

ALINE MARIA TEIXEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FARINHA
DE AVEIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

T266d
2019
Teixeira, Aline Maria, 1993-
Desenvolvimento de método analítico para determinação de
resíduos de agrotóxicos em farinha de aveia / Aline Maria
Teixeira. – Viçosa, MG, 2019.
xv, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.42-46.

1. Extração (Química). 2. Produtos químicos agrícolas.
3. Triadimenol. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica. II. Título.

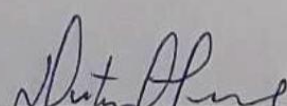
CDD 22 ed. 664.022

ALINE MARIA TEIXEIRA

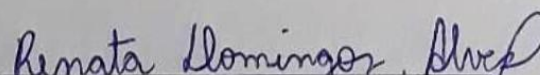
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FARINHA DE AVEIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

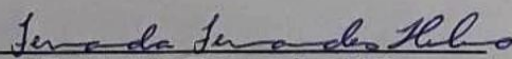
APROVADA: 27 de fevereiro de 2019.



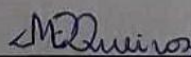
Antônio Augusto Neves



Renata Domingos Alves



Fernanda Fernandes Heleno
(Coorientadora)



Maria Eliana L. R. de Queiroz
(Orientadora)

Dedico este trabalho a *Deus*;
aos meus pais, José de Assis e Imaculada
e aos meus irmãos.

*Agradeço pelo apoio e amor
incondicional durante todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Química pela oportunidade de realizar este trabalho de pesquisa;

A minha orientadora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, agradeço pela orientação, apoio, além da amizade e companheirismo;

Aos meus coorientadores André Fernando de Oliveira e Fernanda Fernandes Heleno e ao professor Antônio Augusto Neves, agradeço os ensinamentos, contribuindo para minha formação profissional e pessoal;

Aos membros da banca examinadora que consentiram em participar da avaliação deste trabalho de pesquisa;

A Liany pela ajuda e disponibilidade;

A CNPq pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Essa dissertação é fruto de uma caminhada árdua, mas que se tornou mais leve graças à pessoas que caminharam ao meu lado, dando forças no momento de aflição e coragem nos períodos de desânimos;

Agradeço, primeiramente a Deus por nunca me abandonar e me mostrar mesmo quando me sentia incapaz, que eu não estava sozinha;

À minha família, especialmente à minha mãe Imaculada e ao meu pai José de Assis fonte eterna de inspiração, pelo apoio incondicional e paciência;

Aos meus irmãos Áurea e Édson, pelo carinho e zelo em todos os momentos;

Aos meus sobrinhos Mariah Alice e Gustavo por realçar a beleza de ser criança e fazer prosseguir minhas buscas com muita esperança;

A todos os amigos do LAQUA, em especial a Alessandra, Jéssika, Liany, Marcos, Mariane, Thaís e Vitor pela amizade e apoio que fizeram de nosso ambiente de trabalho um lugar produtivo e agradável.

Aos amigos que mesmo distante sempre estiveram presentes, ajudando em todos os momentos, em especial ao Igor, Valdeir e Mayara.

Aos colegas de curso pela agradável convivência e troca de experiências.

BIOGRAFIA

Aline Maria Teixeira, filha de José de Assis Teixeira e Maria Imaculada Pereira Teixeira, nasceu em Guiricema, Minas Gerais, em 25 de maio de 1993.

Em março de 2012, iniciou o curso de Química pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), na cidade de Viçosa – MG, diplomando-se como Licenciada em julho de 2016.

No período de março de 2014 a março de 2016 foi bolsista do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação à Docência (PIBID), com atuação na Escola Estadual Effie Rolfs, localizada na cidade de Viçosa e no espaço Ciência em Ação, do departamento de química da UFV.

Estagiou no Departamento de Química – Química Analítica, no período de agosto de 2014 a maio de 2016.

Em março de 2017 iniciou o curso de pós graduação em Agroquímica, em nível mestrado, na Universidade Federal de Viçosa – UFV, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2019.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Aveia (Avena Sativa L.).....	2
2.2. Agrotóxicos	3
2.3. Determinação de resíduos de agrotóxicos	7
2.3.1. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP).....	7
2.4. Técnicas de análises.....	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo geral.....	9
3.2. Objetivos específicos	9
4.MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1. Preparo de soluções-padrão e reagentes	9
4.2. Instrumentação	9
4.3. Amostras de farinha de aveia.....	11
4.3.1. Fortificação das amostras	11
4.4. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)	12
4.4.1. Extração dos agrotóxicos por SLE/LTP – Técnica geral	12
4.4.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP).....	12
4.4.2.1. Otimização do volume de água e volume do solvente extrator usada na SLE/LTP	12
4.4.2.2. Otimização do tempo de agitação, centrifugação e congelamento para SLE/LTP	13
4.5. Validação do método analítico	14
4.5.1. Seletividade	14
4.5.2. Linearidade da resposta do método.....	15
4.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação	15
4.5.4. Exatidão	16
4.5.5. Precisão	17
4.5.6. Repetitividade	17
4.5.7. Precisão intermediária	17
4.6. Aplicação do método.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18

5.1. Análise cromatográfica.....	18
5.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP).....	21
5.2.1. Otimização da mistura extratora usada na SLE/LTP.....	21
5.2.2. Otimização do tempo de agitação, centrifugação e congelamento.....	24
5.3. Validação do método analítico.....	28
5.3.1. Seletividade.....	28
5.3.2. Linearidade de resposta do método.....	30
5.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação.....	34
5.3.4. Exatidão.....	35
5.3.5. Precisão.....	36
5.3.6. Repetitividade.....	37
5.3.7. Precisão intermediária.....	38
5.4. Aplicação do método.....	39
6. CONCLUSÕES.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

%R – Porcentagem de Recuperação

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASE – Extração Acelerada por Solvente

CV – Coeficiente de Variação

DV – Desvio padrão

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

GC – Cromatógrafo a Gás

GC/ECD – Cromatógrafo a Gás com Detector por Captura de Elétrons

GC-MS – Cromatógrafo a Gás acoplado ao espectrômetro de massas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LD – Limite de Detecção

LMR – Limite Máximo de Resíduos

LQ – Limite de Quantificação

NPD – Detector de Nitrogênio-Fósforo

PARA – Programa de Análise de Resíduos em Agrotóxicos

POF – Pesquisa de Orçamento Familiares

RSD – Desvio padrão relativo

SIM – Monitoramento do íon selecionado (Select Ion Monitoring)

SLE/LTP – Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura

SLE/LTP-GC-MS – Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura e análise por cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas

t_R – Tempo de Retenção

UPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns agrotóxicos permitidos na cultura de aveia e seus respectivos LMR

Tabela 2. Compostos em estudo com suas propriedades físico-químicas

Tabela 3. Íons selecionados dos agrotóxicos em estudo

Tabela 4. Planejamento fatorial 2^2 aplicado para otimização do volume de água e volume de solvente extrator usada na SLE/LTP em amostras de farinha de aveia

Tabela 5. Planejamento fatorial 2^3 com ponto central (n=3) aplicado para otimizar as variáveis tempo de agitação, centrifugação e congelamento da SLE/LTP de agrotóxicos presentes em amostras de farinha de aveia

Tabela 6. Concentrações das amostras de farinha de aveia utilizadas para a construção das curvas analíticas e avaliação da linearidade do método SLE/LTP-GC-MS otimizado

Tabela 7. Concentrações dos agrotóxicos empregadas para avaliar a exatidão do método

Tabela 8. Coeficientes de correlação do triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol e azoxistrobina

Tabela 9. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método para os cinco agrotóxicos em estudo

Tabela 10. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de amostras de farinha de aveia fortificadas em três níveis de concentração

Tabela 11. Coeficientes de variação (CV) obtidos a partir de ensaios realizados em um mesmo dia. As amostras de farinha de aveia foram fortificadas em três diferentes níveis de concentração

Tabela 12. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtida,

para amostras de farinha de aveia fortificadas em três níveis de concentração. Estes ensaios inter-dia foram obtidos após análise no primeiro, terceiro e quinto dia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cromatogramas obtidos no modo SIM de: A) solução-padrão e B) extrato de farinha de aveia, contendo os agrotóxicos triadimenol (1): $t_R = 6,12$ min; flutriafol (2): $t_R = 6,45$ min; λ -cialotrina (3): $t_R = 8,21$ e $8,32$ min, difenoconazol (4): $t_R = 11,38$ e $11,49$ min e azoxistrobina (5): $t_R = 12,24$ min.

Figura 2. Espectros obtidos para cada composto em estudo. Sendo, a) triadimenol, flutriafol, λ -Cialotrina, difenoconazol, azoxistrobina.

Figura 3. Gráfico de Pareto para as variáveis, quantidade de água, de acetonitrila e suas interações na extração do a) triadimenol, b) flutriafol, c) λ -cialotrina, d) difenoconazol e e) azoxistrobina em farinha de aveia por SLE/LTP.

Figura 4. Superfície de resposta representando a interação entre as variáveis quantidade de acetonitrila (ACN) e água para o triadimenol.

Figura 5. Gráfico de Pareto para as variáveis, tempo de agitação, centrifugação e congelamento e suas interações na extração do a) triadimenol, b) flutriafol, c) λ -cialotrina, d) difenoconazol e e) azoxistrobina em farinha de aveia por SLE/LTP.

Figura 6. Superfície de respostas representando a interação entre o tempo de centrifugação e congelamento para um planejamento 2^3 com ponto central ($n = 3$), sendo (a) λ -cialotrina e (b) difenoconazol e (c) gráfico de superfície de resposta representando a interação entre o tempo de centrifugação e agitação para um planejamento 2^3 com ponto central ($n = 3$) para λ -cialotrina.

Figura 7. Cromatogramas, obtidos pelo GC-MS (Agilent), de extrato das amostras de farinha de aveia a) isento dos analitos; b) contendo $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de triadimenol, $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de flutriafol e difenoconazol, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de λ -cialotrina e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de azoxistrobina: (1) triadimenol: $t_R = 5,70$ min; (2) flutriafol: $t_R = 6,03$ min; λ -cialotrina: $t_R = 7,78$ e $7,88$ min, (4) difenoconazol: $t_R = 10,48$ e $10,57$ min e (5) azoxistrobina: $t_R = 11,21$ min.

Figura 8. Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de farinha de aveia que foram fortificadas com padrão dos analitos. Sendo: (a) triadimenol (50 - $350 \mu\text{g kg}^{-1}$), (b) flutriafol (150 - $450 \mu\text{g kg}^{-1}$), (c) λ -cialotrina (100 - $400 \mu\text{g kg}^{-1}$) e (d)

difenoconazol ($150-450 \mu\text{g kg}^{-1}$) e (e) azoxistrobina ($500-800 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Figura 9. Gráficos de resíduos para as curvas analíticas para as amostras de farinha de aveia. Sendo: (a) triadimenol, (b) flutriafol, (c) λ -cialotrina, (d) difenoconazol e (e) azoxistrobina.

Figura 10. Cromatograma de uma das amostras autênticas analisadas pelo método SLE/LTP-GC-MS Agilent.

RESUMO

TEIXEIRA, Aline Maria, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Desenvolvimento de método analítico para determinação de resíduos de agrotóxicos em farinha de aveia.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: Fernanda Fernandes Heleno e André Fernando de Oliveira.

Neste trabalho foi otimizado e validado um método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) e análise por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS) para determinar resíduos de agrotóxicos (triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol e azoxistrobina) em farinha de aveia. Utilizou-se inicialmente um planejamento 2^2 com ponto central ($n=3$) para otimização do volume de água e volume de solvente extrator. Posteriormente foi realizado um segundo planejamento 2^3 com ponto central ($n=3$) para otimização do tempo de agitação, centrifugação e congelamento. As melhores condições obtidas para 2,00 gramas da farinha de aveia foram: adicionar a esta massa 3,00 mL de água destilada, 4,00 mL de acetonitrila, tempo de agitação de 30 s, tempo de centrifugação de 3 min, tempo de congelamento de 4 h. O método foi validado e os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão e precisão. Os resultados indicaram que o método de SLE/LTP-GC-MS é eficiente para a extração dos analitos nas amostras de farinha de aveia mostrando-se seletivo e sensível com limites de detecção e quantificação variando de 1,72 a 12,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 5,73 a 43,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, para os compostos estudados. O método também apresentou porcentagem de recuperação variando de 91,7 a 108%. O método otimizado e validado foi aplicado para determinar resíduos de agrotóxicos em 8 amostras de farinha de aveia, adquiridas aleatoriamente em mercados de Viçosa (MG), não sendo detectado resíduos de agrotóxicos.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Aline Maria, Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Development of an analytical method for determination of residues of pesticides in oat flour.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-Advisors: Fernanda Fernandes Heleno and André Fernando de Oliveira.

In this work, a solid-liquid extraction method with low temperature partition (SLE/LTP) and gas chromatographic analysis coupled to a mass spectrometer (GC-MS) was used to determine residues of pesticides (triadimenol, flutriafol, λ -cyhalothrin, difenoconazole and azoxystrobin) in oatmeal. Initially, a center point 2^2 design (n=3) was used to optimize water volume and extractor solvent volume. Subsequently, a second planning 2^3 with a central point (n=3) was performed to optimize agitation, centrifugation and freezing time. The best conditions obtained for 2.00 grams of oatmeal were: to add to this mass 3.00 mL of distilled water, 4.00 mL of acetonitrile, agitation time of 30 s, centrifugation time of 3 min, time of freezing for 4 h. The method was validated and the parameters evaluated were selectivity, linearity, limit of detection and quantification, accuracy and precision. The results indicated that the SLE/LTP method is efficient for extraction of the analytes in the samples of oatmeal, showing selective and sensitive detection limit and quantification ranging from 1.72 to 12.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 5.73 to 43.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, for the compounds studied. The method also presented recovery percentage ranging from 91.7 to 108%. The optimized and validated method was applied to determine residues of pesticides in 8 samples of oatmeal, randomly acquired in markets of Viçosa (MG), and no residues of pesticides were detected.

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais setores para o sustento da população é a agricultura. O aumento da população mundial contrasta com a necessidade de se aumentar a produção de alimentos. Para se obter uma produção que consiga atender à demanda da população é necessário controlar algumas pragas que são responsáveis pela perda de mais de 50% da produção anual de alimentos. Para diminuir essa perda e aumentar a produção agrícola, os agrotóxicos passaram a ser importantes agentes para controlar pragas e outras doenças relacionadas com as plantas. O termo agrotóxico engloba compostos com atividade inseticidas, fungicidas, herbicidas, entre outros (CHAWLA *et al.*, 2018 e WU, 2017).

Apesar dos benefícios atribuído ao uso dos agrotóxicos, quando estes são utilizados em excesso, apresentam desvantagens devido sua toxicidade, alta persistência no solo e acumulação na cadeia alimentar. Com isso, tem-se a necessidade de monitorar esses resíduos nos alimentos, em matrizes ambientais e em água (GALDOS-RIVEROS, 2012 e LIU *et al.*, 2016).

Em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou o Programa de Análise de Resíduos em Agrotóxicos (PARA) com o objetivo de avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de maneira a evitar possíveis danos à saúde da população. A escolha dos alimentos a serem monitorados pelo PARA se baseia nos dados de consumo obtido na Pesquisa de Orçamento Familiares (POF), disponibilidade dos alimentos nos supermercados e no uso de agrotóxicos nas culturas. Alguns alimentos, como a aveia, são consumidos em baixa escala e por isso não são analisados pelo PARA. Entretanto, isto não elimina a possibilidade de se encontrar resíduos na mesma, uma vez que os agrotóxicos são empregados nesta cultura e no armazenamento desses grãos. Alguns agrotóxicos permitidos na cultura de aveia como triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol, azoxistrobina apresentam Limite Máximo de Resíduos (LMR) segundo a ANVISA na faixa de 100-1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ sendo estes aplicado nas folhas e até mesmo nas sementes, porém não se têm muitos estudos sobre análise de resíduos em tal matriz (ANVISA, 2014).

Para analisar esses resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes, as técnicas cromatográficas (cromatografia líquida e gasosa), tem sido muito útil em separar, identificar e quantificar as espécies em uma determinada amostra (GALLI *et*

al., 2006).

Desta maneira, o trabalho em questão teve o objetivo de desenvolver um método capaz de extrair e quantificar cinco diferentes agrotóxicos em farinha de aveia utilizando cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. Para análise no cromatógrafo foi-se necessário primeiramente um preparo de amostra adequado. Neste trabalho, a farinha de aveia foi submetida ao método de SLE/STP-GC-MS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aveia (*Avena Sativa L.*)

A aveia (*Avena sativa L.*) tem sido muito utilizada na alimentação animal e na dieta e cuidados da saúde humana. Por possuir uma quantidade considerável de fibras solúveis, proteínas e ácidos graxos insaturados, a aveia fornece aporte energético e nutricional equilibrado (ZHANG *et al.*, 2018). Estudos com produtos à base de aveia mostraram que o seu consumo tem efeito positivo na saúde do homem, podendo diminuir os níveis de colesterol, reduzir o risco de câncer e diminuir a absorção de glicose. Além disso, a maior conscientização da população para aumentar o consumo de fibras em sua dieta levou ao aumento do consumo de produtos à base de aveia na indústria alimentícia como cereais matinais, produtos fermentados de aveia e bebidas à base de leite de aveia (OZTURK & TAKHAR, 2017).

A aveia é cultivada preferencialmente em climas temperados frios, sendo que a maioria de sua produção mundial ocorre no hemisfério norte (67%). Já no hemisfério sul, há um destaque para a Austrália, a qual é considerada a maior produtora (ZWER, 2016). No Brasil, a área cultivada com aveia vem aumentando nos últimos anos. Segundo dados do IBGE, na safra de 1996, a área cultivada com aveia no Brasil era de 162.623 hectares, enquanto que em 2018, a área cultivada de aveia no Brasil foi de 435.126 hectares, sendo sua produção de 928.047 toneladas (IBGE, 2018). Os estados do Rio Grande do Sul e Paraná são os maiores produtores seguidos de Santa Catarina, Mato Grosso do Sul e São Paulo. A maior concentração da produção ocorre nessas regiões devido à aveia ser um cereal de inverno muito exigente a água (EMBRAPA, 2000). Sua produção ocupa o sexto lugar em relação à produção mundial de grãos, ficando atrás do milho, trigo, cevada, sorgo e milheto (ZHANG *et al.*, 2018).

As culturas de aveia são afetadas por uma ampla gama de pragas e doenças

causadas por fungos, bactérias, insetos, entre outros, o que resulta em um menor rendimento da produção e em grãos de qualidade inferior (ZWER, 2016). Para garantir melhor produção nas culturas e atender à procura de toda população, tem-se a necessidade do uso de agrotóxicos. Esta é a estratégia mais empregada para o controle de pragas e doenças, o que acarreta o aumento do consumo dessas substâncias em todo o mundo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2018). Embora seja permitido o uso de diversos agrotóxicos na cultura de aveia, como por exemplo, triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol e azoxistrobina (ANVISA, 2018). Existem hoje poucos trabalhos envolvendo tal matriz e uma vez que vários agrotóxicos são usados para cultura de aveia, tem-se a necessidade de desenvolver ou adaptar novos métodos para análise de resíduos de agrotóxicos em aveia (FINNAN *et al.*, 2019).

2.2. Agrotóxicos

Ao longo da segunda metade do século XX, o consumo de alimentos sofreu um grande aumento devido ao grande crescimento populacional em todo o mundo. Por esse fato, ocorreu-se uma intensificação agrícola e simultaneamente o uso generalizado de produtos químicos agrícolas com o objetivo de minimizar perdas gerada por várias pragas e doenças recorrentes nas diversas culturas (Ali *et al.*, 2014; ABBASI, 2014).

O Brasil é um grande consumidor de agrotóxicos ficando em quinto lugar no ranking mundial ($7,6 \times 10^4$ toneladas de agrotóxicos por ano) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2018).

Segundo a FAO, Organização das Nações Unidas para alimentação e Agricultura, os agrotóxicos englobam herbicidas, inseticidas, fungicidas ou qualquer outra substância que pode prevenir, destruir ou controlar pragas que podem atrapalhar a produção, processamento, armazenamento, transporte ou comercialização de alimentos. Já em relação a estrutura química os agrotóxicos podem se dividir em grupos, sendo eles, organoclorados, organofosforados, carbamatos, triazinas, piretróides, cloroacetamidas, etc. (KIM *et al.*, 2017).

Com o aumento do uso de agrotóxicos houve, também, um aumento na produção, porém seu uso desenfreado acarreta desvantagens por ser tóxico para seres humanos e também para animais. A exposição a esses produtos se dá de várias

maneiras como, exposição intencional quando ocorre um suicídio ou homicídio ou exposição ocupacional relacionada à produção, ao transporte, à entrega, à aplicação do produto ou até mesmo por viver próximo a áreas onde a concentração dos agrotóxicos é alta. A não intencional é quando essa se dá ao longo da vida, que correspondem a níveis baixos de exposição devido a circulação e acumulação destes agrotóxicos em água, ar e na cadeia alimentar podendo gerar vários danos à saúde como doença de Alzheimer, toxicidade produtiva, toxicidade metabólica, entre demais doenças (SABARWAL *et al.*, 2018). A *Agricultural Health Study* (AHS) realizou vários estudos para provar a relação entre a exposição a pesticidas e o desenvolvimento de câncer (ALLSOP *et al.*, 2015).

Atualmente no Brasil, 525 ingredientes ativos podem ser usados com diferentes finalidades em agroquímicos, onde muitos desses já são proibidos (ANVISA, 2014). Um estudo com informações completas do uso de butilato, realizado por Lynch *et al.* (2009), com 19.655 produtores em um intervalo de tempo médio de 9 anos, mostrou uma relação entre câncer de próstata com o uso de tal composto, principalmente em indivíduos que já apresentam histórico familiar deste tipo de câncer (LYNCH *et al.*, 2009).

Devido todos esses problemas, tem-se a necessidade de se monitorar alimentos, sendo então criado o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que tem como objetivo avaliar e promover a qualidade dos alimentos em relação ao uso de agrotóxicos e afins. Os resultados gerados pelo programa permitem verificar se os alimentos comercializados apresentam níveis de resíduos de agrotóxicos dentro dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) que são estabelecidos pela ANVISA, se tais agrotóxicos estão devidamente registrados no país e se foram aplicados apenas em culturas para as quais estão autorizados. Permite também estimar a exposição da população a resíduos de agrotóxicos em alimentos de forma a avaliar os riscos à saúde dessa exposição (ANVISA, 2014).

A cultura de aveia requer o uso de agrotóxicos por ser atacada por várias doenças e pragas. Várias pragas como pulgões, lagartas e corós atingem a cultura gerando prejuízos. São muito atingidas por doenças como a ferrugem do colmo causada pelo fungo *Puccinia graminis*, que aparece no final do ciclo da cultura quando

a temperatura é mais elevada. Outro problema causado por fungos em aveia é a ferrugem da folha causada pelo fungo *Puccinia Coronata* que leva a reduções no rendimento de grãos (EMBRAPA, 2000).

Diversos agrotóxicos são permitidos hoje em dia para a cultura de aveia, e cada um deles possuem LMR definido pelos órgãos. Na Tabela 1 são apresentados alguns agrotóxicos permitidos e seus respectivos LMR segundo a ANVISA e União Européia.


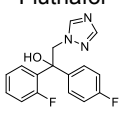
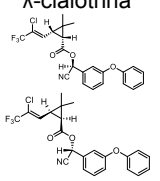
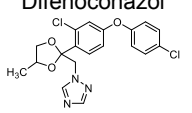
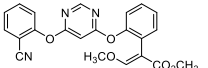
Tabela 1. Alguns agrotóxicos permitidos na cultura de aveia e seus respectivos Limites Máximos de Resíduos (LMR).

Agrotóxicos	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	ANVISA	União Européia
Triadimenol	100	50
Flutriafol	300	10
λ-Cialotrina	200	300
Tebuconazol	100	2000
Bifentrina	700	10
Carboxina	200	10
Clorotalonil	500	400
Difenoconazol	300	50
Azoxistrobina	1000	1500

Fonte: ANVISA, 2018; União Européia, 2018.

Desta maneira é interessante a análise de resíduos de agrotóxicos em tal matriz. Na Tabela 2, são apresentados os compostos escolhidos para estudo com algumas de suas propriedades físico-químicas.

Tabela 2. Compostos em estudo com algumas propriedades físico-químicas.

Composto	Fórmula	Grupo químico	Classe	Classe toxicológica	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Kow	Solubilidade na água a 20 °C (mg L ⁻¹)	Ponto de Ebulição (°C) a 760 mmHg
 <p>Triadimenol</p>	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	Triazol	Fungicida	Classe II	295,76	1,51 x 10 ³	72	465,4 ± 55,0
 <p>Flutriafol</p>	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O	Triazol	Fungicida	Classe III	301,29	2,00 x 10 ²	95	506,5 ± 60,0
 <p>λ-cialotrina</p>	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃	Piretróide	Inseticida	Classe III	449,85	3,16 x 10 ⁵	50	498,9 ± 45,0
 <p>Difenoconazol</p>	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	Triazol	Fungicida	Classe I	406,26	2,29 x 10 ⁴	15	547,0 ± 60,0
 <p>Azoxistrobina</p>	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	Estrobilurina	Fungicida	Classe III	403,40	3,16 x 10 ²	6,7	581,3 ± 50,0

Fonte: Clomazone, 2018; ChemSpider, 2015.

2.3. Determinação de resíduos de agrotóxicos

Apesar dos poucos estudos envolvendo a farinha de aveia como matriz, tem-se na literatura relatos da análise de resíduos em grãos utilizando diferentes técnicas. Pang *et al.* (2006) desenvolveu um método para a determinação de 405 agrotóxicos, usando extração acelerada por solvente (ASE), extração em fase sólida (SPE) e análise por GC-MS e LC-MS-MS. O método proposto foi adequado para a determinação de 405 resíduos de agrotóxicos em grãos, como milho, trigo, aveia, arroz e cevada, etc. Outro método para análise de resíduos em grãos foi empregado por Mastovska *et al.* (2010), onde foi utilizado o método QuEChERS para determinar resíduos de agrotóxicos em grãos e cereais (milho, aveia, arroz e trigo). As análises dos extratos foram feitas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa (UPLC-MS-MS). Uma técnica que apresenta resultados similares ao QuEChERS é a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP). Essa técnica se baseia na partição dos analitos entre uma fase aquosa e orgânica pelo abaixamento de temperatura (-20 °C), na qual os componentes da amostra são congelados com a fase aquosa e os agrotóxicos são extraídos pela fase orgânica (COSTA *et al.*, 2015).

O preparo de amostra antes da análise instrumental é uma etapa fundamental para estabelecimento de um método cromatográfico seletivo e sensível destinado a análise dos analitos mesmo se estes se encontrarem em baixa concentração (LANÇAS, 2009). Este deve ser simples e ter uma recuperação máxima dos analitos de maneira a remover os interferentes, e com isso, fornecer resultados confiáveis e/ou proteger o instrumento analítico de possíveis danos (NUCKOWSI *et al.*, 2018). As principais etapas de preparo de amostra são: amostragem, extração, clean up, concentração e análise final (PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018).

2.3.1. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)

Existem hoje em dia várias técnicas de preparo de amostras, como por exemplo, a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP). A SLE/LTP é uma técnica de preparo de amostra que permite a extração dos analitos e *clean up* em uma etapa única, além de ser uma técnica de baixo custo. Essa técnica

consiste de quatro etapas: adição de um solvente extrator à matriz em estudo, agitação, centrifugação e congelamento para que ocorra a separação das fases (SOUSA *et al.*, 2014).

A técnica SLE/LTP vem sendo muito utilizada para análise de resíduos em solo, alimentos, entre outros. Costa *et al.* (2015) desenvolveram um método utilizando essa técnica e usando análise por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC/ECD) para determinação de nove agrotóxicos em alface. O método apresentou valores médios de recuperação na faixa de 72,3-103,2%, coeficientes de variação $\leq 12\%$ e limites de detecção na faixa de 0,4-37 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

2.4. Técnicas de análises

As técnicas de separação, como a cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE) são técnicas que vem se destacando pela eficiência de análises em amostras ambientais, biológicas, farmacêuticas e em alimentos (RIBANI *et al.*, 2004). As técnicas cromatográficas cresceram intensamente, devido à necessidade cada vez maior de se ter técnicas mais precisas e sensíveis para identificação e quantificação dos analitos em matrizes complexas (GALLI *et al.*, 2006).

As técnicas cromatográficas acopladas a sistemas clássicos de detecção como por exemplo, detecção por captura de elétrons (ECD), detecção de nitrogênio-fósforo (NPD) vêm sendo utilizadas desde 1970 para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PRESTES *et al.*, 2009). Essas técnicas cromatográficas são excelentes ferramentas para separação com boas informações quantitativas sobre as espécies que foram separadas, fornecendo resultados com limites de detecção na faixa de nanograma a microgramas por litro (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), dependendo do detector e da técnica de extração utilizada (GALLI *et al.*, 2006).

Atualmente, a técnica GC-MS vem sendo muito utilizada para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, pois permite a confirmação e a determinação de uma grande quantidade de compostos simultaneamente. Permite obter baixos LD's devido à alta seletividade gerada pelo uso de diferentes modos como, por exemplo, o modo SIM. No modo SIM o sinal é mais forte, pois o tempo é maior para medir íons selecionados durante a aquisição dos dados (TAN *et al.*, 2019 e PRESTES *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Otimizar e validar a técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinar resíduos de agrotóxicos de diferentes classes químicas por cromatografia gasosa em amostras de farinha de aveia.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar as condições cromatográficas para análise dos agrotóxicos triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol e azoxistrobina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS);
- Otimizar a técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) para determinar esses agrotóxicos em farinha de aveia por GC-MS;
- Validar o método (SLE/LTP-GC-MS) otimizado;
- Aplicar o método otimizado e validado para determinar resíduos de agrotóxicos em farinha de aveia comercializada em Viçosa-MG e região.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo de soluções-padrão e reagentes

Os seguintes padrões analíticos dos agrotóxicos triadimenol (pureza = 99,0% m/m) Dr. Ehrenstorfer GmbH, flutriafol (pureza = 97,0% m/m), λ -cialotrina (pureza = 95,0% m/m), difenoconazol (pureza = 97,2% m/m) e azoxistrobina (pureza = 99,9% m/m) obtidos da Sigma-Aldrich (Seelze, Alemanha) foram empregados neste trabalho.

Foram preparadas soluções-estoque dos padrões dos agrotóxicos na concentração de 1000 mg L⁻¹ em acetonitrila 99,9% grau HPLC (Sigma-Aldrich, EUA). As demais soluções de trabalho utilizadas foram preparadas em acetonitrila a partir das soluções estoque, por meio de diluições.

Todas estas soluções foram armazenadas em freezer à temperatura de aproximadamente - 20 °C.

4.2. Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás da Agilent, modelo 7820A GC, equipado com auto injetor G4513A, acoplado a uma

espectrômetro de massas, modelo 5977B MDS.

As condições ideais de análise por GC-MS (Agilent) foram otimizadas e se encontram descritas a seguir:

- Coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,10 μm de espessura de filme), da Phenomenex (EUA), modelo ZB-5 (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano)
- Gás de arraste: Hélio (grau de pureza:99,999%, White Martins)
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min^{-1}
- Volume injetado: 1,0 μL
- Modo de injeção: splitless
- Temperatura do injetor: 310 $^{\circ}\text{C}$
- Programação de aquecimento da coluna:

150 $^{\circ}\text{C}$ (0,30 min) $\xrightarrow{20^{\circ}\text{C min}^{-1}}$ 290 $^{\circ}\text{C}$ (5,5 min)

- Temperatura do detector: 300 $^{\circ}\text{C}$
- Tempo total de análise: 12,8 min
- Monitoramento modo SIM e SCAN
- Fonte de ionização: impacto de elétrons 70 eV
- Analisador: Single quadrupole
- Temperatura de interface: 300
- Temperatura da fonte de ionização: 200 $^{\circ}\text{C}$
- Tempo de corte: 4,5 min

Neste trabalho também foram utilizados uma balança analítica (Shimadzu AU7220), um agitador vórtex modelo certomat® MV (B.Braun Internacional, Melsungen, Alemanha), uma centrífuga Excelsa® II modelo 206 MP e um freezer 280 L (Consul).

Na Tabela 3 são mostrados os compostos em estudo com as razões massa/carga (m/z) selecionadas para cada e o tempo de retenção obtidos no GC-MS (Agilent).

Tabela 3. Íons selecionados dos agrotóxicos em estudo

Agrotóxicos	Íons monitorados (m/z)	Tempo de retenção (min) GC-MS (Agilent)
Triadimenol	112, 168	5,70
Flutriafol	219, 164	6,03
λ -cialotrina	181, 208	7,78; 7,88
Difenoconazol	265, 323	10,48; 10,57
Azoxistrobina	344, 388	11,21

4.3. Amostras de farinha de aveia

Para o processo de otimização e validação do método de extração foram utilizadas amostras de farinha de aveia obtidas no comércio de Viçosa - MG, isentas dos agrotóxicos em estudo. Para tal confirmação foram feitas análises das amostras de farinhas antes de serem empregadas na etapa de otimização e validação. Essas amostras foram consideradas como branco.

Todas as amostras eram armazenadas à temperatura ambiente e em sacos plásticos bem vedados, de maneira a evitar qualquer tipo de contaminação.

4.3.1. Fortificação das amostras

Para a fortificação das amostras de farinha, 2,0000 g da mesma foram medidas em balança analítica. Todas as amostras foram fortificadas com 0,1 mL da solução de trabalho contendo os cinco agrotóxicos com diferentes concentrações, sendo 4,00 mg L⁻¹ triadimenol, 12,0 mg L⁻¹ flutriafol e difenoconazol, 8,00 mg L⁻¹ λ -cialotrina e 20,0 mg L⁻¹ azoxistrobina, afim de se obter uma concentração igual a 200 μ g kg⁻¹ para triadimenol, 600 μ g kg⁻¹ para flutriafol e difenoconazol, 400 μ g kg⁻¹ para λ -cialotrina e 1000 μ g kg⁻¹ para azoxistrobina. Foram utilizadas diferentes concentrações devido às diferenças de sensibilidade do aparelho para cada composto.

As amostras de farinha fortificadas foram agitadas em vórtex durante 10 s e deixadas em repouso por 2 horas, de maneira a conseguir uma melhor interação dos agrotóxicos com a amostra e evaporação do solvente orgânico proveniente da solução. Após 2 horas todas as amostras foram levadas para o processo de extração,

de maneira a determinar as condições ótimas para análise dos cinco agrotóxicos em estudo por cromatografia gasosa.

4.4. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)

4.4.1. Extração dos agrotóxicos por SLE/LTP – Técnica geral

Para a técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura, 2,0000 g de amostras de farinha de aveia foram medidas em frascos de vidros com tampa plástica, com capacidade de 22 mL. Em seguida as amostras foram fortificadas, agitadas em vórtex e deixadas em repouso por duas horas. Posteriormente, a essas amostras foram adicionadas água e acetonitrila. A mistura obtida foi em seguida agitada em vórtex. Após agitação as amostras foram levadas à centrifugação a 1818 g e colocadas em freezer a -20 °C. Os parâmetros volume de água, volume de acetonitrila, tempo de agitação, tempo de centrifugação e tempo de congelamento foram otimizados para se obter melhor eficiência na extração dos agrotóxicos em estudo.

Após algumas horas de resfriamento a fase orgânica foi recolhida, transferida para frascos de vidro e armazenada em freezer até o momento da análise cromatográfica.

4.4.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)

No processo de otimização da técnica SLE/LTP alguns parâmetros importantes para análise dos agrotóxicos em estudo foram avaliados procurando-se obter os melhores rendimentos com menor tempo de análise e baixo custo. Neste trabalho foram realizadas duas otimizações, a primeira para avaliar volume de água e volume de solvente extrator, e a segunda para avaliar quais seriam os melhores tempos de agitação, centrifugação e congelamento.

4.4.2.1. Otimização do volume de água e volume do solvente extrator usada na SLE/LTP

O primeiro planejamento foi realizado a fim de otimizar o volume de água e o volume de solvente extrator de maneira a obter uma melhor extração. Optou-se neste caso em trabalhar com o método de otimização multivariado, onde todos os fatores

são alterados e analisados simultaneamente em cada experimento, levando em conta as interações entre eles. O primeiro planejamento foi composto por duas variáveis e dois níveis, sendo então um planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central ($n=3$) envolvendo 7 ensaios realizados em duplicata, ou seja, 14 experimentos. As áreas obtidas nas análises foram utilizadas como respostas analíticas.

Os dados dos planejamentos estão dispostos nas Tabelas 4.

Tabela 4. Planejamento fatorial 2^2 aplicado para otimização do volume de água e volume de solvente extrator usada na SLE/LTP em amostras de farinha de aveia.

	Variáveis	Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Volume (mL)	Água	3	4	5
	Acetonitrila	4	5	6

Ensaio	Fatores Codificados	
	Água	Acetonitrila
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0
6	0	0
7	0	0

4.4.2.2. Otimização do tempo de agitação, centrifugação e congelamento para SLE/LTP

Um segundo planejamento foi realizado para otimizar o tempo de agitação, centrifugação e congelamento, com a finalidade de se obter uma melhor extração para os agrotóxicos estudados. Para isso, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central ($n=3$), totalizando 11 ensaios realizados em duplicata, ou seja, 22 experimentos. Utilizou-se como resposta analítica as áreas obtidas nas análises. Os dados do planejamento estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5. Planejamento fatorial 2^3 com ponto central (n=3) aplicado para otimizar as variáveis tempo de agitação, centrifugação e congelamento da SLE/LTP de agrotóxicos presentes em amostras de farinha de aveia.

Variáveis		Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Tempo	Agitação (s)	30	45	60
	Centrifugação (min)	3	6	9
	Congelamento (h)	4	5	6
Ensaio	Fatores codificados			
	Agitação	Centrifugação	Congelamento	
1	-	-	-	
2	+	-	-	
3	-	+	-	
4	+	+	-	
5	-	-	+	
6	+	-	+	
7	-	+	+	
8	+	+	+	
9	0	0	0	
10	0	0	0	
11	0	0	0	

4.5. Validação do método analítico

O método SLE/LTP-GC-MS otimizado para determinação de resíduos de agrotóxicos em farinha de aveia foi validado utilizando GC-MS (Agilent) para as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão seguindo as normas da ANVISA de 2017 (ANVISA, 2017).

4.5.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação de cromatogramas dos extratos do branco da farinha de aveia, ou seja, isento dos agrotóxicos em estudo

com os cromatogramas dos extratos das amostras fortificadas e submetidas ao método de extração.

Para obtenção desses extratos as amostras de farinha de aveia foram submetidas ao procedimento SLE/LTP otimizado. O extrato foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.

4.5.2. Linearidade da resposta do método

A linearidade da resposta do método foi feita fortificando amostras de farinha de aveia com os cinco agrotóxicos em 5 níveis de concentração. Essas amostras foram submetidas ao método SLE/LTP-GC-MS otimizado. As concentrações estudadas para cada agrotóxico são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentrações das amostras de farinha de aveia utilizadas para a construção das curvas analíticas e avaliação da linearidade do método SLE/LTP-GC-MS otimizado.

Agrotóxicos	Concentração/($\mu\text{g kg}^{-1}$)				
	1°	2°	3°	4°	5°
Triadimenol	50	100	150	250	350
Flutriafol	150	200	250	350	450
λ -cialotrina	100	150	200	300	400
Difenoconazol	150	200	250	350	450
Azoxistrobina	500	550	600	700	800

As amostras foram analisadas por GC-MS e através dos dados obtidos foram construídas curvas analíticas para cada um dos agrotóxicos e a linearidade de cada um foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados e também pelo gráfico de resíduos.

4.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos utilizando parâmetros obtidos por meio das curvas analíticas. Estes podem ser calculados por meio das Equações 1 e 2.

$$LD = 3,3 \times \frac{SD}{B} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = 10 \times \frac{SD}{B} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo:

SD = Média do desvios padrão das áreas obtidas para o extrato do branco;

B = Inclinação da curva analítica obtida pela injeção e análise por GC-MS dos extratos fortificados de farinha de aveia.

4.5.4. Exatidão

Para determinar a exatidão do método foram realizados ensaios de recuperação. Para isso, as amostras de farinha de aveia foram fortificadas com diferentes concentrações, as quais são mostradas na Tabela 7, e submetidas ao método otimizado.

Tabela 7. Concentrações dos agrotóxicos empregadas para avaliar a exatidão e repetitividade do método.

Analitos	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
	1°	2°	3°
Triadimenol	50	150	350
Flutriafol	150	250	450
λ -Cialotrina	100	200	400
Difenoconazol	150	250	450
Azoxistrobina	500	600	800

Estes experimentos foram feitos em triplicata e a exatidão determinada pela porcentagem de recuperação (%R) de acordo com a Equação 3.

$$\%R = \frac{C_E \times 100}{C_R} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo:

C_E = Média das concentrações obtidas experimentalmente;

C_R = Concentração real (Concentração em que as amostras foram fortificadas).

4.5.5. Precisão

A precisão do método otimizado SLE/LTP-GC-MS para determinar resíduos de agrotóxicos em farinha de aveia foi avaliado por um estudo intralaboratorial, por meio de ensaios de repetitividade e de precisão intermediária.

A precisão representa a dispersão de seus resultados em diferentes ensaios. Esses resultados são avaliados pelo coeficiente de variação (CV), calculados conforme a Equação 4.

$$CV = \left(\frac{S}{X} \times 100 \right) \quad (\text{Equação 4})$$

Em que:

S = Desvio padrão das áreas obtidas para cada analito;

X = Média entre as áreas obtidas.

4.5.6. Repetitividade

Para avaliar a repetitividade o experimento foi realizado em triplicata para 3 níveis de concentração. As concentrações utilizadas para cada analito é mostrado na Tabela 7.

Foram determinados os coeficientes de variação (CV) e as porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em estudo (%R).

4.5.7. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação (%R) de todos os agrotóxicos em estudo e também pelos seus respectivos coeficientes de variação (CV), que foram obtidos pela análise dos extratos em 3 diferentes concentrações, em triplicata.

4.6. Aplicação do método

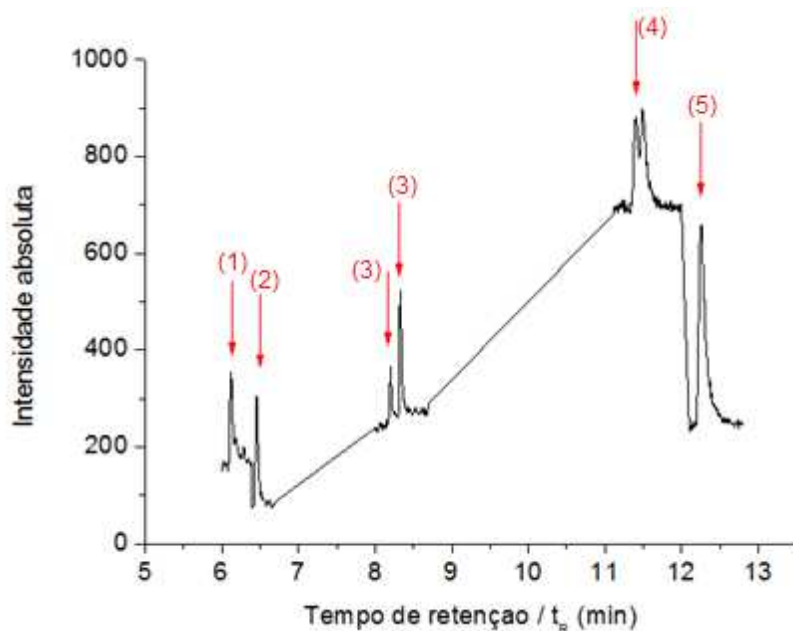
O método otimizado e validado foi aplicado para determinação de resíduos dos agrotóxicos triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol e azoxistrobina em amostras de farinha de aveia obtidas no comércio de Viçosa – MG. O método também foi aplicado em amostras de farelo e flocos de aveia, de maneira a verificar se o método poderia ser aplicado em farinhas de aveia em diferentes granulometrias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise cromatográfica

Cromatogramas de uma solução padrão em acetonitrila e em extrato de farinha de aveia, contendo os cinco analitos em estudo nas seguintes concentrações: triadimenol ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$), flutriafol ($600 \mu\text{g kg}^{-1}$), λ -cialotrina ($400 \mu\text{g kg}^{-1}$), difenoconazol ($600 \mu\text{g kg}^{-1}$), azoxistrobina ($1000 \mu\text{g kg}^{-1}$), analisados no modo SIM são mostrados na Figura 1. Os cromatogramas foram obtidos nas condições descritas no item 4.2. O tempo necessário para total eluição dos cinco analitos foi de 12,8 min.

A)



B)

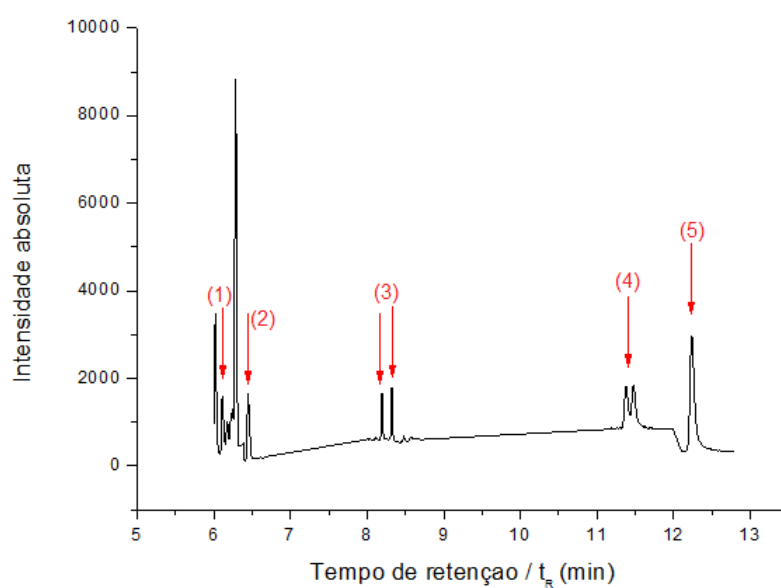


Figura 1. Cromatogramas obtidos no modo SIM de: A) solução padrão contendo os agrotóxicos triadimenol (1); flutriafol (2); λ -cialotrina (3); difenoconazol (4) e azoxistrobina (5) e B) extrato de farinha de aveia, contendo os agrotóxicos triadimenol (1); flutriafol (2); λ -cialotrina (3); difenoconazol (4) e azoxistrobina (5).

A identificação dos cinco agrotóxicos foi realizada por comparação com os tempos de retenção de cada analito em acetonitrila com os analitos no extrato de

farinha de aveia e com os íons alvos selecionados de cada agrotóxico. Os íons alvos foram obtidos pelo modo SCAN, onde foi possível também a identificação dos compostos através da biblioteca NIST. Os espectros de cada um dos compostos são mostrados na Figura 2.

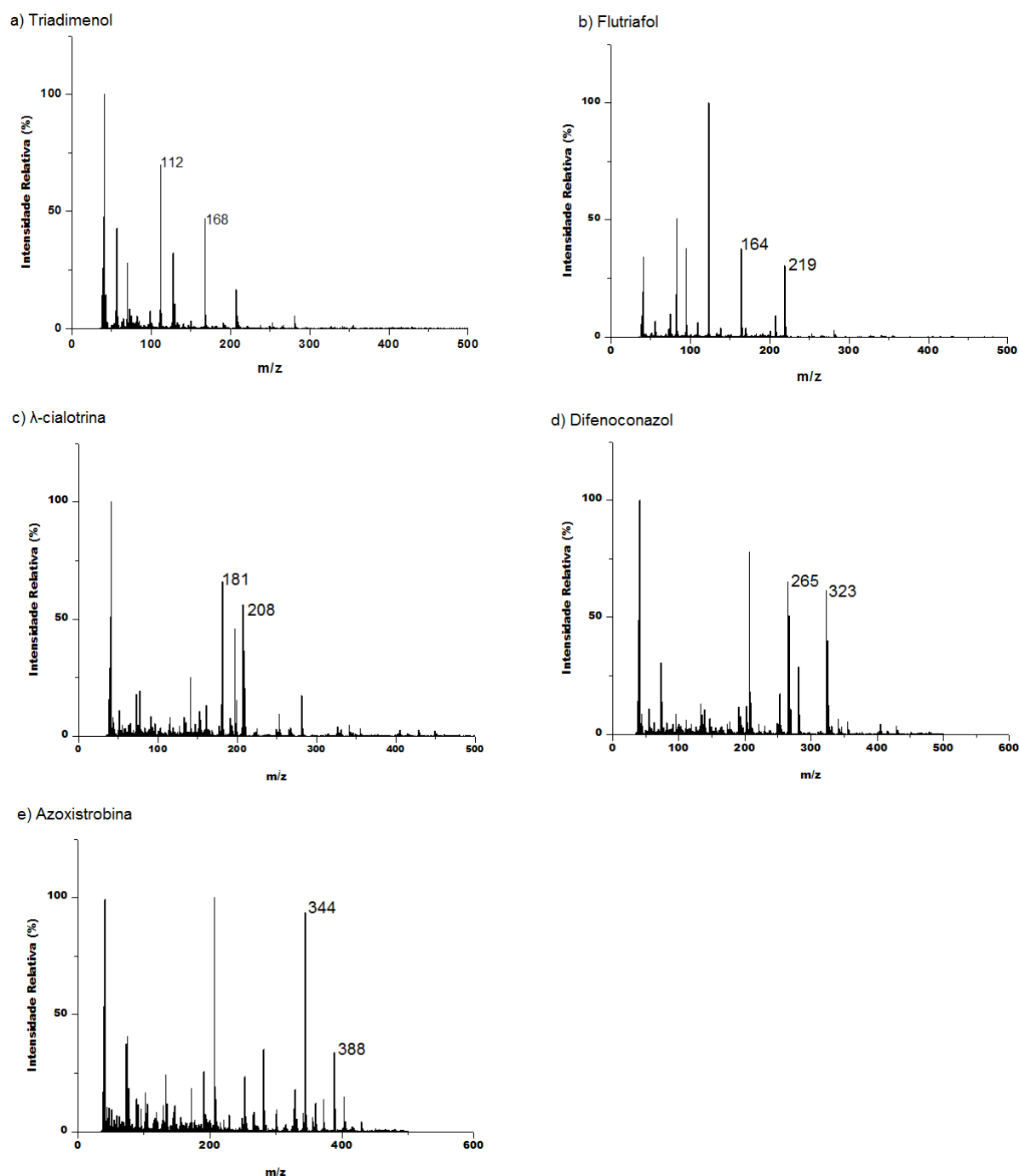


Figura 2. Espectros obtidos para cada composto em estudo. Sendo, a) Triadimenol, Flutriafol, λ-Cialotrina, Difenconazol, Azoxistrobina.

5.2. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP)

A otimização para este trabalho foi dividida em duas etapas. Na primeira, os volumes de água e de solvente extrator foram otimizados e na segunda foram otimizados os tempos de agitação, de centrifugação e de congelamento.

5.2.1. Otimização da mistura extratora usada na SLE/LTP

As quantidades de água e de acetonitrila foram otimizadas utilizando um planejamento fatorial 2^2 com ponto central conforme descrito no item 4.4.2.1. A significância de cada fator foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) usando níveis de significância p-valor a um nível de 95% de confiança.

Para gerar os gráficos de Pareto foi utilizada a área de cada agrotóxico nos extratos dos respectivos ensaios. Estes gráficos mostram os valores dos efeitos de cada uma das variáveis e da interação entre elas, de forma a verificar se os mesmos são estatisticamente significativos. Os gráficos foram gerados com resultados obtidos dos agrotóxicos, isoladamente, como mostrado na Figura 3. O comprimento da barra permite avaliar a significância de cada um dos efeitos e interações. Quanto mais à direita da linha vermelha a barra estiver, mais significativo será o efeito dessa variável na área do agrotóxico.

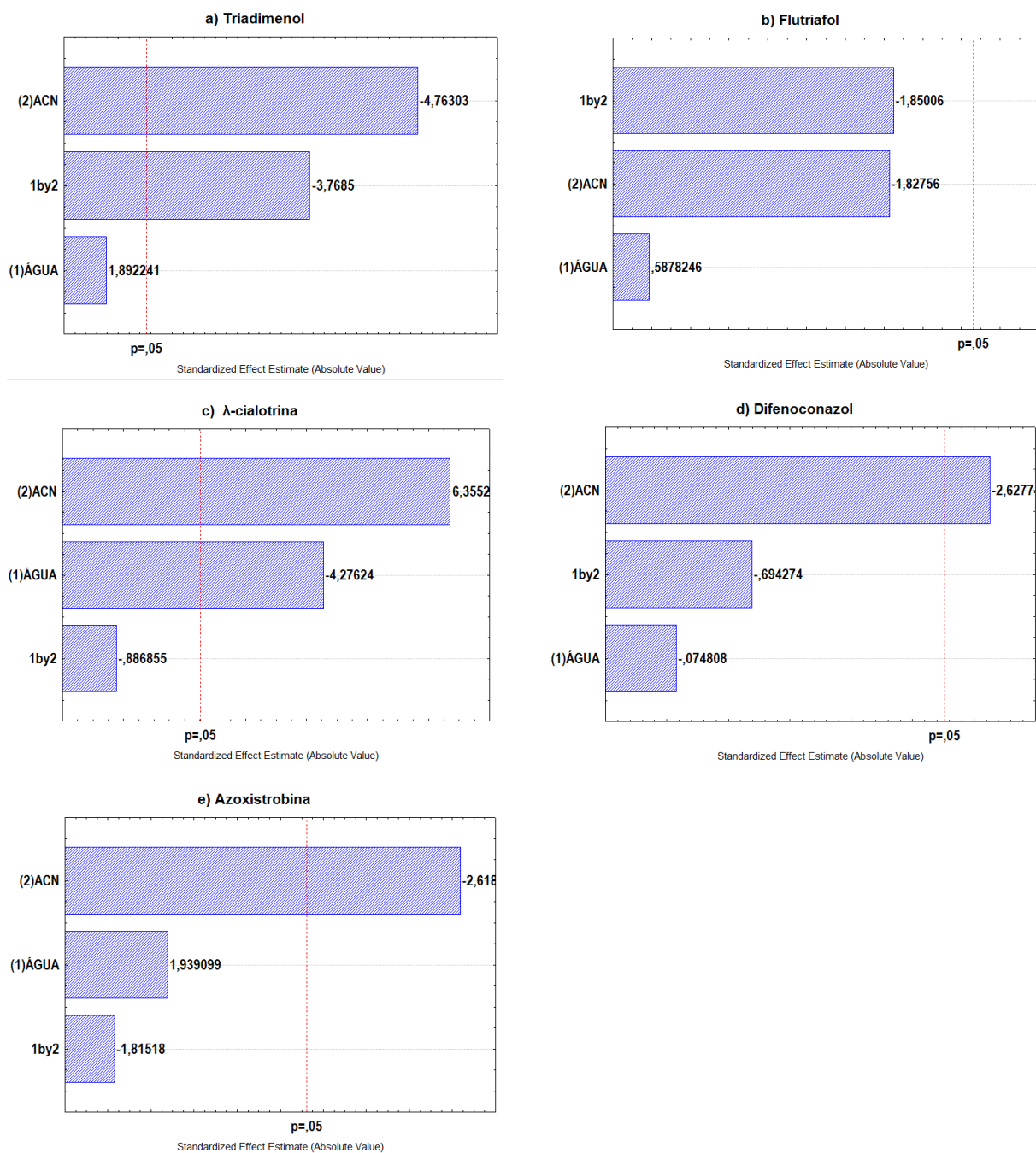


Figura 3. Gráfico de Pareto para as variáveis, quantidade de água, de acetonitrila e suas interações na extração do a) triadimenol, b) flutriafol, c) λ-cialotrina, d) difenoconazol e e) azoxistrobina em farinha de aveia por SLE/LTP.

De acordo com os gráficos de Pareto apresentados na Figura 3, nota-se que o volume de acetonitrila influenciou de maneira positiva a resposta da λ -cialotrina e de maneira negativa para triadimenol, difenoconazol e azoxistrobina, enquanto que para o flutriafol o volume de acetonitrila não foi significativo. Já o fator volume água teve significância para apenas um dos compostos, a λ -cialotrina, e esta influência foi negativa. Esses resultados mostram que o menor volume de água iria favorecer a extração da λ -cialotrina, sendo essa variável não significativa para os demais analitos em estudo. Com isso, optou-se por adotar o menor valor para as duas variáveis, volume de água (3,00 mL) e volume de acetonitrila (4,00 mL) afim de promover maior recuperação dos analitos, melhorando a sensibilidade do método.

Na Figura 3 também é possível notar que a interação entre os fatores volume de água e de acetonitrila foi significativa apenas para o triadimenol, e essa influência foi negativa, indicando que, para obter uma melhor extração deste composto deveria se utilizar menor volume de acetonitrila e maior volume de água. Para melhor visualizar este efeito, foi construído um gráfico de superfície de resposta para este composto, que é apresentado na Figura 4. Neste trabalho optou-se por apresentar apenas o gráfico de superfície de resposta para o triadimenol, uma vez que ao analisar os gráficos de Pareto, pôde-se perceber que as interações entre volume de água e de acetonitrila não são significativas para os demais compostos.

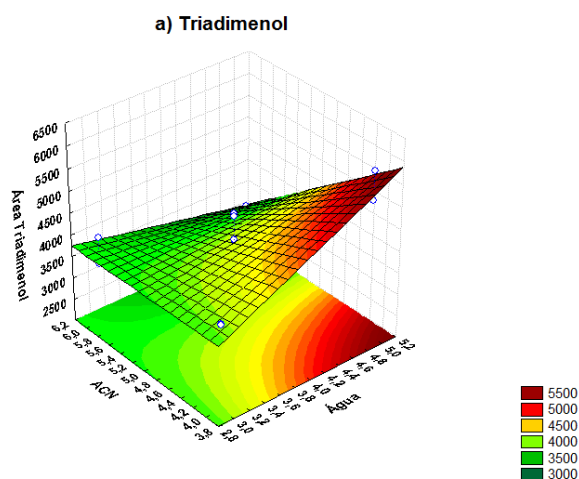


Figura 4. Superfície de resposta representando a interação entre as variáveis quantidade de acetonitrila (ACN) e água para o triadimenol, na extração de farinha de aveia fortificada com os triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol e azoxistrobina pela SLE/LTP.

Embora o gráfico de superfície de resposta e o gráfico de Pareto tenham indicado que os volumes de acetonitrila e água devem ser opostos, para se obter maior eficiência de extração para o triadimenol, optou-se por empregar menor volume de acetonitrila e de água. Essa escolha foi feita pois, pelo gráfico de Pareto, observou-se que para a maioria dos compostos o volume de acetonitrila foi significativo negativo, mostrando que o menor volume forneceria uma melhor extração destes. Já o volume de água foi significativo apenas para a λ -cialotrina, de modo negativo, não influenciando na extração dos demais compostos. Por isso, para definir as melhores condições para essa etapa da otimização optou-se por adotar 4,00 mL de acetonitrila e 3,00 mL de água para extração dos agrotóxicos.

5.2.2. Otimização do tempo de agitação, centrifugação e congelamento

Outros parâmetros importantes que devem ser otimizados para obter uma melhor extração pela técnica SLE/LTP são, o tempo de agitação, de centrifugação e de congelamento. Para avaliar a condição ótima para essas três variáveis foi feito um planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata no ponto central (Tabela 5), sendo o experimento feito em duplicata, conforme descrito no item 4.4.2.2. Nesse planejamento, a área cromatográfica atribuída ao analito, determinada experimentalmente, foi utilizada como resposta para gerar os gráficos de Pareto e as superfícies de resposta. Estas respostas possibilitam verificar quais os efeitos e as interações que são estatisticamente significativas. Os gráficos de Pareto gerados para cada um dos agrotóxicos estão dispostos na Figura 5. As superfícies de respostas, onde as interações foram significativas, são mostradas na Figura 6.

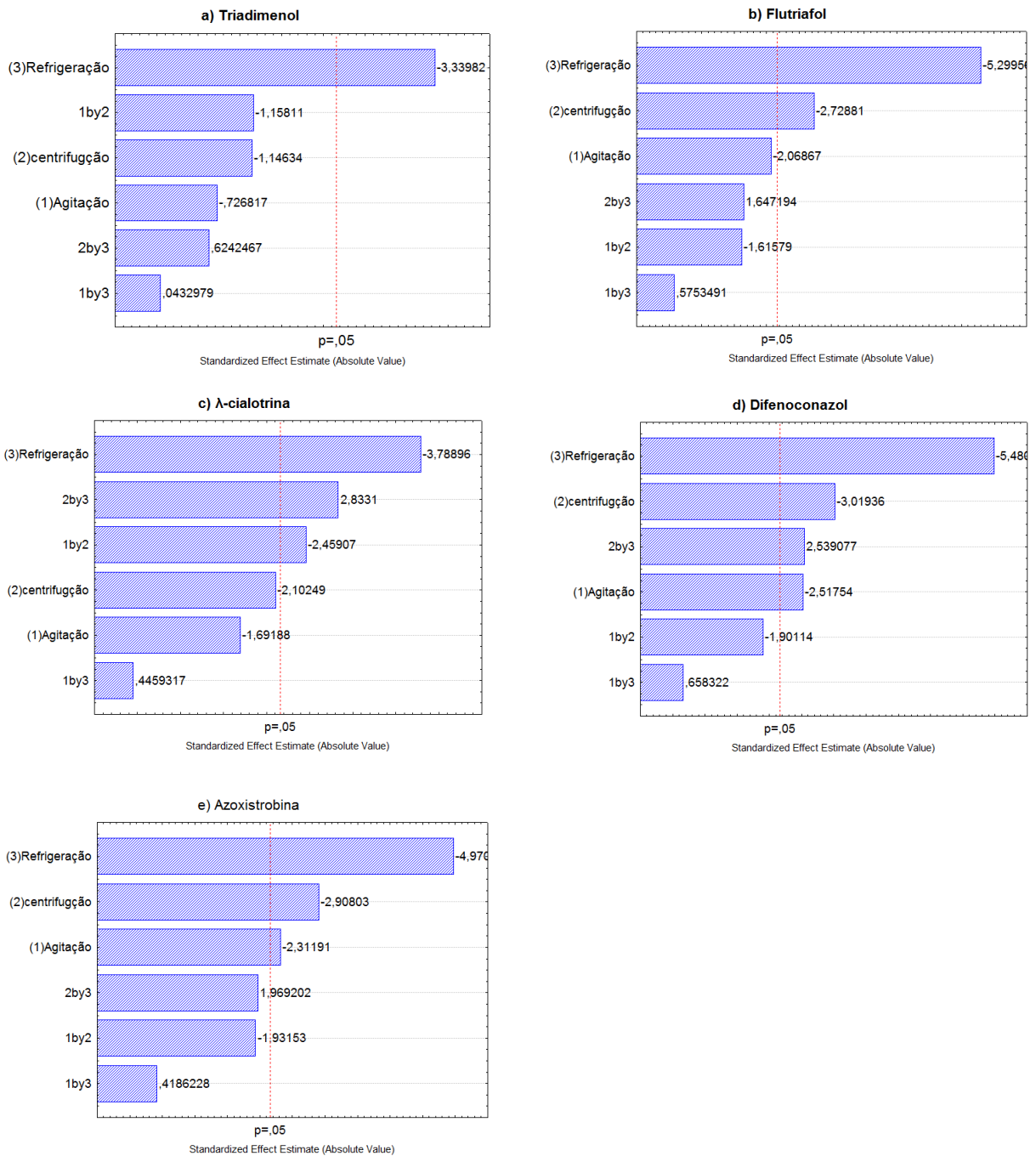


Figura 5. Gráfico de Pareto para as variáveis, tempo de agitação, centrifugação e congelamento e suas interações na extração do a) Triadimenol, b) Flutriafol, c) Λ-cialotrina, d) Difenoconazol e e) Azoxistrobina em farinha de aveia por SLE/LTP.

Pelo Gráfico de Pareto (Figura 5), pôde-se perceber que o tempo de congelamento foi o parâmetro de maior relevância, uma vez que, foi significativo negativo para todos os cinco compostos em estudo. O tempo de centrifugação foi significativo negativo para três dos cinco compostos (flutriafol, difenoconazol e azoxistrobina), enquanto para os outros dois (triadimenol e λ -cialotrina) esta variável não foi significativa. Já o parâmetro tempo de agitação foi significativo negativo apenas para o difenoconazol e azoxistrobina, sendo que para o triadimenol, flutriafol e λ -cialotrina não foi significativo. Para os três parâmetros ao dizer que a significância é negativa pôde-se compreender que quanto menor o valor para esses, melhor a extração dos compostos.

Outras informações obtidas pelo gráfico de Pareto foram sobre as interações entre os parâmetros, optando-se por destacar apenas as significativas. A interação entre o tempo de congelamento e centrifugação foi significativamente positiva para λ -cialotrina e difenoconazol, sendo, não significativa para os demais. De posse dessa informação, para se determinar a influência de cada um desses parâmetros na interação, analisou-se o gráfico de superfície de resposta (Figura 6). Por meio desse gráfico foi possível verificar que para estes dois compostos o menor tempo de congelamento e centrifugação gerou uma maior resposta, o que está de acordo com os resultados observados no gráfico de Pareto. Para a λ -cialotrina outra interação significativa, foi entre o tempo de agitação e o tempo de centrifugação. Essa interação teve significância negativa indicando que esses parâmetros devem ter valores opostos.

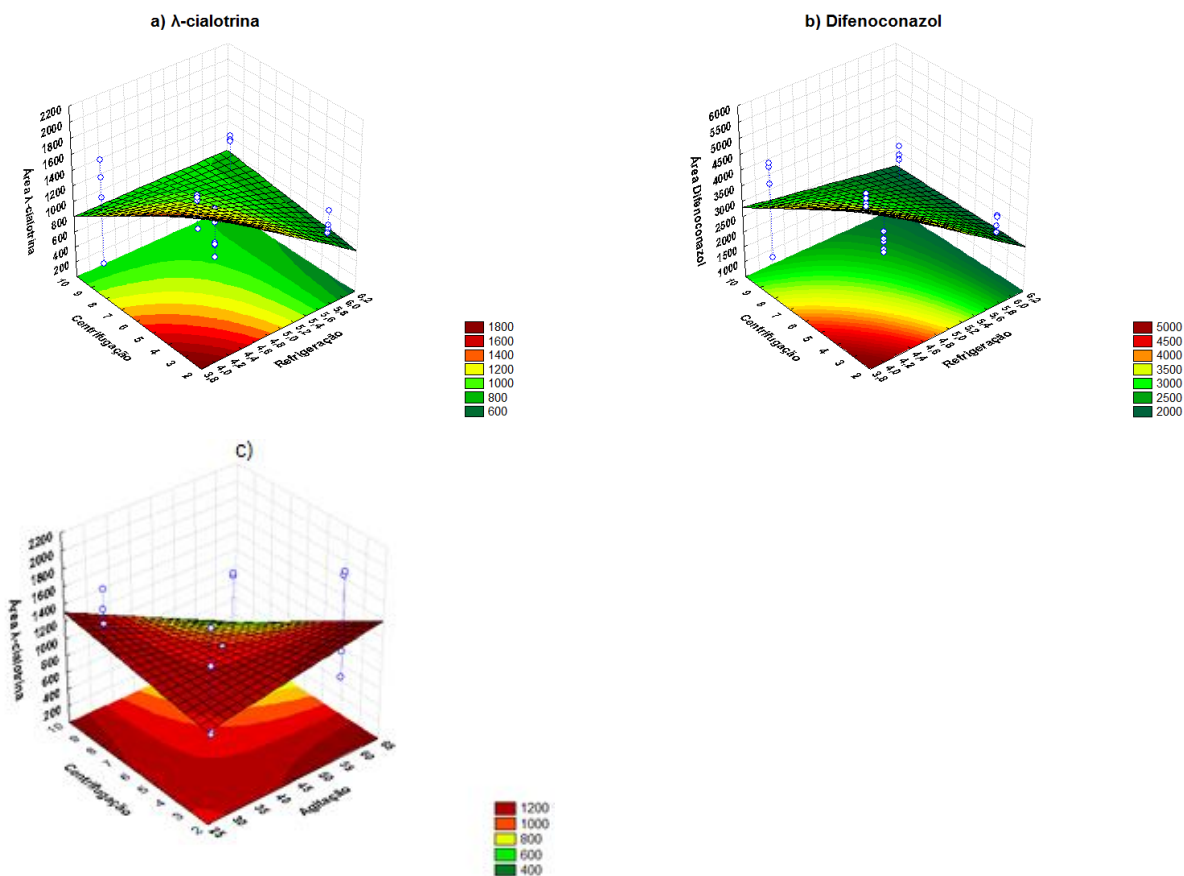


Figura 6. Superfície de respostas representando a interação entre o tempo de centrifugação e congelamento para um planejamento 2^3 com ponto central ($n=3$), sendo (a) λ -cialotrina e (b) Difenoconazol e (c) Gráfico de superfície de resposta representando a interação entre o tempo de centrifugação e agitação para um planejamento 2^3 com ponto central ($n=3$) para λ -cialotrina.

Apesar do resultado obtido para interação entre o tempo de agitação e o tempo de centrifugação para a λ -cialotrina (Figura 6c) mostrar que a melhor extração foi obtida com um maior tempo de agitação e menor tempo de centrifugação, os demais parâmetros e interações possibilitam definir que a melhor condição para extração dos cinco compostos foi obtida quando menor tempo de agitação (30 s), de centrifugação (3 min) e de congelamento (4 h) foram empregados. Sendo possível assim obter uma melhor extração para os compostos.

5.3. Validação do método analítico

Validar um método analítico tem como finalidade garantir através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, proporcionando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2017). Desta maneira, a técnica SLE/LTP-GC-MS foi validada com base em alguns parâmetros, sendo eles, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão seguindo as recomendações da ANVISA (2017). Para a validação do método analítico, desse trabalho, utilizou-se um GC-MS da Agilent.

5.3.1. Seletividade

Seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade que um método possui de avaliar um composto em presença de outros componentes da matriz tais como impurezas, produto de degradação e componentes da matriz. Se a seletividade não estiver adequada, a linearidade, a exatidão, e a precisão estarão comprometidas (ANVISA, 2017).

Para averiguar a seletividade do método, os cromatogramas dos extratos das amostras de farinha de aveia isentas dos agrotóxicos em estudo (Branco) foram comparados com os cromatogramas dos extratos das amostras de farinha de aveia fortificadas com os cinco agrotóxicos. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento de extração SLE/LTP otimizado de forma a obter os extratos das amostras.

A Figura 7 mostra os cromatogramas dos extratos obtidos para a amostra de extrato de farinha de aveia isenta dos agrotóxicos (a) e dos extratos da farinha de aveia fortificada com os analitos (b). Para melhor visualização foi necessário aplicar zoom pois, tem-se um co-extrativo com tempo de retenção 5,9 min que interfere a visualização dos compostos de interesse.

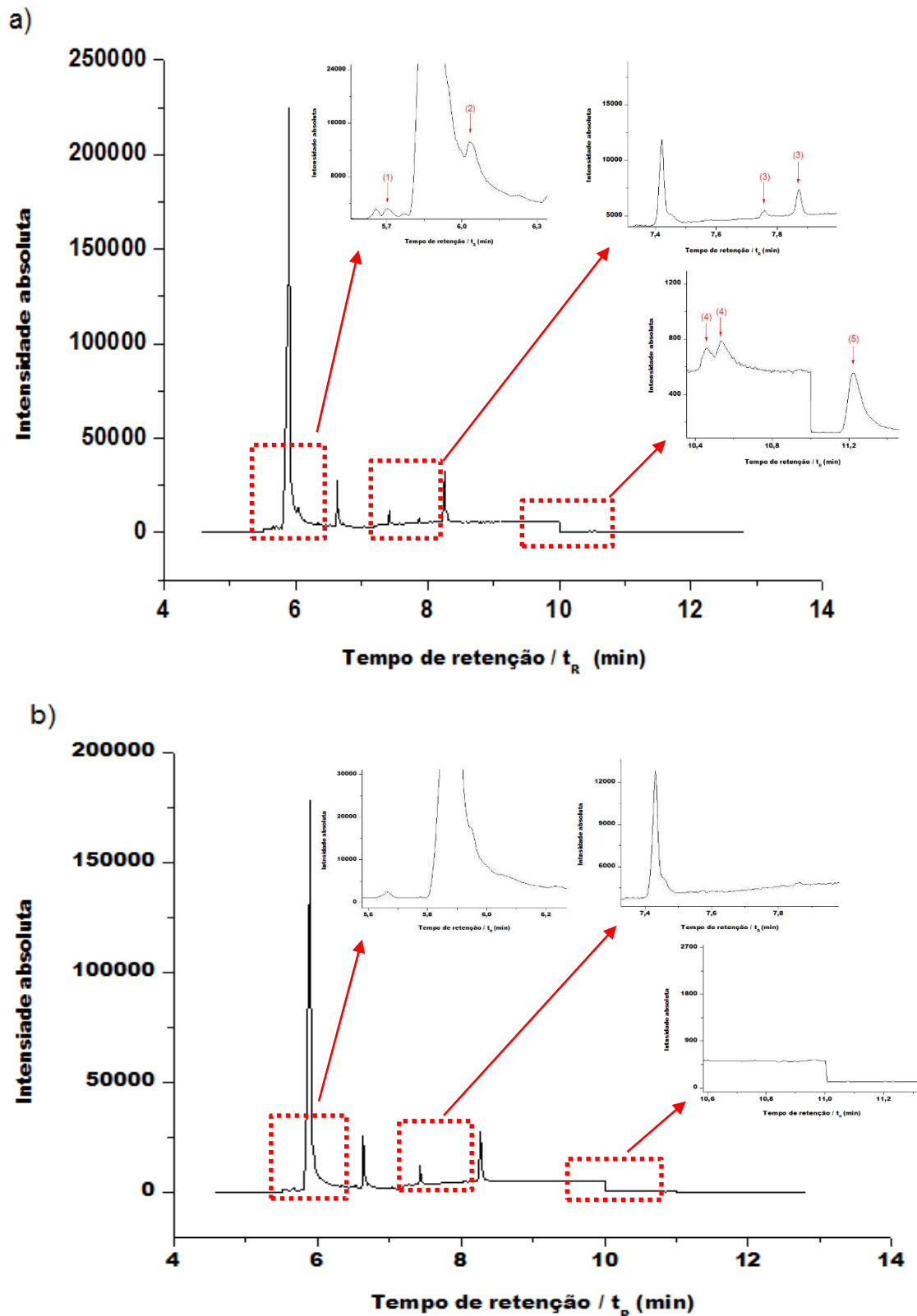


Figura 7. Cromatogramas, obtidos pelo GC-MS (Agilent), de extrato das amostras de farinha de aveia a) contendo $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de triadimenol, $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de flutriafol e difenoconazol, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de λ -citalotrina e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de azoxistrobina: (1) triadimenol: $t_R = 5,70$ min; (2) flutriafol: $t_R = 6,03$ min; λ -citalotrina: $t_R = 7,78$ e $7,88$ min, (4) difenoconazol: $t_R = 10,48$ e $10,57$ min e (5) azoxistrobina: $t_R = 11,21$ min; b) isento dos analitos

Percebe-se, que, ao analisar os cromatogramas, que o extrato da amostra de farinha de aveia não apresentou interferentes no mesmo tempo de retenção dos cinco analitos analisados, o que torna método otimizado seletivo para determinação de resíduos de triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol e azoxistrobina em farinha de aveia.

5.3.2. Linearidade de resposta do método

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito. Esse parâmetro está restrito a uma faixa de concentração e pode ser expresso por uma equação de reta obtida pela curva analítica. O coeficiente de correlação (r) da referida equação estima sua qualidade (RIBANI *et al*, 2004), na qual segundo a ANVISA (2017) o coeficiente de correlação deve ser maior ou igual a 0,990.

O método SLE/LTP-GC-MS otimizado foi aplicado em amostras de farinha de aveia fortificadas em diferentes concentrações dos agrotóxicos (Tabela 6). A partir dos dados obtidos, curvas analíticas foram construídas utilizando as médias das áreas para cada um dos compostos. A linearidade dos mesmos foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados. Os valores de r foram obtidos extraíndo a raiz quadrada dos coeficientes de determinação (r^2), onde todos os cinco compostos apresentaram valores de r iguais ou próximos a 0,99 como o estabelecido pelos parâmetros da ANVISA. Esse coeficiente de correlação linear é um bom indicativo da linearidade da resposta porém não é conclusivo, logo, deve ser avaliado também a distribuição os resíduo para confirmação. Esses são apresentados graficamente para que seja possível observar se há comportamento aleatório (INMETRO, 2018). Se for observada alguma tendência no comportamento dos dados no gráfico de resíduos, pode ser indício de que o modelo linear seja inadequado. Na Figura 9 são apresentados os gráficos de resíduos obtidos para todos os agrotóxicos. Observa-se que os dados apresentam comportamento aleatório, indicando que o método desenvolvido foi linear para os cinco agrotóxicos, dentro das faixas avaliadas.

Os coeficientes de correlação (r) para cada composto são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Coeficientes de correlação do triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol e azoxistrobina.

Agrotóxico	Coeficiente de correlação (r)
Triadimenol	0,999
Flutriafol	0,997
λ -Cialotrina	0,993
Difenoconazol	0,993
Azoxistrobina	0,988

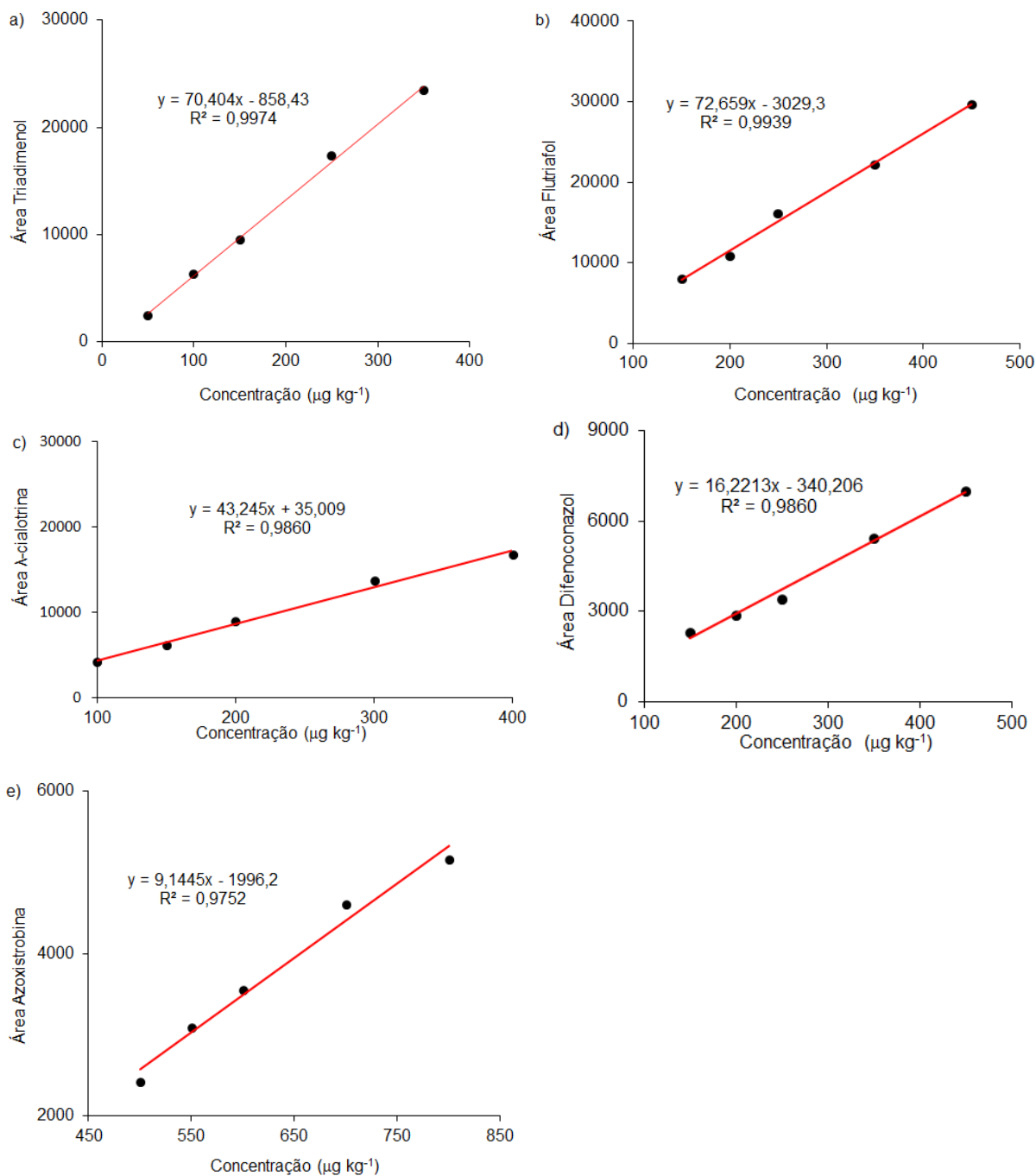


Figura 8. Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de farinha de aveia que foram fortificadas com padrão dos analitos. Sendo: (a) triadimenol ($50\text{-}350 \mu\text{g kg}^{-1}$), (b) flutriafol ($150\text{-}450 \mu\text{g kg}^{-1}$), (c) λ -cialotrina ($100\text{-}400 \mu\text{g kg}^{-1}$) e (d) difenoconazol ($150\text{-}450 \mu\text{g kg}^{-1}$) e (e) azoxistrobina ($500\text{-}800 \mu\text{g kg}^{-1}$).

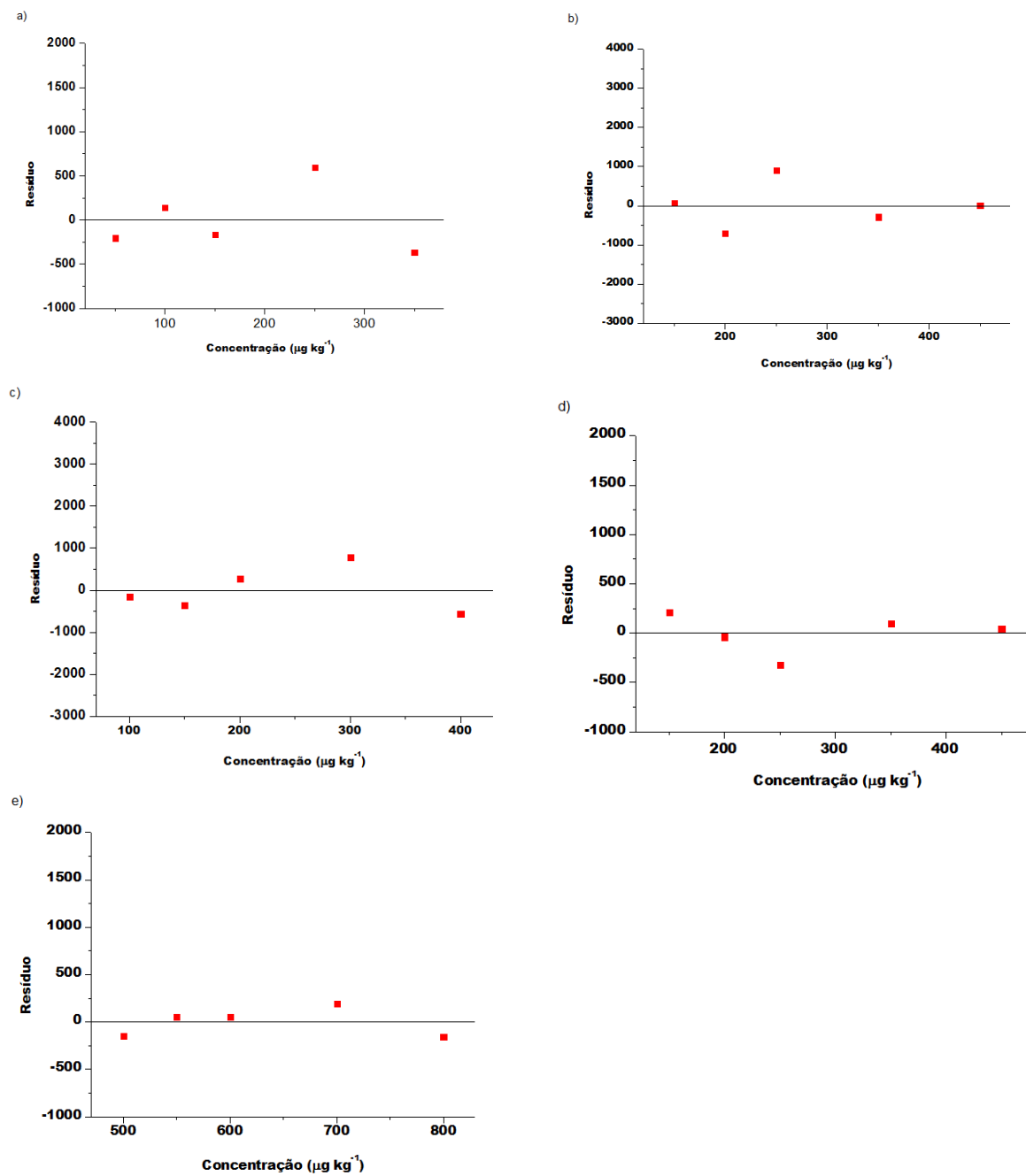


Figura 9. Gráficos de resíduos para as curvas analíticas para as amostras de farinha de aveia. Sendo: (a) Triadimenol, (b) Flutriafol, (c) λ-cialotrina, (d) Difenconazol e (e) Azoxistrobina.

5.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação

Limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LQ) é denominado como a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão adequada (ANVISA, 2017).

Para este trabalho, os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) para cada um dos cinco analitos foram determinados de acordo com as Equações 1 e 2 como descrito no item 4.5.3. Os valores de LD e LQ obtidos para cada um dos agrotóxicos estudados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método para os cinco agrotóxicos em estudo.

Agrotóxico	LD/($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ/($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Triadimenol	3,03	10,1
Flutriafol	12,9	43,0
λ -cialotrina	12,7	42,3
Difenoconazol	1,72	5,74
Azoxistrobina	1,72	5,73

Os valores obtidos de LD e LQ para os cinco agrotóxicos utilizando GC-MS variam entre 1,72 e 12,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 5,73 e 43,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Esses valores obtidos podem ser comparados com os limites máximos de resíduos (LMR), estabelecidos pela ANVISA e União Europeia para os cinco agrotóxicos em aveia conforme mostrado na Tabela 1. Pode-se perceber que os valores de LD e LQ do método estão bem abaixo dos valores máximos permitidos para esses agrotóxicos em aveia. Pang *et al.* (2006) encontraram valores de LQ para o triadimenol, difenoconazol e flutriafol de 75, 150 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente para análise de resíduos em grãos. Estes valores de LQ são maiores do que os obtidos neste trabalho para farinha de aveia. Isso indica que o método proposto para determinação de resíduos de agrotóxicos em farinha de aveia mostra-se apto para avaliar esse tipo de

contaminação.

5.3.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação a um valor de referência, dito verdadeiro (ANVISA, 2017; RIBANI, 2004).

A exatidão do método SLE/LTP-GC-MS proposto neste trabalho foi avaliada através de ensaios de recuperação conforme as recomendações da ANVISA (2017). Os ensaios foram feitos em triplicata em três diferentes concentrações como mostrado na Tabela 7. A porcentagem de recuperação (%R) e o coeficiente de variação (CV) obtidos para extração de cada um dos analitos presentes nas amostras de farinha de aveia estão apresentados na Tabela 10.

Os resultados obtidos mostram uma recuperação entre 91,7 e 108% (aceitável de 70-120). Dessa maneira o método desenvolvido apresenta boa exatidão, sendo adequado para extração e análise de triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol e azoxistrobina em amostras de farinha de aveia.

Tabela 10. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de amostras de farinha de aveia fortificadas em três níveis de concentração

Agrotóxicos	Concentração Nominal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	%R
Triadimenol	50	94,2
	150	98,3
	350	98,4
Flutriafol	150	101
	250	105
	450	98,8
λ -cialotrina	100	100
	200	106
	400	93,2
Difenoconazol	150	108
	250	91,7
	450	100
Azoxistrobina	500	96,8
	600	101
	800	97,9

5.3.5. Precisão

A precisão mede o grau de dispersão entre os resultados obtidos ao aplicar o método otimizado diversas vezes em uma mesma amostra. É expressa através do desvio padrão (DV) ou coeficiente de variação (CV), também chamado de desvio padrão relativo (RSD) (ANVISA, 2017; RIBANI, 2004). Para este trabalho foram realizadas triplicatas de três ensaios de diferentes concentrações como mostrada na Tabela 7.

5.3.6. Repetitividade

A repetitividade mede a dispersão dos resultados obtidos pelo método otimizado em um curto intervalo de tempo, por isso, é também chamada de precisão intra-dia (RIBANI *et al.*, 2004). A repetitividade foi avaliada em três diferentes concentrações com três replicatas cada. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Coeficientes de variação (CV) obtidos a partir de ensaios realizados em um mesmo dia. As amostras de farinha de aveia foram fortificadas em três diferentes níveis de concentração.

Agrotóxicos	Concentração	CV (%)
	($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
Triadimenol	50	1,63
	150	2,87
	350	1,72
Flutriafol	150	8,32
	250	6,00
	450	1,42
λ -cialotrina	100	7,81
	200	6,78
	400	2,32
Difenoconazol	150	10,7
	250	4,37
	450	8,16
Azoxistrobina	500	11,6
	600	3,84
	800	9,03

Os resultados obtidos mostram uma boa repetitividade dos dados, onde o CV variou de 1,42-11,6% e em amostras complexas são aceitáveis coeficientes de variação de até 20% (ANVISA, 2017).

5.3.7. Precisão intermediária

A precisão intermediária, também chamada de precisão inter-dia, avalia a repetibilidade dos resultados quando se usa o mesmo método analítico no mesmo laboratório, podendo também ser feita por diferentes analitos e/ou em diferentes equipamentos (RIBANI, 2004; ANVISA, 2017).

Neste estudo, a precisão intermediária do método foi avaliada aplicando-se o método otimizado em diferentes dias, ou seja, determinou-se a porcentagem de recuperação do triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol e azoxistrobina por SLE/LTP em diferentes dias. As análises foram feitas nas mesmas condições em diferentes dias.

A precisão foi realizada por meio dos coeficientes de variação obtidos para cada composto. Estes resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (CV) obtida, para amostras de farinha de aveia fortificadas em três níveis de concentração. Estes ensaios inter-dia foram obtidos após análise no primeiro, terceiro e quinto dia.

Agrotóxicos	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV (%)
Triadimenol	50	8,51
	150	6,61
	350	4,00
Flutriafol	150	8,04
	250	4,45
	450	3,04
λ -cialotrina	100	10,3
	200	9,70
	400	7,16
Difenoconazol	150	10,3
	250	9,65
	450	8,46
Azoxistrobina	500	8,89
	600	8,59
	800	5,66

Os resultados obtidos mostram uma boa precisão inter-dia dos dados, pois os valores dos coeficientes de variação ficaram entre 3,04 10,3%. Os intervalos de recuperação para análise de resíduos geralmente são 70-120% com coeficientes de variação de até 20% (RIBANI *et al.*, 2004).

5.4. Aplicação do método

O método desenvolvido, foi aplicado em amostras autênticas, sendo aplicado em farinhas de aveia e também em farelo e flocos para verificar a aplicação em diferentes granulometrias, totalizando 8 amostras. Após aplicação não foi encontrado

nenhum resíduo dos cinco agrotóxicos em estudo. A Figura 10 representa o cromatograma de uma amostra autêntica obtida após extração e análise pelo método proposto.

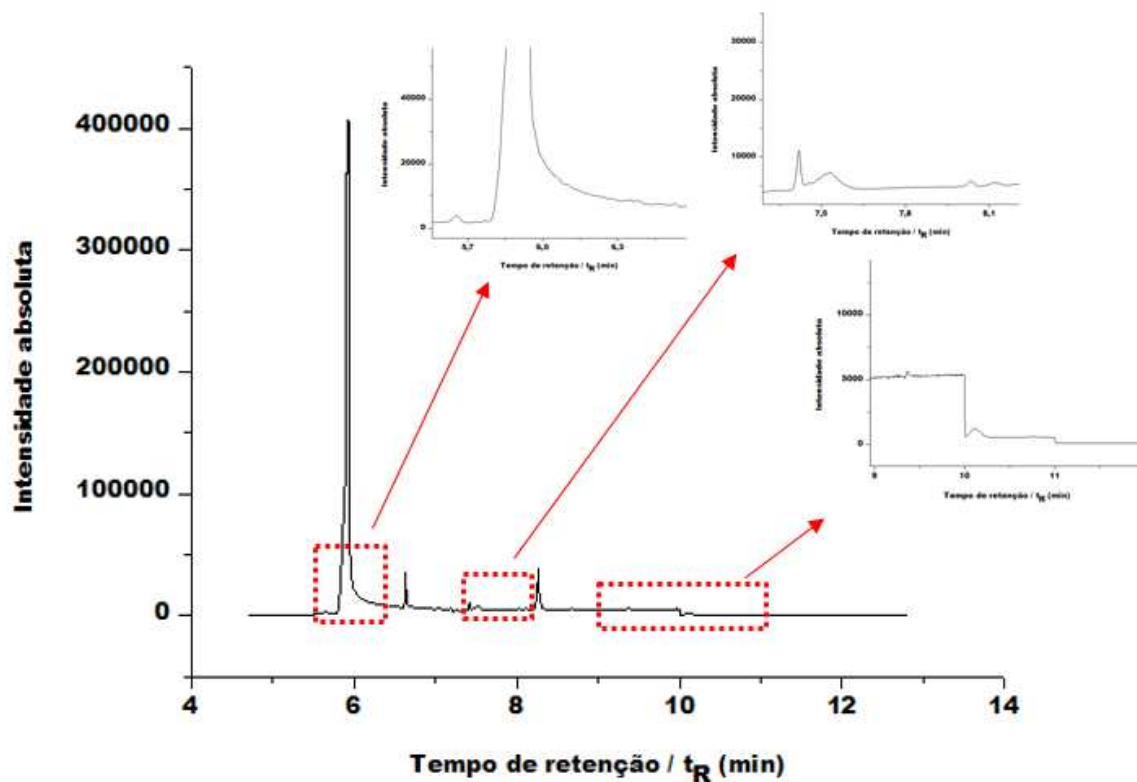


Figura 10. Cromatograma de um extrato obtido pela extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE/LTP) das amostras autênticas analisadas pelo método SLE/LTP-GC-MS

6. CONCLUSÕES

A técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura foi otimizada e validada para a determinação de triadimenol, flutriafol, λ -cialotrina, difenoconazol, azoxistrobina em farinha de aveia. Foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Agilent) (GC-MS) para validação e aplicação do método em amostras autênticas. O método pode ser considerado viável para análise dos analitos em amostras de farinha de aveia, com porcentagem de recuperação variando de 91,7 a 108% e CV variando de 1,42 a 11,6%.

O método apresenta bons valores de precisão e exatidão, boa linearidade e baixos limites de detecção e de quantificação, sendo este considerado um método simples, eficaz, com baixo consumo de solvente, baixo custo, sem necessidade da etapa de purificação para que o extrato seja analisado por cromatografia.

Em função dos resultados obtidos, pode-se concluir que o método desenvolvido é capaz de identificar e quantificar a presença de resíduos de agrotóxicos em farinha de aveia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, A.; SAJID, A.; HAQ, N.; RAHMAN, S.; MISBAH, Z.; SANOBBER, G.; ASHRAF, M. **Improvement of crops in the Era of climatic Changes**. Volume 1, cap. 13, pag 347-387, 2014.

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Brasília, 2014.

ANVISA. Regularização de produtos – Agrotóxicos. Monografias Autorizadas. Disponível em: <http://portal.ANVISA.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>. Acesso em: 20/04/2018.

ALBUQUERQUE, N. C. P.; CARRÃO, D. B.; HABENSCHUS, M. D.; OLIVEIRA, A. R. M. Metabolism studies of chiral pesticides: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 89–109, 2018.

CHAWLA, P.; KAUSHIK, R.; SWARAJ, V. J. S.; KUMAR, N. Organophosphorus pesticides residues in food and their colorimetric detection. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 10, p. 292–307, 2018.

ChemSpider. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <http://www.chemspider.com/>. Acesso em 25/01/2019.

COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; SOUSA, F. A.; ZAMBOLIM, L. Determination of pesticides in lettuce using solid – liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, v. 181, p. 64–71, 2015.

European Commission. EU Pesticides database. Disponível: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides->

database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN. Acesso em: 20/02/2018.

EMBRAPA. **Recomendações técnicas para o cultivo de aveia**. São Carlos, SP, Dezembro, 2000.

FINNAN, J.; BURKE, B.; SPINK, J. The effect of nitrogen timing and rate on radiation interception , grain yield and grain quality in autumn sown oats. **Field Crops Research**, v. 231, p. 130–140, 2019.

GALDOS-RIVEROS, A. C.; PESSOLATO, A. G. T.; PALOMINO-ROGRIGUES, M. G.; MARIA, D. A. Análise de pesticidas por espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa (CG-EM). **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 2008–2018, 2012.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Quim. Nova**, v. 29, p. 105–112, 2006.

IBGE. Área e Produção de Cerais, Leguminosas e Oleaginosas - Segundo os Produtos Agrícolas - Brasil - Safra 2018. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtml>. Acesso em: 20/01/2019.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008), julho, 2018.

IUPAC. Global availability of information on agrochemicals. Disponível em: https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/168.htm?fbclid=IwAR1CMVd_JXCj2N6siNKZT97xCbgzFzDnsKw_nm9AFMMp4LV8cu6roHIFqTo. Acesso em: 25/01/2019.

KIM, K.; KABIR, E.; ARA, S. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 525–535, 2017.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna HPLC/CLAE** . Editora Átomo, 2009.

LIU, Y.; SHEN, D.; LI, S.; NI, Z.; DING, M.; YE, C.; TANG, F. Residue levels and risk assessment of pesticides in nuts of China. **Chemosphere**, v. 144, p. 645–651, 2016.

LYNCH, S. M.; MAHAJAN, R.; BEANE, L. E.; HOPPIN, J. A.; ALAVANJA, M. C. R. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to butylate in the Agricultural Health Study (AHS). **Environmental Research**, v. 109, p. 860–868, 2009.

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

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

OZTURK, O. K.; TAKHAR, P. S. Stress relaxation behavior of oat fl akes. **Journal of Cereal Science**, v. 77, p. 84–89, 2017.

PANG, G.-F.; LIU, Y.-M.; FAN, C.-K.; ZHANH, J.-J.; CAO, Y.-Z.; LI, X.-M.; LI, Z.-Y.; WU, Y.-P.; GUO, T.-T. Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Bional Chem**, v. 384, p. 1366–1408, 2006.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, M.; GERARDO, R.; PEZZA, L.; REDIGOLO, H. An overview of the main foodstu ff sample preparation technologies for tetracycline residue determination. **Talanta**, v. 182, p. 1–21, 2018.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; QUÍMICA, D. De; FEDERAL, U.; MARIA, D. S. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620–1634, 2009.

Resolução RDC ANVISA n°.166, de 25 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771–780, 2004.

SABARWAL, A.; KUMAR, K.; SINGH, R. P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health – Cancer and other associated disorders. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 63, p. 103–114, 2018.

SOUSA, D. A.; GONÇALVES, R. M.; HELENO, F. F.; QUEIROZ, M. E.L. R.; ROSA, M.; MARCHI, R. Chemometric optimization of solid – liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in Caiman yacare eggs. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 266–272, 2014.

TAN, S.; NIU, Y.; LIU, L.; SU, A.; HU, C.; MENG, Y. Development of a GC – MS / SIM method for the determination of phytosteryl esters. **Food Chemistry**, v. 281, p. 236–241, 2019.

WU, C. Multiresidue method for the determination of pesticides in Oolong tea using QuEChERS by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 229, p. 580–587, 2017.

ZHANG, N.; GAO, Y.; TONG, L.; LI, Z. Superheated steam processing improved the qualities of oats flour and noodles. **Journal of Cereal Science**, v. 83, p. 96–100, 2018.

ZWER, P. K. Oats: Overview. **Encyclopedia of Food Grains** (Second Edition), v. 1, p. 173-183, 2016.