

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

Arthur Mateus Schreiber

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Santa Maria - RS
2022

Arthur Mateus Schreiber

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS 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), como requisito parcial para a obtenção do grau **Mestre em Química**.

Orientador: Prof.Dr. Osmar Damian Prestes
Coorientador: Prof.Dr. Renato Zanella

Santa Maria – RS
2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Arthur Mateus Schreiber

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS 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), como requisito parcial para a obtenção do grau **Mestre em Química**.

Aprovada em 09 de setembro de 2022:

Osmar Damian Prestes, Dr., UFSM
(Orientador)

Darlina Mello Souza, Dra, UFSM

Magali Kemmerich, Dra, UNIPAMPA

Santa Maria – RS
2022

AGRADECIMENTOS

Maior gratidão a Deus, pela sua misericórdia e graça infinita, as quais permitiram chegar nesse momento da minha vida e ter proporcionado as condições necessárias para isso. Conforme deixou registrado o Apóstolo João, em seu livro, no capítulo 1 e versículo 3 “Todas as coisas foram feitas por intermédio dele; sem ele, nada do que existe teria sido feito”.

Aos meus queridos pais, Nelson e Marilei, por terem feito concessões e deixado os seus sonhos e planos de lado para que os meus sonhos pudessem ser realizados. Obrigado por proporcionarem condições para que eu pudesse me desenvolver como pessoa e como profissional. Gratidão também a minha família, pelas orações diárias e incessantes, bem como pelo apoio e palavras de ânimo.

Agradeço a minha noiva Débora, pela compreensão de muitas vezes não lhe dar a atenção que tanto merece, e por ter aceitado a abdicação de passarmos tempo juntos, para que eu pudesse realizar esse trabalho, bem como pelo apoio ao corrigir e sugerir melhorias.

Aos professores do LARP, Renato, Martha e Osmar, que me receberam alegremente, me permitindo essa grande oportunidade de crescimento profissional e compartilharam comigo seus conhecimentos. Um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Osmar, que sempre estava disposto a me ajudar e fez seu papel com excelência.

Aos membros da banca Profa. Dra. Darliana e Profa. Dra. Magali pelas excelentes contribuições e comentários desta defesa de dissertação.

Aos meus colegas e amigos do LARP pelas diferentes manifestações de apoio, em especial a Pimperelli e ao Giovane. Gratidão às mãos voluntárias que apoiaram o desenvolvimento desse trabalho.

À UFSM e aos professores do Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ) pela contribuição essencial na minha formação.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS

AUTOR: Arthur Mateus Schreiber
ORIENTADOR: Osmar Damian Prestes

A canola tem sido usada como forragem verde para alimentação animal, adubação para condicionamento do solo e matéria-prima para extração de óleo. Além disso, tem sido empregada na alimentação humana, para uso industrial e, mais recentemente, para produção de biocombustível. A produção brasileira de canola tem crescido nas últimas duas décadas, o estado do Rio Grande do Sul responde por 98,7% da produção nacional do grão. No Brasil, há cerca de 20 agrotóxicos registrados para esta cultura. Atualmente, a canola não faz parte dos alimentos monitorados pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Por isso, é importante o desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos que permitam a determinação de resíduos de agrotóxicos de diferentes classes em canola. Portanto, essa pesquisa desenvolveu e validou um método analítico para determinação de 78 diferentes agrotóxicos em canola empregando o método QuEChERS e a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). O método foi validado obedecendo aos critérios de validação estabelecidos pela SANTE. O limite de quantificação para a maioria dos compostos foi de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o LOD de $3 \mu\text{g kg}^{-1}$. A maior parte dos agrotóxicos avaliados apresentaram recuperações entre 70 a 120% com RSD $\leq 20\%$. O método proposto foi aplicado em 21 amostras de canola cultivadas no estado do Rio Grande do Sul. Destas, 11 amostras apresentaram resíduos de agrotóxicos, sendo 72,7% agrotóxicos de uso não permitido no Brasil para esta cultura. O fungicida trifloxistrobina apresentou elevado valor de concentração ($0,26 \text{ mg kg}^{-1}$). Os resultados obtidos demonstram que o método proposto é adequado para a determinação de diferentes classes de agrotóxicos em canola.

Palavras-Chave: Preparo de amostra. Alimentos. Método multirresíduo. Cromatografia. Espectrometria de Massas

ABSTRACT

DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN CANOLA USING THE QuEChERS AND UHPLC-MS/MS METHOD

AUTHOR: Arthur Mateus Schreiber

ADVISOR: Osmar Damian Prestes

Rapeseed has been used as green fodder for animal feed, fertilizer for soil conditioning, and as a raw material for oil extraction. It has been used as human food, for industrial use, and more recently for the production of biofuel. The Brazilian production of canola has grown in the last two decades, the state of Rio Grande do Sul accounts for 98.7% of national production of the grain. In Brazil, there are about 20 pesticides registered for this crop. Currently, canola is not part of the foods monitored by the Pesticide Residue Analysis Program (PARA) of the National Health Surveillance Agency (ANVISA). Therefore, the development and application of analytical methods that allow the determination of pesticide residues of different classes in canola is important. Therefore, this research developed and validated an analytical method for the determination of 78 different pesticides in canola employing the QuEChERS method and ultra-high efficiency liquid chromatography coupled to serial mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The method was validated following the validation criteria established by SANTE (2021). The limit of quantification for most compounds was 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and the LOD was 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Most of the pesticides evaluated showed recoveries between 70 to 120% with RSD $\leq 20\%$. The proposed method was applied to 21 samples of canola grown in the state of Rio Grande do Sul. Of these, 11 samples presented pesticide residues, being 72.7% pesticides of not allowed use in Brazil for this crop. The fungicide trifloxystrobin presented a high concentration value (0.26 mg kg^{-1}). The results obtained demonstrate that the proposed method is suitable for the determination of different classes of pesticides in canola.

Keywords: Sample preparation. Food. Multiresidue method. Chromatography. Mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Percentual de propriedades rurais que utilizam agrotóxicos, por município.....	29
Figura 2 - Esquema do preparo de amostra utilizando o método Swedish.....	54
Figura 3 - Esquema representativo das diferentes versões do método QuEChERS utilizados neste trabalho.....	55
Figura 4 - Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução padrão 25 µg L ⁻¹ (extrato da matriz).....	62
Figura 5 - Extratos obtidos pela extração de agrotóxicos de canola utilizando o método Swedish A) sem LTP e B) com LTP.....	66
Figura 6 - Cromatogramas de íons totais obtido por GC-MS/MS a partir do branco da matriz submetida e não submetida a precipitação a baixa temperatura (LTP) seguido de <i>cleanup</i> para os ensaios: A) QuEChERS original; B) QuEChERS citrato; C) QuEChERS acetato.....	67
Figura 7 - Avaliação visual dos extratos obtidos, após secagem do extrato em corrente de nitrogênio, das versões do método QuEChERS original (a), acetato (b), citrato (c) e modificado (d).....	68
Figura 8 - Avaliação da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS (original, citrato, acetato e modificado) para os compostos Imazetapir, Imazapique e Difenconazol.....	70
Figura 9 - Avaliação da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS (original, citrato, acetato e modificado).....	70
Figura 10 - Número de compostos recuperados, 70-120% com RSD ≤20%, empregando diferentes sorventes por d-SPE.....	71
Figura 11 - Número de compostos recuperados, 70-120% com RSD ≤20%, empregando diferentes cartuchos por SPE.....	72
Figura 12 - Número de compostos recuperados, 70-120% com RSD ≤20%, empregando diferentes proporções de sílica por d-SPE.....	73
Figura 13 - Avaliação visual dos extratos obtidos, após a análise gravimétrica, utilizando o método QuEChERS modificado com e sem etapa de limpeza por d-SPE.....	74

Figura 14 - Comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis remanescentes utilizando QuEChERS modificado com e sem etapa de limpeza.....	75
Figura 15 - Método QuEChERS modificado otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em canola por UHPLC-MS/MS.....	76
Figura 16 - Avaliação da seletividade para comparação da amostra branco de canola e transição SRM para clorantraniliprole 25 µg L ⁻¹ preparada no extrato da matriz.....	77
Figura 17 - Percentual de recuperação versus log Kow de cada composto para os ensaios de exatidão nas concentrações 10, 25 e 50 µg kg ⁻¹	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo de óleo e proteína nas principais culturas oleaginosas.....	20
Tabela 2 - Classificação dos agrotóxicos de acordo com grau de toxicidade.....	25
Tabela 3 - Uso de agrotóxicos: quantidade total (em 1 mil toneladas).....	26
Tabela 4 - Vendas de ingredientes ativos de agrotóxicos (em 1 mil toneladas), conforme grau de periculosidade ambiental e por região.....	28
Tabela 5 - Agrotóxicos permitidos e Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos para o cultivo de canola pela ANVISA, <i>Codex Alimentarius</i> e União Européia.....	31
Tabela 6 - Aplicações empregando diferentes técnicas de preparo de amostra e cromatográficas para determinação de agrotóxicos em canola e matrizes semelhantes.....	39
Tabela 7 - Parâmetros de avaliação na validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos.....	42
Tabela 8 - Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.....	47
Tabela 9 - Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em canola por UHPLC-MS/MS.....	53
Tabela 10 - Ensaio empregando diferentes combinações de sorventes na etapa de limpeza do método QuEChERS.....	57
Tabela 11 - Ensaio variando-se as proporções de sílica visando melhor recuperação.....	58
Tabela 12 - Compostos avaliados por UHPLC-MS/MS com seus respectivos tempos de retenção, voltagem do cone, íon precursor e íons produtos utilizados na quantificação e identificação e energia de colisão.....	63
Tabela 13 - Resultados obtidos na etapa de validação do método QuEChERS para os parâmetros de validação LOQ, LOD, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz.....	78
Tabela 14 - Resultados em mg kg ⁻¹ das 11 amostras de canola que apresentaram resíduos de agrotóxicos utilizando o método QuEChERS modificado e UHPLC/MS-MS.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos (do inglês, <i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
C18	Octadecilsilano
Cotrijuí	Cooperativa Regional Triticola Serrana Ltda
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
d-SPE	Extração dispersiva em fase sólida (do inglês, <i>dispersive solid phase extraction</i>)
DL ₅₀	Dose Letal em 50% dos animais testados
EC	Energia de colisão
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (do inglês, <i>European Food Safety Authority</i>)
EM	Efeito matriz
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
eV	Elétron Volt
ESI	Ionização por eletrospray (do inglês, <i>electrospray ionization</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês, <i>Food and Agriculture Organization</i>)
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
GCB	Carbono grafitizado (do inglês, <i>Graphitized Carbon Black</i>)
GC-MS/MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (do inglês, <i>gas chromatography–mass spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)

K _{oc}	Coeficiente de adsorção normalizado pelo carbono orgânico
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
LARP	Laboratório de Análises de Resíduo de Pesticidas
LC	Cromatografia Líquida (do inglês, <i>liquid chromatography</i>)
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas em série (do inglês, <i>liquid chromatography with tandem mass spectrometry</i>)
LMR	Limite máximo de resíduo
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>limit of quantification</i>)
LTP	Precipitação a baixa temperatura (do inglês, <i>low temperature precipitation</i>)
m/z	Razão massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
Min	Minutos
MS	Espectrometria de massas (do inglês, <i>mass spectrometry</i>)
m/m	Razão massa/massa
NAFTA	Tratado Norte-Americano de Livre-Comércio (do inglês, North American Free Trade Agreement)
n.d.	Não detectado
NPC	Princípios ativos não permitidos para a cultura
OIT	Organização Internacional do Trabalho (do inglês, International Labour Organization)
ONU	Organização das Nações Unidas
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	Padrão de controle
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pka	Constante de dissociação ácida
PI	Padrão interno
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	Amina primária-secundária (do inglês, <i>Primary Secondary Amine</i>)

QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro (do inglês, <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i>)
r^2	Coeficiente de correlação
RS	Rio Grande do Sul
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, <i>relative standard deviation</i>)
RSDr	Desvio padrão relativo da repetibilidade (do inglês, <i>relative standard deviation</i>)
RSDpi	Desvio padrão relativo da precisão intermediária (do inglês, <i>relative standard deviation</i>)
S/N	Sinal/ruído
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Sinitox	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês, <i>solid-phase extraction</i>)
SRM	Monitoramento de reações selecionadas (do inglês, <i>selected reactions monitoring</i>)
TIC	Cromatograma total de íons (do inglês, <i>total ions chromatogram</i>)
t_r	Tempo de retenção
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida
TQ	Tripla Quadropolo
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (do inglês, <i>ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>)
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (do inglês, <i>United States Department of Agriculture</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>World Health Organization</i>)
V	Volts
v/v	Razão volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 A EVOLUÇÃO DA AGRICULTURA BRASILEIRA	18
2.1.1 Produção agrícola no Brasil	19
2.2 CANOLA	19
2.2.1 Origem e características gerais	19
2.2.2 Produção de canola e óleo de canola no Brasil e no Mundo	21
2.3 AGROTÓXICOS	23
2.3.1 Classificação dos agrotóxicos	23
2.3.2 Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos	25
2.3.3 A expansão da utilização dos agrotóxicos no Brasil	26
2.3.4 Fiscalização e Controle de Resíduos e Contaminantes no Brasil	29
2.3.5 Controle e uso de agrotóxicos na cultura de canola	31
2.3.6 Resíduos de agrotóxicos em alimentos e agravos à saúde	32
2.4 PREPARO DE AMOSTRAS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS	34
2.4.1 Preparo de amostra utilizando o método <i>Swedish</i>	35
2.4.2 Preparo de amostra utilizando método QuEChERS	36
2.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS	40
2.5.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série	40
2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	43
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS	44
3.3 COMPOSTOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO	45

3.4 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE.....	51
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS	51
3.7 SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA.....	52
3.7.1 Escolha da Fase Móvel	52
3.7.2 Condições do sistema UHPLC-MS/MS	53
3.8 AVALIAÇÃO DO MÉTODO <i>SWEDISH</i> PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA.....	54
3.9 AVALIAÇÃO DO MÉTODO <i>QuEChERS</i> PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA.....	55
3.9.1 Avaliação da eficiência de extração de cada uma das versões do método QuEChERS.....	55
3.9.2 Avaliação da influência da etapa de congelamento na remoção dos coextrativos do extrato da canola	56
3.9.3 Avaliação de diferentes sorventes na etapa de limpeza por d-SPE e SPE.....	56
3.9.4 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de limpeza.....	58
3.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUAL DE AGROTÓXICOS EM CANOLA.....	59
3.10.1 Seletividade	59
3.10.2 Curva analítica e linearidade.....	59
3.10.3 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ).....	60
3.10.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão	60
3.10.5 Precisão (repetitividade) e precisão intermediária	60
3.10.6 Efeito matriz.....	61
3.11 DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE CANOLA.....	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
4.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS.....	62

4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO <i>SWEDISH</i> PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA.....	65
4.3 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA.....	66
4.3.1 Avaliação da eficiência de extração das versões do método QuEChERS original, acetato, citrato e modificado.....	66
4.3.2 Avaliação de diferentes sorventes nas etapas de limpeza por d-SPE e SPE.....	71
4.3.3 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de extração.....	74
4.3.4 Método QuEChERS modificado otimizado.....	75
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE CANOLA.....	76
4.4.1 Seletividade.....	76
4.4.2 Curva analítica e linearidade.....	77
4.4.3 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ).....	82
4.4.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão.....	82
4.4.5 Precisão (repetitividade) e precisão intermediária.....	85
4.4.6 Efeito matriz.....	85
5 DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE CANOLA.....	87
6 CONCLUSÃO.....	90

1 INTRODUÇÃO

A canola (*Brassica napus* L. var. oleífera) é uma das principais oleaginosas no mundo. A canola tem sido usada como forragem verde para alimentação animal, adubação para condicionamento do solo e matéria-prima para extração de óleo, o qual tem sido empregado na alimentação humana (óleo comestível, margarina, maionese e outros derivados), para uso industrial (sabões e outros derivados) e, mais recentemente, para produção de biocombustível (MORI; TOMM; FERREIRA, 2014).

A composição química da canola varia amplamente e depende de fatores ambientais e genéticos. São encontrados teores de óleo que variam de 33,2% a 47,6%, teores de proteína na faixa de 29,5% a 57,5%, considerando uma umidade básica de 8,5%. De modo geral a canola contém duas vezes mais óleo que a soja e o seu farelo desengordurado possui um pouco menos de proteína (VASCONCELOS, 1998).

Nos últimos anos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série tem se destacado como técnica preferencial de determinação de diferentes grupos e espécies de compostos (MAY, *et al.*, 2017). Porém, a análise de matrizes complexas (por exemplo, com alto teor de gordura e proteínas), como é o caso dos grãos de canola, 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. O método QuEChERS (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged, safe*) é utilizado para uma diversidade de alimentos. A utilização deste método de preparo de amostra torna a análise mais fácil pela diminuição de interferentes da matriz, garantindo resultados mais confiáveis, além de possibilitar a análise de um grande número de compostos (FACCO, 2017).

Neste cenário, a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a determinação ampla de diferentes substâncias, em diferentes matrizes, é indispensável.

1.1 OBJETIVOS

Visando a obtenção das melhores condições de preparo de amostra, determinação cromatográfica e validação do método, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Otimizar as condições cromatográficas do sistema UHPLC-MS/MS visando a separação e determinação multirresíduo de agrotóxicos;
- Avaliar diferentes versões do método QuEChERS (original e modificações) visando encontrar as melhores condições de extração dos analitos selecionados;
- Avaliar o uso do método de extração *Swedish* (acetato de etila) visando encontrar as melhores condições de extração dos analitos selecionados;
- Avaliar diferentes sorventes na etapa de limpeza por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) e extração em fase sólida (SPE), visando minimizar a presença de coextrativos e aumentar a recuperação dos compostos avaliados;
- Validar o método desenvolvido de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Guia SANTE e INMETRO, avaliando: curva analítica, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção;
- Aplicar o método desenvolvido na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de canola cultivadas na região das Missões no Rio Grande do Sul (RS), empregando o método desenvolvido e validado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A EVOLUÇÃO DA AGRICULTURA BRASILEIRA

Nas décadas de 1960 e 1970, o Brasil vivia processos de industrialização e urbanização e de forte crescimento econômico. Porém, estes processos não encontravam correspondência no setor agrícola do país, caracterizado pela baixa produtividade. Parte considerável do abastecimento interno de alimentos provinha das importações (EMBRAPA, 2021). No entanto, ao longo dos últimos cinquenta anos, o uso intensivo de ciência e tecnologia resultou em ganhos acentuados de produtividade. A inovação apoiada nas transformações locais e nas mudanças institucionais, foi essencial para o Brasil se tornar um dos maiores exportadores de alimentos do mundo (FILHO & FISHLOW, 2017).

Como resultado dos esforços empreendidos pelo governo, pelas instituições de ciência e tecnologia, pelos agentes públicos e privados do setor e especialmente pelos produtores rurais, acentuados ganhos de produtividade no setor agrícola puderam ser observados (EMBRAPA, 2021). Em relação as alterações tecnológicas, a primeira e importante mudança foi à mecanização de diversas atividades agrícolas e a consequente substituição da mão-de-obra pela maquinaria. A segunda mudança foi a introdução, a partir de 1930, dos agrotóxicos e fertilizantes químicos, intensificando sua utilização induzida pela revolução verde. A terceira e importante mudança foi a introdução da biotecnologia, destacando-se o uso de organismos geneticamente modificados (transgênicos) (OIT, 2001).

A chamada revolução verde iniciada em meados de 1960 levou à pesquisa e ao desenvolvimento de sistemas modernos de produção agrícola. Como resultado, houve a incorporação de pacotes tecnológicos visando maximizar a capacidade potencial das culturas para criar condições ecológicas ideais, afastar os inimigos naturais através do uso de agrotóxicos e, por outro lado, fornecer nutrientes através da fertilização sintética. O uso de agrotóxicos e fertilizantes, combinado com o desenvolvimento genético de sementes, levou à revolução verde, um amplo programa para aumentar a produção agrícola mundial (BARROS, 2010). Segundo Conway (2003), sem o advento da revolução verde, a quantidade de pobres e famintos hoje seria bem maior. De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), o número de pessoas, em 2025, dependentes de alimentos provenientes do meio rural no

mundo será de 7,9 bilhões. Esta necessidade crescente faz com que o processo de produção agrícola esteja, cada vez mais, submetido a fortes mudanças tecnológicas, visando à produtividade (JOBIM *et al.*, 2010).

2.1.1 Produção agrícola no Brasil

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2021), no décimo segundo levantamento da safra de grãos de 2020/21, o volume de produção de grãos no país é estimado, atualmente, em 252,3 milhões de toneladas. Apresentando uma redução de 1,8% em comparação com a safra 2019/20, a qual atingiu um total de 257,8 milhões de toneladas de grãos.

Em relação à distribuição da produção pelas Unidades da Federação, o Mato Grosso lidera como o maior produtor nacional de grãos, com uma participação de 28,2%, seguido pelo Rio Grande do Sul (14,9%), Paraná (13,5%), Goiás (9,3%), Mato Grosso do Sul (7,7%) e Minas Gerais (6,1%), que, somados, representaram 79,7% do total nacional (IBGE, 2021).

2.2 CANOLA

2.2.1 Origem e características gerais

A canola (*Brassica napus* L. var. oleífera) é uma das principais oleaginosas no mundo. Pertencente à família das Crucíferas, do gênero *Brassica*, têm como principais características serem herbáceas, anuais, e em sua maioria, com folhas inteiras e compostas, alternas e sem estípulas. Os frutos são síliquas (frutos secos) com cerca de 5,0 cm de comprimento, podendo variar segundo a cultivar ou híbrido, cujo interior se encontram as sementes. As sementes são esféricas, variando de 2,0 a 3,5 mm de diâmetro e, quando maduras, apresentam coloração marrom escura (BENNETT, 2001).

O nome "Canola" foi inicialmente registrado pela Associação dos Esmagadores de Oleaginosas do Oeste Canadense para se referir ao óleo com 5% ou menos de ácido erúico (ácido graxo ω -9 monoinsaturado), e 3 mg L⁻¹ ou menos, dos glucosinolatos encontrados normalmente no farelo (CANOLA COUNCIL OF CANADA, 2022a).

Os grãos de canola possuem em torno de 24 a 27% de proteína e, em média, 38% de óleo, conforme demonstrado na Tabela 1, a qual correlaciona os teores de óleo e proteína presentes nas principais plantas oleaginosas.

Tabela 1 - Conteúdo de óleo e proteína nas principais culturas oleaginosas.

Planta oleaginosa	Teor de óleo (%)	Teor de proteína (%)
Mamona	45-50	29
Girassol	40-45	28
Amendoim	40-45	26
Gergelim	40-50	18
Canola	38-40	26
Dendê	18-22	7
Soja	18-20	38
Algodão	15-20	27
Pinhão Manso	30-39	15
Babaçu (amêndoa)	60-66	2

Fonte: Adaptado de CONAB (2014)

A canola é o resultado do melhoramento genético da colza (*Brassica napus* L.). A história sugere que a colza era cultivada na Índia em 2.000 A.C e que foi introduzida na China e no Japão no início da era cristã (CANOLA COUNCIL OF CANADA, 2022b). Segundo Dias (1992), existem relatos da introdução do grão no Japão, por meio da China ou Península Coreana, há cerca de dois mil anos. A cultura era usada como hortaliça, no século VI, e seu óleo era usado pelas civilizações orientais e do mediterrâneo em lamparinas (para iluminação) e na fabricação de sabões no século XIV.

As pesquisas e o cultivo de canola no Brasil foram iniciados em 1974, em Ijuí (noroeste do Estado do Rio Grande do Sul), resultado de acordo de cooperação entre a Cooperativa Regional Triticola Serrana Ltda (Cotrijuí) e a Universidade de Göttingen, Alemanha. Os trabalhos com a nova cultura procuravam diversificar as opções para a região, visto que a produção agropecuária da região se baseava nas monoculturas de trigo ou soja (EMBRAPA, 2019). No Brasil, hoje, se cultiva apenas canola de primavera, da espécie *Brassica napus* L.var. oleifera, que foi desenvolvida por melhoramento genético convencional da colza, grão que apresentava teores mais elevados de ácido erúico e de glucosinolatos (EMBRAPA, 2007).

A canola tem sido usada como forragem verde para alimentação animal, adubação para condicionamento do solo e matéria-prima para extração de óleo, o qual

tem sido empregado na alimentação humana (óleo comestível, margarina, maionese e outros derivados), para iluminação (lâmparina à base de óleos vegetais), para uso industrial (sabões e outros derivados) e, mais recentemente, para produção de biocombustível. O farelo de canola, coproduto sólido da extração de óleo, é usado como suplemento proteico na formulação de rações para animais. A planta é considerada melífera e sua floração ocorre no período final de inverno, época de floração escassa de outros vegetais (EMBRAPA, 2014).

2.2.2 Produção de canola e óleo de canola no Brasil e no Mundo

De acordo com o levantamento realizado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, do inglês *United States Department of Agriculture*) (2022), a produção mundial de óleos vegetais tem crescido nos últimos 50 anos, passando de 23,58 milhões de toneladas, na safra 1972/1973, para 213,91 milhões de toneladas, na safra 2021/2022 (USDA, 2022), apresentando um acréscimo superior a 907%. Observou-se que até o final dos anos 1960, o óleo de canola figurava como o terceiro óleo vegetal mais produzido no mundo, antecedido pelos óleos de soja e de coco. Entre os anos de 1969 e 1985, o óleo de canola perdeu importância relativa para outros óleos (algodão, girassol e palma/dendê), oscilando sua posição como 4º a 6º lugar em termos de oferta. A partir do final da década de 1980, e até presente momento, o óleo de canola voltou a assumir a terceira posição, após os óleos de palma/dendê e de soja.

A produção do óleo de canola aumentou de 2,45 milhões de toneladas, safra 1972/1973, para 27,87 milhões de toneladas, na safra 2021/2022 (USDA, 2022), representando 13,03% da produção mundial de óleos vegetais. O farelo de canola apresenta a segunda maior produção, 11,09%, depois do farelo de soja, que representa 71,10% de todo farelo produzido mundialmente dentre os farelos e farinhas destinados à alimentação animal (USDA, 2022). Nas últimas cinco décadas, a área colhida de canola no mundo variou de 6,73 (safra 1968/1969) a 38,0 milhões de hectares (safra 2021/2022) (USDA, 2022).

De acordo com o levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2022), a produção brasileira de canola tem crescido nas últimas duas décadas, passando de 40 mil toneladas, na safra 1999/2000, para 54,7 mil toneladas, na safra 2021/2022, apresentando um aumento de 36%. Na safra

2021/2022, o Estado do Rio Grande do Sul respondeu por 98,7% da produção e o Paraná, 1,3%, com rendimento de grãos médio de 1.399 kg/ha. Embora dados estatísticos oficiais somente registrem informações destes dois estados, outros trabalhos apontam cultivo em estados como Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Santa Catarina, São Paulo, Goiás e Minas Gerais (TOMM, 2005; DE MORI *et al.*, 2014).

Segundo a Associação Brasileira dos Produtores de Canola (ABRASCANOLA, 2022) no Rio Grande do Sul as regiões noroeste e das missões no último respondeu por 51% da produção de canola no Estado. Dos 35 mil hectares semeados com canola no Estado, 18 mil estavam nessa região, que contempla municípios das Missões, entre elas São Luiz Gonzaga e do entorno de Santa Rosa.

O óleo de canola é considerado um alimento saudável, pois apresenta elevada quantidade de ômega-3, ácido docosa-hexaenoico, vitamina E, gorduras monoinsaturadas e o menor teor de gordura saturada de todos os óleos vegetais (EMBRAPA, 2022a). O principal destino brasileiro da produção de óleo de canola é para o consumo humano. No cenário mundial, o óleo de soja representa 30% do consumo, enquanto o óleo de canola fica com 14% da fatia do mercado, segundo o levantamento feito pela EMBRAPA (2022b), no ano de 2019.

O maior mercado consumidor do óleo de canola está na Europa, onde a conscientização com o consumo de alimentos saudáveis é crescente, assim como o nível de exigência do consumidor (EMBRAPA, 2022b). O consumo per capita de óleo de canola no Brasil, estimado pelo IBGE (2012) em 2008-2009, foi de 0,064 kg/habitante/ano, valor bastante inferior ao consumo estimado de óleo de soja de 6,34 kg/habitante/ano. O óleo de canola representou 0,9% do consumo per capita de óleo no Brasil (estimado em 7,1kg/habitante/ano). As regiões sul (0,11 kg/habitante/ano) e sudeste (0,098 kg/habitante/ano) apresentaram maior consumo per capita e representou 1,35% e 1,30% do consumo per capita de óleos, respectivamente. O estado de Mato Grosso apresentou o maior consumo per capita, 0,204 kg/habitante/ano, seguido dos estados de Santa Catarina (0,163 kg/habitante/ano), São Paulo (0,119 kg/habitante/ano), Paraná (0,099 kg/habitante/ano) e Rio de Janeiro (0,093 kg/habitante/ano). Seu consumo limitado está condicionado pelo preço do produto, baixos volumes de produção e dificuldades de distribuição logística (EMBRAPA, 2014).

2.3 AGROTÓXICOS

Se por um lado os avanços na agricultura geram crescimento econômico, por outro tem riscos potenciais ao ambiente e à saúde humana. Entre esses riscos, se incluem efeitos prejudiciais associados ao uso massivo e crônico de agrotóxicos.

A Lei Federal nº 7.802, de 11/07/1989, regulamentada pelo Decreto nº. 4.074, de 04/01/2002, em seu artigo 2º, inciso I, define o termo “agrotóxico” como sendo:

Os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas, de culturas florestais e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Segundo o *Codex Alimentarius* (2001), toda substância capaz de controlar, prevenir, destruir ou repelir qualquer tipo de praga, durante qualquer etapa do processo produtivo, de armazenagem, estocagem ou distribuição de alimentos e rações ou ainda, qualquer substância que possa ser administrada como controle de parasitas externos, é chamada de agrotóxico.

Para a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (2012) os agrotóxicos são substâncias pertencentes a uma ampla classe de compostos bioativos empregados principalmente na produção de alimentos, os quais possuem funções básicas de prevenir, controlar e destruir pragas de origem animal, vegetal ou microbiológica que, de um modo ou outro, afetam a produção e o armazenamento de alimentos.

2.3.1 Classificação dos agrotóxicos

Segundo o Decreto nº 4.074 (BRASIL, 1989), os agrotóxicos devem ser divididos em classes, com o intuito de diferenciá-los em função da sua utilização, seu modo de ação e potencial. Segundo BAIRD E CANN (2011), as classificações dos agrotóxicos quanto ao seu emprego são:

Inseticidas: combatem os insetos.

Herbicidas: combatem as plantas daninhas.

Fungicidas: combatem os fungos.

Acaricidas: combatem os ácaros.

Moluscocidas: combatem os moluscos.

Rodenticidas: combatem os roedores.

Bactericidas: combatem as bactérias.

Outra classificação refere-se à classificação química, sendo as principais:

Organoclorados: De acordo com a estrutura molecular, correspondem a hidrocarbonetos clorados, ainda que, além do cloro, alguns deles possuam oxigênio. São derivados do clorobenzeno, do ciclohexano e/ou do ciclodieno. Foram muito utilizados na agricultura como inseticidas, porém seu emprego tem sido progressivamente restringido ou mesmo proibido (BAIRD, 2002).

Organofosforados: Estes foram os primeiros a substituírem os representantes do grupo dos organoclorados. Quanto a sua estrutura molecular, são ésteres, amidas ou derivados tiol dos ácidos de fósforo. São compostos biodegradáveis e, portanto, apresentam curta persistência no solo (JOKANOVIC, 2001).

Carbamatos: São agrotóxicos orgânicos derivados do ácido carbâmico e podem ser inseticidas, herbicidas ou fungicidas. Geralmente, são compostos instáveis e vários fatores influenciam sua degradação, como umidade, temperatura, luminosidade e volatilidade (BARBOSA, 2004).

Triazinas: Estão entre os herbicidas mais largamente empregados na pré-emergência ou pós-emergência de ervas daninhas, interferindo no processo de fotossíntese e impedindo o seu desenvolvimento (SILVA *et al.*, 2014).

Piretróides: São compostos sistêmicos extraídos do crisântemo. São muito utilizados para o controle de insetos. Os piretróides sintéticos tem boa estabilidade sob a luz e a temperatura ambiente. Degradam-se por hidrólise e oxidação (ANVISA, 2005).

A classificação dos agrotóxicos em função dos efeitos à saúde, decorrentes da exposição humana a esses agentes, pode resultar em diferentes classes toxicológicas, sumarizadas na Tabela 2. Essa classificação obedece ao resultado de testes ou estudos realizados em laboratórios, que visam estabelecer a dosagem letal (DL) do agrotóxico em 50% dos animais utilizados naquela concentração, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2021a).

Tabela 2 - Classificação dos agrotóxicos de acordo com grau de toxicidade.

Classe Toxicológica	Toxicidade	DL ₅₀ (mg kg ⁻¹)	Cor da faixa
I	Extremamente tóxico	< 5	Vermelho
II	Altamente tóxico	5 - 50	Vermelho
III	Mediamente tóxico	50 - 500	Amarelo
IV	Pouco tóxico	500 - 5000	Azul
V	Improvável de causar dano	-	Azul
Não classificado	Não classificado	-	Verde

Leia-se: DL₅₀ – Dose letal. Fonte: Adaptado de ANVISA (2021a)

2.3.2 Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos

O conhecimento das propriedades físico-químicas, bem como a estrutura e massa molecular são fundamentais para realizar estudos sobre a dinâmica dos agrotóxicos. Estas propriedades são responsáveis pela volatilização ou mobilidade destas substâncias (SPADOTTO *et al.*, 2010).

Dentre as propriedades físico-químicas podemos citar: a solubilidade em água, indicando a tendência do agrotóxico em ser transportado junto com a água. A constante de dissociação ácida do composto (pK_a), revela informações a respeito da forma pela qual o mesmo se encontra através da relação com o pH do meio (BARCELÓ & HENNION, 2003; CALDAS *et al.*, 2001).

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), também representado como Log K_{ow} ou Log P, representa o grau de hidrofobicidade de uma substância. O tempo de meia vida (t_{1/2}) de um composto fornece informações sobre a possibilidade de persistência do mesmo nos diferentes compartimentos (BARCELÓ & HENNION, 2003; CALDAS *et al.*, 2001).

2.3.3 A expansão da utilização dos agrotóxicos no Brasil

O uso de agrotóxicos no Brasil cresceu substancialmente a partir do início dos anos 1990, em proporção relativamente próxima à dos demais países do Mercosul, mas superior à de outros grandes produtores agrícolas. A Tabela 3 contém números absolutos da quantidade de agrotóxicos utilizados no período 1991-2015, observando-se que o Brasil esteve entre os que mais ampliaram o seu consumo. Foram selecionadas as dez maiores economias do mundo, além dos demais países do Mercado Comum do Sul (Mercosul), BRICS e Tratado Norte-Americano de Livre Comércio (Nafta) (MORAES, 2019).

Tabela 3 - Uso de agrotóxicos: quantidade total (em 1 mil toneladas).

	1991	1995	1999	2003	2007	2011	2015	% sob total mundial (2015)
Argentina	26	41	63	63	77	112	208	5,10%
Brasil	58	93	129	181	285	345	375	9,20%
Paraguai	3	11	7	15	25	35	27	0,70%
Uruguai	2	3	4	7	12	19	17	0,40%
África do Sul	17	18	26	27	27	27	27	0,70%
China	787	1.079	1.287	1.351	1.620	1.792	1.787	43,60%
Índia	73	60	47	40	26	50	56	1,40%
Canadá	29	32	42	35	45	66	76	1,80%
Estados Unidos	396	427	429	420	391	391	408	9,90%
México	27	27	27	16	47	52	46	1,10%
Japão	80	80	80	68	62	54	53	1,30%
Alemanha	31	29	33	35	41	43	47	1,10%
França	95	90	107	78	76	62	71	1,70%
Itália	93	80	82	88	78	68	61	1,50%
Reino Unido	30	34	35	31	22	17	19	0,50%
Mundo	2.290	2.675	3.034	3.150	3.583	3.953	4.098	

Fonte: Adaptado de MORAES (2019).

Como referência, o Brasil consumia em 1991 cerca de sete vezes menos agrotóxicos que os Estados Unidos, enquanto em 2015 as quantidades no Brasil e nos Estados Unidos foram próximas, cada um respondendo por cerca de 10% do consumo mundial. Esta tendência é reforçada pelo fato de que o consumo tem diminuído em vários países desenvolvidos, aumentando a importância relativa do mercado brasileiro (MORAES, 2019).

Ao longo deste período ocorreram mudanças substanciais em termos da dimensão da produção agrícola e extensão das áreas cultivadas. Foi em parte o crescimento nestas dimensões que levou à expansão do consumo de agrotóxicos no Brasil. Segundo dados apresentados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization*) sobre a taxa de aplicação de agrotóxicos por área cultivada, indicam que o Brasil esteve entre os que mais intensificaram o uso de agrotóxicos. Para cada hectare de área cultivada, a quantidade aplicada aumentou cerca de quatro vezes no período entre 1991 e 2015 (MORAES, 2019).

No início de 2019, existiam no Brasil cerca de 13.300 registros de produtos formulados para uso como agrotóxicos (AENDA, 2019). Em termos de ingredientes ativos, em agosto de 2022, haviam 486 ingredientes ativos cujo uso é autorizado no Brasil para 153 diferentes culturas. A aplicação é concentrada em algumas lavouras, como: soja, milho e cana-de-açúcar, as quais responderam por cerca de três quartos do total de agrotóxicos consumidos no Brasil (ANVISA, 2021b).

As regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste apresentam as maiores percentagens no uso de ingredientes ativos de agrotóxicos e conseqüentemente são as regiões que possuem maior quantidade de agrotóxicos vendidos, de acordo com um levantamento realizado entre os anos de 2016 e 2020 pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2022).

A Tabela 4 apresenta a relação entre as regiões do Brasil e a quantidade de agrotóxicos vendidos, levando em consideração a classe toxicológica. Observa-se que o crescimento do uso de produtos extremamente tóxicos e de alta toxicidade (classes I e II) foi maior em 2020, pois houve um aumento de 58,9% em relação a 2016, enquanto o uso de produtos de média e pouca toxicidade (classes III e IV) cresceu 9,8%. Atualmente, cerca de um terço dos agrotóxicos consumidos no país são de extrema ou alta toxicidade (IBAMA, 2022).

Ao se comparar as diferentes regiões do país, nota-se como algumas responderam proporcionalmente mais pelo crescimento do uso de agrotóxicos de classe toxicológica I e II do que outras. Nas três regiões que mais consomem agrotóxicos no Brasil, o crescimento, foi maior no Centro-Oeste (83,3%), seguido do Sudeste (35,9%) e Sul (35,2%).

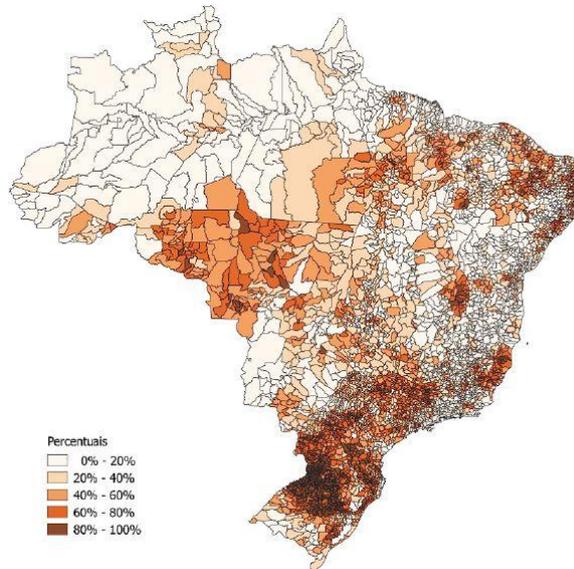
Tabela 4 - Vendas de ingredientes ativos de agrotóxicos (em 1 mil toneladas), conforme grau de periculosidade ambiental e por região.

classe toxicológica	região	2016	2017	2018	2019	2020
I e II	Centro-Oeste	58,1	61,6	67,6	89,1	106,5
	Sudeste	42,6	42,1	44,3	53,6	57,9
	Sul	37,5	38,4	37,8	48,8	50,7
	Nordeste	15,1	16,6	18,8	23,1	27,3
	Norte	6,4	7,9	7,0	8,1	11,4
	Total	159,7	166,6	175,5	222,7	253,8
III e IV	Centro-Oeste	120,5	116,9	110,0	120,8	130,7
	Sudeste	77,6	66,4	82,7	87,7	85,7
	Sul	102,8	105,4	95,9	101,6	103,8
	Nordeste	29,7	33,5	29,8	32,9	36,7
	Norte	16,2	19,9	15,9	18,1	23,1
	Total	346,8	342,1	334,3	361,1	380,0
Total	506,5	508,7	509,8	583,8	633,8	

Fonte: IBAMA (2022)

A Figura 1 contém dados de uso de agrotóxicos por município no ano de 2019, indicando o percentual de propriedades rurais em que agrotóxicos foram utilizados. Observa-se que o uso intensivo ocorre não apenas em áreas de grandes propriedades (Mato Grosso e Rondônia, por exemplo), mas também onde prevalecem propriedades de menores dimensões (Paraná, Santa Catarina e partes do Rio Grande do Sul, por exemplo).

Figura 1 - Percentual de propriedades rurais que utilizam agrotóxicos, por município.



Fonte: MORAES (2019)

2.3.4 Fiscalização e Controle de Resíduos e Contaminantes no Brasil

Segundo a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*), o risco que os agrotóxicos oferecem ao homem através da alimentação, devido ao consumo diário, determinou a exigência de Limites Máximos de Resíduos (LMR) (EFSA, 2022). Devido a isto, vários países adotaram programas de monitoramento dos níveis de resíduos de agrotóxicos, a fim de garantir a segurança dos alimentos (STEPAN *et al.*, 2005).

O LMR é definido, pelo *Codex Alimentarius*, como a concentração máxima do resíduo de um agrotóxico (expresso em mg kg^{-1}) legalmente permitido em alimentos e rações para animais (CODEX ALIMENTARIUS, 2010). O IDA (Ingestão Diária Aceitável) é um parâmetro de segurança definido como a quantidade máxima de agrotóxico que podemos ingerir por dia, durante toda a nossa vida, sem que soframos danos à saúde por esta ingestão. A quantidade máxima de ingestão permitida é calculada para cada agrotóxico, e a medida expressa em miligramas de agrotóxico por quilo de peso corpóreo da pessoa que o ingere (ANVISA, 2022b).

Internacionalmente, procedimentos de avaliação de risco são conduzidos pelos comitês científicos da Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) e da FAO para subsidiar o estabelecimento de padrões alimentares pelo *Codex Alimentarius* (JARDIM e CALDAS, 2009).

No Brasil, de acordo com a Lei 7.802/1989 e com o Decreto 4.074/2002, compete ao Ministério da Saúde, através da ANVISA, estabelecer o LMR de agrotóxicos nos alimentos. Quando não houver limites estabelecidos, adota-se o limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius*, principalmente nas ações de comércio entre os países do MERCOSUL (BRASIL, 2021). A ANVISA é responsável pelo processo de registro de aditivos, agrotóxicos e medicamentos veterinários e pela condução de avaliação de risco da exposição humana a estas substâncias e a contaminantes em alimentos. O monitoramento dessas substâncias é coordenado pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Esta é uma ação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), coordenado pela ANVISA em conjunto com os órgãos estaduais e municipais. O PARA foi criado em 2001 como um projeto, com o objetivo de estruturar um serviço para avaliar e promover a segurança dos alimentos em relação aos resíduos de agrotóxicos. Em 2003, o projeto transformou-se em programa, através da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 119 de 19 de maio de 2003, e passou a ser desenvolvido anualmente no âmbito do SNVS (ANVISA, 2022a). Nesse contexto, os resultados do PARA permitem: verificar se os alimentos comercializados no varejo apresentam níveis de resíduos de agrotóxicos dentro dos LMRs estabelecidos pela ANVISA; conferir se os agrotóxicos utilizados estão devidamente registrados no país e se foram aplicados somente nas culturas para as quais estão autorizados; estimar a exposição da população a resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal e, conseqüentemente, avaliar o risco à saúde dessa exposição (ANVISA, 2014).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) tem como função inspecionar e fiscalizar a qualidade dos produtos de origem vegetal produzidos em todo o território nacional. São monitorados produtos de origem vegetal destinados ao mercado interno e à exportação. Dentro do subprograma de monitoramento existe o subprograma de investigação, que investiga os produtos não conformes a partir das informações obtidas pelo monitoramento dos resíduos e contaminantes no país. O programa também fiscaliza os ingredientes ativos de uso proibido no país e os não registrados para determinada(s) cultura(s), além de violações aos limites máximos nacionais (MAPA, 2022).

2.3.5 Controle e uso de agrotóxicos na cultura de canola

No Brasil, a ANVISA estabelece valores de LMRs para 13 agrotóxicos em canola, enquanto o *Codex Alimentarius* e União Europeia possui limites estabelecidos para 37 compostos. Esta cultura não faz parte dos alimentos monitorados nos programas PARA e PNCRC. A Tabela 5 apresenta os agrotóxicos permitidos para uso no cultivo de canola e os respectivos LMRs estabelecidos pela ANVISA, *Codex Alimentarius* e União Européia.

Tabela 5 - Agrotóxicos permitidos e Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos para o cultivo de canola pela ANVISA, *Codex Alimentarius* e União Européia.

composto	(Continua)		
	ANVISA (mg kg ⁻¹)	União Europeia (mg kg ⁻¹)	<i>Codex Alimentarius</i> (mg kg ⁻¹)
Azoxistrobina	-	0,50	0,50
Carbendazim	-	0,10	0,05
Carbofurano	-	0,02	0,05
Ciantraniliprole	-	0,80	0,80
Ciproconazol	-	0,40	0,40
Cletodim	0,05	1,00	0,50
Clorantraniliprole	-	2,00	2,00
Difenoconazol	-	0,50	0,15
Diflubenzurom	0,20	0,01	-
Etofenproxi	0,40	0,05	0,01
Fenbuconazol	-	0,05	0,05
Fluasifope-P-Butílico	0,02	9,00	-
Flusilazol	-	0,01	0,10
Flutriafol	-	0,50	0,50
Fluxapiroxade	0,20	0,90	-
Imazapique	-	0,05	0,05
Imazapir	-	0,05	0,05
Imazetapir	-	-	0,10
Imidacloprido	-	0,10	0,05
Lufenurom	0,02	0,01	-
Metalaxil-M	0,01	0,02	-
Metiocarbe	-	0,10	0,05
Metomil	-	0,01	0,05
Piraclostrobina	0,20	0,20	-
Procloraz	-	0,30	0,70
Profenofós	0,05	0,02	-

composto	ANVISA (mg kg ⁻¹)	União Europeia (mg kg ⁻¹)	(Conclusão)
			<i>Codex Alimentarius</i> (mg kg ⁻¹)
Propiconazol	-	0,05	0,02
Protioconazol	-	0,15	0,10
Quincloraque	-	0,02	0,15
Saflufenacil	-	0,60	0,60
Tebuconazol	-	0,15	0,30
Tebufenozida	-	2,00	2,00
Teflubenzurom	2,00	0,02	-
Tiacloprido	-	0,60	0,20
Tiofanato-metílico	0,01	0,10	-

Fonte: ANVISA (2022b); EUROPEAN COMMISSION (2022);
CODEX ALIMENTARIUS (2022).

2.3.6 Resíduos de agrotóxicos em alimentos e agravos à saúde

No último levantamento do Programa PARA, do primeiro ciclo do Plano Plurianual 2017-2020, foram analisadas 4.616 amostras de 14 alimentos de origem vegetal representativos da dieta da população brasileira: abacaxi, alface, alho, arroz, batata-doce, beterraba, cenoura, chuchu, goiaba, laranja, manga, pimentão, tomate e uva. Foram pesquisados um total de 270 agrotóxicos (ANVISA, 2022c). Do total de amostras analisadas, 3.544 (77%) foram consideradas satisfatórias quanto aos agrotóxicos pesquisados, sendo que em 2.254 (49%) não foram detectados resíduos, e 1.290 (28%) apresentaram resíduos com concentrações iguais ou inferiores ao LMR, estabelecido pela ANVISA. Foram consideradas insatisfatórias 1.072 amostras (23%) em relação à conformidade com o LMR (ANVISA, 2022c).

Dentre as amostras consideradas insatisfatórias, foram encontrados três tipos de irregularidades: em 5,4% das amostras foram encontrados ingredientes ativos em concentração acima do LMR estabelecido pela ANVISA; em 20,4% foram encontrados ingredientes ativos não permitidos para a cultura e em 0,9% das amostras foram detectados a presença de ingrediente ativo proibido para a cultura (ANVISA, 2022c).

O uso de um ou mais agrotóxicos em culturas para as quais eles não estão autorizados, sobretudo daqueles em fase de reavaliação ou de descontinuidade programada devido à sua alta toxicidade, apresenta consequências negativas na saúde humana e ambiental (DOSSIÊ ABRASCO, 2015).

As primeiras informações sobre problemas de saúde causados por agrotóxicos no Brasil datam de 1950, quando foram constatados na região de Presidente Prudente, pelo Instituto Biológico da Secretaria Estadual de Agricultura, casos de doenças em agricultores de algodão. Com a implantação, a partir dos anos 80, dos Centros de Controle de Intoxicações em vários estados brasileiros, as notificações de agravos causados pelos agrotóxicos passaram a ser mais sistematizadas, constituindo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, coordenado pela Fundação Oswaldo Cruz do Ministério da Saúde (TRAPÉ, 2007).

Mesmo que alguns dos ingredientes ativos possam, com base em seus efeitos agudos, ser classificados como medianamente ou pouco tóxicos, não se pode perder de vista os efeitos crônicos que podem ocorrer meses, anos ou até décadas após a exposição, manifestando-se em várias doenças como câncer, má-formações congênitas, distúrbios endócrinos, neurológicos e mentais (DOSSIÊ ABRASCO, 2015).

A exposição aos agrotóxicos pode ocorrer pelas vias dérmica, oral e respiratória, sendo a alimentação a principal forma de exposição da população geral (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009). Todavia, casos de exposição mais intensa, em geral, ocorrem entre indivíduos ocupacionalmente expostos (SILVA *et al.*, 2005), entre os quais se destacam: os trabalhadores da agricultura e pecuária, agentes de controles de endemias, trabalhadores de empresas desinsetizadoras, trabalhadores de transporte e comércio dos agrotóxicos e trabalhadores de indústrias de formulação de agrotóxicos (LONDRES, 2012).

A exposição aos agrotóxicos pode gerar efeitos agudos, subagudos, subcrônicos e crônicos. A intoxicação aguda ocorre após exposição a uma dose elevada desses compostos por um período de até 24 horas, com o surgimento dos efeitos imediatamente após o contato ou depois de alguns dias (KLAASSEN, 2013). Entre os sintomas gerais de intoxicação aguda estão: tontura, fraqueza, cólicas abdominais, irritação nos olhos, visão turva, dor de cabeça, irritabilidade, cansaço, dormência, coceira na pele, diarreia, falta de apetite, enjoo, vômito, tremores, convulsão, falta de ar e aceleração dos batimentos cardíacos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 1996).

Em um levantamento realizado pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), entre 2007 e 2017, houve um aumento de 117% dos casos notificados no SINAN de intoxicação exógena por agrotóxicos, sendo que o total

acumulado no período alcançou 54.914 casos. Entre os Estados que mais notificaram casos de intoxicação exógena por agrotóxicos, no período observado, foram Paraná (8.954 casos), São Paulo (7.731 casos), Minas Gerais (6.830 casos) e Pernambuco (4.801 casos) (BRASIL, 2022).

2.4 PREPARO DE AMOSTRAS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é um desafio, devido às baixas concentrações dos analitos ($\mu\text{g kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g L}^{-1}$) que apresentam distintas propriedades físico-químicas. Associada a estas características, a complexidade das matrizes (presença de gordura, açúcar, proteína, pigmentos, etc), faz com que ocorra a necessidade de uma etapa prévia de preparo da amostra (HERCEGOVÁ *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008). Trabalhar com estas amostras, como é o caso da canola, torna-se um desafio, tendo em vista o desenvolvimento de método multirresíduo. Portanto, para o desenvolvimento do método faz-se necessário uma avaliação destes compostos, bem como, das características da matriz, visando a obtenção um procedimento rápido que seja eficiente na extração dos analitos de interesse e na eliminação das interferências.

Na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos, o preparo de amostra 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 que afetam o sistema de análise. Nos últimos anos, ocorreu um rápido desenvolvimento de novos métodos analíticos. Estes avanços tiveram como objetivo a substituição dos métodos tradicionais, que apresentavam como características a morosidade de suas diversas etapas, emprego de grandes volumes de solvente, alto custo, etc. (CABRERA, 2012).

Os LMRs estabelecidos para resíduos e contaminantes presentes nos alimentos estão, em geral, diminuindo devido a exigência dos consumidores e órgãos governamentais por alimentos de melhor qualidade. Por este motivo são necessários métodos mais sensíveis e confiáveis, com menores limites de detecção, capazes de melhorar a avaliação de risco da presença de agrotóxicos nos alimentos, fornecendo maior proteção para o consumidor (RIDGWAY *et al.*, 2007).

A partir da busca por métodos mais eficientes para extração e determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras com alto teor de gordura, tem-se avaliado pela comunidade científica diferentes formas de preparo da amostra. Liu e colaboradores (2012) desenvolveram um método de uma etapa baseado na dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) para a determinação simultânea de resíduos de 15 agrotóxicos organofosforados em óleo de camélia. O limite de detecção do método foi de $0,005 \mu\text{g g}^{-1}$.

Chung & Chan (2010) desenvolveram método multirresíduo para determinação de resíduos de organofosforados (49) e carbamatos (24) em queijo e ovos, utilizando hexano/acetona (2:1, v/v) como solvente extrator, e etapa de limpeza por d-SPE utilizando PSA, com determinação por LC-MS/MS. O limite de detecção do método foi de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Eyring, Hermann e Poulsen (2021) propuseram um método de determinação multirresíduo de 184 agrotóxicos na alimentação de peixes (ração) com alto teor de gordura usando um novo método genérico de extração usando GC e LC-MS/MS. Os autores avaliaram o método de extração QuEChERS e o método do acetato de etila (*Swedish*). Tendo em vista a dificuldade em recuperar compostos organoclorados em matrizes gordurosas, os autores propuseram a utilização da combinação de água-acetonitrila e heptano como solventes extratores, e clean-up por d-SPE utilizando PSA e C18. Dos 184 agrotóxicos testados, 179 atenderam aos critérios de validação da Legislação da União Europeia com um LOQ de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, mostrando recuperações entre 70 e 120% e um desvio padrão relativo (RSD) abaixo de 20%.

2.4.1 Preparo de amostra utilizando o método *Swedish*

A Administração Nacional Sueca de Alimentos desde 1989, emprega um método multirresíduo baseado na extração com acetato de etila, conhecido como método *Swedish*, seguida de determinação por LC e GC. Este procedimento tem sido revisado continuamente, resultando em um método simples para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (EURL, 2022). Este método tem sido aplicado em matrizes como frutas e vegetais (UCLÉS *et al.*, 2014; PIHLSTRÖM; BLOMKVIST; FRIMAN, 2007), plantas (TAHA; GADALLA, 2017) entre outras.

O método *Swedish* pode ser caracterizado como uma sequência de etapas: extração utilizando acetato de etila, partição (*salting out*) com sulfato de sódio

(Na_2SO_4) anidro, limpeza do extrato (*cleanup*), se necessário, e secagem do extrato em fluxo de nitrogênio e redissolução em outro solvente, variando de acordo com a técnica instrumental utilizada para o ensaio.

2.4.2 Preparo de amostra utilizando método QuEChERS

O método de preparo de amostra QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) foi introduzido pela primeira vez por Anastassiades e colaboradores (2003), com o intuito de superar limitações práticas dos métodos multirresíduos já existentes. Este método apresenta como vantagens, como: elevados percentuais de recuperação para agrotóxicos com diferentes propriedades físico-químicas; utilização de menores quantidades de solvente orgânico e uso de solventes não clorados, entre outras.

Muitos alimentos têm uma composição de gordura maior que 2%, sendo considerados alimentos gordurosos, entre eles nozes, ovos, abacate e grãos em geral (HAN *et al.*, 2016). Grãos como: canola, gergelim, soja e amendoim fazem parte desse grupo. Em amostras com alto teor de gordura, tanto contaminantes lipofílicos quanto hidrofílicos podem estar presentes. Portanto, os métodos analíticos devem ser desenvolvidos visando abranger uma ampla faixa de polaridade para análise de resíduos de agrotóxicos (HAN *et al.*, 2016).

O método QuEChERS pode ser caracterizado como uma sequência de etapas: extração, partição (*salting out*) e limpeza do extrato (*cleanup*). A seleção do solvente de extração é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. Muitos aspectos devem ser considerados, entre eles: habilidade de extração de um amplo espectro de compostos com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e limpeza, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo, segurança, além de observar a legislação ambiental (PRESTES *et al.*, 2009).

O método QuEChERS original é baseado em três etapas principais: extração com acetonitrila; partição promovida pela adição de sais, por exemplo, sulfato de magnésio (MgSO_4) e cloreto de sódio (NaCl) para promover o efeito *salting out*, o tamponamento do pH do meio, além da remoção de água, e limpeza do extrato empregando a técnica denominada extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive solid phase extraction*) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). A utilização

de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de interferentes da amostra, assim como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos. É possível, com a utilização de acetonitrila, a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades, e quando acidificada, em certos casos permite recuperações satisfatórias (70-120%) de analitos que geralmente apresentam problemas de estabilidade (MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Lehotay e colaboradores (2005) adicionaram ao método original uma etapa de tamponamento e desenvolveram o método QuEChERS acetato, que utiliza acetonitrila acidificada com 1% (v/v) de ácido acético e acetato de sódio (CH_3COONa) como sal de partição, formando um tampão em pH 4,8. Este foi reconhecido como o método oficial da Associação de métodos analíticos oficiais (AOAC, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*) (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Anastassiades e colaboradores (2007) desenvolveram o método QuEChERS citrato que utiliza uma mistura de citrato de sódio diidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e hidrogenocitrato sesquihidratado ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$) que formam um tampão em pH 5,0-5,5 (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

O uso de sais na etapa de partição como o sulfato de magnésio se deve pela separação mais completa da fase líquido-líquido e ainda aumenta a eficiência de extração de agrotóxicos não polares devido a reação exotérmica produzida durante sua ação. Já o cloreto de sódio apresenta a vantagem de melhorar a separação das fases quando introduzido junto ao sulfato de magnésio e, além disso, reduzir a quantidade de componentes co-extraídos da matriz (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*; 2015).

A etapa de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), também conhecida como a etapa de limpeza, consiste em adicionar uma quantidade de extrato em contato com uma mistura de sorventes com o uso de sais que promovem a remoção de água (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). A escolha do sorvente ideal é avaliada através da remoção de interferentes do extrato da matriz. Neste sentido, a limpeza do extrato é muito importante na etapa de d-SPE (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

Atualmente os sorventes mais utilizados com a finalidade de limpeza de extratos de grãos são o Florisil[®], GCB, C18 e PSA. O Florisil[®] é um adsorvente altamente seletivo que possui ampla utilidade em química analítica. Ele é composto por silicato de magnésio e apresenta boa interação com compostos de baixa polaridade, como lipídeos (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). O GCB ou

carbono grafitizado (do inglês *graphitized carbon black*) é um sorvente muito eficiente na remoção de pigmentos como a clorofila e carotenóides, porém apresenta afinidade por compostos polares o que dificulta a recuperação destes (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

O PSA (do inglês *primary secondary amine*) apresenta a característica de não reter os agrotóxicos, mas sim remover interferentes apolares como é o caso de ácidos graxos, açúcares, ácidos orgânicos e pigmentos (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015). Por ter a capacidade de ligar-se a compostos que contém grupos carboxílicos ácidos torna este sorvente muito importante na remoção de ácidos graxos em extratos de grãos mesmo que possa interagir com agrotóxicos ácidos (HERRMANN; POULSEN, 2015).

O octadecilsilano ou C18 é um sorvente eficiente na remoção de lipídios apolares, devido a estrutura química apresentar 18 carbonos (HERRMANN; POULSEN, 2015), tornando-se um sorvente em potencial para limpeza de extratos gordurosos, como é caso da canola.

O sorvente Z-Sep+ é um sorvente desenvolvido recentemente, e é formado a partir de uma mistura de C18 e sílica revestida com dióxido de zircônio. O Z-Sep+ é aplicado para interferentes não polares como é o caso de lipídios (REJCZAK; TUZIMSKI, 2017).

A Agilent Technologies desenvolveu em 2015 o sorvente Bond Elut EMR-Lipid. O EMR-Lipid é um produto utilizado no preparo de amostras com alto teor de gordura para a remoção de lipídios. Normalmente utilizado no tratamento de extratos obtidos pelo método QuEChERS e/ou precipitação de proteínas. Bond Elut EMR-Lipid consiste em 1 grama de EMR-Lipid em um tubo de polipropileno de 15 mL. Sua eficiência na remoção de lipídios ocorre através das interações hidrofóbicas e exclusão por tamanho. Sendo assim, os lipídios são retidos pelas partículas devido a grande cadeia de hidrocarbonetos e os demais analitos não interagem devido ao tamanho da partícula (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015).

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

Após a extração dos analitos, alguns autores reportaram a realização de uma etapa de separação de fases por partição a baixa temperatura. Este procedimento

consiste no resfriamento do extrato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um determinado tempo. Desta forma, há o congelamento da fase aquosa, enquanto os analitos particionam para a fase orgânica (acetonitrila, por exemplo), que permanece líquida. A utilização da baixa temperatura faz com que os coextrativos lipídicos precipitem, ficando aprisionados na fase aquosa congelada, e assim promove também a limpeza do extrato (SHAO, AGAR e GIESE, 2017; FERREIRA *et al.*, 2016,).

Existem diversas possibilidades quanto ao preparo de amostras e aos instrumentos que podem ser utilizados para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de canola e óleos de canola. A Tabela 6 apresenta algumas aplicações empregando o método QuEChERS e suas modificações no preparo de amostra e determinação cromatográfica de resíduos de agrotóxicos em canola e grãos que apresentam características semelhantes.

Tabela 6 - Aplicações empregando diferentes técnicas de preparo de amostra e cromatográficas para determinação de agrotóxicos em canola e matrizes semelhantes.

matriz	classe dos analitos	método	limpeza extrato	instrumentação	referência
Canola	Multiclasse	QuEChERS Citrato	d-SPE	LC-MS/MS	Belarbi <i>et al.</i> , (2021)
Gergelim	Multiclasse	QuEChERS Original	d-SPE	LC-MS/MS	Shinde <i>et al.</i> , (2021)
Óleo de Canola e outros óleos	Organoclorados	QuEChERS modificado	d-SPE	GC-MS/MS	Cui <i>et al.</i> , (2020)
Óleo de Canola	Herbicidas	QuEChERS 1% A.F	d-SPE	LC-MS/MS	Ski (2017)
Soja	Multiclasse	QuEChERS Acetato	d-SPE	UHPLC-MS/MS	Wang <i>et al.</i> , (2013)
Óleo de Canola e Canola	Multiclasse	QuEChERS Acetato	Sem	LC-MS/MS	Jiang <i>et al.</i> , (2012)
Óleo de Amendoim	Organofosforados	QuEChERS Original	d-SPE	GC-MS/MS	Su <i>et al.</i> , (2011)

Lê-se: A.F - Ácido Fórmico

2.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

Como técnica analítica, a cromatografia tem a finalidade de separar os analitos de interesse os quais realizam diferentes interações entre a fase estacionária e a fase móvel (MCNAIR; MILLER, 1998). Durante o processo de eluição 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).

Dentre os métodos cromatográficos destaca-se a cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*). A separação de agrotóxicos por cromatografia líquida normalmente é realizada por fase reversa, 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 utilizada para a determinação de resíduos de agrotóxicos, no modo fase reversa, consiste em misturas de água-metanol e água-acetonitrila (GRIMALT e DEHOUCK, 2016).

2.5.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série

Em relação à seletividade, detectabilidade e velocidade de análise, o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas em série (LC-MS, do inglês *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) fornece vantagens significativas. A espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é considerada uma poderosa técnica de detecção associada à cromatografia, com características importantes: i) alta sensibilidade a diferentes analitos (detecção em nível de traço); ii) fornece informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos eluídos da coluna e iii) capacidade de distinguir diferentes substâncias na amostra (RIOS, 2019).

De acordo com Collins; Braga e Bonato (2006) o espectrômetro de massas é um instrumento constituído pela fonte de ionização, analisador de massas e detector. Após a injeção da amostra formam-se íons que são analisados de acordo com sua razão massa/carga (m/z) e a detecção é feita pela intensidade do feixe de elétrons. O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas tem como

vantagem possibilitar a determinação de um amplo espectro de analitos de forma altamente seletiva. Ao operar no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*), permite a quantificação de picos cromatográficos sobrepostos, com alta detectabilidade, avaliação da pureza do pico e a confirmação da presença do analito. 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 tecnologia da cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*), cujo advento data de 2004, permite que colunas com partículas de fase estacionária muito pequenas (menores que 2 μm) atinjam excelente desempenho 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 LC 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).

2.6 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). É considerado um passo crucial no desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis (KIM *et al.*, 2018). Essa validação de método deve ser abrangente, de forma a contemplar todas as necessidades da tal aplicação desde a amostragem ao resultado experimental (INMETRO, 2017).

Para a validação do método alguns parâmetros devem ser levados em consideração. De acordo com a SANTE (2021) e INMETRO (2020) deve-se avaliar a seletividade, faixa linear, efeito matriz, exatidão, precisão e os limites de quantificação e de detecção, conforme a Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros de avaliação na validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos.

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	Sinal/Ruído = 3 Sinal/Ruído = 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: SANTE (2021)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho proposto consistiu no desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação de resíduos de agrotóxicos em canola empregando sistema 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 3UV[®] (Millipore, L'Isle D'Abeau Chesnes, França);
- Centrífuga refrigerada para tubos de 15 mL e 50 mL (NT 825 Novatécnica, São Paulo, Brasil);
- Agitador Vortex – Modelo VX-38 (IONLAB, Araucária, Brasil);
- Agitador Giroscópio modelo MJ 51.3 (Junqueira, São Paulo, Brasil);
- Agitador multi turbo vortex (Fisher Scientific, Waltham, EUA);
- Moinho A11 Basic (IKA[®], Staufen, Alemanha);
- Balanças analíticas modelo UX-420H e APX-200 (Shimadzu, Quioto, Japão);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Brand, Alemanha e Hamburgo, Alemanha);
- Concentrador e evaporador TurboVap LV[®] (Biotage, Uppsala, Suécia);
- Sistema UHPLC-MS/MS equipado com:
 - Cromatógrafo à líquido Acquity Waters (Waters, Milford, EUA);
 - Coluna Acquity UPLC BEH C18 (2,1x50 mm, 1,7 µm) (Waters, Milford, EUA);
 - Detector MS triplo quadrupolo, modelo Xevo TQ (Waters, Milford, EUA);
 - Interface/fonte de ionização por eletronebulização (Waters, Milford, EUA);
 - Compressor de nitrogênio (Atlas Copco, Nacka, Suécia)
 - Gerador de nitrogênio PEAK NM30L-MS (Peak Scientific, Glasgow, Reino Unido);

- Amostrador automático com sistema de injeção com agulha de poli(éter-éter-cetona)(PEEK) dentro da agulha de aço (Waters, Milford, EUA);
- Sistema de aquisição de dados software MassLynx 4.1 (Waters, Milford, EUA).
- Bomba a vácuo (Tecnal, Piracicaba, Brasil);
- Sistema de manifold para SPE (Varian, Palo Alto, EUA);
- Sistema GC-MS/MS equipado com:
 - Cromatógrafo a gás, modelo Intuvo 9000 B (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA);
 - Detector MS triplo quadrupolo, modelo 7010 B (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA).
 - Amostrador automático, modelo 7693 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA).

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

Os reagentes, solventes e demais materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- Acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, Edo. De Méx., México);
- Metanol, grau HPLC (J.T. Baker, Edo. De Méx., México);
- Acetato de etila (Scharlab, Sentmenat, Espanha);
- Formiato de amônio (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA);
- Hidróxido de amônio 28-30% (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA);
- Ácido fórmico $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA);
- Ácido acético glacial (J.T. Baker, Edo. De Méx., México);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV[®], resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (Millipore, L'Isle D'Abeau Chesnes, França);
 - Filtros de PTFE de 13 mm de diâmetro e $0,22 \mu\text{m}$ de porosidade (Analítica, São Paulo, Brasil);
 - Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Edo. De Méx., México);
 - Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA);
 - Acetato de sódio anidro (J.T. Baker, Edo. De Méx., México);
 - Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA);

- Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA);
- Sorvente Bondesil C18 com diâmetro de partícula de 40 µm (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA);
- Sorvente Bondesil PSA com diâmetro de partícula de 40 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA);
- Sorvente Supel™ QuE Z-Sep+ (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA);
- Sorvente Florisil® (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA);
- Sorvente Supelclean™ Envi-Carb™ SPE Bulk Packing (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA);
- Sorvente Sílica gel 60 mesh ativada (Agilent Technologies, EUA);
- Acetona grau HPLC (J.T. Baker, Edo. De Méx., México);
- Hexano (95% n-hexano, J.T. Baker, Edo. De Méx., México);
- Tubos de polipropileno com 15 mL de capacidade (Sarstedt, Sarstedt, Alemanha);
 - Microtubo, tipo Eppendorf com 2 mL de capacidade (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha);
 - Frascos de vidro (vial) com capacidade de 2 mL (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA);
 - Padrões sólidos dos compostos em estudo;
 - Cartuchos para SPE Bond Elut Carbon GCB 250 mg/PSA 250 mg, 3 mL (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA);
 - Cartuchos para SPE Bond Elut Florisil 1 g/6 mL (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA);
 - Cartuchos para SPE Captiva EMR-Lipid 300 mg/3 mL (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA);
 - Vidraria de laboratório.

3.3 COMPOSTOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO

Foram selecionados 89 agrotóxicos de diferentes classes (herbicidas, fungicidas, inseticidas, etc.). Esta escolha foi baseada nos compostos de uso permitido para a cultura da canola no Brasil e na União Europeia e que estavam disponíveis no banco de padrões analíticos do LARP. Além disso, compostos que são

encontrados com maior frequência nas análises de rotina realizadas no LARP, foram incluídos a fim de proporcionar avaliação de uma maior quantidade de compostos.

Os padrões sólidos dos agrotóxicos selecionados foram adquiridos das empresas Dr. Ehrenstofer (Alemanha), Sigma-Aldrich (EUA) e ChemService (EUA) e estão listados na Tabela 8. Além de algumas propriedades e características físico-químicas, tais como: classe agronômica, grupo químico, pureza do padrão, constante de dissociação ácida (pK_a), coeficiente de partição octanol-água ($\log k_{ow}$), coeficiente de adsorção a matéria orgânica do solo (k_{oc}) e solubilidade em água. Todos os padrões utilizados possuem pureza maior que 90%.

Tabela 8 - Relação dos compostos em estudo, com informações de classe, grupo químico, pureza do padrão sólido e propriedades físico-químicas.

								(continua)
Composto	Classe (s)	Grupo químico	Pureza (%)	pK _a	log K _{ow}	K _{oc} (mg L ⁻¹)	Solubilidade (mg L ⁻¹)	
atrazina	herbicida	triazina	99	1,7	2,61	122	30	
atrazina-d5 (PC)	herbicida	triazina	99	-	-	-	-	
azinfós etílico	inseticida	organofosforado	98	-	3,40	237,1	10,50	
azinfós metílico	inseticida	organofosforado	99	5	2,53	69,7	43,54	
azoxistrobina	fungicida	estrobilurina	99	0,94	2,50	740,2	11,61	
bitertanol	fungicida	triazol	99	-	-	-	-	
boscalida	fungicida	anilida	99	10,7 e 0,11	4,00	3,74 10 ⁷	2,61	
brumoconazol	fungicida	pirimidina	94	-	3,24	-	50	
buprofezina	inseticida e acaricida	tiadiazinona	99	0,38	4,30	5741	2,43	
carbaril	inseticida	metilcarbamato de naftila	98	10,4	2,36	241,7	416,2	
carbendazim	fungicida	benzimidazol	99	4,2	1,55	175,8	2441	
carbofurano	inseticida, cupinizada, acaricida e nematocida	metilcarbamato de benzofuranila	98	3,78 e 2,16	2,32	70,85	353,9	
3 hidroxí carbofurano	inseticida	carbamato	99	-	-	-	-	
carboxina	fungicida	oxatina	99	0,5	2,14	79,96	423,7	
cianazina	herbicida	triazina	99	12,9	2,22	123,8	183,8	
ciantroniliprole	inseticida	antranilamida	99	-	-	-	-	
cletodim	herbicida	oxima ciclohexanodiona	90	-	4,21	-	11,9	
ciproconazol	fungicida	triazol	99	-	2,90	1,60 10 ⁷	45,74	
clomazona	herbicida	isoxazolidinona	95	-	2,50	4770	197,5	
clorantraniliprole	inseticida	antranilamida	94	10,8	3,98	2724	0,37	
clorimurom etílico	herbicida	sulfonilureia	97	4,2	2,50	78,19	18,15	
clorpirifós	inseticida, formicida e acaricida	organofosforado	99	4,55	4,96	6829	0,36	
clorpirifós metílico	acaricida e inseticida	organofosforado	97	-	4,31	2008	1,89	
diazinona	inseticida	organofosforado	96	2,6	3,81	1337	6,45	

(continuação)

composto	classe (s)	grupo químico	pureza (%)	pK _a	log K _{ow}	K _{oc} (mg L ⁻¹)	solubilidade (mg L ⁻¹)
difenoconazol	fungicida	triazol	99	1,07	4,30	2,43 10 ⁷	0,60
dimetoato	inseticida e acaricida	organofosforado	98	2	0,28	24,52	6,6 10 ³
diflubenzuron	inseticida e acaricida	benzoiluréia	99	-	3,89	-	0,08
epoxiconazol	fungicida	triazol	99	-	-	-	0,66
fenarimol	fungicida	pirimidinil carbinol	97	-	3,62	3786	14
fembuconazol	fungicida	triazol	99	-	4,23	6131	7,04
fempropimorfe	fungicida	morfolina	94	-	3,30	2937	19
fentiona	inseticida, formicida, acaricida e cupinicida	organofosforado	97	-	4,09	-	2
fipronil	inseticida e acaricida	fenilpirazól	96	-	4,0	-	1,9
fluasifope-p-butílico	herbicida	ácido ariloxifenoxipropiônico	97	-	4,6	-	1,1
fluquinconazol	fungicida	triazol	98	-	-	-	-
flusilazol	fungicida	organosiliconado	99	2,5	3,87	3,81	4,02
flutolanil	fungicida	carboxamida	99	-	3,7	680	6,53
fluxaproxade	fungicida	carboxamida	99	-	-	-	-
flutriafol	fungicida	triazol	99	2,3	23	292	95
imazalil	fungicida	imidazol	97	6,53	-	2080	0,22
imazapique	herbicida	imidazolinona	98	2,0	0,393	-	220
imazetapir	herbicida	imidazolinona	99	2,1	1,49	-	1415
imidacloprido	inseticida	neonicotinóide	98	11,12	0,76	300	580
iprovalicarbe	fungicida	carbamato	97	-	3,18	106	17,8
linurom	herbicida	uréia	99	12,13	3,2	860	75
malationa	inseticida e acaricida	organofosforado	99	6,8	2,7	1800	143
mecarbam	inseticida e acaricida	organofosforado	98	-	-	2,31	-
mepronil	fungicida	carboxamida	99	-	3,66	974	12,7
metalaxil	fungicida	acilalaninato	99	-	1,71	163	8,41
metconazol	inseticida e acaricida	itraconazol	98	11,3 e 1,06	3,85	1,71	30,4
metamidofós	inseticida	organofosforado	99	-	-	8	1,2 10 ⁶

(continuação)

composto	classe (s)	grupo químico	pureza (%)	pK _a	log K _{ow}	K _{oc} (mg L ⁻¹)	solubilidade (mg L ⁻¹)
metiocarbe	lesmicida	metilcarbamato de fenila	99	-	-	655	27
metsulfurom metílico	herbicida	sulfolinuréia	99	3,3	0,02	57	172
mevinfós	inseticida e acaricida	organofosforado	92	-	0,13	72	2,0 10 ³
monocrotofós	inseticida	organofosforado	97	-	0,22	19	8,1 10 ⁵
monolinurom	herbicida	uréia	99	-	2,2	200	735
miclobutanil	fungicida	triazol	99	-	2,94		142
oxamil	acaricida, inseticida e nematocida.	carbamato	97	12,4	0,44	17	1,5 10 ⁵
paraoxon etílico	inseticida	organofosforado	99	7,1	-	-	-
piraclostrobina	fungicida	estrobilurina	97	-	3,99	9300	20
pirazofós	fungicida e inseticida	fosforotioato de heterociclo	97	-	3,8	646	4,2
piridabem	inseticida e acaricida	piridazinona	99	-	6,36	66503	0,012
piridafentiona	inseticida e acaricida	organofosforado	99	-	3,1	7211	100
pirimetanil	fungicida	anilino pirimidina	98	3,52	2,84	301	121
pirimicarbe	inseticida	dimetilcarbamato	97	4,44	1,7	388	3,1 10 ³
procloraz	fungicida	imidazol	97	-	-	-	-
propargite	acaricida	sulfito de alquila	91	-	5,7	-	0,215
protioconazol	fungicida	triazol	98	6,9	4,05	-	300
pirimifós metílico	inseticida e acaricida	organofosforado	99	4,3	4,2	1100	11
profenofós	inseticida e acaricida	organofosforado	98	-	4,44	2010	28
propiconazol	fungicida	triazol	97	1,09	3,72	656	100
propoxur	inseticida	carbamato	99	-	1,56	30	1,8 10 ³
quinoxifem	fungicida	fenoxiquinolona	99	-	4,66	22929	0,05
simazina	herbicida	triazina	98	1,62	2,1	340	6
saflufenacil	herbicida	pirimidinadionas	97	4,41	368,2	-	0,003
tebuconazol	fungicida	triazol	98	-	3,7	1000	32
tebufenozida	inseticida	diacilhidrazina	97	-	4,25	605	1
tetraconazol	fungicida	triazol	97	-	3,56	4680	187

composto	classe (s)	grupo químico	pureza (%)	pK _a	log K _{ow}	K _{oc} (mg L ⁻¹)	(Conclusão)
							solubilidade (mg L ⁻¹)
terbufós	inseticida e nematicida	organofosforado	99	-	-	-	-
teflubenzurom	inseticida	benzoiluréias	98	-	-	-	-
tiacloprido	inseticida	neonicotinóide	99	-	-	615	184
tiametoxam	inseticida	neonicotinóide	99	-	0,13	64	4,1 10 ³
tiodicarbe	inseticida	metilcarbamato de oxima	99	-	1,62	418	22
tiofanato metílico	fungicida	benzimidazol	99	7,38	1,5	225	25
triazofós	inseticida, acaricida e nematicida	organofosforado	99	-	3,34	358	35
triadimefom	fungicida	triazol	99	-	3,7	365	64
triadimenol	fungicida	triazol	98	-	3,08	273	72
trifenilfosfato (PI)	inseticida	organofosforado	97	-	4,59	-	1,9
tolcofós metílico	fungicida	clorofenil	99	-	4,56	-	1,10
trifloxistrobina	fungicida	estrobilurina	99	-	4,5	2377	0,61
vamidationa	inseticida	organofosforado	98	-	-	70	4 10 ⁶

Leia-se: pK_a - logaritmo negativo da constante de acidez do composto; log K_{ow} - coeficiente de partição octanol/água; K_{oc} - coeficiente de adsorção normalizado pelo carbono orgânico; PI - Padrão Interno; PC - Padrão de Controle. Solubilidade em água a 25°C. Fonte: UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE (2022), [s.d.]; NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (2022) [s.d.].

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), e necessitam apresentar similaridade com os compostos em estudo estabilidade durante o processo de extração e corrida cromatográfica. Estas substâncias são adicionadas em diferentes estágios do procedimento analítico e possuem diferentes finalidades (SANTE, 2021).

A atrazina deuterada (Atrazina-d5) foi utilizada como padrão de controle, com o objetivo de avaliar a eficiência do procedimento de extração. Sua adição foi realizada nas amostras branco e nas amostras analisadas na concentração de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. Como padrão interno empregou-se o trifenilfosfato na concentração $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Esta solução foi adicionada ao extrato final, previamente a determinação por UHPLC-MS/MS e teve como objetivo a verificação da resposta do equipamento, não sendo aplicada para fins de quantificação.

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS

Os padrões analíticos utilizados neste estudo foram preparados a partir de padrões sólidos de alta pureza (90 – 99%). Inicialmente preparou-se uma solução estoque na concentração aproximada de 1000 mg L^{-1} em acetonitrila para cada composto avaliado. A partir dessas soluções individuais, fez-se uma mistura contendo todos os compostos selecionados na concentração de 10 mg L^{-1} para o desenvolvimento do método analítico. A solução foi armazenada em frasco âmbar a temperatura menor que $-5 \text{ }^\circ\text{C}$. Após, esta solução foi utilizada para o preparo de uma solução de 1 mg L^{-1} . A partir esta solução, foram realizados os ensaios de fortificação e o preparo das curvas analíticas nas concentrações de 0,5; 1; 2; 5; 10, 20 e $50 \mu\text{g L}^{-1}$, tanto no extrato da matriz quanto no solvente (acetonitrila).

3.6 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A amostra de canola utilizada como “branco analítico” foi adquirida em um estabelecimento comercial especializado em alimentos orgânicos da cidade de São

Paulo, Brasil. Foi realizada uma avaliação pela técnica de UHPLC-MS/MS a partir da injeção do extrato de canola após extração pelo método QuEChERS e não foram detectados resíduos dos agrotóxicos em estudo. Outras 21 amostras de canola foram fornecidas por estabelecimentos comerciais e agricultores residentes na cidade de São Luiz Gonzaga – RS, e foram avaliadas empregando o método desenvolvido neste estudo.

Para o processamento, as amostras foram moídas em moinho analítico IKA A11 Basic por aproximadamente 1 min a fim de reduzir a granulometria e adquirir um aspecto de farelo (CODEX ALIMENTARIUS, 2020). Após etapa de moagem, as amostras foram armazenadas em frascos individuais de polipropileno devidamente identificados, mantidas em freezer a temperatura ≤ -18 °C até a análise. Para o desenvolvimento do método, as amostras branco analítico eram retiradas do freezer e aguardava-se que as mesmas atingissem a temperatura ambiente.

3.7 SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA

3.7.1 Escolha da Fase Móvel

A composição da fase móvel influencia no sinal analítico e na separação adequada dos analitos. Por isso, visando melhorar a ionização dos compostos, através do sistema UHPLC-MS/MS, utilizou-se dois aditivos na fase móvel, tanto aquosa quanto orgânica, sendo eles o ácido fórmico e o formiato de amônio, como já é de rotina no laboratório (MARTINS *et al.*, 2014; MATOS *et al.*, 2019). A fase móvel empregada consistiu em: A) solução aquosa razão 98:2 água/metanol (v/v) com 0,1% (v/v) ácido fórmico e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ e B) solução na razão 98:2 metanol/água com 0,1% (v/v) ácido fórmico e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹, conforme gradiente descrito na Tabela 9, sendo o tempo total de corrida cromatográfica de 10 min.

Tabela 9 - Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em canola por UHPLC-MS/MS.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
0,25	95	5
7,75	0	100
8,5	0	100
8,51	95	5
10	95	5

Fonte: O Autor

3.7.2 Condições do sistema UHPLC-MS/MS

As condições gerais utilizadas para o desenvolvimento do método e determinação dos agrotóxicos foram otimizadas previamente no LARP-UFSM e são utilizadas em análises de rotina para diversos compostos e matrizes (KEMMERICH *et al.*, 2015).

- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Voltagem do capilar (ESI⁺): 0,5 kV;
- Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 600 mL min⁻¹;
- Vazão do spray: 80 mL min⁻¹;
- Vazão do gás de colisão: 0,15 mL min⁻¹;
- Temperatura da fonte: 150 °C;
- Volume de injeção: 10 µL.

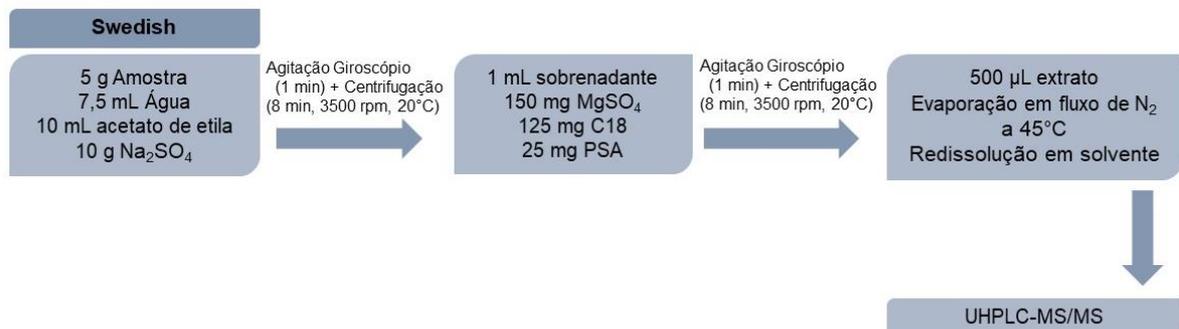
A maioria dos agrotóxicos avaliados, apresentou os melhores resultados em relação a intensidade do sinal analítico quando empregou-se ionização por eletronebulização no modo positivo, exceto para o composto fipronil, o qual apresentou melhor sinal com a ionização operando em modo negativo. A partir destes dados, selecionou-se as energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos com sinal significativo. Logo após, foram avaliadas as transições, no modo SRM a serem utilizadas para a quantificação (transição de maior intensidade) e identificação (transição de segunda maior intensidade) dos compostos estudados.

3.8 AVALIAÇÃO DO MÉTODO SWEDISH PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA

O preparo de amostra é uma etapa muito importante para a obtenção de um extrato limpo e sem coextrativos. Por isso, inicialmente foi aplicado o método *Swedish*, o qual utiliza acetato de etila como solvente extrator (ANDERSSON *et al.*, 1998; OHLIN *et al.*, 1998). O método *Swedish* é constituído de 4 etapas: extração/partição, limpeza, secagem e análise, conforme demonstrado na Figura 2. Os ensaios de recuperação foram avaliados com a fortificação da amostra branco de canola no nível de concentração de 25 µg kg⁻¹. Esta avaliação foi realizada em triplicata (n=3).

A canola possui umidade abaixo de 10% (CANOLA COUNCIL OF CANADA, 2022), por isso foi realizada a adição de água ultrapura a matriz, uma vez que é indicada para amostras com teor de água inferior a 80% (STOCKA *et al.*, 2011). Assim, foram testados diferentes volumes de adição de água (5; 7,5 e 10 mL) para 5 g de amostra de canola moída.

Figura 2 - Esquema do preparo de amostra utilizando o método *Swedish*.



Fonte: O autor

Leia-se: Na₂SO₄ – Sulfato de sódio anidro; N₂ – Nitrogênio.

Avaliou-se o efeito da precipitação a baixa temperatura (LTP, do inglês *low temperature precipitation*) de proteínas e lipídeos presentes no extrato final, com o intuito de obter um extrato mais limpo, com menor concentração de coextrativos. A avaliação da influência da temperatura foi observada submetendo o extrato da matriz a -20°C, por um período de 3 horas, seguido da etapa de limpeza empregando a técnica de d-SPE, conforme descrito na Figura 2.

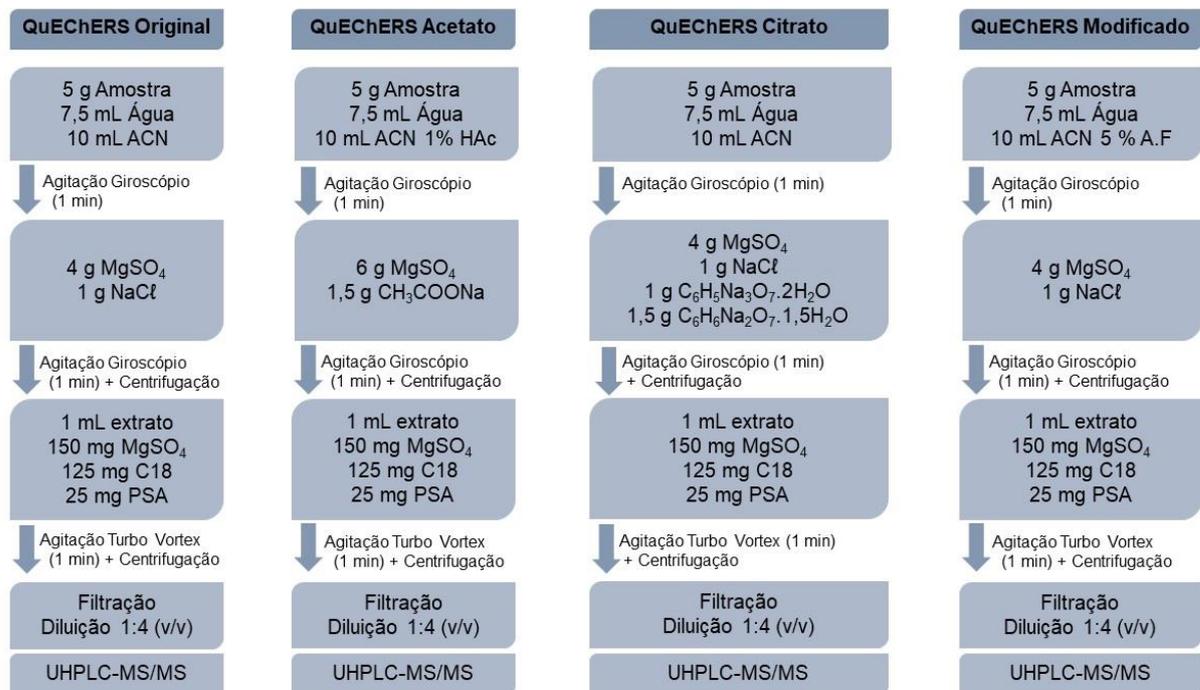
3.9 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA

Foram realizados testes utilizando as três versões mais conhecidas do método QuEChERS: original (ANASTASSIADES, *et al.*, 2003); acetato (LEHOTAY; MASTOVSKA; LIGHTFIELD; 2005) e citrato (ANASTASSIADES, *et al.*, 2007). Estas versões foram avaliadas com e sem a realização da etapa de LTP. Além disso, avaliou-se uma modificação do método QuEChERS empregando acetonitrila acidificada com 5% (v/v) ácido fórmico (VIERA, *et al.*, 2017).

3.9.1 Avaliação da eficiência de extração de cada uma das versões do método QuEChERS

O esquema representativo das versões do método QuEChERS utilizadas neste trabalho está apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Esquema representativo das diferentes versões do método QuEChERS utilizados neste trabalho.



Fonte: O Autor

Leia-se: ACN - Acetonitrila; A.F - Ácido Fórmico; Hac - Ácido Acético.

Os ensaios de recuperação foram avaliados com a fortificação da amostra branco de canola no nível de concentração de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esta avaliação foi realizada em triplicata ($n=3$) para cada versão do método (original, acetato, citrato e modificado) testada. Os testes de extração foram avaliados em relação ao número de compostos que apresentaram recuperação entre 70-120% e $\text{RSD} \leq 20\%$. Após a realização da etapa de limpeza por d-SPE, 200 μL de extrato foram diluídos com 800 μL de água ultrapura. Antes da injeção no sistema UHPLC-MS/MS, a solução diluída foi filtrada empregando filtro de *nylon* de 13 mm e porosidade de 0,2 μm .

3.9.2 Avaliação da influência da etapa de congelamento na remoção dos coextrativos do extrato da canola

Muitos autores citam a etapa de congelamento como significativa para minimizar a presença de coextrativos (principalmente lipídeos) no extrato proveniente de amostras com alto teor de gordura, como por exemplo, peixe, amendoim, soja, milho, entre outros (SHAO, AGAR e GIESE, 2017; PAN *et al.*, 2014). Nesta etapa do estudo, optou-se por avaliar a influência da etapa de congelamento sob as extrações de agrotóxicos em canola utilizando-se inicialmente os métodos QuEChERS original, acetato e citrato. A avaliação foi realizada pela injeção do extrato final (obtido após o processo de extração, partição, congelamento e limpeza, conforme descrito na Figura 3), em sistema GC-MS/MS no modo de monitoramento tipo varredura na faixa de 40-500 m/z . Tendo em vista a preservação da coluna cromatográfica do sistema GC-MS/MS, o método QuEChERS modificado não foi avaliado nesta etapa devido a acidificação do solvente extrator com ácido fórmico 5% (v/v). Nesta etapa não foi realizada a fortificação da matriz, pois o intuito era analisar a remoção de coextrativos.

3.9.3 Avaliação de diferentes sorventes na etapa de limpeza por d-SPE e SPE

Nesta etapa comparou-se a utilização dos sorventes na forma dispersiva (d-SPE) e em cartucho (SPE). Nestes testes, a extração de 5 g de amostra branco de canola, fortificadas na concentração de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, foi realizada com 7,5 mL de água ultrapura e 10 mL acetonitrila contendo 5% (v/v) de ácido fórmico, uma vez que o QuEChERS modificado apresentou melhor recuperação entre os métodos avaliados nas etapas 3.9.1.

Para a etapa de limpeza por d-SPE, 1 mL do sobrenadante (obtido na etapa de extração) foram transferidos para um tubo de polipropileno com capacidade de 15 mL contendo a quantidade de sorvente descrita na Tabela 10. Após, realizou-se a agitação (agitador multi turbo vortex /1 min) e centrifugação (3500 rpm/8 min/20°C). Os extratos foram diluídos 1:4 (v/v) em água ultrapura e em seguida filtrados com filtro de seringa (*nylon*; 0,2 µm).

Tabela 10 - Ensaios empregando diferentes combinações de sorventes na etapa de limpeza do método QuEChERS.

Teste	Condições	Técnica
T1	125 mg C18 + 125 mg PSA	d-SPE
T2	125 mg C18 + 25 mg PSA + 25 mg GCB	d-SPE
T3	125 mg C18 + 25 mg PSA + 25 mg Zsep+	d-SPE
T4	125 mg C18 + 25 mg PSA + 25 mg sílica	d-SPE
T5	125 mg C18 + 50 mg PSA	d-SPE
T6	125 mg C18 + 25 mg PSA + 25 mg Florisil	d-SPE
T7	Bond Elut Florisil 1 g	SPE
T8	Bond Elut Carbon GCB 250 mg/PSA 250 mg	SPE
T9	Captiva EMR 300 mg	SPE

Para os testes de limpeza empregando SPE, 3 mL do sobrenadante foram percolados através do sorvente listado nos testes T7 a T9 (Tabela 10), sem etapa de pré-condicionamento do cartucho. O eluato foi coletado em um novo tubo, seguido de diluição 1:4 (v/v) em água ultrapura e em seguida filtrados com filtro de seringa (*nylon*; 0,2 µm).

Com base nos resultados obtidos a partir dos testes T1 a T9, no qual os resultados indicaram a melhor combinação como (T4), as quantidades desse sorvente foram otimizadas. Para isso, foram realizados cinco testes por d-SPE utilizando apenas a combinação dos sorventes C18, PSA e sílica, variando as proporções a fim de avaliar a recuperação ao utilizar a sílica, uma vez que é um sorvente conhecido para remoção de lipídeos (FERRONATO, 2018). A Tabela 11 apresenta os testes realizados nesta etapa.

Tabela 11 - Ensaios variando-se as proporções de sílica visando melhor recuperação.

Teste	Condições
T10	125 mg C18 + 25 mg PSA + 50 mg sílica
T11	125 mg C18 + 25 mg PSA + 125 mg sílica
T12	125 mg C18 + 50 mg sílica
T13	125 mg C18 + 125 mg sílica
T14	125 mg C18 + 25 mg sílica

3.9.4 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de limpeza

Os testes gravimétricos são uma ferramenta muito útil na quantificação de coextrativos provenientes da matriz. Esta avaliação é uma alternativa, principalmente quando o extrato proveniente do método QuEChERS se encontra em pH ácido e não pode ser realizada injeção em sistema GC-MS/MS para avaliar a limpeza por meio da análise por monitoramento tipo varredura, uma vez que elevadas concentrações de ácido pode reduzir a vida útil da coluna cromatográfica. A quantificação da remoção dos coextrativos por meio do ensaio gravimétrico na etapa de limpeza é realizada comparando-se a massa residual de coextrativos antes e depois da etapa de limpeza (SAPOZHNIKOVA e LEHOTAY, 2013).

Esses testes foram realizados em triplicata utilizando a amostra “branco” de canola. Inicialmente, tubos cônicos de vidro (previamente limpos) foram secos em estufa à 105 °C por 1 hora. Após, estes foram colocados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Cada tubo foi pesado 3 vezes e as massas foram anotadas. Após, transferiu-se uma alíquota de 5 mL dos extratos obtidos nos testes T10 a T14 para cada tubo. Também foram realizados os seguintes ensaios gravimétricos: i) extrato da matriz sem etapa de limpeza, e ii) ensaio utilizando combinação de sorventes avaliados durante os testes preliminares (125 mg de C18 e 25 mg de PSA). Os tubos foram colocados em estufa para promover a evaporação do solvente, aumentando-se a temperatura gradativamente (para que não ocorressem projeções) de 85 até 110°C, por 1 hora. Na sequência, os tubos foram colocados no dessecador até atingir a temperatura ambiente e foram novamente pesados (n=3) para obter-se a massa de coextrativos restantes.

3.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUAL DE AGROTÓXICOS EM CANOLA

O método analítico proposto foi avaliado considerando os parâmetros da Guia SANTE (2021) e INMETRO (2020): seletividade, efeito matriz, curva analítica e linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (avaliada pelos ensaios de recuperação).

3.10.1 Seletividade

A seletividade do método foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos, no sistema UHPLC-MS/MS, para extrato das amostras “branco” e amostra “branco” fortificada no nível de concentração de 25 µg kg⁻¹. Esta avaliação objetivou verificar a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos em estudo (SANTE, 2021).

3.10.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade do método proposto foi avaliada através da análise cromatográfica por UHPLC-MS/MS de soluções analíticas nas concentrações de 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 e 50 µg L⁻¹ preparadas em acetonitrila (solvente orgânico) e no extrato do branco da matriz canola, todas em triplicata. As soluções foram preparadas previamente conforme descrito no item 3.5. A partir destes dados foi possível calcular a equação da curva analítica para cada um dos compostos avaliados bem como o RSD% e o coeficiente de determinação (r^2) de cada curva a partir da Equação 1 descrita abaixo (SANTE, 2021; INMETRO, 2020).

$$y = ax + b \qquad \text{Equação 1}$$

Onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = coeficiente angular-inclinação da curva analítica (sensibilidade);

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

3.10.3 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 método ($\mu\text{g kg}^{-1}$). 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, para o LOD e o LOQ respectivamente.

Considerou-se LOQ do método a menor concentração, fortificada na matriz, que apresentasse recuperações entre 70-120%, com RSD menor ou igual a 20% (INMETRO, 2020; SANTE, 2021). Já o LOD do método foi calculado dividindo o LOQ por 3,33 (INMETRO, 2020).

3.10.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão

A determinação da exatidão foi obtida através de ensaios de fortificação utilizando amostra “branco”. Os níveis avaliados foram de 10, 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com sete replicatas para cada nível de concentração. De acordo com SANTE (2021) e INMETRO (2020), o cálculo de recuperação é feito de acordo com a Equação 2.

$$\text{recuperação (\%)} = \frac{c_1 - c_2}{c_3} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

- C1= Concentração determinada na amostra fortificada ($\mu\text{g kg}^{-1}$);
- C2= Concentração determinada na amostra não fortificada ($\mu\text{g kg}^{-1}$);
- C3= Concentração usada para fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

3.10.5 Precisão (repetitividade) e precisão intermediária

A precisão pode ser calculada através da equação do desvio padrão relativo (RSD), de acordo com a Equação 3, conforme SANTE (2021) e INMETRO (2020).

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

Onde:

- s= estimativa de desvio padrão absoluto;
- $s = \{\sum(x_i - \bar{x}_m)^2 / n - 1\}^{1/2}$;
- x_i = valores individuais;
- \bar{x} = média das medidas em replicatas;
- N= número de medidas.

A precisão do método foi avaliada, em termos de repetitividade (RSDr) através da extração das amostras fortificadas, sendo realizadas em sete replicatas para cada nível de concentração avaliada.

A precisão intermediária (RSDpi) foi avaliada realizando o procedimento analítico em dias diferentes, através da injeção da curva analítica e das amostras branco nos níveis de 10, 25 e 50 µg kg⁻¹.

3.10.6 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado comparando as áreas obtidas das curvas analíticas em solvente e em extrato 'branco' da matriz, como é mostrado na Equação 4, conforme SANTE (2021).

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

Onde:

X1 = média das inclinações da curva preparada no extrato da matriz;

X2 = 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.

3.11 DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE CANOLA

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de resíduos dos agrotóxicos em 21 amostras de canola. As amostras foram fornecidas por estabelecimentos comerciais e agricultores residentes na cidade de São Luiz Gonzaga – RS. Todas as canolas foram colhidas entre os meses de novembro e dezembro de 2021, e a amostragem ocorreu posteriormente ao processo de colheita e antes do tratamento do grão em unidades de beneficiamento.

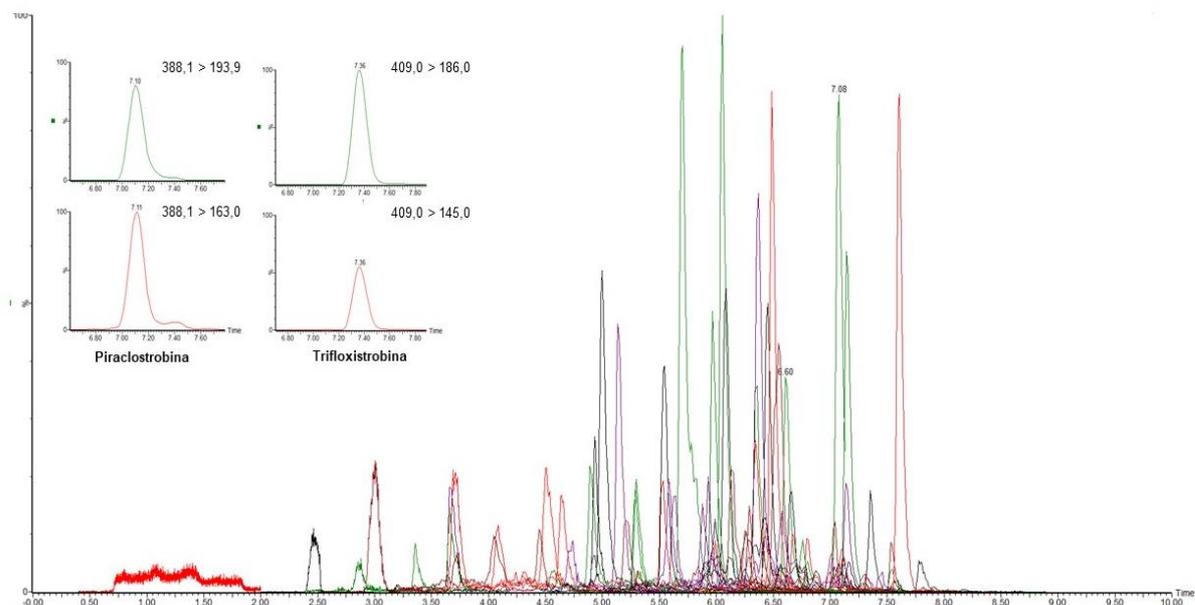
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DO SISTEMA UHPLC-MS/MS

As condições cromatográficas utilizadas para esse trabalho foram estabelecidas de acordo com trabalhos realizados no LARP, onde o modo de ionização e as transições para a quantificação e a qualificação dos analitos foram escolhidas utilizando o monitoramento SRM. Sendo que a transição de maior intensidade foi utilizada para a quantificação e a segunda de maior intensidade para a qualificação dos compostos. Os parâmetros tempo de retenção, voltagem do cone e energia de colisão para as transições SRM de cada agrotóxico em estudo estão descritos na Tabela 12.

A Figura 4 apresenta um cromatograma de íons totais (TIC) obtido para uma solução de mistura de padrões contendo todos os analitos em estudo, na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato “branco” da matriz. Como também as transições SRM (para os agrotóxicos piraclostrobina e trifloxistrobina) obtidas a partir de uma solução padrão (preparada no extrato da matriz) na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 4 - Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução padrão $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (extrato da matriz).



Fonte: O Autor

Tabela 12 - Compostos avaliados por UHPLC-MS/MS com seus respectivos tempos de retenção, voltagem do cone, íon precursor e íons produtos utilizados na quantificação e identificação e energia de colisão

(Continua)

	composto	t _R (min)	VC (V)	íon precursor (m/z)	1ª transição quantificação		2ª transição identificação	
					íon produto (m/z)	EC (eV)	íon produto (m/z)	EC (eV)
1	3-hidroxi-carbofurano	3,7	25	238,0	163,0	16	181,0	10
2	atrazina	5,6	30	216,1	96,1	26	174,1	18
3	atrazina d-5 (PC)	5,6	26	221,0	101,0	23	179,0	18
4	azinfos etil	6,6	10	346,0	77,1	36	132,0	16
5	azinfos metil	5,9	12	318,0	160,0	8	261,0	8
6	azoxistrobina	6,1	17	404,0	329,0	30	372,0	15
7	bitertanol	7,2	12	338,1	70,1	8	99,1	16
8	boscalida	6,3	32	342,9	139,9	20	307,0	20
9	bromuconazol	6,9	32	376,0	70,1	25	158,9	35
10	buprofezina	7,6	22	306,1	57,4	20	201,0	12
11	carbaril	5,2	19	202,0	117,0	28	145,0	22
12	carbendazim	2,8	24	192,1	132,1	18	160,1	18
13	carbofurano	5,0	25	222,1	123,0	16	165,1	16
14	carboxina	5,1	25	236,0	87,0	22	143,0	16
15	clorpirifós	7,8	27	349,9	97,0	32	198,0	20
16	clorpirifós-metílico	7,3	23	321,8	125,0	20	289,9	16
17	ciantraniliprole	5,3	20	475,0	286,0	20	444,0	20
18	cletodim	7,5	23	360,0	164,0	18	268,1	12
19	clomazona	6,0	23	240,0	89,0	46	125,0	18
20	clorantranilipore	5,9	20	482,0	284,0	14	451,0	22
21	clorimurom-etílico	6,3	25	415,1	186,0	15	213,0	17
22	cianazina	4,7	28	241,0	96,0	25	214,0	17
23	ciproconazol	6,6	27	292,2	70,2	18	125,1	24
24	diazinona	7,0	20	305,1	96,9	35	169,0	22
25	difenoconazol	7,3	37	406,0	111,1	60	251,1	25
26	diflubenzurom	6,8	20	311,0	113,0	40	141,0	28
27	dimetoato	3,7	12	230,1	125,0	20	199,0	10
28	epoxiconazol	6,7	25	330,0	101,0	50	121,0	22
29	fenarimol	6,6	37	331,0	81,0	34	268,0	22
30	fenbuconazol	6,8	29	337,0	70,1	20	125,0	36
31	fenpropimorfe	6,1	41	304,2	57,2	30	147,1	28
32	fention	7,0	25	279,1	169,1	16	247,1	13
33	fipronil	6,9	25	435,0	250,1	26	330,2	16
34	fluasifope-p-butílico	7,5	27	384,1	282,1	22	328,1	16
35	fluquiconazol	6,6	37	376,0	306,9	30	348,8	18

(continuação)

	composto	t _R (min)	VC (V)	íon precursor (m/z)	1ª transição quantificação		2ª transição identificação	
					íon produto (m/z)	EC (eV)	íon produto (m/z)	EC (eV)
36	flusilazol	6,8	27	316,0	165,0	28	247,0	18
37	flutolanil	6,4	23	324,1	65,0	40	262,1	18
38	flutriafol	5,6	23	302,1	70,2	18	123,1	29
39	fluxaproxade	6,4	44	380,0	131,0	24	248,0	21
40	imazalil	5,5	31	297,0	69,0	22	159,0	22
41	imazapique	4,0	35	276,2	231,2	20	248,2	18
42	imazetapir	4,6	35	290,2	159,1	38	245,2	18
43	imidacloprido	3,4	23	256,1	175,1	20	209,1	15
44	iprovalicarbe	6,6	19	321,1	119,1	16	203,1	10
45	linurom	6,1	25	249,1	160,1	18	181,1	16
46	malationa	6,3	12	331,0	99,0	24	127,0	12
47	mecarbam	6,6	12	330,0	97,0	35	227,1	8
48	mepronil	6,4	27	270,1	91,0	44	119,0	28
49	metalaxil	5,7	15	280,1	192,1	17	220,1	13
50	metconazol	7,2	29	320,1	70,0	22	125,0	36
51	metamidofos	0,7	17	142,0	93,9	13	124,9	13
52	metiocarbe sulfúrico	3,9	17	242,0	122,0	28	185,0	14
53	metsulfurom-metilico	4,9	22	382,0	167,0	16	198,9	22
54	mevinfos	4,2	13	225,1	127,1	15	193,1	8
55	monocrotofós	3,0	15	224,1	98,1	12	127,1	16
56	monolinuron	5,3	23	215,0	99,0	34	126,0	22
57	miclobutanil	6,5	25	289,1	70,2	18	125,1	32
58	oxamil	2,5	12	237,0	72,0	10	90,0	10
59	paraoxon-etílico	5,6	28	276,1	220,1	17	248,2	16
60	pirimicarbe	4,5	25	239,1	72,0	18	182,1	15
61	pirimifós-metilico	7,1	25	306,1	108,1	32	164,1	22
62	procloraz	7,1	13	376,0	70,1	34	307,1	16
63	profenofos	7,5	25	372,9	127,9	40	302,6	20
64	propargite	7,9	15	368,0	175,0	15	231,0	15
65	propiconazol	7,1	37	342,0	69,0	22	159,0	34
66	propoxur	4,9	22	210,0	111,0	16	168,0	10
67	protioconazol	7,1	13	344,0	189,0	20	326,0	12
68	piraclostrobina	7,1	20	388,1	163,0	25	193,9	12
69	pirazofós	7,1	33	374,0	194,0	32	222,1	22
70	piridabem	8,2	19	365,1	147,1	24	309,1	12
71	piridafentiona	6,5	31	341,0	92,0	34	189,0	22
72	pirimetanil	5,9	42	200,0	82,0	24	107,0	24
73	quinoxifeno	7,8	52	308,0	161,9	44	197,0	32
74	saflufenacil	6,0	30	501,1	198,0	49	349,0	30
75	simazina	4,9	34	202,0	96,0	22	124,0	16

(conclusão)

	composto	t _R (min)	VC (V)	íon precursor (m/z)	1ª transição quantificação		2ª transição identificação	
					íon produto (m/z)	EC (eV)	íon produto (m/z)	EC (eV)
76	tebuconazol	7,0	31	308,0	70,1	22	125,0	40
77	tebufenozida	6,8	12	353,1	133,0	20	297,1	8
78	teflubenzurom	7,7	17	380,9	140,9	40	158,0	20
79	terbufos	7,6	12	289,0	57,2	22	103,0	8
80	tetraconazol	6,6	32	372,0	70,1	20	159,0	30
81	tiacloprido	4,1	32	253,0	90,1	40	126,0	20
82	tiametoxam	2,8	19	292,0	132,0	22	211,2	12
83	tiodicarbe	5,3	17	355,0	87,9	16	107,9	16
84	tiofanato metílico	4,9	23	343,1	151,0	21	311,1	11
85	tolcofos metílico	7,2	30	301,1	125,0	17	174,9	29
86	triadimefom	6,4	22	294,0	69,3	20	197,2	15
87	triadimenol	6,6	12	296,1	70,2	10	99,1	15
88	triazofos	6,5	22	314,1	118,9	35	161,9	18
89	trifenilfosfato (PI)	7,1	40	327,2	152,1	37	215,2	28
90	trifloxistrobina	7,3	25	409,0	145,0	40	186,0	16
91	vamidotiona	3,7	17	288,0	118,0	28	146,0	10

Fonte: O Autor

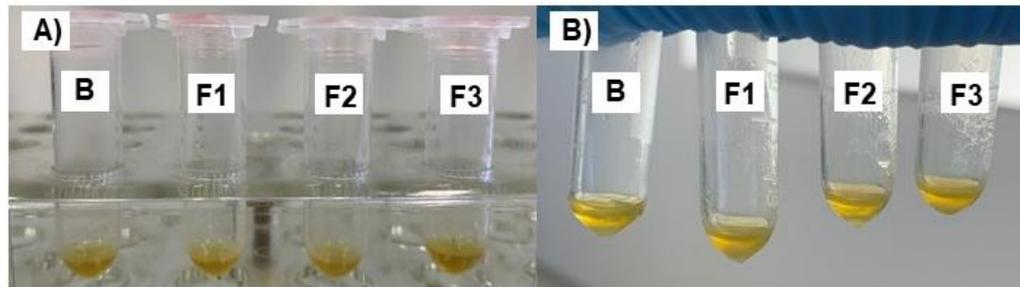
Leia-se: t_R - Tempo de retenção; EC - Energia de colisão; PI - Padrão Interno; PC - Padrão de Controle, VC – Voltagem do Cone.

4.2 AVALIAÇÃO DO MÉTODO *SWEDISH* PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA

Os testes iniciais para a avaliação do método de extração, *Swedish* ou QuEChERS, levaram em consideração, principalmente, os percentuais de recuperação (70-120%) e o desvio padrão ($\leq 20\%$).

Os ensaios utilizando o método *Swedish* foram realizados comparando o extrato final com e sem a utilização da etapa de LTP, com a etapa de fortificação (F1, F2 e F3) da amostra na concentração de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em triplicata. Por se tratar de uma matriz com uma quantidade elevada de lipídeos e utilizando acetato de etila como solvente extrator, o uso da LTP poderia ser uma alternativa para a redução da presença de lipídeos no extrato final. Na Figura 5 é possível visualizar a aparência dos extratos após a realização das etapas de extração, limpeza com e sem LTP, e secagem em fluxo de nitrogênio.

Figura 5 - Extratos obtidos pela extração de agrotóxicos de canola utilizando o método *Swedish* A) sem LTP e B) com LTP.



Fonte: O Autor

A partir da Figura 5 é possível observar que a extração de agrotóxicos utilizando o método *Swedish* e limpeza com os sorventes PSA e C18 ocasiona uma elevada extração de lipídeos, evidenciado pela coloração amarelada no interior dos tubos Eppendorf®. Percebeu-se também que a utilização da precipitação a baixa temperatura não contribuiu para reduzir a quantidade de coextrativos extraídos da amostra de canola. Devido a estes fatos, os extratos não foram injetados no sistema UHPLC-MS/MS para avaliar a recuperação dos compostos. E, portanto, o método *Swedish* não pode ser utilizado para esta matriz nas condições propostas.

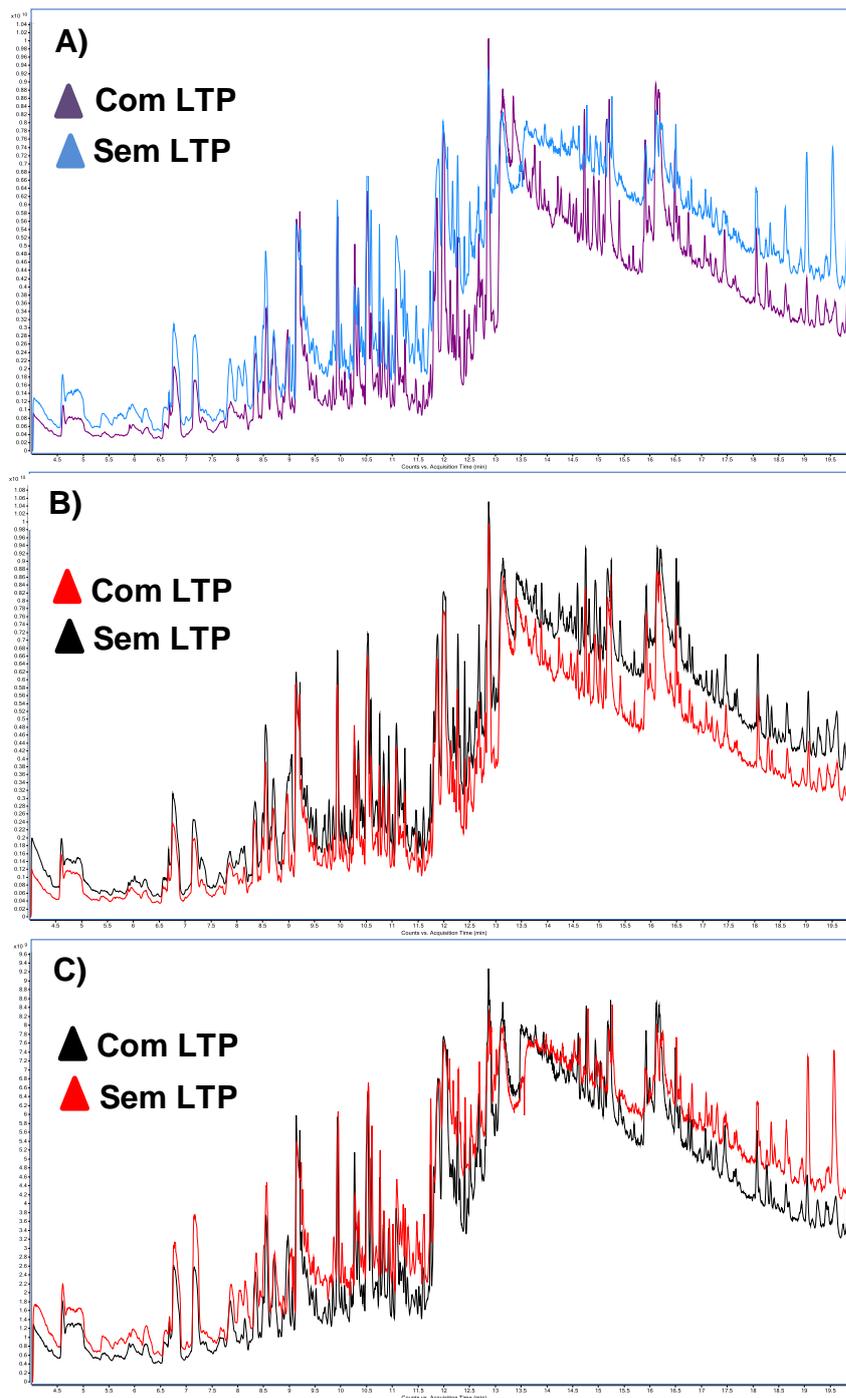
4.3 AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM CANOLA

4.3.1 Avaliação da eficiência de extração das versões do método QuEChERS original, acetato, citrato e modificado

Inicialmente foram avaliadas as três versões do método QuEChERS comumente conhecidas e utilizadas de acordo com o item 3.9.1. Em um primeiro momento foi verificado se a utilização da LTP proporcionaria uma redução de coextrativos (principalmente lipídeos) da matriz. Para isto, foram realizadas extrações, conforme descritos na Figura 3, utilizando o método QuEChERS original, acetato e citrato. Para os três métodos manteve-se a mesma proporção dos sorventes C18 e PSA, combinados com e sem etapa de LTP. Os extratos obtidos foram injetados em sistema GC-MS/MS no modo de monitoramento em varredura na faixa de 40-500 m/z, visando observar a quantidade de coextrativos residual nos extratos. Na Figura 6, a

seguir, estão demonstrados os cromatogramas obtidos no modo varredura para as três versões do método QuEChERS avaliadas utilizando e não utilizando LTP.

Figura 6 - Cromatogramas de íons totais obtido por GC-MS/MS a partir do branco da matriz submetida e não submetida a precipitação a baixa temperatura (LTP) seguido de limpeza para os ensaios: A) QuEChERS original; B) QuEChERS citrato; C) QuEChERS acetato.

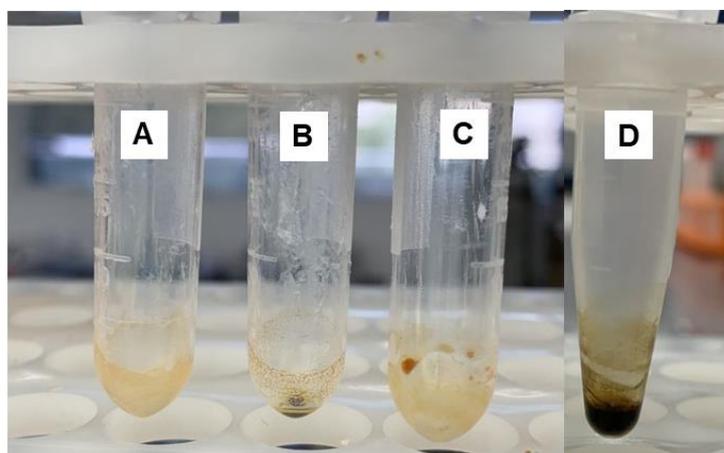


Fonte: O Autor

A partir dos cromatogramas demonstrados na Figura 6 é possível observar que não houve redução acentuada dos coextrativos entre os três métodos avaliados, como também, para a utilização da LTP. Portanto, a LTP não foi utilizada para os testes subsequentes, tendo em vista a ineficiência para a remoção de coextrativos do extrato de canola nas condições avaliadas e causaria um acréscimo de 3 horas no procedimento de extração.

Avaliou-se nesta etapa se o uso de acetonitrila como solvente extrator não causaria a extração elevada de lipídeos, como ocorreu com o uso do acetato de etila no método *Swedish*, como demonstrado na Figura 5. Para isto, os extratos, obtidos a partir de cada uma das 4 versões avaliadas, seguidos de limpeza (d-SPE) foram submetidos a secagem em fluxo de nitrogênio. Na Figura 7 é possível observar o resíduo remanescente no extrato do QuEChERS original, acetato, citrato e modificado. Nota-se que os ensaios utilizando o método QuEChERS acetato (b) e o modificado com ácido fórmico (d) apresentaram, visualmente, uma maior quantidade de resíduo após o processo de evaporação em fluxo de nitrogênio. Esse fato ocorre devido ao pH mais ácido do meio, que acaba provocando o carreamento de uma quantidade maior de substâncias durante o processo de extração. Ferronato (2018) ao trabalhar com azeite de oliva, matriz altamente gordurosa, assim como a deste estudo, reportou resultados semelhantes ao comparar os métodos QuEChERS original, acetato e citrato.

Figura 7 - Avaliação visual dos extratos obtidos, após secagem do extrato em corrente de nitrogênio, das versões do método QuEChERS original (a), acetato (b), citrato (c) e modificado (d).



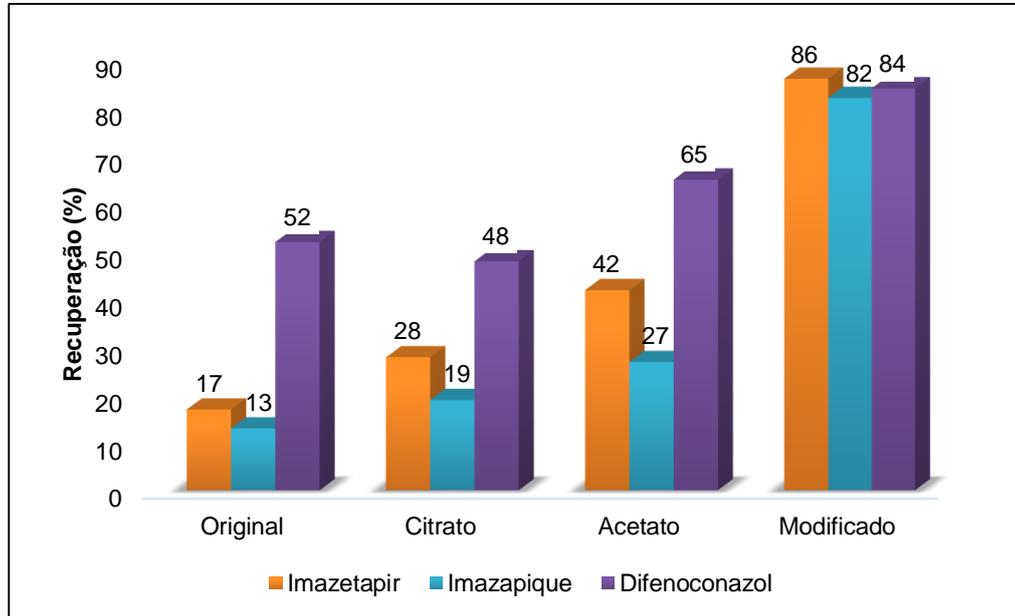
Fonte: O Autor

Em termos de recuperação, para cada um dos métodos avaliados a amostra branco foi fortificada na concentração de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados foram relacionados com curvas preparadas no extrato branco da matriz de acordo com cada teste avaliado ($n=3$).

A adição de ácido fórmico à acetonitrila contribui para melhor extração de compostos com problema de estabilidade, como é o caso dos compostos imazetapir, imazapique e difenoconazol (EURL, 2015). Este fato pode estar relacionado com a constante de dissociação ácida (pK_a) destes compostos. A utilização do ácido fórmico reduziu significativamente o pH do meio, se comparado aos demais métodos avaliados. Desta forma, proporcionou um ambiente favorável para extração dos compostos imazetapir ($pK_a = 2,1$), imazapique ($pK_a = 2,0$) e o difenoconazol ($pK_a = 1,07$), como pode ser observado na Figura 8. O ácido fórmico combinado com acetonitrila pode causar a hidrólise de ligações éster de compostos de óleo e acabar promovendo a extração de compostos alvo, especialmente agrotóxicos com alta lipofilicidade (JIANG *et al.*, 2012; KACZYNSKI, 2017).

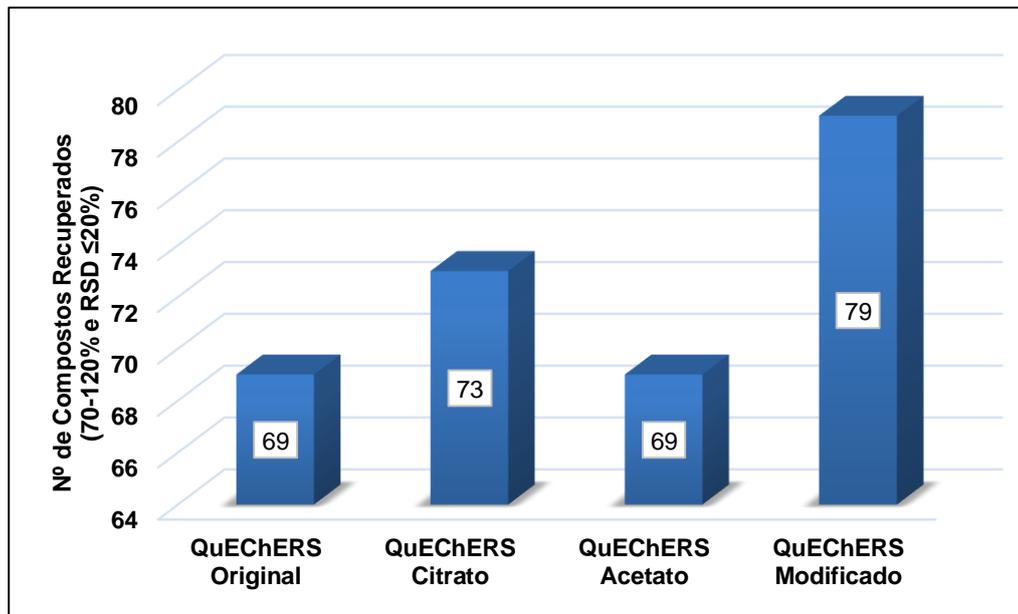
Na Figura 9, são apresentados os resultados considerados satisfatórios (recuperação 70-120%, $RSD \leq 20\%$) para os quatro métodos QuEChERS. De um total de 89 compostos avaliados o ensaio utilizando o QuEChERS original apresentou uma recuperação de 69 agrotóxicos, QuEChERS citrato de 73 compostos, QuEChERS acetato de 69 compostos e o QuEChERS modificado com ácido fórmico de 79 compostos.

Figura 8 - Avaliação da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS (original, citrato, acetato e modificado) para os compostos Imazetapir, Imazapique e Difenconazol.



Fonte: O Autor

Figura 9 - Avaliação da eficiência de extração das diferentes versões do método QuEChERS (original, citrato, acetato e modificado).



Fonte: O Autor

Tendo em vista a maior recuperação o método QuEChERS modificado com ácido fórmico mostrou-se o mais adequado para ser utilizado nas etapas subsequentes deste trabalho, mesmo que este método apresente uma extração maior

de coextrativos se comparada aos demais, uma vez que objetivou-se recuperar compostos que são permitidos para a cultura de canola no Brasil e internacionalmente para o desenvolvimento do método.

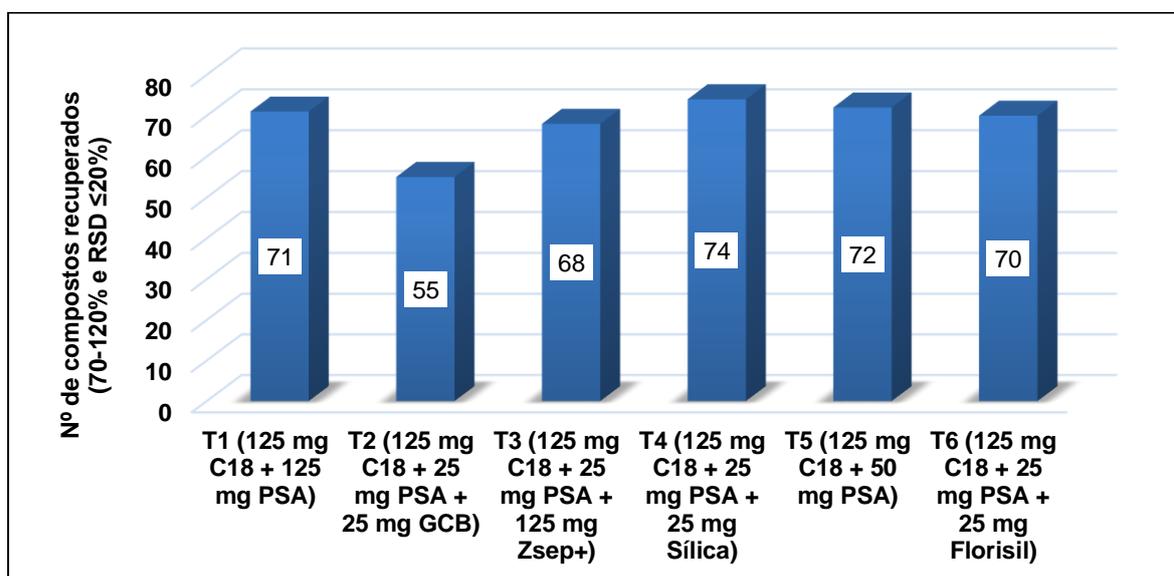
4.3.2 Avaliação de diferentes sorventes nas etapas de limpeza por d-SPE e SPE

Os ensaios visando avaliar a recuperação dos compostos utilizando diferentes técnicas de limpeza do extrato, sorventes e proporções foram realizados conforme descrito no item 3.9.3.

A Figura 10 apresenta o número de compostos com resultados considerados adequados (recuperação 70-120%, RSD \leq 20%) para todos os testes avaliados na etapa de d-SPE utilizando o método QuEChERS modificado com ácido fórmico. Verificou-se que o uso da sílica, evidenciado pelo teste 4 (T4), aumentou o número de compostos recuperados, em comparação aos demais métodos.

A sílica (SiO_2) é o sorvente mais usado em cromatografia. Também é conhecida como ácido silício amorfo, pois apresenta caráter fracamente ácido. Ela é usada na separação de compostos lipofílicos como cetonas, aldeídos e ácidos graxos e pode contribuir para recuperar compostos que apresentam caráter mais lipofílicos (FERRONATO, 2018).

Figura 10 - Número de compostos recuperados, 70-120% com RSD \leq 20%, empregando diferentes sorventes por d-SPE.



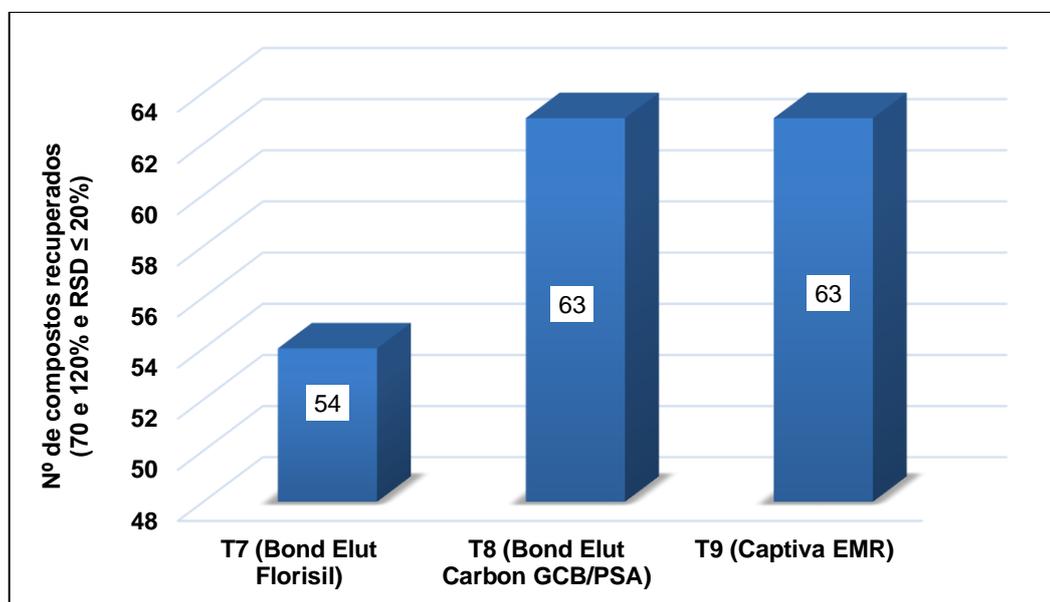
Fonte: O Autor

Observou-se que o uso de GCB reduz consideravelmente a recuperação dos compostos (55), o que pode ser explicado devido a característica da estrutura planar do sorvente, o qual possui grande afinidade por compostos apolares (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015). Por se tratar de uma matriz oleosa, muitos compostos apolares ligam-se a compostos lipídicos da amostra, permanecendo, desta forma, aderidos ao GCB, não causando a recuperação do analito alvo. Os demais testes (T1, T3, T5 e T6) apresentaram recuperação muito semelhante entre 68 e 72 compostos.

A Figura 11 apresenta o número de compostos com resultados considerados adequados (recuperação 70-120%, RSD \leq 20%) para todos os testes avaliados na etapa de SPE utilizando o método QuEChERS modificado com ácido fórmico.

Os testes realizados utilizando a técnica de SPE objetivou recuperar o maior número de compostos, facilitar e desenvolver uma etapa de limpeza mais rápida e eficiente, comparada a d-SPE. Porém, como evidenciado pela Figura 11, a recuperação dos agrotóxicos foi ineficiente.

Figura 11 - Número de compostos recuperados, 70-120% com RSD \leq 20%, empregando diferentes cartuchos por SPE.



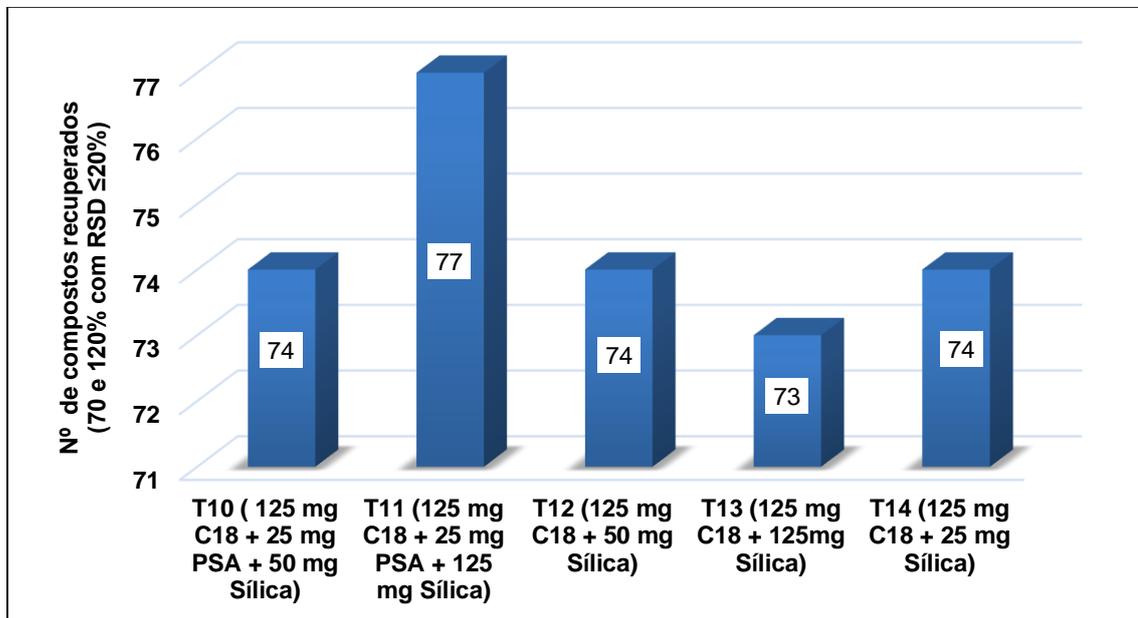
Fonte: O Autor

Uma vez que o teste 4 (T4) utilizando 25 mg de sílica apresentou a melhor recuperação (74 compostos) comparado aos demais testes utilizando d-SEP e SPE, foram propostos novos testes, conforme demonstra a Tabela 11, nos quais foram mantidas as proporções de C18 e PSA utilizadas nos testes T1 a T6, mas variando-se

as quantidades de sílica (25 mg, 50 mg e 125 mg), a fim de avaliar se a quantidade está relacionada a recuperação dos compostos.

Na Figura 12 estão demonstradas as recuperações avaliadas entre 70 e 120% com RSD \leq 20% para os 5 testes (T10 a T14) realizados utilizando sílica. Avaliando-se a recuperação dos compostos nos testes mencionados, é possível verificar que a proporção C18/sílica 1:1 (m/m) combinados com PSA apresentou a maior quantidade de compostos recuperados (77 compostos).

Figura 12 - Número de compostos recuperados, 70-120% com RSD \leq 20%, empregando diferentes proporções de sílica por d-SPE.



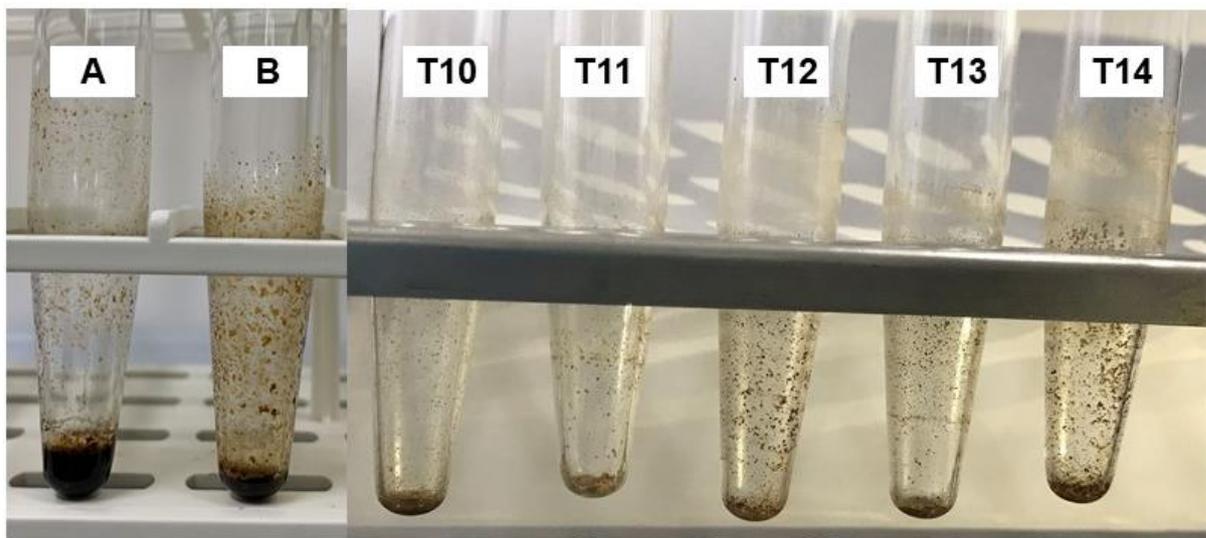
Fonte: O Autor

Na literatura, relata-se que para determinação de agrotóxicos em cereais ou matrizes oleosas o uso de PSA favorece a remoção de coextrativos lipídicos do extrato final e favorece a recuperação de compostos (WALORCZYK; DROŹDŹYŃSKI, 2012). O uso de C18 é indicado para matrizes como cereais e grãos oleosos, para a remoção de lipídios não afetando negativamente a recuperação dos agrotóxicos (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015). De acordo com Cabrera (2012) a utilização em conjunto de PSA e C18 potencializa a limpeza do extrato e amplia o uso em diferentes tipos de amostras e analitos. A combinação desses sorventes com uma proporção 1:1 de C18/Sílica possibilitou percentuais adequados de recuperação e RSD para 77 agrotóxicos.

4.3.3 Avaliação gravimétrica dos coextrativos obtidos após realização da etapa de extração

A avaliação da quantidade de coextrativos presentes no extrato final foi realizada utilizando o método QuEChERS modificado antes e após etapa de limpeza por d-SPE, conforme os ensaios descritos na Tabela 11. Além disso, avaliou-se o impacto da ausência da sílica (Si) na etapa de limpeza. Os procedimentos de extração foram realizados, em triplicata, na amostra “branco” de canola. A Figura 13 apresenta a aparência de cada um dos testes (T10 a T4), o ensaio sem a utilização de limpeza (A) e o ensaio sem a utilização da sílica (B) após a realização dos experimentos descritos no item 3.9.4.

Figura 13 - Avaliação visual dos extratos obtidos, após a análise gravimétrica, utilizando o método QuEChERS modificado com e sem etapa de limpeza por d-SPE.



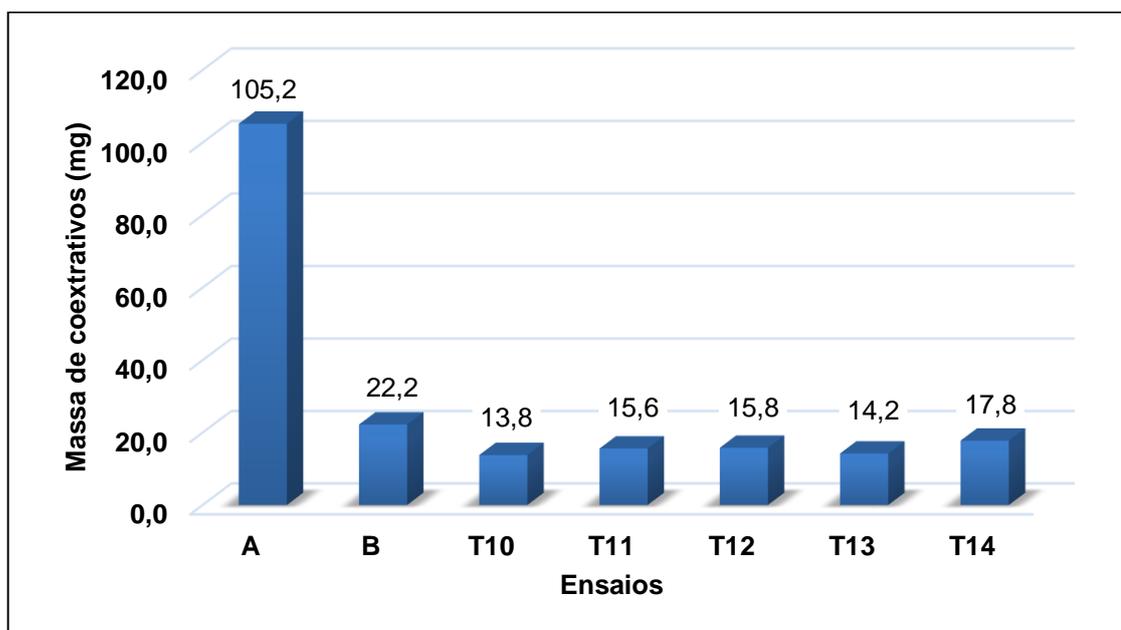
Fonte: O Autor

A=QuEChERS modificado s/ limpeza; B= QuEChERS modificado c/ limpeza 125 mg C18 + 25 mg PSA; T10= QuEChERS modificado c/limpeza 125 mg C18 + 25 mg PSA + 50 mg Si; T11= QuEChERS modificado c/limpeza 125 mg C18 + 25 mg PSA + 125 mg Si; T12= QuEChERS modificado c/limpeza 125 mg C18 + 50 mg Si; T13= QuEChERS modificado c/limpeza 125 mg C18 + 125 mg Si; T14= QuEChERS modificado c/limpeza 125 mg C18 + 25 mg Si.

De acordo com os dados apresentados na Figura 14, as menores quantidades de coextrativos não voláteis estão presentes nos extratos submetidos a limpeza utilizando maiores proporções de sílica (T10, T11 e T13), sendo que o ensaio que apresentou melhor desempenho em relação a remoção de coextrativos foi o T10, o qual é constituído de 125 mg C18, 25 mg PSA e 50 mg sílica, demonstrando uma

eficácia de 86,9% na limpeza do extrato em relação ao ensaio não submetido a limpeza (A). O teste realizado sem a utilização de sílica (B) demonstrou uma redução elevada de coextrativos, porém com menor eficácia em relação aos demais testes, os quais foi utilizado sílica em diferentes proporções, ficando evidente que a utilização deste sorvente contribui com a limpeza do extrato. O teste A, não submetido a etapa de limpeza, apresentou quantidades significativas de coextrativos não-voláteis (105,2 mg). Portanto, fica evidente a necessidade de realização de etapa de limpeza, a fim de que se tenha uma menor quantidade de coextrativos não voláteis no extrato final, contribuindo para uma menor manutenção do sistema cromatográfico.

Figura 14 - Comparação entre as quantidades de coextrativos não-voláteis remanescentes utilizando QuEChERS modificado com e sem etapa de limpeza.



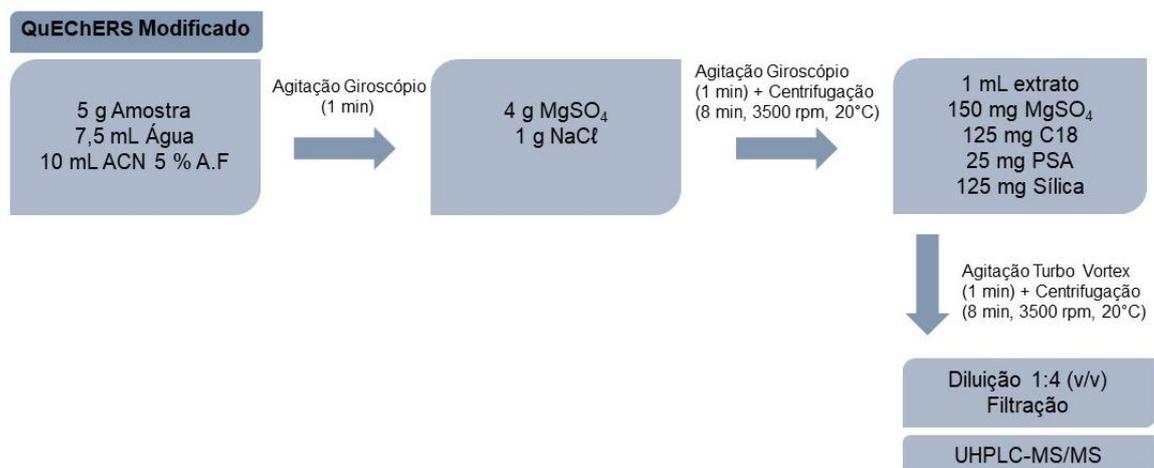
Fonte: O Autor

4.3.4 Método QuEChERS modificado otimizado

Após a realização dos testes a fim de verificar o melhor método de extração e os sorventes de limpeza e suas respectivas proporções, foi possível propor um método final, demonstrado na Figura 15, que consiste na extração de agrotóxicos utilizando 5 g de amostra de canola, 7,5 mL de água ultrapura e 10 mL de acetonitrila 5% ácido fórmico. A partição entre a fase aquosa e orgânica foi realizada utilizando 4 g de $MgSO_4$ anidro e 1 g de $NaCl$. As proporções dos sorventes de limpeza propostos que

apresentaram a melhor recuperação e limpeza do extrato foram 125 mg C18, 25 mg PSA e 125 mg Sílica. A validação do método foi realizada conforme descrito no item 3.10. A Figura 15 mostra um esquema do procedimento de extração final.

Figura 15 - Método QuEChERS modificado otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em canola por UHPLC-MS/MS.



Fonte: O Autor
 Leia-se: ACN - acetonitrila; A.F - ácido fórmico

A validação do método QuEChERS modificado foi realizada utilizando o sistema UHPLC-MS/MS nas condições descritas no item 3.7. Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz (canola).

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE CANOLA

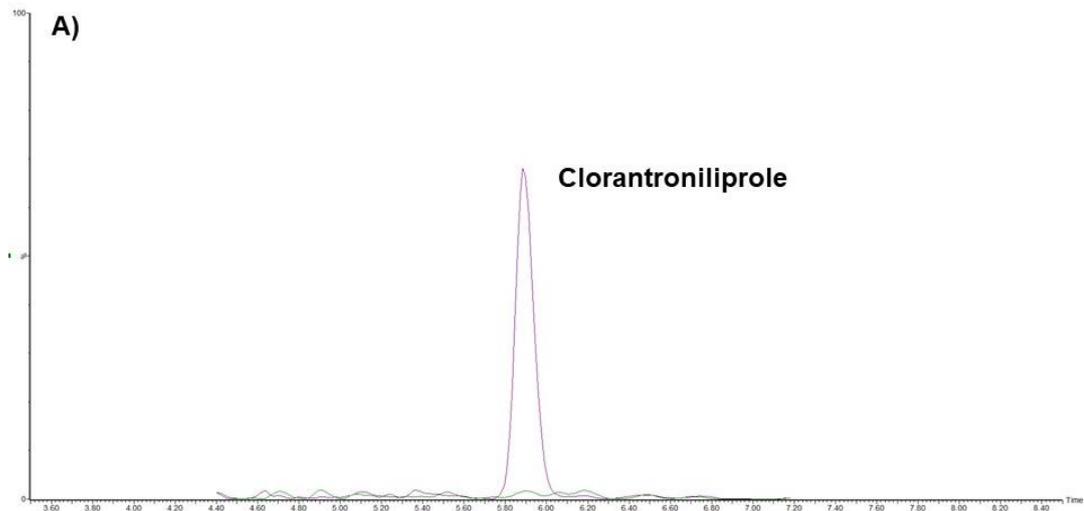
4.4.1 Seletividade

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

A seletividade foi avaliada através da injeção do extrato branco da matriz. Na Figura 16 observa-se os cromatogramas da amostra branco e de uma solução padrão de clorantraniliprole na concentração de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz.

Como não se observaram agrotóxicos de interesse, a amostra “branco” foi utilizada para confecções das curvas analíticas e ensaios de fortificação.

Figura 16 - Avaliação da seletividade para comparação da amostra branco de canola e transição SRM para clorantraniliprole 25 µg L⁻¹ preparada no extrato da matriz.



Fonte: o Autor

4.4.2 Curva analítica e linearidade

A faixa linear foi avaliada para cada analito em triplicata preparando-se a curva no extrato branco da matriz nas concentrações de 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 e 50 µg L⁻¹. O coeficiente de determinação (r^2) obtido através da regressão linear dos pontos da curva analítica preparada no extrato da “amostra branco” apresentou-se $r^2 > 0,9934$ para todos os compostos avaliados, como pode ser visto na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados obtidos na etapa de validação do método QuEChERS para os parâmetros de validação LOQ, LOD, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz.

compostos	recuperação (%) e precisão (RSDr %)			recuperação (%) e precisão intermediária (RSDpi %)			LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	efeito matriz (%)
	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$				
3-hidroxi-carbofurano	116 (11)	99 (6)	93 (4)	101 (10)	98 (9)	95 (9)	10	3	0,9990	-78
atrazina	86 (6)	80 (6)	74 (3)	91 (8)	74 (8)	71 (4)	10	3	0,9997	-70
azinfós metílico	109 (9)	101 (7)	94 (6)	100 (20)	97 (12)	94 (6)	10	3	0,9994	-43
azoxistrobina	109 (3)	106 (2)	105 (1)	116 (6)	107 (2)	105 (3)	10	3	1,0000	-25
bitertanol	88 (8)	95 (11)	91 (12)	100 (15)	77 (19)	77 (12)	10	3	0,9983	-63
boscalida	111 (14)	97 (12)	85 (12)	102 (12)	94 (5)	87 (4)	10	3	0,9996	-56
brumoconazol	73 (14)	84 (14)	76 (14)	93 (8)	83 (11)	78 (15)	10	3	0,9994	-71
buprofezina	84 (3)	81 (5)	83 (4)	77 (5)	80 (3)	79 (3)	10	3	0,9999	-5
carbaril	105 (5)	93 (3)	94 (4)	94 (7)	95 (5)	93 (3)	10	3	0,9998	-56
carbendazim	84 (17)	78 (8)	76 (6)	91 (5)	82 (9)	74 (3)	10	3	0,9986	-93
carbofurano	114 (6)	101 (4)	97 (7)	119 (4)	107 (1)	99 (4)	10	3	0,9990	-59
carboxina	103 (5)	94 (3)	90 (2)	95 (3)	95 (5)	92 (4)	10	3	0,9999	-51
clorpirifós metílico	-	87 (12)	77 (16)	-	97 (15)	72 (15)	10	3	0,9937	-84
ciantraniliprole	116 (10)	97 (10)	95 (6)	106 (16)	104 (5)	103 (5)	10	3	0,9998	-28
cletodim	111 (19)	94 (16)	81 (15)	102 (16)	86 (18)	70 (8)	10	3	0,9962	-81
clomazona	102 (3)	95 (4)	89 (2)	118 (4)	96 (3)	89 (4)	10	3	0,9998	-45
clorantraniliplore	117 (13)	102 (8)	95 (4)	116 (18)	101 (7)	94 (6)	10	3	0,9995	-44
clorimurum etílico	98 (16)	94 (8)	92 (4)	117 (12)	97 (5)	89 (5)	10	3	0,9999	41
cianazina	112 (12)	94 (4)	88 (4)	105 (12)	96 (4)	88 (4)	10	3	0,9995	-49
ciproconazol	117 (18)	79 (16)	95 (5)	113 (17)	88 (6)	83 (7)	10	3	0,9982	-32
difenoconazol	88 (16)	86 (11)	73 (11)	86 (10)	72 (10)	72 (10)	10	3	0,9984	-88
dimetoato	105 (7)	92 (5)	92 (5)	103 (15)	98 (4)	99 (2)	10	3	0,9994	-80
epoxiconazol	106 (10)	99 (8)	86 (5)	98 (11)	89 (10)	87 (7)	10	3	0,9993	-55

(continuação)

compostos	recuperação (%) e precisão (RSDr %)			recuperação (%) e precisão intermediária (RSDpi %)			LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	efeito matriz (%)
	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$				
fenarimol	113 (6)	84 (15)	79 (10)	103 (20)	75 (16)	71 (7)	10	3	0,9993	-47
fembuconazol	-	118 (6)	96 (13)	-	81 (15)	87 (8)	25	8	0,9953	-58
fempropimorfe	93 (4)	94 (4)	88 (3)	118 (4)	94 (2)	90 (5)	10	3	1,0000	-16
fentiona	78 (20)	92 (19)	77 (8)	112 (13)	88 (12)	86 (12)	10	3	0,9986	-83
fipronil	-	116 (10)	103 (11)	-	93 (9)	99 (7)	25	8	0,9966	-13
fluquiconazol	103 (17)	96 (10)	100 (11)	90 (20)	86 (19)	87 (12)	10	3	0,9970	-58
flusilazol	-	98 (3)	106 (9)	-	81 (14)	87 (10)	25	8	0,9974	-90
flutolanil	106 (12)	102 (8)	98 (9)	117 (7)	103 (9)	99 (8)	10	3	0,9995	-59
flutriafol	104 (8)	98 (5)	95 (3)	114 (6)	102 (5)	98 (3)	10	3	0,9999	-12
fluxaproxade	96 (18)	107 (18)	112 (8)	120 (18)	102 (17)	109 (14)	10	3	0,9985	11
imazalil	81 (10)	79 (3)	77 (4)	101 (7)	87 (3)	79 (5)	10	3	0,9999	-42
imazapique	101 (8)	86 (5)	82 (9)	120 (5)	95 (3)	88 (3)	10	3	0,9998	-70
imazetapir	101 (5)	89 (5)	88 (3)	95 (4)	95 (3)	90 (2)	10	3	0,9997	-57
imidacloprido	83 (9)	79 (7)	79 (7)	98 (9)	100 (5)	88 (6)	10	3	0,9993	-60
iprovalicarbe	116 (5)	104 (3)	97 (9)	106 (5)	97 (5)	96 (5)	10	3	0,9994	-52
linurom	95 (7)	93 (7)	87 (5)	100 (10)	92 (3)	90 (4)	10	3	0,9998	-56
malationa	107 (14)	102 (6)	97 (7)	116 (15)	102 (2)	99 (6)	10	3	1,0000	-47
mecarbam	119 (10)	104 (3)	102 (5)	109 (14)	98 (8)	92 (8)	10	3	0,9994	-49
mepronil	114 (7)	97 (8)	88 (5)	118 (6)	95 (8)	87 (4)	10	3	0,9994	-57
metalaxil	99 (4)	98 (3)	100 (5)	105 (4)	100 (3)	98 (4)	10	3	0,9998	-26
metconazol	95 (7)	91 (9)	76 (9)	93 (17)	78 (11)	76 (6)	10	3	0,9992	-74
metamidofós	102 (3)	83 (3)	76 (2)	108 (9)	87 (1)	77 (1)	10	3	0,9988	-49
metiocarbe	100 (4)	90 (2)	85 (2)	100 (3)	91 (2)	95 (8)	10	3	0,9994	42
metsulfurom metílico	109 (8)	102 (4)	94 (9)	79 (6)	93 (5)	94 (4)	10	3	1,0000	50
monocrotofós	98 (5)	89 (3)	87 (2)	119 (1)	101 (2)	92 (9)	10	3	0,9996	-55
monolinurom	106 (5)	96 (3)	96 (1)	110 (5)	98 (3)	95 (3)	10	3	0,9998	-44

(Continuação)

compostos	recuperação (%) e precisão (RSDr %)			recuperação (%) e precisão intermediária (RSDpi %)			LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	efeito matriz (%)
	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$				
miclobutanil	75 (19)	108 (12)	99 (9)	85 (12)	91 (8)	88 (17)	10	3	0,9984	-31
oxamil	118 (7)	102 (7)	97 (4)	102 (4)	98 (2)	95 (3)	10	3	0,9942	-59
paraoxon etílico	107 (4)	98 (2)	96 (3)	114 (3)	104 (2)	98 (1)	10	3	0,9997	-36
pirimicarbe	81 (2)	77 (2)	72 (2)	84 (5)	77 (2)	78 (5)	10	3	0,9997	-72
pirimifós metílico	92 (2)	81 (2)	81 (1)	103 (4)	85 (3)	78 (4)	10	3	0,9998	-45
procloraz	88 (9)	84 (6)	82 (3)	107 (8)	84 (4)	79 (4)	10	3	0,9993	-53
profenofós	-	89 (8)	70 (14)	-	86 (17)	70 (6)	25	8	0,9992	-88
propiconazol	99 (16)	81 (10)	73 (4)	100 (16)	74 (15)	75 (9)	10	3	0,9963	-83
propoxur	108 (7)	105 (6)	98 (5)	102 (3)	102 (3)	103 (4)	10	3	0,9998	-49
piraclostrobina	77 (13)	84 (11)	79 (13)	111 (16)	84 (11)	76 (10)	10	3	0,9995	-92
pirazofós	106 (10)	97 (7)	88 (8)	96 (14)	83 (5)	85 (11)	10	3	0,9996	-65
piridafentiona	105 (6)	101 (6)	97 (3)	118 (6)	100 (4)	97 (7)	10	3	0,9999	-39
saflufenacil	116 (1)	108 (2)	105 (1)	120 (2)	109 (1)	105 (6)	10	3	0,9998	27
simazina	90 (16)	81 (6)	77 (6)	119 (14)	93 (10)	80 (6)	10	3	0,9999	-68
tebuconazol	-	111 (11)	88 (15)	-	91 (19)	73 (18)	25	8	0,9937	-72
tebufenozida	102 (13)	98 (14)	106 (14)	109 (14)	96 (14)	92 (16)	10	3	0,9992	-88
teflubenzurom	99 (11)	94 (10)	82 (16)	106 (11)	80 (8)	84 (13)	10	3	0,9948	-93
terbufós	-	83 (15)	79 (17)	-	72 (7)	75 (18)	25	8	0,9934	-91
tetraconazol	109 (20)	102 (6)	96 (5)	95 (13)	90 (11)	96 (8)	10	3	0,9986	-64
tiacloprido	98 (4)	88 (2)	86 (2)	101 (4)	94 (3)	93 (3)	10	3	0,9997	-83
tiametoxam	101 (14)	87 (7)	86 (3)	119 (5)	107 (7)	109 (6)	10	3	0,9996	-65
tiodicarbe	113 (13)	85 (5)	73 (4)	100 (9)	93 (7)	91 (8)	10	3	0,9988	-24
tiofanato metílico	90 (8)	79 (4)	74 (7)	107 (7)	101 (4)	114 (18)	10	3	0,9999	-50
tolcofós metílico	-	106 (16)	78 (20)	-	88 (19)	71 (8)	25	8	0,9970	-85
triadimefom	99 (19)	92 (13)	89 (10)	110 (11)	91 (3)	88 (8)	10	3	0,9994	-42
triadimenol	93 (19)	95 (12)	90 (10)	114 (17)	84 (11)	94 (5)	10	3	0,9997	-7

compostos	(Conclusão)									
	recuperação (%) e precisão (RSDr %)			recuperação (%) e precisão intermediária (RSDpi %)			LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	Efeito matriz (%)
	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$				
triazofós	113 (15)	105 (3)	97 (4)	120 (4)	101 (2)	97 (5)	10	3	0,9999	-59
trifloxistrobina	111 (16)	108 (7)	95 (11)	101 (12)	88 (8)	90 (9)	10	3	0,9987	-89
vamidationa	98 (10)	95 (5)	90 (4)	98(11)	93 (6)	88 (3)	10	3	0,9997	-71

Leia-se: RSDr – Desvio padrão relativo a repetibilidade; RSDpi - Desvio padrão relativo a precisão intermediária; r^2 – Coeficiente de correlação; LOD

– Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação.

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

O LOQ foi considerado como sendo o menor nível de fortificação no qual a precisão e a exatidão ficaram dentro dos limites aceitáveis (recuperação entre 70 e 120% e RSD <20%) (SANTE, 2021; INMETRO, 2020). O limite de detecção (LOD) foi calculado dividindo-se o valor do LOQ por 3,33 (INMETRO, 2020).

O LOQ foi estabelecido como 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o LOD como 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a maior parte dos compostos. Apenas os compostos fipronil, terbufós, tolcofós metil, flusilasol e fembuconazol apresentaram LOQ de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LOD de 8 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A legislação vigente estabelece valores de LMR somente para alguns agrotóxicos em canola, conforme demonstrado na Tabela 5. Os valores de LOQ obtidos durante a validação do método proposto, estão de acordo com a legislação, uma vez que atendem aos LMR estabelecidos. O LOQ e o LOD para cada composto estão descritos na Tabela 13.

4.4.4 Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão

Com o objetivo de avaliar a exatidão do método, foram realizados ensaios de fortificação, em três níveis de concentração (10, 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em sete replicatas utilizando o método QuEChERS modificado.

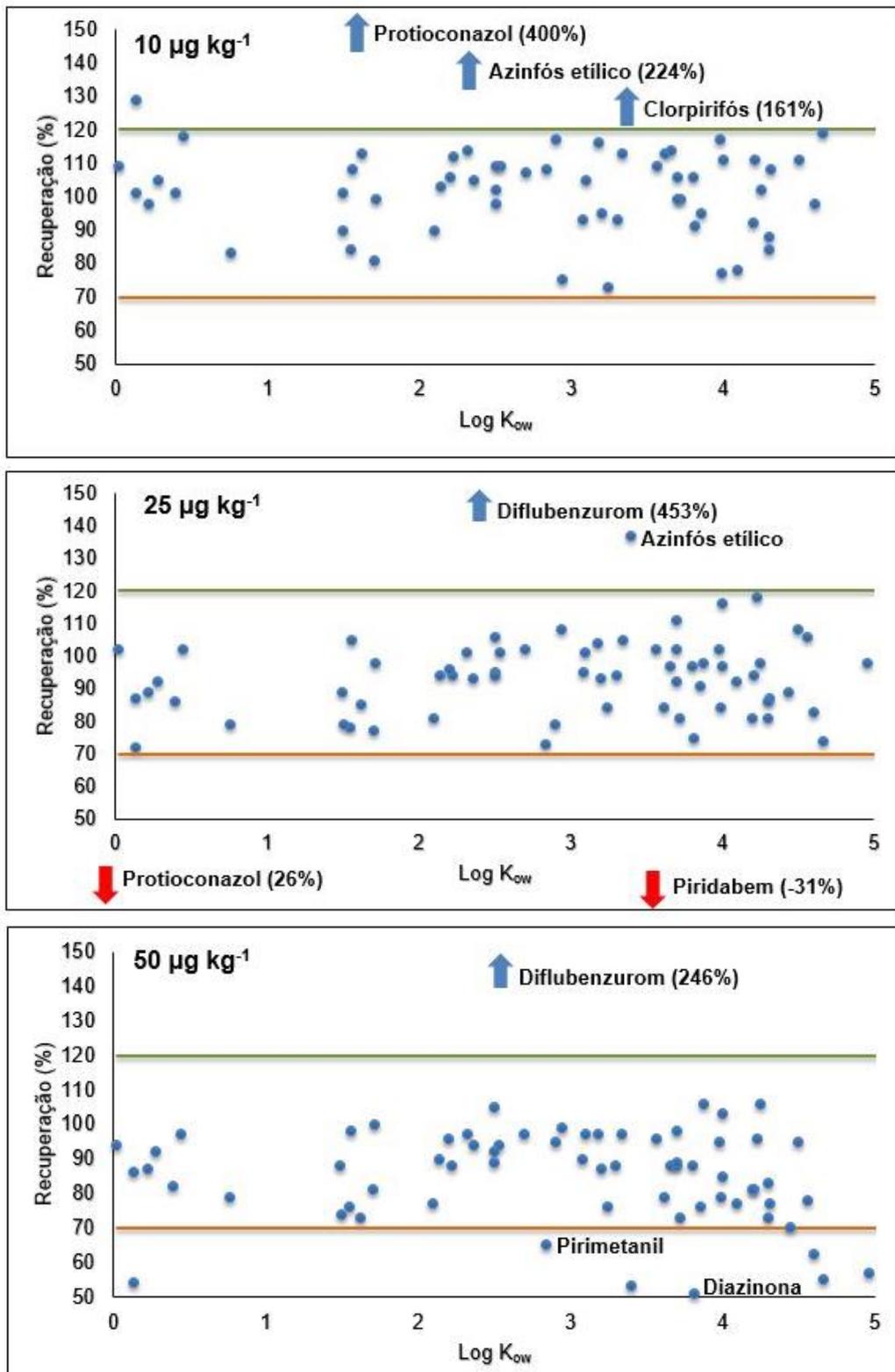
Os percentuais de recuperação foram calculados utilizando curva analítica preparada no extrato da “amostra branco”. Considerou-se o critério de recuperação entre 70 e 120% e RSD \leq 20% conforme o recomendado pela legislação internacional SANTE, 2021). Dos 89 compostos em estudo, 11 não apresentaram valores de recuperação adequados ao critério estabelecido para um ou todos os níveis de fortificação, são eles: azinfós etílico, clorpirifós, diazinona, diflubenzurom, fluazafope-p-butílico, mevinfós, propargito, protioconazol, piridabem, pirimetanil e quinoxifem. Os compostos com maior coeficiente de partição octanol-água ($\log k_{ow} > 3$) e baixa solubilidade em água, como é o caso do azinfós etílico ($\log k_{ow} = 3,4$ e solubilidade em água = 10,5 mg L^{-1}), clorpirifós ($\log k_{ow} = 4,96$ e solubilidade em água = 0,36 mg L^{-1}), diazinona ($\log k_{ow} = 3,81$ e solubilidade em água = 6,45 mg L^{-1}), diflubenzurom ($\log k_{ow} = 3,89$ e solubilidade em água = 0,08 mg L^{-1}).

L⁻¹), fluazifope-p-butílico (log k_{ow} = 4,6), propargito (log k_{ow} = 3,7 e solubilidade em água = 0,21 mg L⁻¹), piridabem (log k_{ow} = 6,36 e solubilidade em água = 0,012 mg L⁻¹) e quinoxifem (log k_{ow} = 4,66 e solubilidade em água = 0,05 mg L⁻¹) apresentaram baixas recuperações nos níveis de fortificação. Segundo Jiang e colaboradores (2012) as recuperações para compostos com log k_{ow} >3 e pouca solubilidade em água geralmente são baixas, tratando-se de matrizes gordurosas.

Ao relacionar o percentual de recuperação com o log K_{ow} de cada composto, evidenciado na Figura 17, observou-se que a maioria dos compostos com acentuada redução da recuperação apresentam características hidrofóbicas, isto é, log K_{ow} acima de três. Dessa forma, eles possivelmente ficaram dissolvidos aos lipídeos durante o processo de extração ou limpeza.

De acordo com a Tabela 13, as recuperações variaram entre 71 e 120%. Os compostos clorpirifós-metílico, fenbuconazol, flusilasol, profenofós, tebuconazol, terbufós e tolcófós metílico não apresentaram recuperação entre 70 e 120% no nível de fortificação 10 µg kg⁻¹ devido à baixa razão sinal/ruído para este nível de fortificação no instrumento analítico. Portanto, estes compostos não foram validados na menor faixa avaliada, apresentando porém, recuperação adequada para os níveis 25 e 50 µg kg⁻¹.

Figura 17 - Percentual de recuperação versus log K_{ow} de cada composto para os ensaios de exatidão nas concentrações 10, 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.



Fonte: O Autor

Entretanto, outros compostos com características hidrofóbicas não foram afetados, entre eles a buprofezina ($\log K_{ow}$ 4,30), fentiona ($\log K_{ow}$ 4,09) e o tolcofós metílico ($\log K_{ow}$ 4,56). Observa-se que muitas variáveis são responsáveis pela recuperação dos compostos, como: a partição de um analito entre uma fase aquosa e outra orgânica pela adição de sais que depende do tipo e quantidade de sal; a estrutura da molécula; da distribuição das espécies em função do pH, em decorrência dos valores de pK_a dos grupos ionizáveis; e das mudanças de solubilidade de acordo com a força iônica (KAUFMANN, 2014 *et al.*, 2014; GRECCO *et al.*, 2018).

4.4.5 Precisão (repetitividade) e precisão intermediária

A precisão do método desenvolvido foi avaliada em função da repetitividade (RSDr) e da precisão intermediária (RSDpi). A repetitividade foi avaliada a partir de sete extrações nos níveis de fortificação 10, 25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ da matriz “branco” proposta.

Em relação a precisão intermediária do método, a avaliação ocorreu utilizando dias de análise diferentes, empregando os mesmos níveis de fortificação aplicados na repetitividade. A Tabela 13 mostra os resultados para a precisão (repetitividade e precisão intermediária). Os RSDr e RSDpi variaram entre 1 a 20%.

Os compostos clorpirifós-metílico, fenbuconazol, flusilasol, profenofós, tebuconazol, terbufós e tolcofós metílico não apresentaram $RSD \leq 20\%$ no nível de fortificação 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Além disso, apresentaram percentuais de recuperação $< 70\%$ na faixa de concentração avaliada.

4.4.6 Efeito matriz

O efeito matriz foi calculado para todos os compostos através da comparação dos coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas no solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz (canola). A faixa de concentração avaliada foi de 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados da avaliação do efeito matriz são apresentados na Tabela 13.

Pode-se dizer que analitos que apresentam resultados de efeito matriz superior a 20%, sofrem efeito significativo da matriz sob sua resposta cromatográfica (CARDOSO,

NÓBREGA e ABRANTES, 2008; SANTE, 2021). Para efeito matriz superior a 20% as curvas preparadas em solvente não são adequadas para determinação dos analitos na matriz em questão, já que são fontes de erro quantitativos bastante importantes (SANTE, 2021). Quanto menor a concentração dos analitos, mais significativo é o efeito da matriz sobre eles.

Observa-se que foram encontrados valores positivos e negativos, significando assim que a matriz causou tanto aumento quanto supressão de sinal, respectivamente, dependendo do analito avaliado. Os valores de efeito matriz variaram entre -93 e 50%. Percebe-se que o efeito matriz apenas não foi significativo (-20 a 20%) para 6 compostos, são eles: buprofezina, fipronil, fempropimorfe, flutriafol, fluxapiroxade e triadimenol. Os compostos que apresentaram os valores mais negativos foram o carbendazim (-93%), flusilazol (-90%), piraclostrobina (-92%), teflubenzurom (-93%) e terbufós (-91%).

5. DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE CANOLA

O método validado neste trabalho foi aplicado à 21 amostras (A1 a A21) de canola cultivadas na região das Missões, principalmente por agricultores residentes nas cidades e comunidades arredores da cidade de São Luiz Gonzaga no estado do Rio Grande do Sul. A Tabela 14 apresenta os resultados de 11 amostras de canola avaliadas que apresentaram resíduo de agrotóxicos.

Das 11 amostras de canola que apresentaram algum resíduo de agrotóxico, 27,3% delas contém resíduo de agrotóxicos não permitidos no Brasil e União Europeia para a cultura. Observando-se apenas os compostos não permitidos no Brasil, esse valor aumenta para 72,7%. A presença de resíduo de agrotóxico não permitido para cultura é recorrente, como evidencia os resultados do programa PARA do ciclo 2017/2018. Das 4.616 amostras analisadas pelo programa, de 941 amostras (20,4%) apresentou resíduos de agrotóxicos não permitidos para as culturas avaliadas (ANVISA, 2022c).

O agrotóxico que apareceu com maior frequência (6 amostras) foi o fungicida epoxiconazol, numa faixa de concentração de <LOQ (amostra A10) à 0,064 mg kg⁻¹ (amostra A11). Este é um fungicida sistêmico e não possui seu uso autorizado para o cultivo da canola no Brasil e União Europeia.

A amostra A6 apresentou concentração de resíduo do agrotóxico teflubenzuron de 0,026 mg kg⁻¹ para um limite máximo de resíduo definido para a União Europeia de 0,02 mg kg⁻¹. Para o Brasil, o LMR deste composto é de 2 mg kg⁻¹, portanto, a amostra apresenta conformidade com a legislação brasileira, mas está inapta para exportação a países da União Europeia.

O composto trifloxistrobina apresentou elevado valor de concentração para a amostra A6, 0,26 mg kg⁻¹. Também foi possível detectar a presença deste composto nas amostras A3, A7, A9 e A11. No entanto, este agrotóxico não é permitido para a cultura de canola no país e na União Europeia. Trata-se de um fungicida utilizado principalmente de soja, trigo, milho, feijão e algodão.

Foi identificada a presença de resíduo de propiconazol em uma das amostras de canola analisadas neste estudo, apresentando concentração abaixo do LOQ do método proposto. Zayats, Leschev e Zayats (2015) identificaram a presença de resíduo de propiconazol (0,25 mg kg⁻¹) em amostras de óleo de canola analisadas em Bielorrússia

acima do LMR ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$). Jiang e colaboradores (2012) não encontraram resíduo deste composto em amostras de canola e óleo de canola comercializados na China.

Tabela 14 - Resultados em mg kg⁻¹ das 11 amostras de canola que apresentaram resíduos de agrotóxicos utilizando o método QuEChERS modificado e UHPLC/MS-MS.

Compostos	LOQ (mg kg ⁻¹)	LMR (mg kg ⁻¹)		concentração de agrotóxicos (mg kg ⁻¹)											
				amostras											
				ANVISA	EU	Codex	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
Ciproconazol	0,01	-	0,4	0,4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,039	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Clorantraniliprole	0,01	-	2	2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,011	0,015	n.d	0,017
Epoxiconazol	0,01	-	-	-	n.d	0,022	n.d	n.d	n.d	n.d	0,019	0,026	0,040	<LOQ	0,064
Imidacloprido	0,01	-	0,1	0,05	n.d	n.d	n.d	n.d	0,014	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Iprovalicarbe	0,01	-	-	-	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Piraclostrobina	0,01	0,2	0,2	-	n.d	n.d	n.d	n.d	0,01	n.d	n.d	0,012	0,011	0,015	n.d
Propiconazol	0,01	-	0,05	0,02	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Saflufenacil	0,01	-	0,6	0,6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ
Teflubenzurom	0,01	2	0,02	-	n.d	n.d	n.d	0,026	n.d						
Trifloxistrobina	0,01	-	-	-	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	0,260	<LOQ	n.d	<LOQ	n.d	<LOQ

Fonte: O Autor. Leia-se: n.d – não detectado; <LOQ – concentração menor que o limite de quantificação do método.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho consistiu na avaliação do método *Swedish* (acetato de etila), e de quatro versões do método QuEChERS, utilizando d-SPE, SPE e LTP, para determinação multirresíduo de agrotóxicos em canola por UHPLC-MS/MS.

Os ensaios utilizando o método *Swedish* apresentaram como desvantagem a elevada extração de lipídeos.

A etapa de precipitação a baixa temperatura (LTP) aplicada aos extratos obtidos nas diferentes versões do método QuEChERS (original, acetato e citrato, seguido de d-SPE) não apresentou boa remoção de coextrativos quando comparado ao extrato não submetido a etapa de congelamento. A utilização da técnica de SPE não evidenciou interessante recuperação dos analitos se comparada a d-SPE.

Os resultados demonstraram que o método QuEChERS modificado com ácido fórmico 5% (v/v) combinado com d-SPE utilizando uma mistura de sorventes C18, PSA e sílica foi o mais adequado, considerando que possibilitou a recuperação de um maior número de 78 agrotóxicos de diferentes classes.

A otimização das condições do sistema UHPLC-MS/MS proporcionou a separação e determinação simultânea de 78 agrotóxicos com seletividade e detectabilidade adequadas.

O método proposto neste trabalho foi validado, de acordo com os parâmetros do Guia SANTE (2021), para agrotóxicos de uso autorizado e não autorizado pela ANVISA para o cultivo de canola no Brasil, União Europeia e *Codex Alimentarius*. Todos os 78 agrotóxicos avaliados neste estudo atingiram valores de LOQ que atendem aos LMRs estabelecidos pela legislação nacional e internacional. Foram encontrados resíduos de agrotóxicos em 11 das 21 amostras de canola analisadas, o que ressalta a necessidade de monitoramento dessa cultura.

Dessa forma, conclui-se que o método QuEChERS modificado proposto para determinação de agrotóxicos em canola, mostrou-se eficaz, bem como o uso do sistema UHPLC/MS-MS, podendo ser aplicados em análises de rotina e monitoramento, uma vez que atendem as legislações de acordo com os parâmetros de validação de métodos cromatográficos.

7. REFERÊNCIAS

A. ANDERSSON, H. PÅHLSHEDEN, Pesticide Analytical Methods in Sweden. Part 1. Rapport 17/98, **National Food Administration**, Uppsala, Sweden, 1998, pp. 9–41.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS DEFENSIVOS GENÉRICOS (AENDA). **Produtos registrados no Brasil** – fevereiro 2019.

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.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Sistema de informações sobre agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>>. Acesso em: 26 de fevereiro de 2022a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Monografias de agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoinformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>. Acesso em: 8 mar. 2022b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em: 21 fev. 2022c.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Anvisa aprova novo marco regulatório para agrotóxicos**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-aprova-novo-marco-regulatorio-para-agrotoxicos/219201. Acesso em: 22 de outubro de 2021a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil**. Disponível em: <<https://bit.ly/2WD8grj>>. Acesso em 02 out 2021b.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Classificação e Rotulagem de agrotóxicos**. 2005. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/secex/ghs/curso>>. Acesso em: 29 de abril de 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA): relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012**. Brasília, outubro de 2014.

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

ANASTASSIADES M, SCHERBAUM E, TASDELEN B, STAJNBAHER D (2007) Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In: Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW (eds) **Pesticide chemistry. Crop protection, public health, environmental safety**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

ANASTASSIADES, M; *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v.86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE CANOLA (ABRASCANOLA). **Projeção da Associação Brasileira dos Produtores de Canola reflete uma combinação de fatores conjunturais e estruturais**. Disponível em: <https://abrascanola.com.br/noticias/284/area-de-canola-pode-crescer-ate-45-no-rs>. Acesso em: 26 set. 2022.

BAIRD, C e CANN, M. **Química Ambiental**. 4a ed. - Porto Alegre: Bookman, 2011, 644 p. 45.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 622 p, 2002.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004, p. 15-34.

BARCELÓ, D.; HENNION, M.C. Trace Determination of Pesticides and their degradation products in water. 2ª ed., **Elsevier**: Amsterdam, 2003.

BARCHANSKA, 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.

BARROS, B. Há 40 anos, DDT precipitou restrições. **Valor Econômico**, São Paulo, 22 nov. 2010. Agronegócios, p. B12.

BELARBI, S.; VIVIER, M.; ZAGHOUANI,W.; DE SLOOVERE, A.; AGASSE, V.; CARDINAEL, P. Comparison of Different d-SPE Sorbent Performances Based on Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) Methodology for Multiresidue Pesticide Analyses in Rapeseeds. **Molecules** **2021**, 26, 6727. <https://doi.org/10.3390/molecules26216727>

BENNETT, J.W. Aspergillus and koji: history practice and molecular biology. **Journal Of The Brewing Society Of Japan**, Toquio, v. 96, n. 11, p. 743-749, out. 2001.

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

BRASIL. **Governo anuncia normas para reconhecimento dos limites de resíduos de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/editoria/saude/2017/06/governo-anuncia-normas-para-reconhecimento-dos-limites-de-residuos-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 25 de out de 2021.

BRASIL. Lei nº. 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus 46 componentes e afins, e da outras providencias. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 jul. 1989.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **AMBIENTE, TRABALHO E CÂNCER: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, TOXICOLÓGICOS E REGULATÓRIOS**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/ambiente-trabalho-e-cancer-aspectos-epidemiologicos-toxicologicos-e-regulatorios>. Acesso em: 23 fev. 2022.

CABRERA L. **Estudo do efeito matriz na determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de arroz pelo método QuEChERS modificado e LC-MS/MS**. [tese]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2012.

CALDAS, S, S.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E, G. Herbicides and Environment. In: _____. Risk Estimate of Water Contamination and Occurrence of Pesticides in the South of Brazil. **Rijeka: InTech**, Cap. 23, p. 471-492, 2001.

CANOLA COUNCIL OF CANADA. **Canola grower's manual**. Disponível em: <<http://www.canolacouncil.org/cropproduction/canola-grower's-manual-contents>>. Acesso em: 01 abril 2022a.

CANOLA COUNCIL OF CANADA. **Current canola oil, meal, and seed prices**. Disponível em: <<http://www.canolacouncil.org/markets-stats/statistics/current-canola-oil,-meal,-and-seed-prices>>. Acesso em: 20 fevereiro. 2022b.

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Fourth national report on human exposure to environmental chemicals**. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 2009. Available at: <https://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/fourthreport.pdf>. Access in: 01 Fevereiro 2022.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C.; J. **Chromatogr.** 2008, 1184, 191. *Chromatography A*, v.1153, p. 36–53, 2007.

CHUNG, S. W. C., & CHAN, B. T. P. (2010). Validation and use of a fast sample preparation method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in analysis of ultratrace levels of 98 organophosphorus pesticide and carbamate residues in a total diet study involving diversified food types. **Journal of Chromatography A**. 1217, 4815–4824.

CODEX ALIMENTARIUS. **Joint FAO/WHO Food Standards Programme**. 2001. Disponível em <<http://www.fao.org/DOCREP/005/Y2200E/Y2200E00.HTM>>. Acesso em: 19 de outubro de 2021.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide Index**. Disponível em: <https://www.fao.org/faowhocodexalimentarius/codextexts/dbs/pestres/pesticides/en/>. Acesso em: 8 mar. 2022.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticides Residues in Food and Feed – Glossary of terms**. 2010. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/reference/glossary.html>>. Acesso em: 20 de out de 2021.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Tabela de dados - Produção e balanço de oferta e demanda de grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 1 mar. 2022.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: Conab. p. 72, 2014 Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_10_15_07_19_boletim_graos_janeiro_2014.pdf. Acesso em: 16 fevereiro de 2022.

CONWAY, G. Êxitos anteriores. In:_____. **Produção de alimentos no século XXI: biotecnologia e meio ambiente**. São Paulo: Estação Liberdade, 2003. cap.4, p.69-74.

CUI, YANG; KE, RUNHUI; GAO, WEI; TIAN, FEIFEI; WANG, Yawei AND JIANG, GUIBIN. Analysis of Organochlorine Pesticide Residues in Various Vegetable Oils Collected in Chinese Markets **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2020 68 (49), 14594-14602 DOI: 10.1021/acs.jafc.0c05227.

DE MATOS ,EMC; RIBEIRO, LC; PRESTES, OD; DA SILVA, JAG; DE FARIAS, BS; DE A PINTO, LA; ZANELLA, R (2019) Multiclass method for the determination of pesticide residues in oat using modified QuEChERS with alternative sorbent and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Food Anal Methods** 12:2835–2844.

DE MORI, C.; TOMM, G. O.; FERREIRA, P. E. P. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da canola no mundo e no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2014. 36 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos online, 149). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do149.htm>. Acesso em: 18 jun. 2021.

DIAS, J. C. A. **Canola/colza**: alternativa de inverno com perspectiva de produção de óleo comestível e energético. Pelotas: Embrapa-CPATB, 1992. 46 p. (Embrapa-CPATB. Boletim de Pesquisa, 3).

DOSSIÊ ABRASCO. **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Rio de Janeiro / São Paulo: Expressão Popular, 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul (2007)**. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/canola/p_sp03_2007. Acesso em: 29 set. 2022.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/visao/o-futuro-da-agricultura-brasileira>. Acesso em: 21 set. 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da canola no mundo e no Brasil, 2014**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/988475/aspectos-economicos-e-conjunturais-da-cultura-da-canola-no-mundo-e-no-brasil>. Acesso em: 23 fev. 2022.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Cultivo de Canola**. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaold=3703&p_r_p_-996514994_topicold=3024. Acesso em: 23 fev. 2022a.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Evento destaca potencial de crescimento da canola no Brasil**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/42184746/evento-destaca-potencial-de-crescimento-da-canola-no-brasil>. Acesso em: 1 mar. 2022b.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Levantamento de tecnologias empregadas no cultivo de canola pelos produtores do Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais**. 2019.. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1114872/levantamento-de-tecnologias-empregadas-no-cultivo-de-canola-pelos-produtores-do-rio-grande-do-sul-parana-e-minas-gerais>. Acesso em: 23 fev. 2022.

EU REFERENCE LABORATORIES FOR RESIDUES OF PESTICIDES (EURL-SRM). **Analysis of Acidic Pesticides using QuEChERS (EN15662) and acidified QuEChERS method 2015.**

EU REFERENCE LABORATORIES FOR RESIDUES OS PESTICIDES. **ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED SANTE 11312/2021.** Disponível em: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf. Acesso em: 1 dez. 2021

EUROPEAN COMMISSION. **EU Pesticides Database.** Disponível em: https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en. Acesso em: 8 mar. 2022.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Maximum residue levels.** Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/pesticides/mrls.htm>> Acesso em: 26 de janeiro de 2022.

EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR RESIDUES OF PESTICIDES (EURL). **Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection 0.1.** Disponível em: https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/fv/ethyl_acetate_extraction.pdf. Acesso em: 21 ago. 2022.

EYRING, P. R. M. P; HERRMANN, Susan Strange; POULSEN, Mette Erecius. Multiresidue analysis of 184 pesticides in high-fat fish feed using a new generic extraction method coupled with gas and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Appl Biol Chem.** Dinamarca, v. 64, n. 38, 2021.

FACCO, Janice de Fátima. **DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM MILHO EMPREGANDO MÉTODO QUÉCHERS MODIFICADO E LC-MS/MS.**[Tese de Doutorado]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. Programa de pós-graduação em química; 2017.

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

FERRONATO, Giovana. **DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AZEITE DE OLIVA E AZEITONAS EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS e UHPLC-MS/MS.** [Tese de doutorado]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. Programa de pós-graduação em química; 2018.

FILHO, J. E.; FISHLOW, A. **Agricultura e indústria no Brasil: inovação e competitividade.** Ipea, Brasília, 2017.

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

GRECCO, C. *et al.* Extração líquido-líquido assistida pelo efeito salting out para análise de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 10, p. 99-110, 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.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E.; **J. Chromatogr., A** 2007, 1153, 54.

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.

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.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Sistema IBGE de Recuperação Automática- SIDRA. 2012. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**. Tabela 2393 - Aquisição alimentar domiciliar per capita anual por grupos, subgrupos e produtos. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=2393&z=t&o=23>>. Acesso em: 20 set. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistemico-da-producao-agricola.html?=&t=publicacoes>. Acesso em: 28 set. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Acesso em: 15 fev. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Requisitos Gerais para a Competência dos Laboratórios de Ensaio e de Calibração**. ABNT NBR, p.12, 2017.

O INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS (2020)**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br>. Acesso em: 28 nov. 2021.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Compendium of Chemical Terminology**. 2012. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>>. Acesso em 10 set. 2021.

JARDIM, A. N.O e CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para a saúde. **Química Nova**, 2009, v. 32, n. 1, p. 1898-1909.

JIANG, Y., LI, Y., JIANG, Y., LI, J., & PAN, C. (2012). Determination of multiresidues in rapeseed, rapeseed oil, and rapeseed meal by acetonitrile extraction, lowtemperature cleanup, and detection by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 60, 5089–5098

JOBIM, P. F. C. *et al.* Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência e saúde coletiva**, 15(1):277-288, 2010.

JOKANOVIC M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v. 60, p. 166-139, 2001.

KACZYNSKI, Piotr. 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: Poland**, v. 230, p. 411-422, 2017.

KAUFMANN, A. *et al.* Multi-residue quantification of veterinary drugs in milk with a novel extraction and clean up technique: Salting out supported liquid extraction (SOSLE). **Analytica Chimica Acta**, v. 820, p. 56-68, 2014.

KEMMERICH, M.; RIZZETTI, 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 in Sweet Pepper and Analysis by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 728–739, 2015.

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.

KLAASSEN, C. D. (ed.). Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 8th ed. New York: McGraw-Hill Education, 2013.

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.

LEHOTAY, SJ; MASTOVSKA, K; LIGHTFIELD, AR (2005) Use of bufferig and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **J AOAC Intern** 88:615–629

LIU, Y. *et al.* Simultaneous Determination of 15 Multiresidue Organophosphorous Pesticides in Camellia Oil by MSPD-GC–MS. **Bull Environ Contam Toxicol**, New York, v. 90, p. 274-279, 2012.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rede Brasileira de Justiça Ambiental; Articulação Nacional de Agroecologia, 2012.

MARTINS, GL; FRIGGI, CA; PRESTES, OD; VICARI, MC; FRIGGI, DA; ADAIME, MB;; ZANELLA, R (2014) Simultaneous LC-MS/MS determination of imidazolinone herbicides together with other multiclass pesticide residues in soil. **Clean Soil Air Water** 42:1441–1449

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal Chromatography A**, v. 1040, n. 2, p. 259-272, 2004.

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.

MAY, Marília Melina. **DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM BEBIDAS À BASE DE SOJA EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E UHPLC-MS/MS**. [Dissertação de Mestrado]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. Programa de pós-graduação em química; 2016.

MCNAIR H. M.; MILLER J. M. **Basic Gas Chromatography**. New York: John Wiley & Sons. 1998.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Produção de grãos na safra 2020/21 deve chegar a 252,3 milhões de toneladas**. Disponível em:

<https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2021/09/producao-de-graos-na-safra-2020-21-deve-chegar-a-252-3-milhoes-de-toneladas>. Acesso em: 28 set. 2021.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC / Animal**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Acesso em: 28 jun. 2022.

MORAES, R. F. D. **AGROTÓXICOS NO BRASIL: PADRÕES DE USO, POLÍTICA DA REGULAÇÃO E PREVENÇÃO DA CAPTURA REGULATÓRIA**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, Brasília, v. 1, n. 2506, p. 7, set./2019. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br> . Acesso em: 19 set. 2021.

MORI, CLAUDIA DE; TOMM, GILBERTO OMAR; FERREIRA, P. E. P. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da canola no mundo e no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Passo Fundo - RS, v. 1, n. 149, p. 1, mar./2014.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Pubchem DataBase**. [s.d.] Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 05 julho 2022.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO TRABALHO (OIT). **Agricultura y sectores basados en recursos biológicos**. pp. 64.2- 64.77. In Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo, vol. III, parte X, capítulo 64. 2001. Disponível em <www.mtas.es/Publica/enciclo/default.htm>. Acessado em: 16 de maio de 2021.

OHLIN, B; JANSSON, C. Pesticide Analytical Methods in Sweden. Part 1. Rapport 17/98, **National Food Administration**, Uppsala, Sweden, 1998, pp. 63–74.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, DF: OPAS, 1996.

PAN, X. *et al.* Comparison of different cleanup procedures for oil crops based on the development of a trace analytical method for the determination of pyraclostrobin and epoxiconazole. **Sep. Sci. China**, v. 37, p. 3669-3676, 2014.

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.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.

PIHLSTRÖM, T; BLOMKVIST, G; FRIMAN, P *et al* (2007) Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Anal Bioanal Chem** 389:1773–1789.

PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidade e tendências no preparo de amostras para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**. v. 3, n. 1, p. 51-64. Brasil, 2011.

PRESTES, OSMAR D.; FRIGGI, CAROLINE A.; ZANELLA, RENATO. Quechers – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quim. nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, jul. 2009.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. **Food Chemistry**, v. 217, p. 225-233, 2017.

RIDGWAY K.; LALLJIE S. P. D.; SMITH R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1153, p. 36–53, 2007.

RIOS, Jorge Osmar. **DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM DIFERENTES VARIEDADES DE ARROZ (BRANCO, PRETO E VERMELHO) EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS E LC-MS/MS** [dissertação de mestrado]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2019.

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

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

SHINDE, R. *et al.* Development and validation of an analytical method for the multiresidue analysis of pesticides in sesame seeds using liquid- and gas chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. India, v. 1652, 2021.

SILVA, J. M. da *et al.* Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência e Saúde Coletiva**, 10(4):891-903, 2005.

SILVA, RAQUEL THOMAZ DA; RAZABONI, BÁRBARA FERNANDA SANCHEZ; ABATE, GILBERTO. ESTUDO PARA A DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS DA CLASSE DAS TRIAZINAS POR EXTRAÇÃO NO PONTO NUVEM (CPE). **Scientia chromatographica**, Curitiba -PR, v. 6, n. 3, p. 175-185, 2014.

SKI, PIOTR KACZYN'. 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**. Bialystok, Poland, v. 230, p. 411-422, 2017.

SPADOTTO, C. A., *et al.* **Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos**. Campinas: Embrapa, (Embrapa Meio Ambiente Documentos, 78), 49p, 2010. 55

STEPAN, R.; TICHA, J.; HAJŠLOVA, J. Baby food production chain: Pesticide residues in fresh apples and products. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 12, p. 1231-1242, 2005.

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

SU *et al.* Determination of organophosphorus pesticides in peanut oil by dispersive solid phase extraction gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v. 879, p. 3423-3428, 2011.

TAHA, SHERIF M.; GADALLA, SOHAIR A. Development of an efficient method for multi residue analysis of 160 pesticides in herbal plant by ethyl acetate hexane mixture with direct injection to GC-MS/MS. **TALANTA**. Egito, v. 174, p. 767-779, 2017.

TOMM, G. O. **Situação em 2005 e perspectivas da cultura de canola no Brasil e em países vizinhos**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005. 21 p. html (Embrapa Trigo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento online, 26). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp26.htm>. Acesso em: 20 maio 2021.

TRAPÉ, ANGELO ZANAGA. Agrotóxicos e saúde pública. **Visão agrícola**, n. 7, p.61-63, jan/jun 2007.

UCLÉS, N. BELMONTE, M. MEZCUA, A.B. MARTÍNEZ, M.J. MARTINEZ-BUENO, M. GAMÓN, A.R. FERNÁNDEZ-ALBA, Validation of a multiclass multiresidue method and monitoring results for 210 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatographytriple quadrupole mass spectrometry, **J. Environ. Sci. Heal. Part B** 49 (2014) 557–568.

UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE. **Pesticide Properties DataBase**. [s.d.] Disponível em: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>> Acesso em: 05 julho 2022.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Foreign Agricultural Service. **Production, supply, and distribution online**. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: 01 março 2022

VASCONCELOS, Lucia Helena. **Determinação das propriedades físicas da canola (Brassica napus), variedade Iciola 41, relacionadas a armazenagem**. 1998. 92f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/257333>>. Acesso em: 19 set. 2021.

VIERA, M.S.; *et al.* 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 of Chromatography A**, v. 1526, p. 119-127. Brasil, 2017.

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

WANG, Jian; CHEUNG, Wendy; CHOW, Willis. Ultra-High Performance Liquid Chromatography/ Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry Determination of 151 Pesticides in Soybeans and Pulses. **Journal of AOA C International**. v. 96, n. 5, p. 2013.

ZAYATS, MIKHAIL F.; LESCHEV, SERGEY M.; ZAYATS, MARINA A. An improved extraction method of rapeseed oil sample preparation for the subsequent determination in it of azole class fungicides by gas chromatography. **Analytical Chemistry Research**. Belarus, v. 3, p. 37-45, 2015.