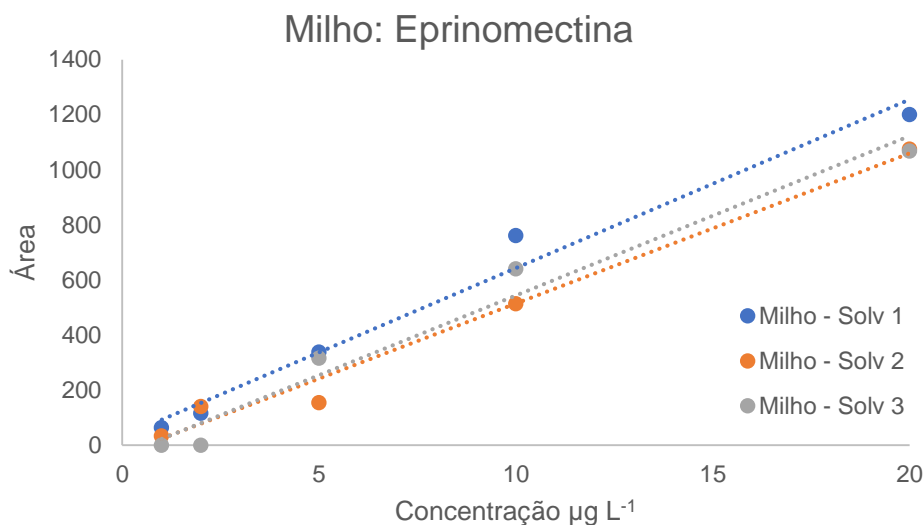


Figura 18 - Curvas analíticas para eprinomectina ao realizar a extração com os três solventes em milho



A eprinomectina continua possuindo a menor resposta entre os compostos para o feijão. Além disso, as curvas analíticas obtidas mantêm uma inclinação semelhante às curvas de soja para o mesmo composto, obtendo maior sinal com a utilização do solvente 1. A Figura 17 representa a curva analítica para a eprinomectina.

Em relação ao milho, os comportamentos de ABA e EPRI com os solventes testados são semelhantes aos em soja e feijão, onde o solvente 1 gera a maior intensidade de sinal para esses compostos. Além disso, ao realizar a extração com os três solventes, a eprinomectina continua obtendo o menor sinal entre as cinco avermectinas e após a abamectina. Porém, a diferença na inclinação das curvas para os três solventes é menor para eprinomectina, o que difere nas curvas no extrato “branco” em soja e feijão. Observa-se esse fato na Figura 15 para a abamectina e na Figura 18 para eprinomectina.

Levando em consideração as conclusões obtidas sobre a resposta gerada pelos três solventes para cada analito, a partir da avaliação das curvas analíticas no extrato “branco” das matrizes, o solvente 1 foi escolhido para o método modificado de QuEChERS citrato para soja, feijão e milho.

4.2.3 Otimização dos sorventes da etapa de limpeza

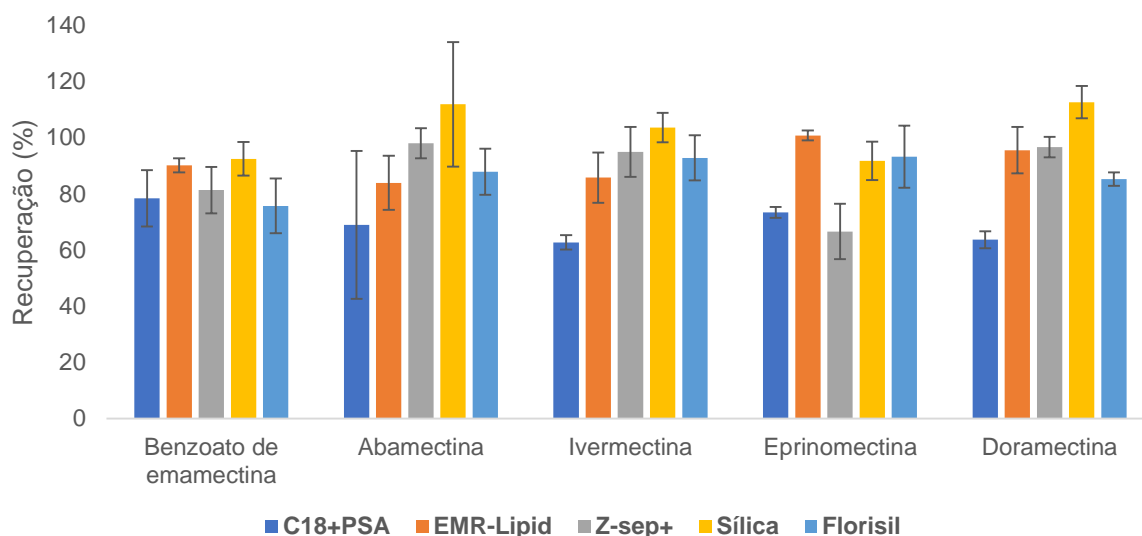
Na etapa de limpeza optou-se por realizar testes empregando apenas a d-SPE, excluindo as opções de limpeza com SPE, com a finalidade de manter o método QuEChERS rápido.

Os sorventes Z-Sep⁺ e EMR-Lipid e suas quantidades foram retirados do trabalho de Facco (2017), onde os mesmos foram empregados nos testes de limpeza para determinação multirresíduo de agrotóxicos em milho. As proporções de água e extrato para o EMR-Lipid e as quantidades de MgSO₄ e NaCl para o Polish foram retirados do protocolo Agilent (ZHAO e LUCAS, 2015) de análise multirresíduo de pesticidas em abacate. As quantidades de Sílica e Florisil foram 400 mg para ambas, a fim de manter quantidades equivalentes entre os cinco sorventes.

Em relação ao sorvente EMR-Lipid empregado, o mesmo foi ativado com 2 mL de água, para posteriormente ser adicionado 2 mL de extrato ao tubo. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto e centrifugados a 6000 rpm por 8 minutos. Dos tubos centrifugados retirou-se 2 mL de sobrenadante para passar ao tubo de Polish. O Polish consiste em mais uma etapa de partição, onde é empregado MgSO₄ e NaCl na proporção 4:1 (m/m), respectivamente.

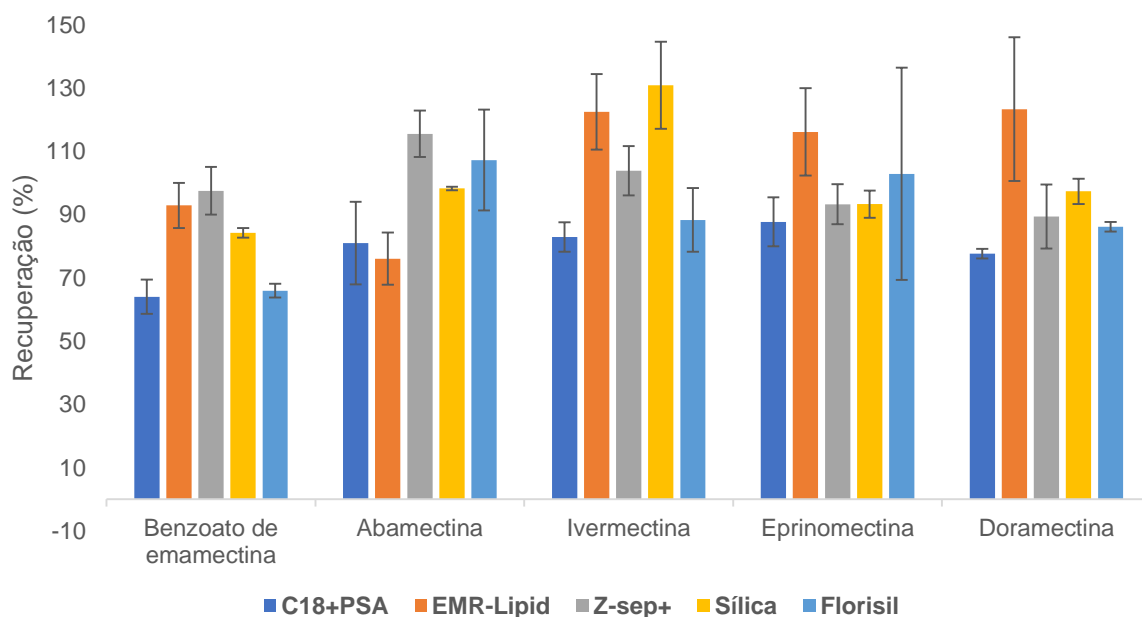
Os cinco sorventes avaliados para a soja resultaram em recuperações acima de 70% para a maioria dos compostos. O emprego do C18+PSA gerou as recuperações mais baixas, com uma recuperação média abaixo de 70% para abamectina (69%), ivermectina (63%) e doramectina (64%), além disso a abamectina obteve um desvio padrão acima de 20%. Em relação ao EMR-Lipid ativado e Florisil, os cinco compostos apresentaram recuperações entre 70-120%, com RSD < 20%. Os resultados para o Z-Sep⁺ foram satisfatórios, exceto para a eprinomectina em que obteve uma recuperação média de 67%. Empregando a sílica como sorvente, as recuperações foram acima de 70% para todos os compostos, porém o desvio padrão da abamectina foi maior que 20%. A comparação das recuperações para as cinco avermectinas empregando os cinco testes de limpeza está demonstrada na Figura 19.

Figura 19 - Comparação dos testes de limpeza para cada analito em soja



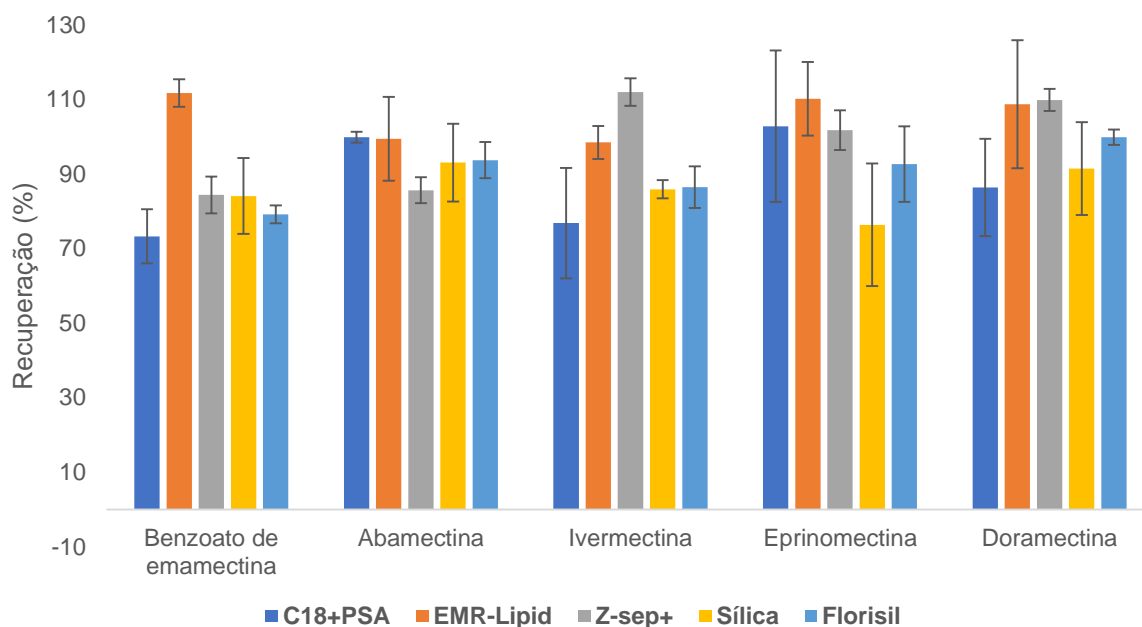
Os sorventes C18+PSA, EMR-Lipid, Sílica e Florisil obtiveram algumas recuperações médias abaixo de 70% e acima de 120% para o feijão. Novamente o C18+PSA apresentou as recuperações mais baixas em comparação aos demais sorventes, sendo que, a emamectina teve apenas 64% de recuperação. O EMR-Lipid apresentou todas as recuperações acima de 70%, com a ivermectina e a doramectina acima de 120%, sendo 122 e 123%, respectivamente. A sílica apresentou recuperação média de 131% para ivermectina e o Florisil 66% para a emamectina e um RSD acima de 30% para a eprinomectina. O Z-Sep+ foi o único sorvente que apresentou recuperações entre 70-120% (Figura 20).

Figura 20 - Comparação dos testes de limpeza para cada analito em feijão



Para o milho todos os cinco sorventes avaliados apresentaram recuperações satisfatórias, como pode ser visto na Figura 21 a seguir. O desvio padrão foi satisfatório para todos os analitos, com exceção da eprinomectina, ao empregar C18+PSA onde obteve um desvio maior que 20%. Em relação ao analito emamectina, o uso do Florisil e C18+PSA geraram as menores recuperações, sendo 79 e 73%, respectivamente. Para a abamectina, o Z-Sep⁺ gerou a menor recuperação (86%).

Figura 21 - Comparação dos testes de limpeza para cada analito em milho

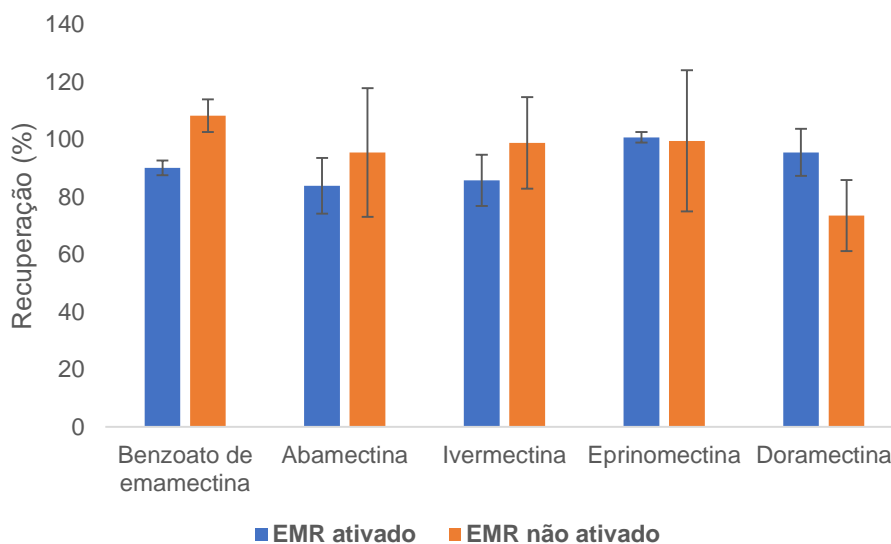


Como o milho obteve recuperações entre 70-120% para os cinco sorventes, levou-se em consideração os valores obtidos para a soja e o feijão para a escolha do sorvente mais adequado. O C18+PSA foi descartado pelo fato de obter os menores valores de recuperação em comparação aos demais sorventes para ambas matrizes. O sorvente que gerou melhores resultados para o feijão foi o Z-Sep⁺ e para a soja o EMR-Lipid. Devido ao alto custo do Z-Sep⁺, optou-se por empregar o EMR-Lipid. Além disso, o uso do EMR-Lipid não tem sido muito relatado na literatura para amostras de soja, feijão e milho, por ser relativamente novo no mercado, sendo mais um motivo para a utilização desse sorvente.

Após a escolha do EMR-Lipid, sua forma não ativada foi testada na etapa de limpeza para a soja, para verificar se haveria melhores resultados ou semelhantes ao ativado para poder ser empregado, eliminando assim, a etapa de partição com Polish. O EMR-Lipid não ativado obteve recuperações mais elevadas para EMA, ABA e IVER, comparando com o EMR-Lipid ativado com Polish, como pode ser visto na Figura 22.

A EPRI manteve-se com uma recuperação semelhante ao EMR-Lipid ativado e a DORA gerou uma recuperação bem menor.

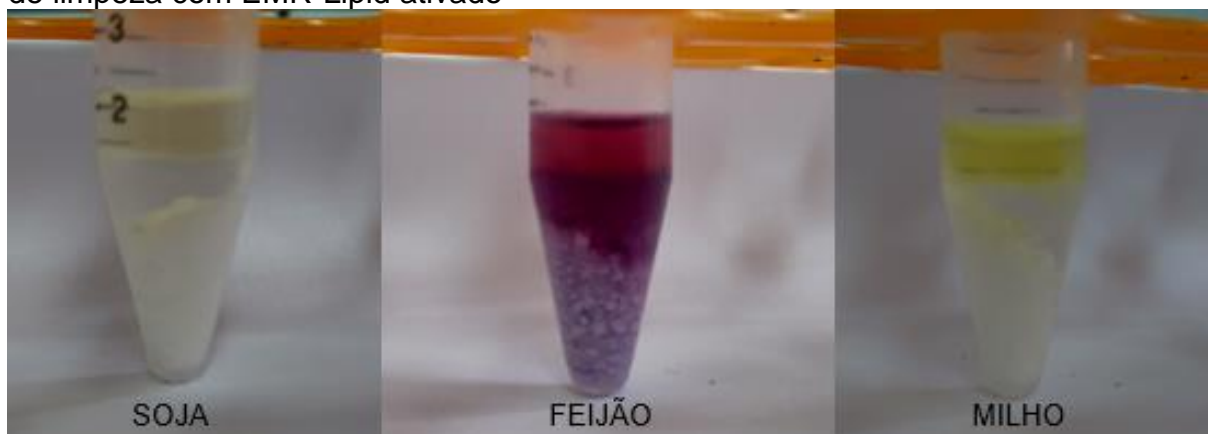
Figura 22 - Comparação, entre EMR-Lipid ativado e EMR-Lipid não ativado, das recuperações e desvios padrões para soja



Porém, os valores de desvio padrão para os cinco compostos aumentaram com o emprego do EMR-Lipid não ativado, podendo ser visualizado um aumento significativamente grande para ABA e EPRI. Ficando ambos os compostos com RSD maior que 20%. Com a utilização do EMR-Lipid ativado os desvios padrões ficaram menores que 10% para todas as avermectinas. Além disso, a intensidade de sinal para a eprinomectina caiu pela metade com o sorvente não ativado. Os outros quatro compostos também tiveram uma diminuição no sinal gerado.

Uma grande diferença observada ao empregar EMR-Lipid ativado e não ativado foi a quantidade de extrato gerado após a centrifugação dos tubos de limpeza. O ativado gerou uma quantidade de extrato pequena, em torno de 300 μ L, e o não ativado obteve quase 1 mL de extrato. Outra diferença foi a geração de duas fases líquidas com o EMR-Lipid ativado, como mostrado na Figura 23, sendo a fase sobrenadante o extrato, com coloração incolor, e a outra fase um líquido oleoso. Já o EMR-Lipid não ativado obteve apenas uma fase, com coloração amarelada e não apresentou oleosidade.

Figura 23 - Extratos de soja, feijão e milho com formação de duas fases após a etapa de limpeza com EMR-Lipid ativado

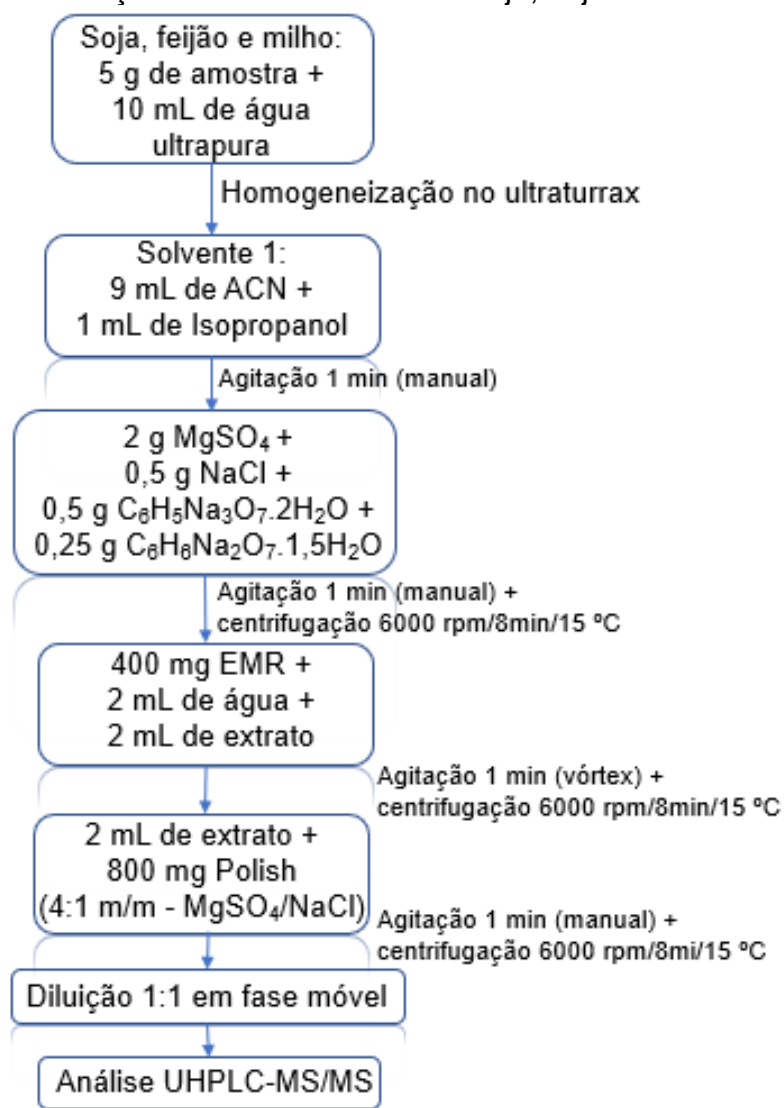


A partir das observações dos sorventes nas formas ativado e não ativado, concluiu-se que o EMR-Lipid ativado com o Polish é o mais adequado para ser empregado no método de extração proposto.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA ANÁLISE DE AVERMECTINAS

A validação do método foi realizada conforme descrito no item 3.8 para cada matriz. A Figura 24 mostra um esquema do procedimento de extração final. Os parâmetros avaliados estão elucidados a seguir.

Figura 24 - Fluxograma do procedimento QuEChERS proposto e validado neste estudo para determinação de avermectinas em soja, feijão e milho

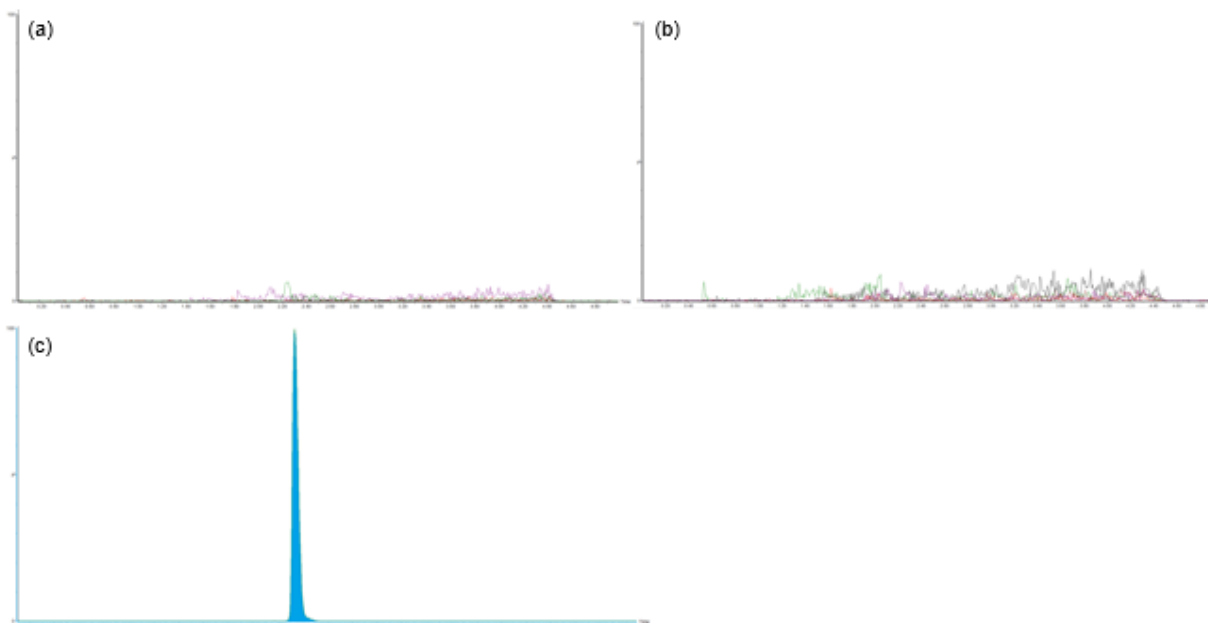


4.3.1 Seletividade

A partir dos resultados das análises é possível afirmar que, não existem interferentes com mesmos íons de quantificação e confirmação no tempo de retenção dos analitos avaliados nas amostras “branco” de soja, feijão e milho, garantindo assim, a seletividade do método desenvolvido.

Os solventes e reagentes também foram avaliados, sendo verificado a ausência de contaminantes que poderiam interferir na análise cromatográfica, como é demonstrado na Figura 25 para soja. O mesmo ocorre com feijão e milho.

Figura 25 - Demonstração da ausência de picos cromatográficos de interferentes no tempo total de análise (5 min) nas amostras (a) branco reagente e (b) amostra branco de soja e (c) pico cromatográfico da emamectina fortificada na matriz no nível $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ (corresponde no equipamento a $20 \mu\text{g L}^{-1}$)



4.3.2 Avaliação do Efeito Matriz

O efeito matriz foi estimado para cada matriz realizando a comparação dos coeficientes angulares das equações de reta obtidas, através do cálculo demonstrado no item 3.8.5. Considera-se que o efeito matriz exerce influência no desempenho analítico quando o resultado não estiver entre -20% e 20%. Logo, para todos os compostos em soja e feijão o efeito não foi considerado significativo. Para a matriz milho os compostos ABA, EMA, IVER e EPRI também resultaram em efeito matriz insignificante, no entanto, a doramectina apresentou efeito matriz de 22%. Os valores encontrados para o efeito matriz nas três matrizes estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 13 - Avaliação do efeito matriz para os compostos em estudo em soja, feijão e milho

Compostos	Soja	Feijão	Milho
	Efeito Matriz (%)	Efeito Matriz (%)	Efeito Matriz (%)
Emamectina	-3,6	0,8	-10,0
Abamectina	-6,8	1,2	-5,9
Ivermectina	-11,1	-4,1	13,9
Eprinomectina	-5,8	0,2	-16,4
Doramectina	-16,5	-10,7	22,2

Os valores de efeito matriz obtidos para as três matrizes (entre -20% e 20%) deve-se ao fato de que os compostos de interesse (abamectina, doramectina, emamectina, eprinomectina e ivermectina) possuem massas moleculares altas, demorando mais para eluïrem. Com isso, os interferentes de soja, feijão e milho eluem antes, obtendo assim, um efeito matriz insignificante.

4.3.3 Curva analítica e faixa de trabalho

A curva de calibração utilizada para quantificação em ambas matrizes foi a curva na matriz "branco", onde a linearidade foi obtida apresentando coeficiente de determinação maior que 0,99 para os cinco compostos, como mostra a Tabela 14. A faixa de trabalho consistiu de 4 a 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspondendo no equipamento de 1 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A estabilidade do equipamento foi comprovada através do uso do padrão interno dimetridazol deuterado, pela repetibilidade do sinal no sistema cromatográfico em todas as injeções.

Tabela 14 - Valores de coeficiente de determinação (r^2) e faixa de trabalho obtidos para as avermectinas a partir da curva de calibração na matriz "branco"

Composto	Soja		Feijão		Milho	
	r^2	Faixa de trabalho ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Faixa de trabalho ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Faixa de trabalho ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Emamectina (benzoato)	0,99974	4,0 - 80,0	0,99913	4,0 - 80,0	0,99883	4,0 - 80,0
Abamectina	0,99682	4,0 - 80,0	0,99878	4,0 - 80,0	0,99667	4,0 - 80,0
Ivermectina	0,99834	4,0 - 80,0	0,99981	4,0 - 80,0	0,99499	4,0 - 80,0
Eprinomectina	0,99471	8,0 - 80,0	0,99704	8,0 - 80,0	0,99793	8,0 - 80,0
Doramectina	0,99985	4,0 - 80,0	0,99357	4,0 - 80,0	0,99786	4,0 - 80,0

4.3.4 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método

O LOD_i e LOQ_i referem-se aos limites de detecção e quantificação, respectivamente, em relação ao instrumento e são expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$. O LOD_m e

LOQ_m referem-se aos limites do método, ou seja, a concentração real nas amostras, sendo obtidos através da relação entre o fator de diluição do método e os limites do instrumento.

No método proposto houve etapas de diluição da amostra e, portanto, os limites em relação ao método e ao instrumento foram diferentes. Considerando LOQ_m e LOQ_i a menor concentração do “branco” fortificado com recuperação entre 70-120% e RSD ≤ 20% e os valores de LOD_m e LOD_i 3,33 vezes menor que o valor dos respectivos limites de quantificação, tem-se os valores para cada avermectina para cada matriz (Tabela 15).

Tabela 15 - LOD e LOQ do método e do instrumento para os compostos validados em soja, feijão e milho.

Composto	LOD_i (µg L⁻¹)	LOQ_i (µg L⁻¹)	LOD_m (µg kg⁻¹)	LOQ_m (µg kg⁻¹)
Soja				
Emamectina (benzoato)	0,3	1,0	1,2	4,0
Abamectina	0,3	1,0	1,2	4,0
Ivermectina	0,3	1,0	1,2	4,0
Eprinomectina	0,6	2,0	2,4	8,0
Doramectina	0,3	1,0	1,2	4,0
Feijão				
Emamectina (benzoato)	0,3	1,0	1,2	4,0
Abamectina	0,3	1,0	1,2	4,0
Ivermectina	0,3	1,0	1,2	4,0
Eprinomectina	0,6	2,0	2,4	8,0
Doramectina	0,3	1,0	1,2	4,0
Milho				
Emamectina (benzoato)	0,3	1,0	1,2	4,0
Abamectina	0,3	1,0	1,2	4,0
Ivermectina	0,3	1,0	1,2	4,0
Eprinomectina	0,6	2,0	2,4	8,0
Doramectina	0,3	1,0	1,2	4,0

4.3.5 Ensaios de fortificação para avaliação da exatidão do método

Com o objetivo de avaliar a exatidão do método, foram realizados ensaios de fortificação, em cinco níveis de concentração (4, 8, 20, 40 e 80 µg kg⁻¹) para cada matriz utilizando o método QuEChERS citrato modificado. Os menores níveis de concentração foram escolhidos levando em consideração os LMR's estabelecidos para abamectina e emamectina em soja, milho e feijão.

Efetuiu-se a fortificação dos “brancos” de soja, feijão e milho, adicionando para as concentrações 4, 8 e 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ um volume de 20 μL , 40 μL e 100 μL de uma solução de mistura, com concentração 1 mg L^{-1} , dos padrões em estudo. Para as concentrações 40 e 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi adicionado 20 μL e 40 μL das soluções individuais de concentração 10 mg L^{-1} dos padrões. Após, realizou-se a extração com solvente e sais de partição e limpeza do extrato, conforme o método representado na Figura 24, no item 4.3. As recuperações foram calculadas utilizando as curvas analíticas em solvente, no extrato “branco” das matrizes em estudo e as curvas analíticas nas matrizes “brancos”.

Como resultado empregando as curvas no extrato “branco” da matriz e em solvente, não foi possível obter recuperações satisfatórias para a abamectina em milho na concentração de 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, ou seja, não seria possível quantificar o analito abaixo do seu LMR (5 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Também não se obteve recuperação entre 70-120% para a soja, no menor nível de fortificação, para a abamectina quantificando com a curva no extrato “branco” da matriz.

Para a emamectina, as recuperações ficaram inferiores a 60% para as três matrizes, utilizando a curva em solvente na concentração de 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que para o feijão esse efeito se repete na concentração de 8 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Porém, com a curva de trabalho na matriz “branco” todos os compostos (para as três matrizes) apresentaram resultados aceitáveis nos cinco níveis de concentração, conforme a SANTE (2017), com recuperações entre 70 e 120% e RSD $\leq 20\%$.

4.3.6 Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermediária)

A precisão do método desenvolvido foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada a partir de cinco extrações de cada nível de fortificação de cada matriz “branco” proposta, sendo realizada uma injeção de cada extrato.

Em relação a precisão intermediária do método, a avaliação ocorreu utilizando dias de análise diferentes, empregando os níveis de fortificação 4, 8, e 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A Tabela 16 a seguir, mostra os resultados para exatidão, em termos de recuperação e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) para a soja, feijão e milho.

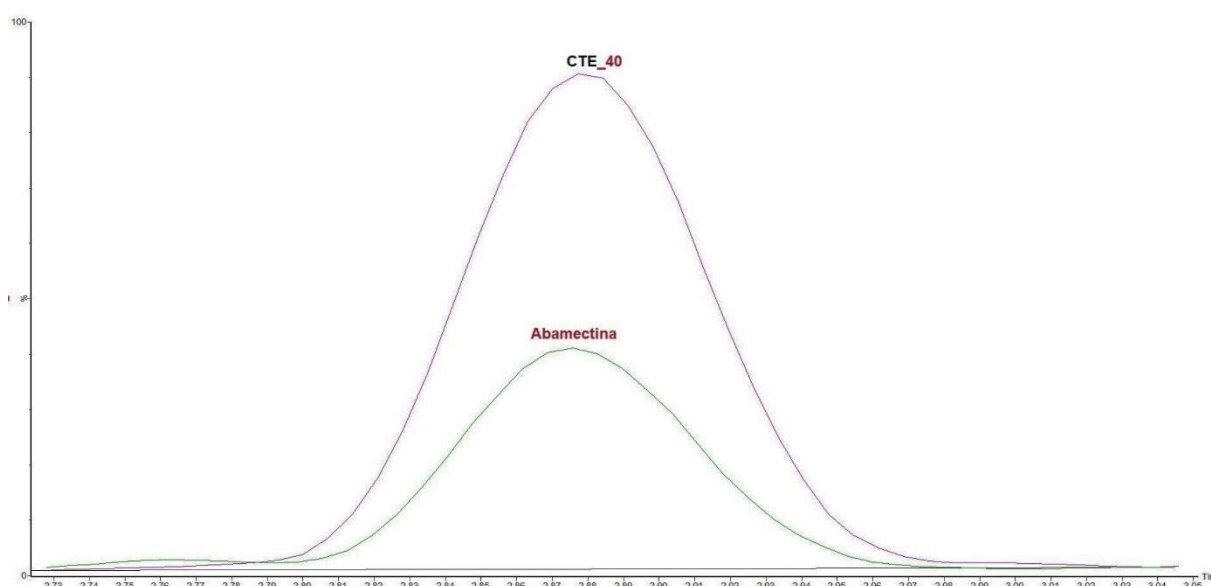
Tabela 16 - Resultados de validação do método QuEChERS citrato modificado para soja, feijão e milho: exatidão (recuperação, %) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Compostos	Níveis de fortificação – Soja								
	4 µg kg ⁻¹		8 µg kg ⁻¹		20 µg kg ⁻¹		40 µg kg ⁻¹		80 µg kg ⁻¹
	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %) Pi	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %) Pi	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %) Pi	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %)
Emamectina	88 (7)	106 (9)	97 (5)	96 (6)	103 (7)	101 (9)	103 (5)	100 (9)	
Abamectina	77 (11)	98 (17)	79 (5)	101 (13)	114 (14)	102 (20)	94 (13)	99 (10)	
Ivermectina	105 (4)	98 (14)	104 (3)	89 (9)	104 (15)	94 (11)	102 (6)	101 (9)	
Eprinomectina	102 (16)	87 (16)	98 (17)	117 (8)	113 (19)	91 (17)	105 (3)	101 (13)	
Doramectina	109 (13)	100 (15)	101 (9)	100 (8)	99 (10)	99 (14)	102 (6)	100 (5)	
Compostos	Níveis de fortificação – Feijão								
	4 µg kg ⁻¹		8 µg kg ⁻¹		20 µg kg ⁻¹		40 µg kg ⁻¹		80 µg kg ⁻¹
	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %) Pi	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %) Pi	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %) Pi	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %)
Emamectina	105 (9)	108 (6)	94 (12)	95 (10)	105 (14)	104 (5)	103 (6)	99 (8)	
Abamectina	83 (5)	98 (13)	89 (6)	97 (4)	105 (10)	103 (10)	96 (11)	99 (9)	
Ivermectina	101 (5)	93 (12)	98 (3)	104 (19)	98 (7)	102 (4)	95 (9)	100 (11)	
Eprinomectina	112 (6)	89 (14)	103 (16)	106 (15)	90 (11)	96 (10)	95 (6)	101 (11)	
Doramectina	71 (2)	108 (7)	107 (3)	95 (10)	91 (5)	110 (6)	96 (4)	98 (7)	
Compostos	Níveis de fortificação – Milho								
	4 µg kg ⁻¹		8 µg kg ⁻¹		20 µg kg ⁻¹		40 µg kg ⁻¹		80 µg kg ⁻¹
	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %) Pi	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %) Pi	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %) Pi	Rec % (RSD %)	Rec % (RSD %)
Emamectina	89 (16)	103 (12)	105 (1)	98 (6)	109 (3)	104 (4)	103 (3)	99 (3)	
Abamectina	71 (6)	74 (5)	106 (6)	109 (10)	92 (15)	107 (8)	97 (6)	99 (9)	
Ivermectina	102 (5)	115 (4)	102 (3)	92 (9)	87 (1)	109 (3)	101 (2)	99 (8)	
Eprinomectina	96 (5)	94 (20)	117 (9)	99 (11)	89 (12)	103 (13)	98 (8)	100 (19)	
Doramectina	118 (3)	105 (11)	113 (7)	97 (5)	88 (7)	100 (6)	96 (6)	101(1)	

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

O método validado foi aplicado na avaliação de 18 amostras de soja, conforme descrito no item 3.9. A análise destas amostras detectou a presença do composto abamectina na concentração de $21,06 \mu\text{g kg}^{-1}$. A Figura 26 demonstra a confirmação da detecção de ABA superior ao LOQ_m . Outras três amostras também apresentaram resíduos de abamectina, porém, com concentração menor que o LOQ_m ($< \text{LOQ}$).

Figura 26 - Sobreposição do sinal na matriz "branco" de soja de concentração $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ com a amostra contendo $21,06 \mu\text{g kg}^{-1}$ de abamectina



Para as 12 amostras de feijão e 5 amostras de milho não foram encontrados resíduos dos analitos avaliados acima do limite de quantificação do método ou entre o LOD_m e LOQ_m . Contudo, uma amostra de feijão apresentou picos de quantificação e identificação para o composto benzoato de emamectina no tempo de retenção correto e razão s/n maior que 10, porém a concentração obtida foi menor que o limite de detecção. Com isso, demonstra-se a importância de realizar o monitoramento desses compostos nas culturas em estudo e demais culturas agrícolas, como forma de garantir a segurança alimentar e saúde da população.

5 CONCLUSÕES

Obteve-se uma extração eficiente dos analitos de interesse (abamectina, emamectina, ivermectina, eprinomectina e doramectina) em soja, feijão e milho, a partir das modificações do método QuEChERS citrato.

As propriedades e composição das matrizes foram ponto importante para o desenvolvimento do método de preparo de amostras. Levando em consideração esses fatores, foi possível desenvolver um método QuEChERS modificado que abrangesse as três matrizes. Porém, para isso, mudanças no solvente de extração e na etapa de limpeza foram necessárias.

Os medicamentos veterinários, em especial as avermectinas, possuem uma baixa detectabilidade em sistemas UHPLC-MS/MS. Com a mudança do solvente de extração para uma mistura de acetonitrila:isopropanol (9:1, v/v) foi possível gerar uma maior intensidade de sinal para esses compostos em um nível de concentração de $4 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A partir da otimização da etapa de limpeza, obteve-se melhores resultados de recuperação e desvio padrão para os analitos em ambas matrizes, onde o emprego do EMR-Lipid como sorvente na limpeza dispersiva gerou uma boa remoção de coextrativos, principalmente gorduras. Além disso, extraiu os analitos de interesse obtendo recuperações satisfatórias nos ensaios de fortificações no menor nível de concentração.

A modificação no solvente de extração e no sorvente da etapa de limpeza foi muito importante, em conjunto com o uso do sistema UHPLC-MS/MS com aditivos na fase móvel e condições específicas, foi possibilitado a determinação dos resíduos de avermectinas com limites de quantificação abaixo dos LMRs.

Cabe salientar que dos cinco compostos avaliados, apenas abamectina e mais recentemente a emamectina são permitidas para uso como agrotóxicos e possuem LMRs estabelecidos pela ANVISA.

Porém, não existem trabalhos que relatem o desenvolvimento de um método e a avaliação de avermectinas em mais de uma cultura agrícola, destacando assim, a relevância desse trabalho.

Com isso, concluiu-se que o método modificado proposto para determinação de avermectinas em soja, feijão e milho empregando UHPLC-MS/MS mostrou-se eficaz, podendo ser aplicado em análises de rotina.

6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos sólidos gerados no desenvolvimento deste trabalho foram descartados em sacos plásticos e na lixeira de resíduos sólidos contaminados. Já os resíduos líquidos em frascos identificados como “Resíduos halogenados” ou “Resíduos não halogenados”. Ambos foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, onde são devidamente separados. A destinação correta é realizada por uma empresa terceirizada especializada e licenciada para esta finalidade.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliação do escopo de compostos empregados no combate a praga *Helicoverpa Armigera* a serem analisados por UHPLC-MS/MS, entre eles clorpirifós e bifentrina;
- Ampliação e otimização do método para produtos derivados de soja e milho;
- Testar diferentes quantidades de sorvente para avaliar a eficiência de limpeza dos extratos;
- Avaliar a aplicabilidade do método em diferentes tipos de matrizes, como solo e plantas de soja, milho e feijão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDU-ALLAH, G. A. M., PITTENDRIGH, B. R. Lethal and sub-lethal effects of select macrocyclic lactones insecticides on forager worker honey bees under laboratory experimental conditions. **Ecotoxicology**, v. 27, p. 81-88, 2018.

AGA, D. S., LENCZEWSKI, M., SNOW, D., MUURINEN, J., SALLACH, J. B., WALLACE, J. S. Challenges in the Measurement of Antibiotics and in Evaluating Their Impacts in Agroecosystems: A Critical Review. **Journal of Environmental Quality**, p. 407-419, 2016.

ALAMGIR, A. N. M. Poisons, Hallucinogens, Teratogens, Pesticides, and Xenobiotics—Their Sources, Classification, Chemistry, and Metabolism. In: ALAMGIR, A. N. M. Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Volume 2, p. 535-583, Springer International Publishing AG. cap. 6. Disponível em: <https://link-springer-com.ez47.periodicos.capes.gov.br/chapter/10.1007%2F978-3-319-92387-1_6>. Acesso em: 27 ago. 2018.

ALMEIDA, K., C., de. Comportamento de cultivares de feijão preto (*Phaseolus Vulgaris* L.) em três safras no município de Guarapuava-PR. 2016. 64 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2016.

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S., ŠTAJNBAHER, D., SCHENCK, F. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M., TASDELEN, B., SCHERBAUM, E., STAJNBAHER, D. Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. **Crop Protection**, Public Health, Environmental Safety, v. 86, p. 439-458, 2007.

ANVISA, 2010. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0031_11_08_2010.pdf/5e157d15-d3d5-4bb9-98db-5667e4d9e0c8>. Acesso em: 12 jan. 2019.

ANVISA, 2017. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2018.

ANVISA, 2018a. Guia para elaboração de rótulo e bula de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4016300/GUIA++Elaboração+de+Rótulo+e+Bula++versão+28-9-2017+DIARE.pdf/85a0fb5f-a18b-478c-b6ea-e6ae58d9202a?version=1.0>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

ANVISA, 2018b. Parecer Técnico de Indeferimento do Produto Técnico à Base do Ingrediente Ativo Benzoato de Emamectina (Com base no resumo da nota técnica). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://contraosagrototoxicos.org/wp->

content/uploads/2017/11/parecer_indeferimento_ativo_benzoato_emamectin.pdf>.
Acesso em: 17 ago. 2018.

ANVISA, 2018c. Regularização de Produtos Agrotóxicos – Monografias Autorizadas. A18 – Abamectina. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

ANVISA, 2018d. Regularização de Produtos Agrotóxicos – Monografias Autorizadas. B55 – Benzoato de Emamectina. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

ARAÚJO, J. C. de. Avaliação de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para o sistema orgânico de produção. 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

BAI, S. H., OGBOURNE, S. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. **Chemosphere**, v. 154, p. 204-214, 2016.

BANDEIRA, N. M. G. Determinação Multiclasse de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Músculo Ovino por HPLC-FD e UHPLC-MS/MS. 2015. 123 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

BARCANSKA, H., DANEK, M., SAJDAK, M., TUREK, M. Review of Sample Preparation Techniques for the Analysis of Selected Classes of Pesticides in Plant Matrices. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p. 1-25, 2018.

BILAL, M., FREED, S., ASHRAF, M. Z., ZAKA, S. M., KHAN, M. B. Activity of acetylcholinesterase and acid and alkaline phosphatases in different insecticide-treated *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Environ Sci Pollut Res**, v. 25, p. 22903-22910, 2018.

BIRD, L. J., DRYNAN, L. J., WALKER, P. W. The Use of F₂ Screening for Detection of Resistance to Emamectin Benzoate, Chlorantraniliprole, and Indoxacarb in Australian Populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 110, p. 651-659, 2017.

BOXALL, A. B. A., JOHNSON, P., SMITH, E. J., SINCLAIR, C. J., STUTT, E., LEVY, L. S. Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 2288-2297, 2006.

BRASIL, 2002. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. **Presidência da República – Casa Civil.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 20 ago. 2018.

BRASIL, 2011. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.** Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 72p.

BRASIL, 2012. Lei nº 12.689, de 19 de julho de 2012. **Presidência da República – Casa Civil.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2012/Lei/L12689.htm>. Acesso em: 20 ago. 2018.

BRASIL, 2013. Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento,** 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-brasil-2012-2013-a-2022-2023.pdf/view>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

BRASIL, 2017. Resolução nº 2.939, de 3 de novembro de 2017. **Diário Oficial da União.** Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=515&pagina=97&d_ata=06/11/2017>. Acesso em: 17 ago. 2018.

BRIQUÉ-PELLET, C., RAVINET, N., QUENET, Y., ALVINERIE, M., CHARTIER, C. Pharmacokinetics and anthelmintic efficacy of injectable eprinomectin in goats. **Veterinary Parasitology**, v. 241, p. 43-47, 2017.

BUÈS, R., BOUVIER, J. C., BOUDINHON, L. Insecticide resistance and mechanisms of resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the south of France. **Crop Protection**, v. 24, p. 814-820, 2005.

ÇAĞATAY, N. S., MENAULT, P., RIGA, M., VONTAS, J., AY, R. Identification and characterization of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch populations from greenhouses in Turkey. **Crop Protection**, v. 112, p. 112-117, 2018.

CASS, Q. B., CASSIANO, N. M. (Org.). Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

CELESTINA, T. V., KOLAR, L., GOBEC, I., Kuzner, J., FLAJS, V. C., POGACNIK, M., ERZEN, N. K. Factors influencing dissipation of avermectins in sheep faeces. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 18-23, 2010.

CIGIÉ, I. K., PROSEN, H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 62-115, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS, 2018a: Glossary of Terms: Pesticides. **Food and Agriculture Organization of the United States.** Disponível em:

<<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/glossary/en/>>. Acesso em: 5 ago. 2018.

CODEX ALIMENTARIUS, 2018b: Glossary of Terms: Maximum Residue Limit. **Food and Agriculture Organization of the United States**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/glossary/en/>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

CODEX ALIMENTARIUS, 2018c: Pesticides Database Search. **Food and Agriculture Organization of the United States**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

CODEX ALIMENTARIUS, 2018d: Glossary of Terms: Veterinary drugs. **Food and Agriculture Organization of the United States**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/vetdrugs/glossary/en/>>. Acesso em: 5 ago. 2018.

CODEX ALIMENTARIUS, 2018e: Themes: Contaminants. **Food and Agriculture Organization of the United States**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/thematic-areas/contaminants/en/>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

CODEX ALIMENTARIUS, 2018f: Glossary of Terms: Pesticides residues. **Food and Agriculture Organization of the United States**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/glossary/en/>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

COELHO, J. D. Produção de grãos – Feijão, Milho e Soja. **Caderno Setorial ETENE**. v. 3, n. 33, 2018.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia, Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006, 456 p.

CONAB, 2018a. Série Histórica das Safras. **Companhia Nacional do Abastecimento**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=30>>. Acesso em: 25 set. 2018.

CONAB, 2018b. Acompanhamento da Safra Brasileira. v. 5, n. 4. **Companhia Nacional do Abastecimento**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 22 nov. 2018.

COOPER, K. M., WHELAN, M., KENNEDY, D. G., TRIGUEROS, G., CANNAVAN, A., BOON, P. E., WAPPEROM, D., DANAHER, M. Anthelmintic drug residues in beef: UPLC-MS/MS method validation, European retail beef survey, and associated exposure and risk assessments. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, p. 746-760, 2012.

CRUZ, J. C., FILHO, I. A. P., PIMENTEL, M. A. G., COELHO, A. M., KARAM, D., CRUZ, I., GARCIA, J. C., MOREIRA, J. A. A., OLIVEIRA, M. F. de, NETO, M. M. G., ALBUQUERQUE, P. E. P. de, VIANA, P. A., MENDES, S. M., ALVARENGA, R. C., MATRANGOLO, W. J. R. Produção de Milho na Agricultura Familiar. Circular Técnica, n. 159, EMBRAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2011.

Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/15438875.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

DANAHER, M., HOWELLS, L. C., CROOKS, S. R. H., CERKVENIK-FLAJS, V., O'KEEFFE, M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 844, p. 175-203, 2006.

DANAHER, M., RADECK, W., KOLAR, L., KEEGAN, J., CERKVENIK-FLAJS, V. Recent Developments in the Analysis of Avermectin and Milbemycin Residues in Food Safety and the Environment. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p. 936-951, 2012.

DEMARCO, M. Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Mexilhão empregando o Método QuEChERS e HPLC-FD. 2017. 92 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, 2017.

DIAS, J. V., CUTILLAS, V., LOZANO, A., PIZZUTTI, I. O., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1462, p. 8-18, 2016.

DU, P., LIU, X., GU, X., DONG, F., XU, J., KONG, Z., WU, Y., ZHU, Y., LI, Y., ZHENG, Y. Rapid residue analysis of pyriproxyfen, avermectins and diflubenzuron in mushrooms by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Anal. Methods**, v. 5, p. 6741-6747, 2013.

DZHAFAROV, M, Kh., VASILEVICH, F. I., KOVALEV, G. I., KRIVONOS, K. S., TSEPILOVA, I. I., ZAVARZIN, I. V., VASIL'EVA, E. V. Derivatives Of 16-Membered Macrocyclic Lactones: Antiparasitic Properties And Interaction With Gabaa Receptors. **Agricultural Biology**, v. 51, p. 875-882, 2016.

EDVAN, R. L., CARNEIRO, M. S. de S. Uso da digesta bovina como adubo orgânico. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 2, p. 211-225, 2011.

EMBRAPA Soja, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 25 set. 2018.

EUROPEAN COMMISSION, 2018a. Maximum Residue Levels. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels_en>. Acesso em: 21 ago. 2018.

EUROPEAN COMMISSION, 2018b. EU – Pesticides database. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>>. Acesso em: 21 ago. 2018.

FACCO, J. de F. Determinação multirresíduo de agrotóxicos em milho empregando método QuEChERS modificado e LC-MS/MS. 2017. 108 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

FACHI, M. M., LEONART, L. P., CERQUEIRA, L. B., PONTES, F. L. D., CAMPOS, M. L. de, PONTAROLO, R. A systematic and critical review on bioanalytical method validation using the example of simultaneous quantitation of antidiabetic agents in blood. **Journal of Chromatography B**, v. 1055-1056, p. 61-71, 2017.

FALCÃO, H. G., HANDA, C. L., SILVA, M. B. R., CAMARGO, A. C. de, SHAHIDI, F., KUROZAWA, L. E., IDA, E. I. Soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking affects β -glucosidase activity, isoflavone profile and soaking time. **Food Chemistry**, v. 269, p. 404-412, 2018.

FARIA, M. T. de. Produtividade da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) Irrigada por aspersão convencional com diferentes métodos de estimativa de lâmina de irrigação. 2012. 99 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2012.

FEI, C., CHE, R., LI, G., ZHANG, L., FAN, W., XIA, S., XUE, F. Safety and clinical efficacy of tenvermectin, a novel antiparasitic 16-membered macrocyclic lactone antibiotics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 117, p. 154-160, 2018.

FERRAZ, G. J., Fotodegradação de antiparasitários veterinários em solos. 2018. 95 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

FERREIRA, R. G., SPISSO, B. F., HORA, I. M. de C. da, MONTEIRO, M. A., PEREIRA, M. U., COSTA, R. P. da, CARLOS, B. de S. Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 2, p. 30-49, 2012.

FERREIRA, F. de O., SILVA, C. R., RATH S. On-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of avermectins and milbemycin in soils, **Journal Chromatography A**, v. 1471, p. 118-125, 2016.

FILHO, A. M. Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos em manga por SPME-GC-MS e SPME-HPLC-UV-Vis. 2010. 150 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

FUMES, B. H., SILVA, M. R., ANDRADE, F. N., NAZARIO, C. E. D., LANÇAS, F. M. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 9-25, 2015.

GARCIA, E. G., BUSSACOS, M. A., FISCHER, F. M. Harmonização e classificação toxicológica de agrotóxicos em 1992 no Brasil e a necessidade de prever os impactos da futura implantação do GHS. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 2279-2287, 2008.

GEORGIADIS N., TSAROUHAS, K., TSITSIMPIKOU, C., VARDAVAS, A., REZAEI, R., GERMANAKIS, I., TSATSAKIS, A., STAGOS, D., KOURETAS, D. Pesticides and

cardiotoxicity. Where do we stand?. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 353, p. 1-14, 2018.

GOMES, J. J. A., COSTA, C. V. A., TEIXEIRA, A. P. R. T., DIAS, V. S. Comparação química do composto orgânico de esterco bovino e leguminosas: leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit) e sombreiro (*Clitoria fairchildiana* Haward). **Rev. Bras. de Agroecologia**, v. 3, n. 1, p. 78-84, 2008.

GONÇALVES, L. D. Avaliação Química e Tecnológica de grãos de soja para Elaboração e Caracterização de tofus. 2014. 64 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.

GONZÁLEZ, O., BLANCO, M. E., IRIARTE, G., BARTOLOMÉ, L., MAGUREGUI, M. I., ALONSO, R. M. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 10-27, 2014.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á., SOCAS-RODRIGUÉZ, B., HERRERA-HERRERA, A. V., GONZÁLEZ-SÁLAMO, J., HERNÁNDEZ-BORGES, J., RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Evolution and applications of the QuEChERS method. **Trends in Analytical Chemistry**, p 1-39, 2015.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929-3937, 2010.

GRECCO, C. F., SOUZA, I. D., QUEIROZ, M. E. C. Recent development of chromatographic methods to determine parabens in breast milk samples: A review. **Journal of Chromatography B**, v. 1093-1094, p. 82-90, 2018.

GRIMALT, S., DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1433, p. 1-23, 2016.

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.

HANDA, C. L., LIMA, F. S. de, GUELFY, M. F. G., FERNANDES, M. da S., GEORGETTI, S. R., IDA, E. I. Parameters of the fermentation of soybean flour by *Monascus purpureus* or *Aspergillus oryzae* on the production of bioactive compounds and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 271, p. 274-283, 2019.

HASHEMI, B., ZOHRABI, P., SHAMSIPUR, M. Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. **Talanta**, v. 187, p. 337-347, 2018.

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

HERRERO-LATORRE, C., BARCIELA-GARCÍA, J., GARCÍA-MARTÍN, S., PEÑA-CRECENTE, R. M. Graphene and carbon nanotubes as solid phase extraction sorbents for the speciation of chromium: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1002, p. 1-17, 2018.

HUANG, J-X., LU, D-H., WAN, K., WANG, F-H. Low temperature purification method for the determination of abamectin and ivermectin in edible oils by liquid chromatography– tandem mass spectrometry. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, p. 635-639, 2014.

HUERTAS-PÉREZ, J. F., ARROYO-MANZANARES, N., HITZLER, D., CASTRO-GUERREIRO, F. G., GÁMIZ-GRACIA, L., GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Simple determination of aflatoxins in rice by ultra-high performance liquid chromatography coupled to chemical post-column derivatization and fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 245, p. 189-195, 2018.

IBGE, Censo Agropecuário, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2006. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9827-censo-agropecuario.html?=&t=o-que-e>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

IMPERIALE, F. A., FARIAS, C., PIS, A., SALLOVITZ, J. M., LIFSCHITZ, A., LANUSSE, C. Thermal stability of antiparasitic macrocyclic lactones milk residues during industrial processing. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, p. 57-62, 2009.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 5. Brasília, 2011. 19p.

JECHALKE, S., HEUER, H., SIEMENS, J., AMELUNG, W., SMALLA, K. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil, **Trends in Microbiology**, v. 22, p. 536-545, 2014.

JESCHKE, P., NAUEN, R., SCHINDLER, M., ELBERT, A. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 2897-2908, 2011.

KAMALI, F. P., MEUWISSEN, M. P. M., BOER, I. J. M. de, MIDDELAAR, C. E. van, MOREIRA, A., LANSINK, A. G. J. M. O. Evaluation of the environmental, economic, and social performance of soybean farming systems in Southern Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 385-394, 2018.

KACZYNSKI, P. Large-scale multi-class herbicides analysis in oilseeds by rapid one-step QuEChERS-based extraction and cleanup method using liquid chromatography– tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 230, p. 411-422, 2017.

KEMMERICH, M., RIZETTI, T. M., MARTINS, M. L., PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. Optimization by Central Composite Design of a Modified QuEChERS

Method for Extraction of Pesticide Multiresidue ins Sweet Pepper and Analysis by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 728-739, 2015.

KVATERNICK, V., KELLERMAN, M., KNAUS, M., REHBEIN, S., ROSENTEL, J. Pharmacokinetics and metabolism of eprinomectin in cats when administered in a novel topical combination of fipronil, (S)-methoprene, eprinomectin and praziquantel. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p. 2-9, 2014.

KIM, C., RYU, H-D., CHUNG, E. G., KIM, Y., LEE, J-K. A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry. **Journal of Environmental Management**, v. 217, p. 629-645, 2018.

KOLAR, L., FLAJS, V. C., KUZNER, J., MARC, I., POGACNIK, M., BIDOVEC, A., GESTEL, C. A. M. van, ERZEN, N. K. Time profile of abamectin and doramectin excretion and degradation in sheep faeces. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 197-202, 2006.

KOLAR, L., ERZEN, N. K, HOGERWERF, L., GESTEL, C. A. M. van. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 182-189, 2008.

KRUVE, A., REBANE, R., KIPPER, K., OLDEKOP, M-L., EVARD, H., HERODES, K., RAVIO, P., LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015a.

KRUVE, A., REBANE, R., KIPPER, K., OLDEKOP, M-L., EVARD, H., HERODES, K., RAVIO, P., LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 8-28, 2015b.

KUSTER, M., ALDA, M. L. de, BARCELÓ, D. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated Waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 520-529, 2009.

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

LAWAL, A., WONG, R. C. S., TAN, G. H., ABDULRA'UF, L. B., ALSHARIF, A. M. A. Recent Modifications and Validation of QuEChERS-dSPE Coupled to LC–MS and GC–MS Instruments for Determination of Pesticide/ Agrochemical Residues in Fruits and Vegetables: Review. **Journal of Chromatographic Science**, p. 1-14, 2018.

LEHOTAY, S. J., MASTOVSKÁ, K., LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 615-629, 2005.

LEMOS, M. A. T., MATOS, C. A., RESENDE, M. F. de, PRADO, R. B., DONAGEMMA, R. A., NETTO, A. D. P. Development, validation, and application of a method for

selected avermectin determination in rural waters using high performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 424-432, 2016.

LI, J., WANG, D., FAN, W., HE, R., YAO, Y., SUN, L., ZHAO, X., WU, J. Comparative effects of diferente organic materials on nematode Community in continuous soybean monoculture soil. **Applied Soil Ecology**, v. 125, p. 12-17, 2018.

LIMA, M. M. de, VIEIRA, A. C., MARTINS, I., BORALLI, V. B., BORGES, K. B., FIGUEIREDO, E. C. On-line restricted access molecularly imprinted solid phase extraction of ivermectin in meat samples followed by HPLC-UV analysis. **Food Chemistry**, v. 197, p. 7-13, 2016,

LIU, Z., QI, P., WANG, X., WANG, Z., XU, X., CHEN, W. WU, L., ZHANG, H., WANG, Q., WANG, X. Multi-pesticides residue analysis of grains using modified magnetic nanoparticle adsorbent for facile and efficient cleanup. **Food Chemistry**, v. 230, p. 423-431, 2017.

LIU, K. Soybean: Overview. In: Liu, K. **Encyclopedia of Food Grains**. 2. Ed. USA: Elsevier Ltda, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123944375000280>>. Acesso em: 29 ago. 2018.

LÓPEZ-BLANCO, R., NORTES-MÉNDEZ, R., ROBLES-MOLINA, J., MORENO-GONZÁLES, D., GILBERT-LÓPEZ, B., GARCÍA-REYES, J. F., MOLINA-DÍAZ, A. Evaluation of different cleanup sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1456, p. 89-104, 2016.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J., ORTEGA-BARRALES, P., FERNÁNDEZ-DE-CÓRDOVA, M. L., RUIZ-MEDINA, A. Trends in flow-based analytical methods applied to pesticide detection: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 684, p. 30-39, 2011.

MACEDO, F., MARSICO, E. T., CONTE-JÚNIOR, C. A., RESENDE, M. F. de, BRASIL, T. F., NETTO, A. D. P. Development and validation of a method for the determination of low-ppb levels of macrocyclic lactones in butter, using HPLC-fluorescenc. **Food Chemistry**, v. 179, p. 239-245, 2015.

MADEJ, K., KALENIK, T. K., PIEKOSZEWSKI, W. Sample preparation and determination of pesticides in fat-containing foods. **Food Chemistry**, v. 269, p. 527-541, 2018.

MAIA, P. M. S., REZENDE, F. B. de F., NETTO, A. D. P., MARQUES, F. F. de C. An alternative derivatization reaction to the determination of doramectin in bovine milk using spectrofluorimetry. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 100, p. 127-130, 2013.

MANN, M. da S. M. Avaliação de sorventes para remoção de clorofila na determinação de agrotóxicos em espinafre empregando método QuEChERS e GC-ECD. 2017. 107 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

MANNING, P., BEYNON, S. A., LEWIS, O. T. Quantifying immediate and delayed effects of anthelmintic exposure on ecosystem functioning supported by a common dung beetle species. **Plos One**, p. 1-15, 2017.

MAPA, 2009. Instrução Normativa nº 42, de 31 de dezembro de 2008. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pncrc-vegetal/arquivos/00-in-sda-42-2008.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

MAPA, 2013a. Instrução Normativa MAPA nº 13, de 3 de abril de 2013. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.infoconsult.com.br/legislacao/instrucao_normativa_mapa/2013/in_mapa_13_2013.htm>. Acesso em: 17 ago. 2018.

MAPA, 2013b. Portaria nº 1.109, de 6 de novembro de 2013. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2012/10/Portaria-nº-1.109-de-6-de-novembro-de-2013-lano-de-supressão-da-praga-Helicoverpa-armigera-e-as-medidas-emergenciais-de-defesa-sanitária-vegetal.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

MAPA, 2016. Ato nº 1, de 22 de janeiro de 2016. Secretaria de Defesa Agropecuária Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/ato-no-1-2016-dfia-prioridades-de-registro/view>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

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., SUAREZ-VARELA, M. M., LLOPIS-GONZALEZ, A., PICÓ, Y. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 936, p. 40-61, 2016.

MAY, M. M., FERRONATO, G., BANDEIRA, N. M. G., PRESTES, O. D., ZANELLA, R., ADAIME, M. B. Determination of Pesticide Residues in Soy-Based Beverages Using a QuEChERS Method (with Clean-Up Optimized by Central Composite Design) and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Anal. Methods**, v. 10, p. 369-378, 2017.

MEDEIROS, L. A. M. Resistencia genética do feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) ao *Colletotrichum lindemuthianum*. 2004. 97 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

MESQUITA, F. R. Linhagens de Feijão: Composição química e digestibilidade proteica. 2005. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2005.

MOREIRA, R. A. Efeitos dos Agrotóxicos Kraft® 36 ec (abamectina) e Score® 250 ec (difenoconazol), isolados e em misturas, sobre organismos zooplânctônicos. 2017.

145p. Tese (Doutorado em Ciências, Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2017.

MOSCOU, I. C., DASENAKI, M. E., THOMAIDIS, N. S. Ionization study and simultaneous determination of avermectins and milbemycines in fish tissue by LC-ESI-MS/MS. **Journal Chromatography B**, v., 1104, p. 134-140, 2019.

MOUSAVI, L., TAMIJI, Z., KHOSHAYAND, M. R. Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid-liquid microextraction method – A review. **Talanta**, v. 190, p. 335-356, 2018.

NANDI, A., SAGAR, S. V., CHIGURE, G., FULAR, A., SHARMA, A. K., NAGAR, G., KUMAR, S., SARAVANAN, B. C., GHOSH, S. Determination and validation of discriminating concentration of ivermectin against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 250, p. 30-34, 2018.

NUCKOWSKI, L., KACZMARKIEWICZ, A., STUDZIŃSKA, S. Review on sample preparation methods for oligonucleotides analysis by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1090, p. 90-100, 2018.

PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. Circular Técnica, n. 75, EMBRAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2006. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489376/1/Circ75.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

PÁLENÍKOVÁ, A., DOMINGUÉZ, G. M., ARREBOLA, F. J., GONZÁLEZ, R. R., HROUZKOVÁ, S., FRENICH, A. G. Multifamily determination of pesticide residues in soya-based nutraceutical products by GC/MS-MS, **Food Chemistry**, v. 173, p. 796-807, 2015.

PEIRETTI, P. G., MEINERI, G., LONGATO, E., TASSONE, S. Nutritive value and fatty acid content of soybean plant [*Glycine max* (L.) Merr.] during its growth cycle. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, p. 347-352, 2018.

PEREIRA, L. A., JARDIM, I. C. S. F., FOSTIER, A. H., RATH, S. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 159-169, 2012.

PEREIRA, R. G., ALBUQUERQUE, A. W. de, SOUZA, R. de O., SILVA, A. D. da, SANTOS, J. P. A. dos, BARROS, E. da S., MEDEIROS, P. V. Q. de. Sistemas de manejo do solo: soja [*glycine max* (L.)] consorciada com *brachiaria decumbens* (STAPF). **Pesq. Agropec. Trop**, v. 41, p. 44-51, 2011.

PÉREZ, R., PALMA, C., CABEZAS, I., RUBILAR, L., ARBOIX, M. The influence of gastrointestinal parasitism on fecal elimination of doramectin, in lambs. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 2017-2021, 2010.

PÉREZ, J. F. H., SEJERØE-OLSEN, B., ALBA, A. R. F., SCHIMMEL, H., DABRIO, M. Accurate determination of selected pesticides in soya beans by liquid chromatography coupled to isotope dilution mass spectrometry. **Talanta**, v. 137, p. 120-129, 2015.

PÉREZ-FERNÁNDEZ, V., ROCCA, L. M., TOMAI, P., FANALI, S., GENTILI, A. Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 983, p. 9-41, 2017.

PIRSAHEB, M., FATTAHI, N., RAHIMI, R., SHARAFI, K., GHAFARI, H. R. Evaluation of abamectin, diazinon and chlorpyrifos pesticide residues in apple product of Mahabad region gardens: Iran in 2014. **Food Chemistry**, v. 231, p. 148-155, 2017.

POOLE, C. F. New trends in solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 362-373, 2003.

PŁOTKA-WASYLKA, J., SZCZEPANSKA, N., GUARDIA, M. de la, NAMIESNIK, J. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 23-43, 2016.

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.

RAICH-MONTIU, J., PRAT, M. D., GRANADOS, M. Extraction and analysis of avermectines in agricultural soils by microwave assisted extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 697, p. 32-37, 2011.

RAUCCI, G. S., MOREIRA, C. S., ALVES, P. A., MELLO, F. F. C., FRAZÃO, L. de A., CERRI, C. E., CERRI, C. C. Greenhouse gas assessment of Brazilian soybean production: a case study of Mato Grosso State, **Journal of Cleaner Production**, v. 96, p. 418-425, 2015.

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

RIBEIRO, H. J. S. de S., PRUDENCIO-FERREIRA, S. H., MIYAGUI, D. T. Propriedades físicas e químicas de feijão comum preto, cultivar iapar 44, após envelhecimento acelerado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, p. 165-169, 2005

RIMAYI, C.; ODUSANYA, D.; MTUNZI, F.; TSOKA, S. Alternative calibration techniques for counteracting the matrix effects in GC-MS-SPE pesticide residue analysis – A statistical approach. **Chemosphere**, v. 118, p. 35-43, 2015.

ROMANATO, F. N., HAMAWAKI, O. T., SOUSA, L. B. de, NOGUEIRA, A. P. O., NETO, D. P. de C., BORGES, C. C. R., HAMAWAKI, C. D. L., HAMAWAKI, R. L. Parametric and Non-Parametric analysis for Determining the Adaptability and Stability of Soybean Genotypes in Three Sowing Periods. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 3, p. 574-580, 2016.

ROMERO-GONZÁLEZ, R., FRENICH, A. G., VIDAL, J. L. M. Veterinary Drugs Residues: Anthelmintics. In: ROMERO-GONZÁLEZ, R., FRENICH, A. G., VIDAL, J. L.

M. Encyclopedia of Food Safety. v. 3, cap. 243, Espanha: Elsevier inc., 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786128002432>>. Acesso em: 29 ago. 2018.

ROSSMAN00, D. R., BYRNE, A. M., CHILVERS, M. I. Profitability and efficacy of soybean seed treatment in Michigan. **Crop Protection**, v. 114, p. 44-52, 2018.

RÜBENSAM, G. Determinação dos Resíduos de Avermectinas e Milbemicinas em Leite Bovino por Cromatografia Líquida e Detecção por Fluorescência e Espectrometria de Massas. 2010. 106 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

RÚBIES, A., ANTKOWIAK, S., GRANADOS, M., COMPANYÓ, R., CENTRICH, F. Determination of avermectins: A QuEChERS approach to the analysis of food samples, **Food Chemistry**, v. 181, p. 57-63, 2015.

SAJID, M. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with derivatization: A review of different modes, applications, and green aspects. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 106, p. 169-182, 2018.

SAMSIDAR, A., SIDDIQUEE, S., SHAARANI, S. M. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 188-201, 2018.

SANTE, EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Documento nº 11813/2017, Revisão 0, 21-22 de novembro de 2017. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf>. Acesso em: 17 set. 2018.

SANTOS, N. V. dos, SANTOS-EBINUMA, V. de C., JUNIOR, A. P., PEREIRA, J. F. B. Liquid-liquid extraction of biopharmaceuticals from fermented broth: trends and future prospects. **Society of Chemical Industry**, v. 93, p. 1845-1863, 2017

SETH, S., AGRAWAL, Y. C., GHOSH, P. K., JAYAS, D. S., SINGH, B. P. N. Oil extraction rates of soya bean using isopropyl alcohol as solvent. **Biosystems Engineering**, v. 97, p. 209-217, 2007.

SEVERINO, F. J., CARVALHO, S. J. P., CHRISTOFFOLETI, P. J. Interferências mútuas entre a cultura do milho, espécies forrageiras e plantas daninhas em um sistema de consórcio. I – Implicações sobre a cultura do milho (*Zea mays*). **SBCPD – Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 589-596, 2005.

SHEN, Y., WANG, Y., ZHAO, X., SUN, C., CUI, B., GAO, F., ZENG, Z., CUI, H. Preparation and Physicochemical Characteristics of Thermo-Responsive Emamectin Benzoate Microcapsules. **Polymers**, v. 9, p. 1-11, 2017.

SHOAIB, A., WAQAS, M., ELABASY, A., CHENG, X., ZHANG, Q., SHI, Z. Preparation and characterization of emamectin benzoate nanoformulations based on colloidal

delivery systems and use in controlling *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: *Plutellidae*). **RSC Adv.**, v. 8, p. 15687-15697, 2018.

SILVA, F. de O., MIRANDA, T. G., JUSTO, T., FRASÃO, B. da S., CONTE-JUNIOR, C. A., MONTEIRO, M., PERRONE, D. Soybean meal and fermented soybean meal as functional ingredients for the production of low-carb, high-protein, high-fiber and high isoflavones biscuits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 224-231, 2018.

SINGH, P., SCOTT, I., JACOB, A., STORILLO, V. M., POMROY, W. E. Pharmacokinetics of abamectin in sheep, goat and deer. **Small Ruminant Research**, v. 165, p. 30-33, 2018.

SINGH, P., SRIVASTAVA, A., SINGH, S. P. Inexpensive, effective novel activated carbon fibers for sample cleanup: application to multipesticide residue analysis in food commodities using a QuEChERS method. v. 410, p. 2241-2251, 2018

SOBOLEVA, E., AMBRUS, Á. Application of a system suitability test for quality assurance and performance optimisation of a gas chromatographic system for pesticide residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, p. 55-65, 2004.

STEHLE, S., BUB, S., SCHULZ, R. Compilation and analysis of global surface water concentrations for individual insecticide compounds. **Science of the Total Environment**, v. 639, p. 516-525, 2018.

TACO, 2011. Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos. Composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível: Centesimal, minerais, vitaminas e colesterol. **Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**. Disponível em: <http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2018.

TETTE, P. A. S., GUIDI, L. R., GLÓRIA, M. B. de A., FERNANDES, C. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. **Talanta**, v. 149, p. 124-141, 2016.

USDA, 2018. Data & Analysis. **United States Department of Agricultura**. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data>>. Acesso em: 25 set. 2018.

VASSILIS, L. D., GEORGE, B. C., CHARALAMPOS, P. G., ATHINA, P-V., XANTHIPPOS, K. N. Mobility of pharmaceutical compounds in the terrestrial environment: Adsorption kinetics of the macrocyclic lactone eprinomectin in soils. **Chemosphere**, v. 144, p. 1201-1206, 2016.

T, P. P., HAKME, E., UCLÉS, S., CUTILLAS V., GALERA, M. M., MUGHARI, A. R., ALBA, A. R. F. Large multiresidue analysis of pesticides in edible vegetable oils by using efficient solid-phase extraction sorbents based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe methodology followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, p. 20-31, 2016.

VICARI, M. C. de, Desenvolvimento de Método Para a Determinação Simultânea de Resíduos de Agrotóxicos e Medicamentos Veterinários em Solo por UHPLC-MS/MS.

2013. 215 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

VIEIRA, M. S., RIZZETTI, T. M., SOUZA, M. P, de S., MARTINS, M. L., PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. Multiresidue determination of pesticides in crop plants by the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using a calibration based on a single level standard addition in the sample. **Journal Chromatography A**, v. 1526, p. 119-127, 2017.

WANG, J., CHEUNG, W., CHOW, WILLIS. Ultra-High Performance Liquid Chromatography/ Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry Determination of 151 Pesticides in Soybeans and Pulses. **Journal of AOAC International**, v. 96, p. 1114-1133, 2013.

WEI, R., GE, F., ZHANG, L., HOU, X., CAO, Y., GONG, L., CHEN, M., WANG, R., BAO, E. Occurrence of 13 veterinary drugs in animal manure-amended soils in Eastern China. **Chemosphere**, v. 144, p. 2377-2383, 2016.

WEN, Y., CHEN, L., LI, J., LIU, D., CHEN, L. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 26-41, 2014.

YIN, M-M., ZHU, X-Y, CHEN, F-L. Release performance and sustained-release efficacy of emamectin benzoate-loaded polylactic acid microspheres. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, p. 640-647, 2018.

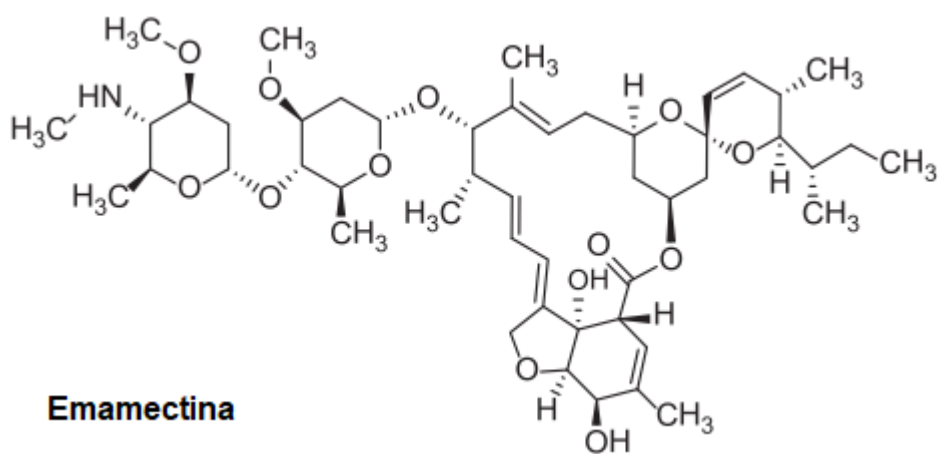
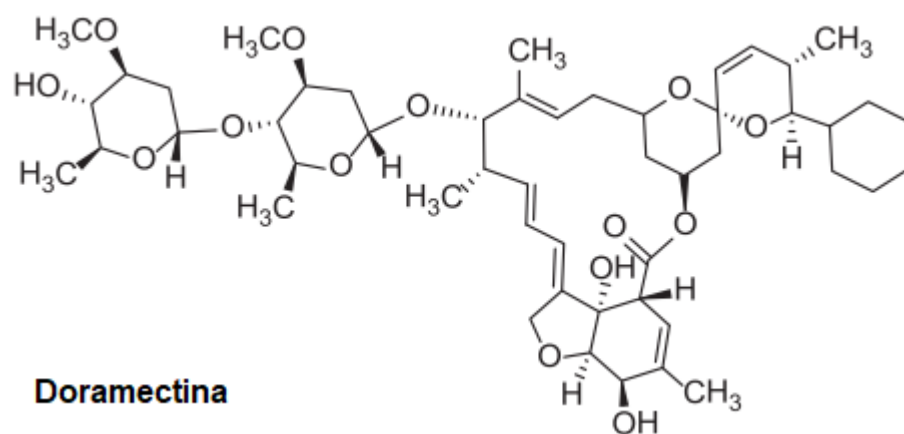
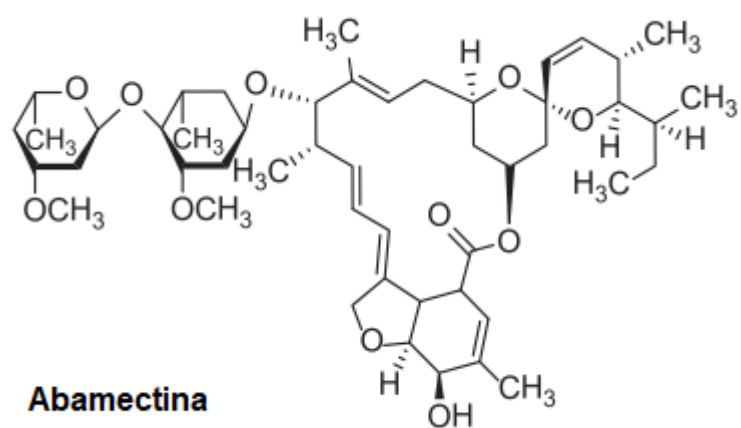
ZHANG, H-X., LU, W., XIA, H., GONG, Y., PENG, X-T., FENG, Y-Q. Rapid and Sensitive Detection of Avermectin Residues in Edible Oils by Magnetic Solid-Phase Extraction Combined with Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Anal. Methods**, v. 10, p. 3201-3208, 2017.

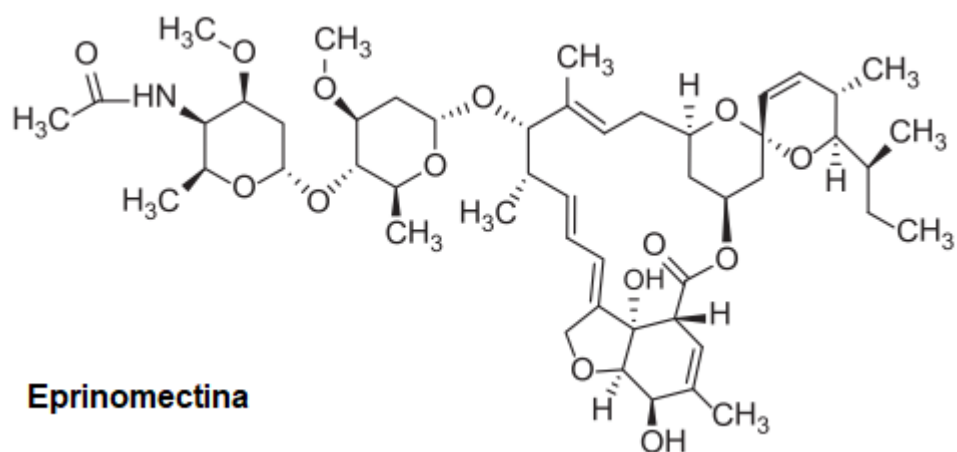
ZHANG, T., XU, W., LIN, X., YAN, H., MA, M., HE, Z. Assessment of heavy metals pollution of soybean grains in North Anhui of China. **Science of the Total Environment**, v. 646, p. 914-922, 2019.

ZHAO, L., LUCAS, D. Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Agilent Bond Elut EMR—Lipid by LC/MS/MS. **Agilent Technologies**, p. 1-12, 2015.

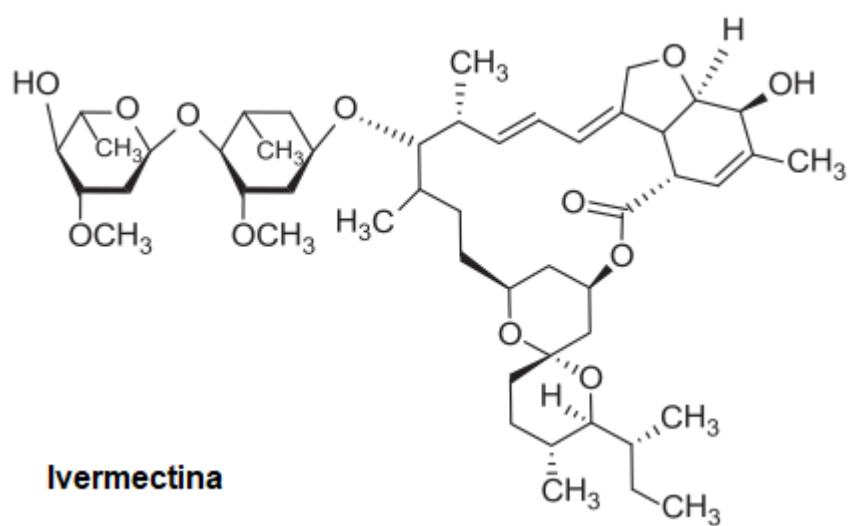
APÊNDICE

Apêndice A - Representação da estrutura química das avermectinas em estudo





Eprinomectina



Ivermectina