

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**MÁRCIA CASSIMIRA MARCOS RIBEIRO**

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.):  
VALIDAÇÃO DE MÉTODO, OCORRÊNCIA NO BRASIL, ORGANIZAÇÃO DE  
ENSAIO DE PROFICIÊNCIA E PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA  
CERTIFICADO.**

Belo Horizonte

2016

**MÁRCIA CASSIMIRA MARCOS RIBEIRO**

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.): VALIDAÇÃO DE MÉTODO, OCORRÊNCIA NO BRASIL, ORGANIZAÇÃO DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA E PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciência de Alimentos

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

Belo Horizonte

2016

R484r Ribeiro, Márcia Cassimira Marcos.  
Resíduos de agrotóxicos em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): validação de método, ocorrência no Brasil, organização de ensaio de proficiência e produção de material de referência certificado / Márcia Cassimira Marcos Ribeiro. – 2016.  
132 f. : il.

Orientador: Roberto Gonçalves Junqueira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Alimentos – Controle de qualidade – Teses. 2. Feijão – Teses. 3. Produtos químicos agrícolas – Teses. 4. Laboratórios – Avaliação – Teses. 5. Segurança alimentar – Teses. 6. Ensaio de proficiência – Teses. 7. Validação de método - Teses. I. Junqueira, Roberto Gonçalves. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 664.07



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPGCA

## FOLHA DE APROVAÇÃO

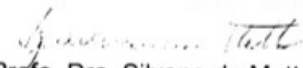
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*, L.):  
VALIDAÇÃO DE MÉTODO, PROVIMENTO DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA E  
PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO.

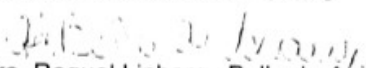
### MÁRCIA CASSIMIRA MARCOS RIBEIRO


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

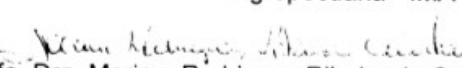
Aprovada em 21 de dezembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira (Orientador)  
Faculdade de Farmácia - UFMG

  
Profa. Dra. Silvana da Motta  
Faculdade de Farmácia - UFMG

  
Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo  
Faculdade de Farmácia - UFMG

  
Prof. Dr. Mauro Lúcio Gonçalves de Oliveira  
Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA

  
Profa. Dra. Mariem Rodrigues Ribeiro da Cunha  
Fundação Ezequiel Dias - FUNED

Belo Horizonte, 21 de dezembro de 2016.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

À Fundação Ezequiel Dias (Funed).

À Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Laboratório Nacional de Agropecuária de Minas Gerais (LANAGRO-MG) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Laboratório Nacional de Agropecuária de Goiás (LANAGRO-GO) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP).

Ao Laboratório de Resíduos de Pesticidas (LARP) da Universidade Federal de Santa Maria.

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos da Nestlé.

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Instituto Adolfo Lutz.

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Agrosafety.

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Eurofins.

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Laboratório Central de Saúde Pública de Goiás (LACEN-GO).

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Instituto Biológico.

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar).

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos da Bioagri.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos da CVUA Stuttgart/Alemanha.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

Agradeço a Deus e a meus pais.

Agradeço ao meu marido.

Agradeço à minha madrinha Geni, ao meu irmão Marcelo e à minha tia Belinha.

Agradeço ao meu orientador e à minha co-orientadora.

Agradeço aos integrantes da banca do exame de qualificação e da banca da defesa da tese.

Agradeço a todos os meus professores.

Agradeço a todos os que colaboraram com este trabalho, de modo especial, à Ysadora.

Agradeço a todos os funcionários e alunos da Fundação Ezequiel Dias e da Faculdade de Farmácia da UFMG.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>14</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
1 AGROTÓXICOS.....	20
2 FEIJÃO.....	23
3 MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS.....	25
3.1 O método analítico QuEChERS.....	25
3.2 Cromatografia líquida e espectrometria de massas sequencial.....	27
4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS.....	28
5 COMPARAÇÕES INTERLABORATORIAIS.....	30
5.1 Ensaio de proficiência.....	31
5.1.1 Importância.....	31
5.1.2 Documentos orientativos.....	31
5.1.3 Avaliação da homogeneidade e da estabilidade.....	31
5.1.4 Determinação do valor designado.....	32
5.1.5 Avaliação de desempenho.....	33
5.2 Caracterização de material de referência.....	33
5.2.1 Importância.....	34
5.2.2 Documentos orientativos.....	34
<b>CAPÍTULO I - RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO (PHASEOLUS VULGARIS, L.): VALIDAÇÃO DE MÉTODO E OCORRÊNCIA NO BRASIL.....</b>	<b>36</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>36</b>
1 INTRODUÇÃO.....	37
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1 Reagentes e amostras.....	38



2.2	Condições da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequencial.....	39
2.3	Preparação dos padrões em matriz.....	44
2.4	Desempenho do método.....	44
2.5	Preparação das amostras.....	46
2.6	Garantia da qualidade dos resultados.....	47
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1	Desempenho do método.....	47
3.2	Análise das amostras.....	53
4	CONCLUSÃO.....	56
	<b>CAPÍTULO II - ENSAIO DE PROFICIÊNCIA EM DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO (PHASEOLUS VULGARIS L.) COM MÉTODO MULTIRRESÍDUOS: COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA PROFICIÊNCIA.....</b>	<b>58</b>
	RESUMO.....	58
1	INTRODUÇÃO.....	59
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1	Reagentes e amostras.....	60
2.2	Divulgação do estudo.....	61
2.3	Preparo e armazenamento dos itens de ensaio.....	61
2.4	Envio dos itens.....	62
2.5	Estudo da homogeneidade.....	62
2.6	Estudo da estabilidade.....	63
2.7	Determinação do valor designado e de seu desvio padrão.....	63
2.8	Z-escores, $Z_B$ e $Z_W$ , h e k.....	64
2.9	Avaliação da proficiência.....	65
2.10	Representação gráfica dos resultados.....	65
2.11	Incerteza do valor designado.....	66
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.1	Laboratórios participantes.....	67
3.2	Estudo da homogeneidade.....	67
3.3	Estudo da estabilidade.....	69
3.4	Número de laboratórios participantes.....	71
3.5	Eliminação de <i>outliers</i> .....	71

3.6	Comparação dos valores designados e dos desvios padrões.....	72
3.7	Avaliação da proficiência.....	73
3.8	Incerteza do valor designado.....	76
3.9	Não declaração de limites de detecção e de quantificação.....	79
3.10	Calibração em matriz.....	80
3.11	Falsos positivos.....	81
3.12	Falsos negativos.....	81
3.13	Método de extração.....	81
3.14	Curva de calibração ou único ponto.....	81
3.15	CL-EM/EM.....	82
3.16	Considerações finais.....	82
4	CONCLUSÃO.....	82
5	APÊNDICE.....	84
<b>CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA</b>		
<b>CERTIFICADO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS</b>		
<b>EM FEIJÃO (PHASEOLUS VULGARIS, L.).....</b>		
		98
	RESUMO.....	98
1	INTRODUÇÃO.....	99
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	100
2.1	Reagentes e amostras.....	100
2.2	Preparo e armazenamento do material.....	101
2.3	Estudo da homogeneidade.....	101
2.4	Estudo da estabilidade.....	101
2.5	Convite aos laboratórios.....	102
2.6	Envio dos itens.....	102
2.7	Determinação do valor de propriedade .....	102
2.8	Determinação da incerteza do valor de propriedade.....	102
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
3.1	Laboratórios participantes.....	104
3.2	Estudo da homogeneidade.....	104
3.3	Estudo da estabilidade.....	106

3.4	Determinação do valor de propriedade e da incerteza associada.....	110
4	CONCLUSÃO.....	114
	<b>CONCLUSÕES INTEGRADAS.....</b>	<b>115</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>117</b>

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

1	Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseada na Dose Letal 50 e na Concentração Letal 50 de formulações líquidas e sólidas.....	22
---	---	----

### CAPÍTULO I

I.1	Agrotóxicos, transições e parâmetros de aquisição dos dados.....	40
I.2	Resultados da validação.....	49
I.3	Resíduos de agrotóxicos encontrados nas amostras analisadas.....	53

### CAPÍTULO II

II.1	Dados do estudo da homogeneidade.....	67
II.2	Resultados do estudo da homogeneidade.....	68
II.3	Dados do estudo da estabilidade.....	69
II.4	Resultados do estudo da estabilidade.....	70
II.5	Número de outliers detectados por Grubbs, Cochran e pelo cálculo dos valores h e k.....	72
II.6	Resultados das determinações dos valores designados.....	73
II.7	Resultados das determinações dos desvios padrões.....	73
II.8	Resultados satisfatórios.....	74
II.9	Resultados insatisfatórios.....	74
II.10	Resultados questionáveis.....	75
II.11	Incerteza padrão do valor designado e $0,3 \times$ desvio padrão da avaliação da proficiência adotado.....	77
II.12	Incerteza expandida do valor designado e desvio padrão da avaliação da proficiência adotado.....	77
II.13	Dados analíticos declarados pelos participantes.....	78
II.A.1	Dados do carbaril.....	84
II.A.2	Dados do carbendazim.....	86
II.A.3	Dados do clorpirifós-etílico.....	88
II.A.4	Dados do miclobutanil.....	90
II.A.5	Dados do pirimifós-metílico.....	92
II.A.6	Dados do tebuconazol.....	94
II.A.7	Dados do tiacloprido.....	96

### **CAPÍTULO III**

III.1	Dados do material de referência certificado.....	110
III.2	Componentes das incertezas do material de referência certificado.....	111

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

I.1	Etapas de extração e purificação das amostras.....	46
I.2	Distribuição dos resíduos detectados.....	55
I.3	Número e resíduos de agrotóxicos encontrados nas amostras de feijão..	55

### CAPÍTULO II

II.1	Porcentagem dos resíduos do escopo analisados pelos participantes.....	79
II.2	Resumo dos resultados obtidos pelos participantes.....	79
II.A.1	Gráfico de Youden para carbaril.....	85
II.A.2	Gráfico de Youden para carbendazim.....	87
II.A.3	Gráfico de Youden para clorpirifós-etílico.....	89
II.A.4	Gráfico de Youden para miclobutanil.....	91
II.A.5	Gráfico de Youden para pirimifós-metílico.....	93
II.A.6	Gráfico de Youden para tebuconazol.....	95
II.A.7	Gráfico de Youden para tiacloprido.....	97

### CAPÍTULO III

III.1	Gráficos do estudo da homogeneidade.....	106
III.2	Gráficos do estudo da estabilidade ao transporte.....	108
III.3	Gráficos do estudo da estabilidade a longo prazo.....	110
III.4	Contribuição das fontes de incerteza.....	112

## RESUMO

Um método para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) foi desenvolvido e validado. A extração e purificação foram realizadas por método QuEChERS modificado e a detecção e quantificação por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequencial (triploquadrupolo). Para 112 agrotóxicos demonstrou-se que o método foi adequado ao uso pretendido. A ocorrência dos resíduos de agrotóxicos em feijão comercial foi estudada com o método validado em 256 amostras coletadas em todos os estados brasileiros e no Distrito Federal. Foi também conduzido um ensaio de proficiência para o escopo análise de agrotóxicos em feijão, com a participação de treze laboratórios. Os itens do ensaio foram preparados pela adição de oito agrotóxicos em feijão orgânico e se mostraram homogêneos e estáveis no período do ensaio. Os resultados dos participantes foram avaliados por três diferentes métodos de proficiência: Algoritmo A da ISO 13.528:2015, mediana com variação interquartil normalizada e fatores de consistência k e h da ISO 5725-2:1994. Os resultados demonstraram que o método da ISO 5725-25725-2:1994 foi mais adequado para a análise dos dados. Os laboratórios que analisaram todos os resíduos e obtiveram apenas resultados satisfatórios no ensaio de proficiência foram selecionados para a caracterização de um candidato a material de referência contendo doze agrotóxicos adicionados a feijão orgânico. Após a avaliação da homogeneidade, da estabilidade ao transporte e a longo prazo, e da caracterização do material, os valores certificados e suas respectivas incertezas foram: 0,061 mg/kg  $\pm$  0,011 mg/kg para acetamiprido; 0,082 mg/kg  $\pm$  0,037 mg/kg para ciproconazol; 0,065 mg/kg  $\pm$  0,018 mg/kg para flutriafol; 0,072 mg/kg  $\pm$  0,013 mg/kg para imidacloprido; 0,048  $\pm$  0,022 para piraclostrobina; 0,049 mg/kg  $\pm$  0,023 mg/kg para piriproxifem; e 0,079 mg/kg  $\pm$  0,009 mg/kg para propiconazol.

Palavras-chave: garantia da qualidade analítica; avaliação externa da qualidade; rastreabilidade metrológica, controle de alimentos.

## ABSTRACT

A method for analysis of multiresidues of pesticides in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) was developed and validated. The extraction and purification were carried out by a modified QuEChERS method and the detection and quantification were reached by liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometer. The method was fit for the purpose of quantification of 112 pesticides. The occurrence of pesticide residues in commercial beans was studied with the validated method in 256 samples collected in all Brazilian states and the Federal District. A proficiency test with thirteen laboratories was also conducted for the analysis of eight pesticides in organic common beans. The proficiency test items were homogeneous and stable during the test period. The results of the participants were evaluated by three different proficiency methods: Algorithm A of ISO 13.528: 2015, median with normalized interquartile range and consistency factors k and h of ISO 5725-2:1994. The results demonstrated that the method of ISO 5725-2:1994 was more appropriate for the data analysis. The laboratories that analyzed all the pesticide residues and obtained all satisfactory results in the proficiency test were selected for the characterization of a candidate reference material containing twelve pesticides added to organic beans. After evaluation of the homogeneity, the stability to the transport and the long term stability, and the characterization of the candidate reference material, the certified values and their respective uncertainties were: 0.061 mg/kg  $\pm$  0.011 mg/kg for acetamiprid; 0.082 mg/kg  $\pm$  0.037 mg/kg for cyproconazole; 0.065 mg/kg  $\pm$  0.018 mg/kg for flutriafol; 0.072 mg/kg  $\pm$  0.013 mg/kg for imidacloprid; 0.048  $\pm$  0.022 mg/kg for pyraclostrobin; 0.049 mg/kg  $\pm$  0.023 mg/kg for pyriproxyfen; and 0.079 mg/kg  $\pm$  0.009 mg/kg for propiconazole.

Key words: Analytical quality assurance, external quality assessment, metrological traceability, food control.



## INTRODUÇÃO

O feijão comum é a mais importante fonte de proteína da dieta brasileira. Combinado com o arroz, o feijão é a refeição diária básica para a maioria dos brasileiros. Nas últimas décadas, o Brasil tornou-se o maior produtor de feijão comum no mundo e também o principal consumidor (BURLE *et al.*, 2010).

Existem vários agrotóxicos que estão sendo comercializados para o uso na cultura do feijoeiro. Muitos destes produtos têm venda livre nas formulações classificadas nas classes toxicológicas III e IV e obrigatoriedade de venda controlada (classes I e II). Os agrotóxicos registrados para o uso na cultura do feijoeiro são importantes na proteção das plantas quanto ao ataque de pragas, doenças e plantas daninhas, mas podem ser perigosos se forem usados de forma incorreta (EMBRAPA, 2011a). Uma possível consequência do seu uso pode ser a presença de resíduos de agrotóxicos nos produtos tratados (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

O Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (LACEN-MG), representado pelo Instituto Octávio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias (IOM/Funed) desempenha atividades significativas no âmbito do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A validação de métodos tem como principal objetivo a confirmação de que o método é adequado ao propósito de uso pretendido (THOMPSON *et al.*, 2002). Já os objetivos do controle de qualidade são monitorar a estabilidade dos parâmetros de desempenho de um método, previamente validado, durante seu uso em atividades de rotina e manter um controle estatístico do processo de medição (VAN DER VOET *et al.*, 1999). Como o processo de validação, na prática, não consegue incluir a totalidade de variáveis analíticas encontradas durante o uso do método, o controle de qualidade interno é requerido para fornecer evidências do desempenho do método durante sua aplicação (HILL & REYNOLDS, 1999).

A participação em ensaios de proficiência (EP) tem se tornado uma prática comum de controle de qualidade externo para os laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos (MEDINA-PASTOR *et al.*, 2010a). Outra ferramenta utilizada no controle da qualidade analítica é o uso regular de materiais de referência (MR) -

material ou substância homogênea que tem uma ou mais propriedades bem estabelecidas (ISO, 2000). O uso de MR e a participação em EP são requisitos fundamentais para os laboratórios que operam seus sistemas de gestão da qualidade em conformidade com a ABNT ISO/IEC 17025 (ISO, 2005).

Existe oferta de EP para resíduos de agrotóxicos em vegetais, entretanto, os custos para a participação são, normalmente, muito elevados, o que, em alguns casos, inviabiliza a participação do laboratório em um número maior de ensaios. Além disso, as dificuldades encontradas na importação das amostras acarretam, muitas vezes, a chegada de materiais fora do prazo e em condições inadequadas de temperatura e integridade (BASTOS *et al.*, 2007). Segundo levantamento feito via banco de dados EPTIS (*European Proficiency Testing Information System*), no Brasil e no mundo já foram realizados vários EP para o escopo resíduos de agrotóxicos em vegetais, mas nenhum para feijão (EPTIS, 2016).

Materiais de referência para agrotóxicos em alimentos são raros. No Brasil, não existe nenhum fornecedor de MR certificado (MRC) para agrotóxicos, o que dificulta o acesso e, conseqüentemente, aumenta o custo para o laboratório (CARDOSO, 2008). São disponíveis apenas MR provenientes de EP (BASTOS *et al.*, 2010).

Dada a importância do feijão para a alimentação e, portanto, para a saúde da população brasileira, associada aos riscos decorrentes da presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos, a confiabilidade dos estudos relativos ao monitoramento destes resíduos é extremamente dependente da implementação de ferramentas de controle e garantia da qualidade analítica.

Neste contexto, pretende-se tornar o Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais um provedor de EP e fornecedor de MR para o escopo resíduos de agrotóxicos em alimentos, favorecendo o controle da qualidade de laboratórios brasileiros e consolidando a atividade de pesquisa no laboratório público.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi otimizar e validar um método rápido e robusto e de baixo custo, adequado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão, realizar um ensaio de proficiência e caracterizar um material de referência para o referido escopo analítico.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar um método para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em feijão, empregando cromatografia líquida (CL) associada à espectrometria de massas sequencial (EM/EM).
- Validar o método otimizado, em processo intralaboratorial, de acordo com protocolos aceitos internacionalmente.
- Preparar um lote de material para a realização de ensaio de proficiência de multirresíduos de agrotóxicos em feijão, incluindo testes de homogeneidade e estabilidade.
- Coordenar um ensaio de proficiência envolvendo laboratórios que realizam análises de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos para a ANVISA.
- Preparar um lote de material com o escopo multirresíduos de agrotóxicos em feijão para a produção de material de referência certificado.
- Coordenar a caracterização do material pelos laboratórios selecionados no ensaio de proficiência.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1 AGROTÓXICOS

O registro de agrotóxicos, seus componentes e afins constitui-se no instrumento básico do processo de controle governamental sobre estes produtos, sendo obrigatório em vários países com o objetivo de minimizar os riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Os órgãos governamentais envolvidos no processo de registro têm a incumbência de estudar e avaliar as características agrônômicas, toxicológicas e ambientais de cada produto, como também de estabelecer as restrições e recomendações de uso que se fazem necessárias para uma maior segurança na utilização dos agrotóxicos (FAO, 1994).

No Brasil, a Lei de Agrotóxicos e Afins nº 7.802, de 11 de julho de 1989, estabelece que os agrotóxicos somente podem ser utilizados no país se forem registrados em órgão federal competente, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura (ANVISA, 2010).

Neste sentido, o Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que regulamentou a Lei, estabelece as competências para os três órgãos envolvidos no registro de agrotóxicos: Ministério da Saúde (MS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente (MMA), através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA). O MS, por meio da ANVISA, é o responsável, dentre outras competências, pela avaliação e classificação toxicológica de agrotóxicos, pelo estabelecimento do Limite Máximo de Resíduo (LMR) e do intervalo de segurança de cada ingrediente ativo de agrotóxico para cada cultura agrícola e, junto com o MAPA, no âmbito de suas respectivas áreas de competência, pelo monitoramento dos resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem vegetal. E ao MMA cabe avaliar e classificar o potencial de periculosidade ambiental (ANVISA, 2010).

A ANVISA, ciente de seu papel institucional e provida de condições técnicas e administrativas, iniciou em 2001 o PARA, visando avaliar a qualidade dos alimentos em relação aos resíduos de agrotóxicos. O Projeto foi transformado em Programa,

por meio da Resolução RDC 119 de 19 de maio de 2003 e veio ao encontro dos anseios dos profissionais voltados à melhoria da qualidade de vida da população, fornecendo a esta uma ferramenta para garantir a qualidade e segurança alimentar quanto aos resíduos de agrotóxicos (ANVISA, 2008).

Até 2007, o MAPA realizava apenas o controle de resíduos de agrotóxicos em produtos de origem animal (MAPA, 1999; MAPA, 2010b), mas, em 2008, por meio da instrução normativa número 42, o MAPA instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal que engloba o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em vegetais (MAPA, 2008). Em 2010, foram divulgados os primeiros resultados do Plano (MAPA, 2010a).

O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) realiza análises de resíduos de agrotóxicos em hortícolas e em água. O Projeto Alimento Seguro (PAS) idealizado e desenvolvido pelo IMA, tem como objetivo sensibilizar e mudar o comportamento de produtores rurais em relação ao uso de agrotóxicos. Lançado em 2009, foi implantado nas propriedades produtoras de tomate e morango, mas o interesse de outros produtores fez com que fosse estendido para as culturas de batata baroa, batata inglesa, couve-flor, alface e cenoura. O PAS envolve um conjunto de diferentes ações: atividades educativas, fiscalização do comércio de agrotóxicos, monitoramento de culturas, análises laboratoriais e, por fim, a concessão de um selo de rastreabilidade. Criado em parceria com a iniciativa privada, o selo contém um código que fica visível nas embalagens dos alimentos. Por meio desse código, o consumidor tem acesso ao histórico do produto que comprou. São fotos da propriedade, plantação, dados sobre os agrotóxicos usados, número da receita agrônoma e os resultados das análises laboratoriais (IMA, 2011).

Segundo a ANVISA (BRASIL, 1989), a classificação dos agrotóxicos é realizada com base no grau de toxicidade do produto sendo estabelecidas quatro classes: classe I - Extremamente Tóxico (rótulo vermelho); classe II - Altamente Tóxico (rótulo amarelo); classe III - Medianamente Tóxico (rótulo azul) e classe IV - Pouco Tóxico (rótulo verde).

A classificação toxicológica dos agrotóxicos está apresentada na Tabela 1, tendo como parâmetros a Dose Letal ( $DL_{50}$ ) e a Concentração Letal ( $CL_{50}$ ), que representam as doses estatisticamente derivadas da administração única de uma

substância química a qual se espera causar a morte de 50% dos animais de uma população de organismos expostos, de acordo com a via de administração, em condições experimentais definidas.

**Tabela 1** - Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseada na Dose Letal<sub>50</sub> e na Concentração Letal<sub>50</sub> de formulações líquidas e sólidas.

Classe	Toxicidade	DL <sub>50</sub> oral		DL <sub>50</sub> dérmica		CL <sub>50</sub> inalatória (mg/L)
		(mg/kg)		(mg/kg)		
		Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	
I	Extremamente	20	5	40	10	0,2
II	Altamente	20-200	5-50	40-400	10-100	0,2-2,0
III	Medianamente	200-2000	50-500	400-4000	100-1000	2,0-20,0
IV	Pouco Tóxico	> 2000	> 500	> 4000	> 1000	> 20,0

DL: dose letal; CL: concentração letal; Fonte: Brasil, 1989.

Estão registrados, no Brasil, 1482 produtos comerciais (424 i.a. - ingredientes ativos), sendo 476 herbicidas (100 i.a.), 398 inseticidas (98 i.a.), 383 fungicidas (106 i.a.), 160 acaricidas (52 i.a.), 26 nematicidas (10 i.a.), 15 bactericidas (6 i.a.), 18 inseticidas biológicos (7 i.a.) e 6 cupinicidas (3 i.a.). Destes, cerca de 673 estão no mercado; 56% são moderadamente ou pouco tóxicos. Em 2009, foram comercializadas 725 mil toneladas de produtos formulados. As principais classes são os herbicidas com 59% (429.693 toneladas), seguido por inseticidas e acaricidas com 21% (150.189 toneladas), fungicidas com 12% (89.889 toneladas) e outros com 8% (55.806 toneladas). Considerando os ingredientes ativos, foram comercializadas 335.816 toneladas, das quais 61% (202.554 toneladas) foram herbicidas, 18% (61.254 toneladas) inseticidas e acaricidas, 11% (37.934 toneladas) fungicidas e 10% (34.074 toneladas) outras classes. A soja é a principal cultura (48%), seguida por milho (11%), cana (8%), algodão (7%), HFF (4,3%), café (4%) e citros (3%). O Mato Grosso é o estado líder em vendas (20%), seguido por São Paulo (15%), Paraná (14%), Rio Grande do Sul (11%), Goiás (10%) e Minas Gerais (9%). O mercado de defensivos agrícolas no Brasil, em 2009, foi de US\$ 6,6 bilhões (R\$ 12,9 bilhões), 7% a menos que 2008. Deste valor, o mercado de herbicidas representou

38% (US\$ 2,5 bilhões), seguido por inseticidas e acaricidas, com 31% (US\$ 2,1 bilhões), fungicidas com 27% (US\$ 1,8 bilhões) e outros, com 4% (US\$ 0,3 bilhões). A previsão para 2010 é que o mercado cresça 10% em relação ao ano anterior. (SINDAG, 2010).

## 2 FEIJÃO

O feijão comum é a mais importante fonte de proteína da dieta brasileira. Combinado com o arroz, o feijão é a refeição diária básica para a maioria dos brasileiros. Nas últimas décadas, o Brasil tornou-se o maior produtor de feijão comum no mundo e também o principal consumidor (BURLE *et al.*, 2010). 100g de feijão carioca cru têm a seguinte composição centesimal: 14% de umidade, 329 kcal de energia, 20g de proteína, 1,3g de lipídeos, 61,2g de carboidratos, 18,4g de fibra alimentar e 3,5g de cinzas (TACO, 2011).

O feijão é um alimento básico para o brasileiro. A média atual de consumo de feijão *per capita* é de 12,7 kg por ano. A preferência do consumidor é regionalizada e diferenciada principalmente quanto à cor e ao tipo de grão. O feijoeiro comum é cultivado ao longo do ano na maioria dos estados brasileiros, proporcionando constante oferta do produto no mercado. É cultivado tanto em culturas de subsistência quanto em cultivos altamente tecnificados. A Região Sul ocupa lugar de destaque no cenário nacional, seguida pelas Regiões Sudeste, Nordeste, Centro-Oeste e Norte, respectivamente (EMBRAPA, 2005-2007). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra 2009/2010, estima-se que a produção foi de 3.322,5 mil toneladas de feijão e a previsão para a safra 2010/2011 é de 3.796,9 mil toneladas. O feijão sempre fez parte da dieta dos brasileiros. No entanto, nos últimos anos, observa-se uma redução constante no consumo per capita do produto. Enquanto em 1975 o consumo per capita de feijão girava em torno de 18,5 quilos por habitante/ano, em 2002, esse número caiu para aproximadamente 16 quilos por habitante/ano, ou - 12%. Algumas das possíveis causas da redução do consumo estão relacionadas com a substituição por fontes de proteína de origem animal, o êxodo rural, bem como a mudança de hábitos alimentares com o advento do *fast food*, além das fortes flutuações de oferta e de preços e a falta de praticidade no preparo do produto. A cadeia produtiva do feijão

está sendo desafiada a encontrar novas oportunidades de mercado. Internamente, por exemplo, poderia ser reforçada a importância do valor alimentar do produto, por meio de campanhas de conscientização dos consumidores. Outra opção apontada é a busca do mercado internacional: é uma opção, no entanto, não há informações suficientes e confiáveis, até o momento, sobre as reais possibilidades de o Brasil se destacar no mercado mundial de feijão (EMBRAPA, 2011b).

Pesquisadores da Embrapa Arroz e Feijão realizaram um levantamento junto à Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) sobre produção, comércio e consumo de feijão no Brasil e no mundo. Comparou-se o consumo per capita e a produção de feijão nos últimos 30 anos (1975-2004) nos principais países produtores e consumidores. A produção brasileira de feijão em grão aumentou de 2,28 milhões de toneladas em 1975 para 3,05 milhões de toneladas em 2004 (33,8%). Isso foi possível graças ao aumento da produtividade média que saltou de 550,5 kg/ha para 757,2 kg/ha (37,5%). Esse aumento permitiu atender à demanda interna, em função do crescimento populacional, e ainda liberou aproximadamente 112 mil hectares para outras culturas. Ou seja, produz-se mais em área menor. Internacionalmente, houve aumento moderado da área colhida (11,5%), um aumento maior do rendimento (26,7%) e, conseqüentemente, um aumento ainda maior da produção (41,3%) no mesmo período. Enquanto o consumo per capita dos brasileiros caiu 12% entre 1975 e 2002 (de 18,5 para 16,3 kg/hab/ano), o consumo per capita mundial caiu 18% no mesmo período, passando de 2,8 kg/hab/ano em 1975 para 2,3 kg/ano em 2002. Apesar do constante aumento da produção, em torno de 30%, e da redução do consumo per capita de feijão, o Brasil ainda possui ampla demanda insatisfeita, que é abastecida com importações, especialmente de grão tipo preto. Em valores, essas importações líquidas têm ultrapassado a margem dos US\$ 20 milhões anuais. Os dez países com maior consumo per capita de feijão são Burundi, Nicarágua, Ruanda, Uganda, Quênia, Brasil, El Salvador, Cuba, Coreia do Norte e o México. Para buscar mercados externos, o Brasil precisa, além de abastecer o mercado interno, desenvolver produtos (melhoramento genético) que atendam às preferências dos consumidores dos países importadores como Índia, Japão, Cuba e Itália. O país precisa definir estratégias para alcançar a auto-suficiência e conduzir estudos para identificar as preferências dos consumidores de



países importadores, além de descobrir formas eficientes de conquista desses mercados (EMBRAPA, 2011b).

### **3 MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS**

A análise de resíduos de agrotóxicos é realizada usando diferentes métodos para extração e purificação seguidos geralmente por cromatografia. A extração de resíduos de agrotóxicos em amostras produz misturas complexas que, muitas vezes, requerem etapas de purificação e preparação de amostra para isolar os agrotóxicos alvos de análise. Além disso, uma estratégia analítica multirresidual é necessária para facilitar a determinação quantitativa de resíduos de agrotóxicos, devido às diferenças entre suas propriedades físicas e químicas e técnicas de detecção incompatíveis (WU *et al.*, 2011).

Alguns laboratórios de determinação de resíduos de agrotóxicos ainda utilizam procedimentos desenvolvidos há 30 anos, quando a análise e os requisitos legais eram menos rigorosos e a tecnologia não era tão avançada como é hoje. Os métodos tradicionais de determinação de agrotóxicos em alimentos são geralmente procedimentos de múltiplas etapas, requerendo grande quantidade de amostra e um ou mais procedimentos de purificação do extrato. Além disso, eles produzem quantidades consideráveis de resíduos e, frequentemente, um limite suficientemente baixo de detecção é inalcançável (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

#### **3.1 O método analítico QuEChERS**

Em 2003, foi desenvolvido um método analítico original QuEChERS, combinando a extração de agrotóxicos de alimentos e purificação do extrato. Essa técnica envolve extração em micro escala utilizando acetonitrila e purificação do extrato por extração em fase sólida dispersiva. Desde que foi desenvolvido e publicado, o método tem ganhado popularidade significativa. É o método de escolha para a análise de alimentos porque combina várias etapas e aumenta a faixa de agrotóxicos recuperados mais do que os métodos antigos que utilizam técnicas de

extração mais demoradas. O método tem sofrido várias modificações e melhorias ao longo dos anos desde sua primeira introdução. Ele tem sido desenhado para aprimorar a recuperação para tipos específicos de agrotóxicos ou de alimentos (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011; HEPERLE *et al.*, 2015).

O procedimento baseia-se na extração por centrifugação de uma matriz alimentar com acetonitrila. A água é separada da acetonitrila por meio da adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. O extrato é então limpo utilizando d-SPE com PSA que remove eficientemente muitas substâncias polares interferentes presentes na matriz. O extrato preparado desta maneira então está pronto para a determinação final. As pesquisas foram continuadas e o processo foi validado para mais de 200 agrotóxicos em várias matrizes de composições diferentes. CG-EM e CL -EM/EM foram utilizados para as determinações finais. Os resultados foram muito bons para a maioria dos resíduos de agrotóxicos analisados em frutas e produtos hortícolas, as exceções foram agrotóxicos que apresentaram problemas de estabilidade por dependerem do pH. Em matrizes não ácidas, tais como a alface, os agrotóxicos sensíveis ao pH básico, como captana, folpete, diclofluanida e clorotalonil, foram degradados. Esse problema foi superado durante o processo de extração com a adição de uma solução de 0,1% ácido acético ou fórmico (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

O método tem sido bem-sucedido para a extração de agrotóxicos em uma variedade de frutas e vegetais, como pêssigo, pimenta, ervilha e couve, morango, uva, cebola, limão, tomate, espinafre, cevada, arroz, ovos, leite, abacate, azeite, entre outros (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

O método QuEChERS é muito flexível e serve como uma base para receber modificações dependendo das propriedades dos analitos, composição da matriz, equipamento e técnica analítica disponível no laboratório. O método QuEChERS é também muito robusto e altas recuperações podem ser conseguidas para muitos agrotóxicos em muitas matrizes mesmo para diferentes proporções, tipos, tamanho de amostras, solvente, sais e sorventes utilizados nas modificações (LEHOTAY *et al.*, 2010).

O método QuEChERS possui muitas vantagens sobre os métodos tradicionais de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos,

dentre elas pode-se citar: altos percentuais de recuperação (> 85%) são obtidos para um grande número de compostos de diferentes polaridade e volatilidade, incluindo pesticidas reconhecidos por sua dificuldade de análise como, por exemplo, metamidofós, ometoato, imazalil, tiabendazol, diclorvós, piretróides, entre outros; permite o preparo de 10 a 20 amostras entre 30 e 40 minutos; utilização de um pequeno volume de solventes, além de não utilizar solventes clorados, a adição de acetonitrila, quando realizada com dispensadores, faz com que o analista tenha uma exposição mínima a este solvente; um único analista pode realizar o preparo da amostra; não requer a utilização de muitos materiais e equipamentos, bem como espaço físico durante a execução do método (PRESTES *et al.*, 2009).

Considerando-se a alta sensibilidade das técnicas cromatográficas disponíveis atualmente, principalmente com CG-EM/EM e CL-EM/EM, o método QuEChERS é adequado e constitui o estado da arte para a determinação multirresíduo de pesticidas em diferentes alimentos (PRESTES *et al.*, 2009).

### **3.2 Cromatografia líquida e espectrometria de massas sequencial**

Nos últimos anos, o número de compostos compatíveis apenas com cromatografia líquida em relação aos compatíveis com a amplamente utilizada cromatografia gasosa aumentou. Por isso, a cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas e a cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas acoplado a espectrometria de massas sequencial têm sido empregadas de modo crescente. Contudo, a necessidade de determinar grande número de compostos não compatíveis com a cromatografia gasosa fez com que a alta sensibilidade, seletividade e capacidade de quantificação das novas técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas levasse a um grande desenvolvimento dos métodos de multirresíduos de agrotóxicos (KMELLAR *et al.*, 2011).

A técnica de separação mais utilizada para agrotóxicos é a cromatografia líquida com fase reversa C18 apolar e, em menor extensão, C8 ligadas em fase estacionária de sílica. A fase móvel é selecionada considerando-se a separação cromatográfica ideal, a ionização eficaz e o desempenho global da espectrometria

de massas. Ao longo das últimas duas décadas, diferentes interfaces foram desenvolvidas utilizando diferentes métodos para conseguir a ionização dos compostos-alvos antes da análise por espectrometria de massas. Os métodos de ionização a pressão atmosférica ionização por electrospray (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI) são os mais utilizados para a determinação de agrotóxicos em amostras de alimentos e água (BOTITSI *et al.* 2010).

Os métodos que utilizam triplo quadrupolo são os mais usados para a análise de agrotóxicos em amostras de alimentos e água devido à alta sensibilidade, seletividade e especificidade, ampla faixa linear (três ordens de grandeza) e precisão (a repetitividade das áreas dos picos é geralmente inferior a 10%) obtidas com esses analisadores. A utilização do modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) oferece excelente seletividade para a análise de traços e reduz a probabilidade de interferências espectrais, permitindo a identificação geralmente pelo monitoramento composto por duas transições alvo (BOTITSI *et al.* 2010).

#### **4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS**

A validação de métodos é um importante requerimento na prática de análises químicas. Muitas recomendações relacionadas à validação de métodos já existem na literatura, especialmente relacionadas a métodos particulares, mas freqüentemente são subutilizadas (EURACHEM, 1998).

A validação de um método é a confirmação, por exame e evidência objetiva, de que os requisitos para um determinado uso são atendidos (ISO, 2005).

É essencial que os estudos de validação sejam representativos. Isto significa que os métodos devem cobrir as faixas de concentração e diferentes tipos de amostras dentro do escopo do método (THOMPSON, 2002). Está implícito no processo de validação, que os estudos para determinação dos parâmetros de desempenho são realizados utilizando equipamentos dentro das especificações e adequadamente calibrados. Da mesma forma, o analista envolvido nos estudos deve ser competente na área em questão e ter conhecimento suficiente para ser capaz de tomar decisões apropriadas a partir de suas observações (EURACHEM, 1998).

Parâmetros de desempenho típicos na validação intralaboratorial de métodos são: aplicabilidade, seletividade, linearidade da curva de calibração, veracidade, precisão, limites de detecção e quantificação, limite de decisão, capacidade de detecção e sensibilidade (AOAC, 1998).

A aplicabilidade inclui especificações sobre a faixa de concentração coberta pela validação, os tipos de matriz, os equipamentos, reagentes e procedimentos analíticos, protocolos de calibração e precauções com a segurança (THOMPSON, 2002).

A seletividade é a capacidade do método em determinar exata e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes na matriz sob condições de teste determinadas (EURACHEM, 1998).

Linearidade é a habilidade de extrair resultados que sejam diretamente, ou por meio de transformações matemáticas bem definidas, proporcionais à concentração de analitos em amostras dentro de uma dada faixa (HUBER, 1998). Para qualquer método quantitativo, é necessário determinar a faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado, e dentro desta faixa de trabalho deve existir uma resposta linear. A relação entre a resposta do instrumento e a concentração não necessita ser perfeitamente linear para que um método seja eficaz, mas deve haver repetibilidade da curva em dias diferentes (EURACHEM, 1998).

A veracidade é a extensão na qual os resultados gerados por um método e os valores verdadeiros concordam (HUBER, 1998).

A precisão indica o grau de dispersão de diversos valores individuais em torno do valor mais provável. As duas medidas de precisão mais comuns são a repetibilidade e reprodutibilidade. Elas representam os dois extremos de medidas de precisão que podem ser obtidos. A repetibilidade representa a variabilidade encontrada quando resultados independentes são obtidos utilizando o mesmo método, em um mesmo laboratório, o mesmo analista, usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade representa a variabilidade encontrada quando resultados são obtidos utilizando o mesmo método, em laboratórios diferentes, com diferentes analistas e usando equipamentos diferentes. Tanto a repetibilidade quanto a reprodutibilidade são geralmente

dependentes da concentração do analito (EURACHEM, 1998). Existe ainda o termo precisão intermediária para definir a avaliação da precisão sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, quando se definem exatamente quais as condições a variar, como: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes dias (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Limite de detecção é a menor concentração detectada em amostras adicionadas, mas não necessariamente quantificada, distinguida de zero, cuja relação sinal / ruído  $\geq 3$  (SOUZA *et al.*, 2005).

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e veracidade apropriadas para o analito e matriz considerados (AOAC, 1998)

A sensibilidade é o parâmetro que descreve quanto a resposta muda com mudanças na concentração do analito (BRUCE *et al.*, 1998).

## **5 COMPARAÇÕES INTERLABORATORIAIS**

Programas interlaboratoriais (PI) são utilizados para vários propósitos e seu uso vem crescendo internacionalmente. Propósitos típicos para programas interlaboratoriais incluem:

- i) avaliação do desempenho de laboratórios para ensaios ou medições específicas e monitoramento do desempenho contínuo de laboratórios com os EP;
- ii) certificação de material com a validação da incerteza declarada;
- iii) avaliação das características de desempenho de um método (ISO, 2010).

## 5.1 Ensaio de proficiência

Ensaio de proficiência envolve o uso de comparações interlaboratoriais para a determinação do desempenho do laboratório (ISO, 2010). Com o advento de um reconhecimento mútuo na Europa e no mundo, atualmente é essencial que os laboratórios participem de testes de proficiência que forneçam interpretação e avaliação de resultados que sejam transparentes para o laboratório e seu cliente.

### 5.1.1 Importância

Através da participação em ensaio de proficiência, o laboratório verifica seu desempenho em relação aos outros laboratórios. Conhecendo o seu desempenho, o laboratório pode avaliar a sistemática de ensaio adotada e, assim, identificar possíveis problemas, a partir dos quais, deverá definir ações corretivas, preventivas e de melhoria. Além disso, pode verificar e validar o método utilizado, a incerteza estimada e a eficiência dos controles internos (ALBANO *et al.*, 2011).

### 5.1.2 Documentos orientativos

A ISO 17043 (ISO, 2010) foi elaborada para fornecer uma base consistente a todas as partes interessadas para determinar a competência de organizações provedoras de ensaios de proficiência.

### 5.1.3 Avaliação da homogeneidade e da estabilidade

O lote do material preparado para o ensaio de proficiência deve ser homogêneo e estável, em relação a cada analito, para assegurar que todos os laboratórios recebam material que não apresente diferença significativa da concentração média. O provedor do programa deve indicar claramente o procedimento utilizado para estabelecer a homogeneidade do material de ensaio (THOMPSON *et al.*, 2006).

O protocolo harmonizado sobre ensaios de proficiência em laboratórios de ensaios químicos detalha aspectos importantes sobre o preparo do material, como

delineamento experimental e estatísticas aplicadas aos testes para avaliação da homogeneidade e estabilidade (THOMPSON & LOWTHIAN, 1996; FEARN & THOMPSON, 2001; THOMPSON *et al.*, 2006).

Outro requisito fundamental é a estabilidade dos materiais durante o esquema. Considerando que os alimentos são misturas complexas, as propriedades dos analitos e dos componentes da matriz devem ser consideradas. A estabilização do material de teste para análise de alimentos deve ser adaptada para cada caso e deve ser estudada detalhadamente antes do processamento para respeitar ao máximo a integridade do material. Geralmente, os materiais são secos para evitar mudanças químicas e microbiológicas. Isso pode ser feito com aquecimento ou por liofilização, dependendo da volatilidade dos analitos e dos componentes da matriz. Alguns materiais podem ser esterilizados por irradiação, mas irradiação  $\gamma$  destrói substâncias orgânicas como os pesticidas. A estabilização do material de teste pelo congelamento simples é fácil, mas não é muito prático devido às dificuldades com o transporte (MAIER *et al.*, 1993). Se a estabilidade gera problemas, deve-se levar em conta a vida total do material de referência, desde a preparação, passando pelo transporte, estocagem e análise pelos participantes. As instruções sobre o intervalo de tempo para a análise também devem ser informadas (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005b).

#### 5.1.4 Determinação do valor designado

O valor designado é uma estimativa do valor do mensurando que é utilizado com o propósito de calcular as pontuações. Ele deve ser determinado por um dos seguintes métodos:

- determinado por um laboratório de referência;
- os valores certificados para um material de referência certificado utilizado como um material de ensaio;
- comparação direta do material do teste de proficiência com materiais de referência certificados;
- consenso de laboratórios especializados;



- formulação (isto é, atribuição de valor com base em proporções utilizadas em uma solução ou outra mistura de ingredientes com teor de substância conhecida);

- um valor consensual (isto é, um valor derivado diretamente dos resultados reportados) (THOMPSON *et al.*, 2006).

#### 5.1.5 Avaliação de desempenho

Os laboratórios são avaliados com a diferença entre seu resultado e o valor designado. Uma pontuação de desempenho é calculada para cada laboratório.

Para cada analito em uma rodada, um critério de desempenho deve ser estabelecido, com o qual o desempenho obtido por um laboratório pode ser julgado. O critério de desempenho é fixado de modo a garantir que os dados analíticos da rotina do laboratório são de uma qualidade adequada para a sua finalidade (THOMPSON *et al.*, 2006).

### 5.2 Caracterização de material de referência

Segundo definição da ISO GUIA 30 (ISO, 2000a), MR é “um material ou substância homogênea que tem uma ou mais propriedades bem estabelecidas para ser usado na calibração de um equipamento, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais”.

Um material de referência certificado (MRC) é acompanhado de documentação emitida por um órgão competente, fornecendo um ou mais valores de propriedades especificados com as incertezas associadas e rastreabilidade comprovada, utilizando procedimentos válidos (VIM, 2008).

De acordo com as definições relacionadas acima, os MRC constituem um subgrupo dos MR.

De acordo com o ABNT ISO GUIA 33 (ISO, 2002), os seguintes critérios se aplicam, de maneira geral, à adequação para uso dos materiais de referência:

- a) O material e os valores de propriedade que estão incorporados a ele devem ser estáveis por um período de tempo aceitável, sob condições reais de armazenamento, transporte e utilização.
- b) O MR deve ser suficientemente homogêneo, para que os valores de propriedade medidos em uma porção do lote se apliquem a qualquer outra porção do lote dentro de limites aceitáveis de incerteza.
- c) Os valores de propriedade do MR devem ter sido estabelecidos com uma incerteza suficiente para a utilização final do MR.
- d) Com relação ao MRC, deve estar disponível documentação clara e os valores de propriedade estabelecidos.

### 5.2.1 Importância

É reconhecido internacionalmente que um laboratório deve tomar medidas apropriadas para assegurar que é capaz de fornecer dados com a qualidade requerida. Tais medidas incluem o uso de métodos de análise validados, procedimentos de controle de qualidade internos, participação em ensaios de proficiência e acreditação a padrão internacional (THOMPSON & LOWTHIAN, 1993). Todas as medidas devem ser tomadas para alcançar a melhor reprodutibilidade e para assegurar a exatidão das determinações. O próprio laboratório pode melhorar a precisão, mas a veracidade só pode ser atingida utilizando um MRC (GRIMALT *et al.*, 2015).

### 5.2.2 Documentos orientativos

O ISO GUIA 30 (2000) recomenda os termos e os significados que devem ser associados a eles quando relacionados a MR, com atenção particular aos termos que são usados nos certificados de MR e nos relatórios de certificação correspondentes. O ISO GUIA 31 (2004) auxilia os produtores na elaboração de certificados claros e concisos para acompanhar um MRC. O ISO GUIA 32 (2000) foi

elaborado para esclarecer a implementação dos princípios da rastreabilidade metrológica em química, identificando algumas recomendações gerais no caso de erros graves na calibração dos parâmetros associados à análise química e aos ensaios de materiais. O ABNT ISO GUIA 33 (ISO, 2002) discute a utilização de MRC e suas aplicações corretas. O ISO GUIA 34 (2004) traz os requerimentos gerais para a competência de produtores de materiais de referência. O ISO GUIA 35 (2006) aborda tópicos como incerteza de medição, homogeneidade de materiais, princípios de certificação, bem como, técnicas estatísticas aplicadas para esses fins.

## **CAPÍTULO I - RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO (PHASEOLUS VULGARIS, L.): VALIDAÇÃO DE MÉTODO E OCORRÊNCIA NO BRASIL.**

### **RESUMO**

Um método QuEChERS foi modificado e validado para análise de resíduos de agrotóxicos em feijão por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequencial. Foram estudados 112 agrotóxicos e para todos demonstrou-se que o método foi adequado ao uso pretendido. O estudo da linearidade foi realizado garantindo o atendimento às premissas da regressão linear simples. Para seis agrotóxicos foram observados desvios da linearidade: Benalaxil, Eton, Metolacoloro, Paration, Piridabem e Quinalfós. O estudo das médias de recuperação e da precisão do método em condições de repetibilidade e de precisão intermediária foi realizado. Flazassulfurom apresentou resultados insatisfatórios quanto a médias de recuperação e desvios padrões relativos. Limite de detecção, seletividade e especificidade foram testados por recuperações e análise de amostras brancas. A ocorrência dos resíduos de agrotóxicos validados foi estudada em 256 amostras coletadas em todos os estados brasileiros e no Distrito Federal. Das 256 amostras analisadas, 24 (9,4%) apresentaram resultado insatisfatório. Foram encontrados 25 resíduos não autorizados (22 amostras) e 2 resíduos acima do LMR (2 amostras) de acordo com a legislação brasileira.

Palavras-chave: Validação de método, resíduos de agrotóxicos, feijão, QuEChERS, CL-EM/EM, ocorrência no Brasil

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão é uma fonte importante de proteínas, algumas vitaminas, minerais, compostos fenólicos e carboidratos complexos (MOJICA & MEJÍA, 2015). 100g de feijão carioca cru apresentam a seguinte composição centesimal: 14% de umidade, 20g de proteína, 1,3g de lipídeos, 61,2g de carboidratos e 18,4g de fibra alimentar (TACO, 2011).

Vários agrotóxicos são comercializados para o uso na cultura do feijoeiro e são importantes na proteção das plantas, mas podem ser perigosos se forem usados de forma incorreta (EMBRAPA, 2011a). Uma consequência do seu uso é a presença de resíduos de agrotóxicos nos produtos tratados (EUROPEAN COMMISSION, 2011). Assim, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em feijão é importante para a proteção da saúde pública.

Apesar dos avanços tecnológicos da instrumentação, a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes complexas de alimentos ainda representa um desafio para os analistas (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2014; LOZANO *et al.*, 2016). Em 2003, foi desenvolvido o método analítico QuEChERS, combinando a extração de agrotóxicos de alimentos e a purificação do extrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Essa técnica envolve extração em microescala utilizando acetonitrila e purificação por fase sólida dispersiva. Desde que foi desenvolvido e publicado, tem sido amplamente utilizado porque amplia a faixa de agrotóxicos recuperados mais do que outros métodos que utilizam técnicas de extração mais demoradas. Várias modificações e melhorias foram realizadas ao longo dos anos desde sua primeira introdução e tem sido moldado para aprimorar a recuperação para tipos específicos de agrotóxicos e de alimentos (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015; LOZANO *et al.*, 2016; LOZANO *et al.*, 2012; RAJSKI *et al.*, 2013; WILKOWSKA & BIZIUK, 2011). Apesar disso, o método QuEChERS tem sido pouco utilizado para a extração de agrotóxicos em leguminosas (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2012).

Após as etapas de extração e purificação das amostras, a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequencial tem sido a técnica mais utilizada para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (ALDER *et al.*, 2006; BOTERO-COY *et al.*, 2012; NÚÑEZ *et al.*, 2012; RIZZETTI *et al.*, 2016).

A validação de métodos tem como principal objetivo a confirmação de que o método é adequado ao propósito de uso pretendido (THOMPSON *et al.*, 2002). Uma validação incompleta ou equivocada é uma importante fonte de erro em análise de alimentos. Um procedimento de validação baseado em estatísticas consistentes, incluindo a verificação de premissas relacionadas a cada teste estatístico é recomendável (SOUZA *et al.*, 2007).

Dada a importância do feijão para a alimentação e, portanto, para a saúde da população brasileira, associada aos riscos decorrentes da presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos, a confiabilidade dos estudos relativos ao monitoramento destes resíduos é extremamente dependente da implementação de ferramentas de controle e garantia da qualidade analítica.

O objetivo deste estudo foi validar um método QuEChERS para análise de resíduos de agrotóxicos em feijão e utilizá-lo para monitorar amostras de feijão do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Reagentes e amostras**

Os padrões de agrotóxicos foram adquiridos do Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). As concentrações das soluções estoque preparadas foram corrigidas pela pureza dos padrões de referência. Reagentes utilizados: acetona para análise (pa) foi adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha), acetona para análise de resíduo (par) foi adquirida de J.T.Baker (Phillipsburg, EUA), acetonitrila para cromatografia líquida de alta eficiência foi adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha), metanol para cromatografia líquida de alta eficiência foi adquirido de J.T. Baker (Center Valley, EUA), ácido fórmico e formiato de amônio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de magnésio anidro foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA), água ultrapura foi gerada pelo Milli-Q Gradient da Millipore (Billerica, EUA), sulfato de magnésio anidro foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha), cloreto de sódio pa foi adquirido de J.T.Baker (Phillipsburg,

EUA) e amina primária secundária (PSA) com partículas de 40 µm foi adquirida da Agilent Technologies (Santa Clara, EUA). Equipamentos utilizados: Cromatógrafo líquido modelo 1200 acoplado a espectrômetro de massas sequencial (triploquadropolo) modelo 6460 da Agilent Technologies (Santa Clara, EUA) com software Masshunter versão B.07.01, moinho e banho termostatizados da Marconi (Piracicaba, Brasil) modelos MA 090/CFT e MA-184, respectivamente, centrífuga refrigerada da Thermo Scientific (Waltham, EUA) e pipetadores automáticos Thermo Scientific (Waltham, EUA) e HBL Lab Soluções (Warszawa, Polônia), Centrífuga refrigerada Jouan Cr3i Thermo Scientific (Waltham, EUA), balança Sartorius TE 612 (Gottingen, Alemanha), balança Scientech AS 210 (Boulder, EUA), balança Sartorius BP 211 D (Gottingen, Alemanha), freezer Thermo Scientific (Waltham, EUA), capelas químicas de exaustão Poliscience e Engelab. Feijão orgânico foi adquirido em loja de produtos orgânicos de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras de feijão (3 kg) de diferentes variedades disponíveis no mercado brasileiro foram coletadas pelos fiscais das vigilâncias sanitárias de cada estado brasileiro e do Distrito Federal, uma por semana, por 10 semanas, de outubro a dezembro de 2014, e enviadas ao laboratório que é acreditado na NBR ISO/IEC 17025 para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças pelo INMETRO (CRL 0322) desde 2011.

## **2.2 Condições da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequencial**

Foi utilizada coluna Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HT (4,6 mm x 150 mm) com partículas de 1.8 micrômetros e pressão máxima de 600 Bar. A fase móvel utilizada foi constituída pela fase A: água, 0,01% de ácido fórmico e 5 mmol/L de formiato de amônio e pela fase B: metanol, 0,01% de ácido fórmico e 5 mmol/L de formiato de amônio. Corrida iniciada com 50% da fase A e 50% da fase B de 0 a 5 minutos e aumentando até 100% de fase B de 5 a 20 minutos, sendo mantido assim de 20 a 25 minutos. Retornando à condição inicial em 5 minutos. Fluxo de fase móvel constante de 0,6 mL/min). Temperatura do injetor: 15°C. O volume de injeção foi de 10 µL. Os parâmetros da fonte foram: temperatura do gás de 300°C, fluxo de

gás de 9 mL/min, nebulizador a 45 psi, temperatura e fluxo da cortina de gás de 250°C e 11 L/min, capilar de entrada a 4500 V e voltagem da agulha de 500 V. Foi utilizada ionização *electrospray* positiva. O método de aquisição de dados utilizado foi MRM (*multiple reaction monitoring*) e foram monitoradas duas transições para cada agrotóxico, uma para quantificação e uma para confirmação, considerando-se também a proporção entre elas para a identificação. A tolerância de proporção permitida foi de  $\pm 30\%$  da média das proporções apresentadas pelas transições dos padrões de cada agrotóxico injetados na mesma corrida (GRANDE-MARTÍNEZ *et al.*, 2015; MOL *et al.*, 2015; SANTE, 2015). Os agrotóxicos, as transições e os parâmetros de aquisição dos dados são apresentadas na Tabela I.1.

**Tabela I.1** - Agrotóxicos, transições e parâmetros de aquisição dos dados.

Agrotóxico	Íon precursor	Íons produto	Fragmentador	Energia de colisão	Tempo de retenção
Acefato	184	143/95	90	5/20	2,75
Acetamiprido	223	126/56	80	15/15	4,56
Aldicarbe	208	116/89	80	10/24	6,60
Aldicarbe sulfona	223	148/76	80	5/5	2,87
Aletrina	303	151/135	100	5/5	20,02
Ametrina	228	186/96	120	20/25	12,92
Aminocarbe	209	152/137	120	10/20	5,94
Atrazina	216	174/132	120	15/20	10,73
Azinfós-etílico	346	137/97	80	20/32	14,79
Azinfós-metílico	318	132/125	80	8/12	11,94
Benalaxil	326	294/148	120	5/10	16,99
Bitertanol	338	99/70	70	10/15	17,12
Boscalida	343	307/271	160	12/28	13,38
Bromacila	261	205/188	80	10/20	8,27
Bromuconazol	376	159/70	150	24/16	14,87
Buprofezina	306	201/116	120	10/15	19,76
Cadusafós	271	159/131	100	5/20	18,16



Carbaril	202	145/117	80	5/10	8,93
Carbendazim	192	160/132	90	20/25	5,46
Carboxina	236	143/87	120	15/20	8,99
Clorfenvinfós	359	155/127	120	10/15	17,05
Clorfluazuron	540	383/158	120	15/15	20,36
Clorpirifós-etílico	350	198/97	100	20/20	19,97
Clofentezina	303	138/102	80	15/20	17,29
Clomazone	240	125/89	120	20/30	12,70
Clotianidina	250	169/132	90	5/15	3,94
Cianazine	241	214/96	120	15/24	7,07
Ciazofamida	325	261/108	80	5/15	14,76
Cimoxanil	199	128/111	80	5/15	5,13
Ciproconazol	292	125/70	120	15/15	14,20
Ciprodinil	226	108/93	120	30/40	16,58
Diazinona	305	169/153	160	20/20	16,88
Diclorvós	221	145/109	120	15/15	8,05
Dicrotofós	238	127/112	90	15/5	3,57
Diflubenzurom	311	158/141	80	10/15	15,24
Dimetoato	230	199/171	80	5/10	4,53
Diniconazole	326	159/70	120	30/25	17,58
Dissulfotom	275	89/61	80	5/20	17,74
Dissulfotom sulfona	307	125/97	100	10/30	10,23
Dissulfotom sulfóxido	291	185/157	80	10/20	10,11
Diurom	233	160/72	120	20/20	10,81
Etiona	385	199/171	80	5/15	19,51
Etofemproxi	394	359/177	100	5/5	22,73
Etoprofós	243	173/131	105	8/16	15,45
Etrinfós	293	265/125	120	15/20	16,58
Fenamifós	304	234/217	120	15/20	15,69
Fenpiroximato	422	366/135	130	15/40	21,24
Fentiona	279	247/169	120	10/15	16,31
Flazassulfurom	408	227/182	120	15/20	10,68

Fluasifope-p-butílico	384	328/282	120	15/20	18,77
Flutriafol	302	123/70	120	20/15	10,32
Heptenofós	251	127/125	80	15/15	11,58
Hexaconazol	314	159/70	120	10/20	16,81
Hexitiazoxi	353	228/168	120	10/20	19,88
Imazalil	297	201/159	120	15/20	14,10
Imibenconazol	411	171/125	100	15/20	19,20
Imidacloprido	256	209/175	80	10/10	3,78
Indoxacarbe	528	203/150	120	36/16	17,61
Iprovalicarbe	321	203/119	80	5/20	14,71
Linuron	249	182/160	120	15/20	12,32
Malaoxon	315	127/99	100	5/20	8,35
Malationa	331	127/99	80	5/10	13,62
Metalaxil	280	220/192	120	10/15	11,47
Metconazol	320	125/70	120	30/25	16,94
Metamidofós	142	125/94	80	10/15	2,78
Metidationa	303	145/85	80	5/10	11,61
Metiocarbe	226	169/121	80	5/10	13,22
Metolaclor	284	252/176	120	10/15	16,08
Mevinfós	225	193/127	80	1/15	4,47
Monocrotofós	224	193/127	100	0/10	3,26
Miclobutanil	289	125/70	120	20/15	13,89
Ometoato	214	183/125	80	5/20	2,84
Paraoxon-etil	276	220/174	120	10/25	10,31
Paraoxon-metil	248	202/90	120	20/25	6,53
Parationa-etílica	292	236/94	100	8/45	15,71
Pencicuum	329	218/125	120	15/20	17,48
Pendimetalina	282	212/194	80	5/10	20,09
Fentoato	321	247/163	80	5/10	15,93
Forato	261	199/75	60	0/4	17,21
Fosmete	318	160/133	80	5/40	12,18
Fosfamidona	300	174/127	130	10/20	7,05

Picoxistrobina	368	205/145	80	5/20	15,65
Pirimicarbe	239	182/72	120	15/20	10,70
Pirimifós-etílico	334	198/182	120	20/25	19,52
Pirimifós-metílico	306	164/108	120	20/30	17,48
Procloraz	376	308/266	80	10/10	17,96
Propargito	368	231/175	90	10/10	20,50
Propiconazol	342	159/69	80	20/20	17,32
Propoxur	210	168/111	120	5/10	8,38
Piraclostrobina	388	194/163	60	10/20	17,07
Pirazofós	374	222/194	120	20/30	17,52
Piridabem	365	309/147	120	10/20	21,82
Pirimetanil	200	183/107	80	25/25	13,24
Piriproxifem	322	185/96	120	10/15	19,73
Quinalfós	299	163/147	120	20/20	16,25
Quizalofope-p-etil	373	299/271	120	15/25	18,87
Simazina	202	132/124	120	20/20	8,42
Tebuconazol	308	125/70	120	30/20	16,30
Temefós	467	419/125	120	8/24	19,05
Terbufós	289	103/57	155	5/16	19,22
Tetraconazol	372	159/70	62	36/16	14,66
Tiabendazol	202	175/131	150	30/40	7,30
Tiacloprido	253	186/126	120	10/20	5,38
Tiametoxam	292	211/181	90	10/20	3,26
Tiobencarbe	258	125/100	80	25/5	17,57
Triadimefom	294	197/69	90	15/20	14,18
Triazofós	314	162/119	70	20/30	14,19
Triclorfom	257	221/109	120	10/20	4,62
Trifloxistrobina	409	206/186	120	10/15	17,89
Triflumizol	346	278/73	120	5/10	18,39
Vamidotiona	288	146/118	80	10/20	4,17
Zoxamida	336	187/159	80	16/36	16,53

Fragmentador (V), Energia de colisão (V), Tempo de retenção (min), janela de retenção de 1,5min e polaridade positiva.

### 2.3 Preparação dos padrões em matriz

Foram utilizadas 8 diferentes concentrações da mistura de padrões em matriz: 0,0025 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,08 mg/kg e 0,10 mg/kg; exceto para Clorfenvinfós, Clorpirifós, Ciproconazol, Diclorvós (DDVP), Diniconazol, Dissulfotom, Fentoato, Flazassulfurom, Imazalil, Pirimifós-etílico e Quinalfós: 0,005 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,12 mg/kg, 0,16 mg/kg e 0,20 mg/kg; para Bromuconazol, Terbufós e Temefós: 0,01 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,16 mg/kg, 0,24 mg/kg, 0,32 mg/kg e 0,40 mg/kg; e para Forato e Paration: 0,02 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,16 mg/kg, 0,32 mg/kg, 0,48 mg/kg, 0,64 mg/kg e 0,80 mg/kg.

### 2.4 Desempenho do método

Para o estudo da linearidade, foram preparadas 3 curvas de calibração em matriz com 6 pontos. Brancos foram utilizados para controle da seletividade. A linearidade foi estudada segundo SOUZA & JUNQUEIRA (2005a). O método dos mínimos quadrados ordinários foi utilizado para estimar os parâmetros da regressão. O teste de resíduos padronizados Jackknife foi aplicado para a detecção de valores dispersos (*outliers*). Testes de Ryan-Joiner, Brown-Forsythe e Durbin-Watson foram utilizados para verificar, respectivamente, normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos. Análise de variância foi utilizada para verificar a adequação do ajuste ao modelo linear.

Veracidade e precisão (sob condições de repetibilidade – mesmo dia e mesmo analista - e precisão intermediária – dias diferentes e analistas diferentes) foram pesquisadas em ensaios com amostras brancas adicionadas em níveis correspondentes ao nível mais baixo, a um nível intermediário e ao nível mais alto da faixa de operação linear encontrada, sendo doze replicatas independentes de cada nível. As amostras foram divididas em quatro lotes com 3 replicatas de cada nível, analisados em quatro dias diferentes por dois analistas: dias 1 e 2 pelo analista 1 e dias 3 e 4 pelo analista 2 (SOUZA *et al.*, 2007).

Os resultados de recuperação obtidos foram analisados quanto à presença de valores dispersos pelo teste de Grubbs (SOUZA *et al.*, 2007).

Falta de veracidade foi investigada por meio das médias de recuperação obtidas para as doze replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. Foram consideradas aceitáveis médias de recuperação entre 70 e 120% (SANTE, 2015).

As precisões sob condições de repetibilidade e precisão intermediária variando-se dia e analista foram expressas em termos de desvios padrão relativos e estimadas por análise de variância dos resultados de recuperação obtidos para as doze replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração (SOUZA *et al.*, 2007).

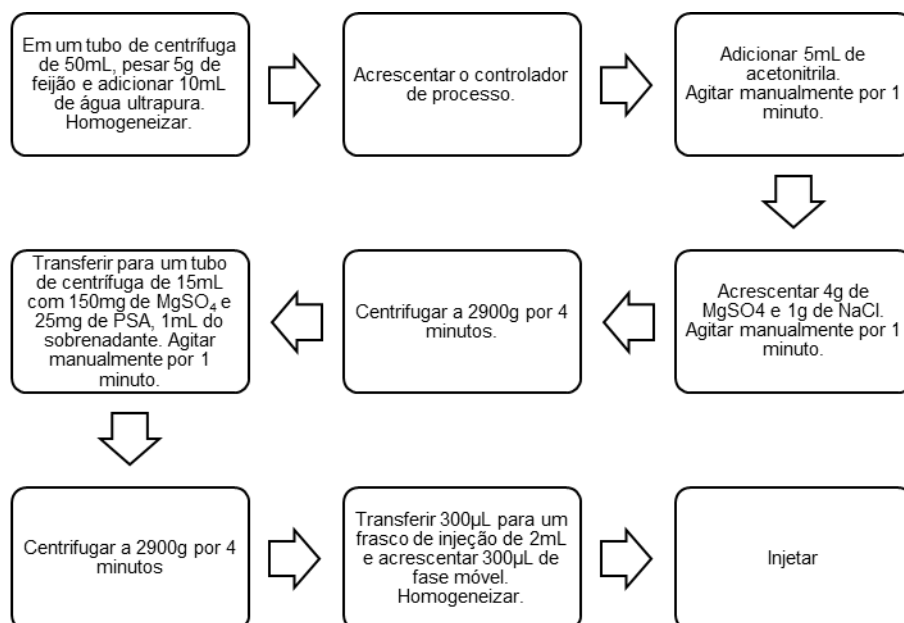
As premissas de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos dos resultados de recuperação, relativas à análise de variância, foram previamente testadas. A premissa de independência foi controlada pela aleatoriedade e independência dos experimentos e a premissa de aditividade foi assumida. Os desvios padrão relativos de repetibilidade ( $DPR_r$ ) e os desvios padrão relativos de precisão intermediária variando-se dia e analista ( $DPR_R$ ) foram considerados aceitáveis quando menores ou iguais a 20% (SANTE, 2015).

Para a determinação do limite de detecção, seletividade e especificidade foram realizadas recuperações na concentração que se referia à metade da concentração de quantificação e análise de amostra branca. Resultados com sinal/ruído maior ou igual a 3, com proporção entre as duas transições diferindo até  $\pm 30\%$  da média das proporções apresentadas pelas duas transições dos padrões injetados na mesma corrida e com área maior que 30% da área do ponto de quantificação em matriz foram considerados aceitáveis para a declaração da detecção do analito (SANTE, 2015). Condições que também foram utilizadas para se declarar que uma amostra apresentava resultado menor que o limite de quantificação. Amostras que apresentaram áreas menores que 30% das áreas dos limites de quantificação e/ou proporção entre as duas transições que diferissem além de  $\pm 30\%$  da média das proporções entre as transições apresentadas pelos padrões em matriz injetados na mesma corrida e/ou proporção sinal/ruído menor

que 3 foram consideradas amostras brancas ou com resultado abaixo do limite de detecção validado para cada agrotóxico (SANTE, 2015).

## 2.5 Preparação das amostras

As amostras foram processadas em moinho refrigerado e 5 g foram pesados em tubos de centrífuga de 50 mL. 10 mL de água ultrapura foram adicionados e a homogeneização foi feita manualmente. Acrescentou-se o controlador de processo para acompanhar perdas durante a análise (Propoxur - 0,040 mg/kg). 5 mL de acetonitrila foram acrescentados e agitação manual foi realizada por 1 minuto. Em seguida, foram acrescentados 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio. Foi feita agitação manual por 1 minuto. Centrifugou-se o tubo a 2900 g por 4 minutos. Transferiu-se 1 mL do sobrenadante para um tubo de centrífuga de 15 mL contendo 150 mg de sulfato de magnésio anidro e 25mg de PSA. Agitou-se manualmente por 1 minuto. O tubo foi centrifugado a 2900 g por 4 minutos. Transferiu-se 300 µL do sobrenadante para um frasco de injeção de 2 mL e acrescentou-se 300 µL de fase móvel (50% de fase A e 50% de fase B) (Figura I.1).



**Figura I.1** - Etapas de extração e purificação das amostras.

## **2.6 Garantia da qualidade dos resultados**

A cada lote, foi injetado um branco, uma recuperação com os 112 agrotóxicos, padrões preparados na concentração do limite de detecção em matriz e curva de calibração de 6 pontos de todos os padrões também em matriz. As recuperações e as soluções padrão foram preparadas atentando-se para que apresentassem a mesma constituição das amostras quanto à quantidade de matriz e solventes. As concentrações das recuperações injetadas a cada lote correspondiam a LD, LQ, 2LQ e 10LQ. Como foram injetados dez lotes de amostras, foram preparadas dez recuperações: uma no ponto de limite de detecção e três em cada um dos outros três pontos. Amostras insatisfatórias foram reextraídas e reanalisadas para confirmação dos resultados. Amostras que apresentaram agrotóxicos com área maior que a do ponto mais concentrado da curva foram diluídas com extrato de amostra branca para garantir a mesma quantidade de matriz durante a quantificação. Quando o controlador de processo ou as recuperações de rotina não apresentavam resultados entre 60% e 140%, as amostras eram reextraídas e reinjetadas (SANTE, 2015).

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Desempenho do método**

Dos 112 agrotóxicos estudados, Benalaxil, Metolacoloro, Etion e Piridaben não atenderam à premissa de independência dos resíduos, apresentando autocorrelação positiva ( $p < 0,10$ ) e 6 apresentaram desvios de linearidade (Benalaxil, Etion, Metolacoloro, Paration, Piridaben e Quinalfós) com  $p < 0,001$ . Comparando-se com o critério de apenas garantir que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) seja maior que 0,99 ou considerando-se apenas resíduos relativos menores que  $\pm 20\%$  não seriam detectados os desvios da linearidade, com exceção do Piridaben que apresentou  $R^2$  de 0,94 e resíduos maiores que 20%. Neste estudo, se fossem considerados apenas resíduos relativos menores que  $\pm 20\%$ , Acefato, Bitertanol, Etofemprox, Flazassulfurom, Imibenconazol, Metamidofós e Ometoato seriam

declarados como apresentando resposta não linear quando, de fato, não apresentam desvios da linearidade. No estudo realizado por GOLGE e KABAK em 2015, pode-se verificar que Metolaclo e Piridabem apresentaram resultados satisfatórios quanto à linearidade; LOZANO e colaboradores em 2014 também encontrou resultados satisfatórios para a avaliação da linearidade para todos os agrotóxicos que apresentaram desvio da linearidade neste estudo, usando faixas mais amplas, com 7 pontos de concentração. Mas nos trabalhos citados os autores utilizaram o critério do coeficiente de determinação.

Quanto ao estudo das recuperações aparentes, Flazassulfurom apresentou médias de recuperações menores que 70% e desvios padrões relativos em condições de precisão intermediária maiores que 20%. Resultados insatisfatórios para os estudos das recuperações também foram encontrados por LOZANO e colaboradores em 2012 para ometoato e monocrotofós em chás e camomila. Nas análises de multirresíduos de agrotóxicos, algumas características dos analitos devem ser consideradas para justificar a não obtenção de resultados aceitáveis: alta solubilidade em água e hidrofília, responsáveis por baixa extração em acetona; agrotóxicos com afinidade por PSA; e compostos presentes na matriz que podem afetar as recuperações (LOZANO *et al.*, 2012).

Assim, apesar de não apresentarem resposta linear ou média de recuperação e precisão aceitáveis para garantir uma faixa de quantificação, esses ensaios foram reconhecidos como adequados ao uso pretendido, pois apenas com o limite de detecção pode ser verificada sua adequação à legislação brasileira, já que não são autorizados para a cultura de feijão. Os limites de detecção estabelecidos foram: 0,005 mg/kg para Benalaxil, Etion, Metolaclo e Piridabem; 0,010 mg/kg para Quinalfós e Flazassulfurom e 0,04 mg/kg para Paration.

Quanto à determinação do limite de quantificação, alguns agrotóxicos não apresentaram média de recuperação e desvio padrão relativo em condições de repetibilidade e de precisão intermediária dentro dos limites aceitáveis para o ponto 1 e, portanto, tiveram seu limite de quantificação estabelecido como ponto 2. São eles: Bromuconazol, Buprofezím, Clorfenvinfós, Clorfluazurom, Dicrotofós, Indoxacarbe, Malation, Metconazol, Pirimifós-etílico, Piraclorobina, Pirazofós, Temefós, Tiametoxam e Vamidotona. Os limites de quantificação mais altos não



foram inadequados para a análise do feijão, pois, ainda assim, foram iguais ou menores que o Limite Máximo de Resíduo estabelecido para a cultura pela legislação brasileira.

Quanto à determinação do limite de detecção, apenas o Bitertanol apresentou, no estudo das recuperações na concentração de 0,005 mg/kg, sinal/ruído menor que 3. E, portanto, seu limite de detecção não foi determinado, ficando apenas definido seu limite de quantificação.

Os resultados da validação são apresentados na Tabela I.2.

**Tabela I.2** – Resultados da validação.

Agrotóxico	MR (%)			DPR <sub>r</sub> (%)			DPR <sub>R</sub> (%)			Limites (mg/kg)		
	1	2	6	1	2	6	1	2	6	LD	LQ	LMR
Acefato	100	94	95	6	5	14	7	6	16	0,005	0,01	0,5
Acetamiprido	82	92	99	7	4	4	14	4	4	0,005	0,01	0,1
Aldicarbe	83	96	105	8	5	4	16	5	5	0,005	0,01	NA
Aldicarbe sulfona	92	103	111	7	4	7	12	4	9	0,005	0,01	NA
Aletrina	77	91	98	6	8	4	18	9	4	0,005	0,01	NA
Ametrina	79	90	97	7	5	4	15	5	6	0,005	0,01	NA
Aminocarbe	89	96	99	7	4	4	13	4	6	0,005	0,01	NA
Atrazina	84	93	99	7	4	4	13	4	5	0,005	0,01	NA
Azinfós-etílico	71	89	102	7	6	4	19	7	4	0,005	0,01	NA
Azinfós-metílico	94	95	97	5	6	4	12	6	5	0,005	0,01	NA
Bitertanol	109	96	93	4	6	5	11	8	6	-	0,01	0,1
Boscalida	77	88	98	6	5	5	19	9	6	0,005	0,01	NA
Bromacila	79	90	98	7	4	4	16	5	4	0,005	0,01	NA
Bromuconazol	46	73	92	13	5	4	28	6	4	0,04	0,08	0,2
Buprofezina	56	72	82	10	5	5	17	16	15	0,01	0,02	0,05
Cadusafós	96	99	98	6	4	4	10	7	9	0,005	0,01	NA
Carbaril	84	94	102	6	5	3	15	6	4	0,005	0,01	0,5
Carbendazim	75	81	86	6	4	4	14	4	4	0,005	0,01	2
Carboxina	80	93	101	7	5	4	16	5	4	0,005	0,01	0,2

Agrotóxico	MR (%)			DPR <sub>r</sub> (%)			DPR <sub>R</sub> (%)			Limites (mg/kg)		
	1	2	6	1	2	6	1	2	6	LD	LQ	LMR
Clorfenvinfós	68	87	102	5	5	4	8	6	4	0,02	0,04	NA
Clorfluazuron	50	71	85	12	7	5	26	10	7	0,01	0,02	NA
Clorpirifós-etílico	91	95	93	6	6	4	11	6	4	0,01	0,02	0,1
Clofentezina	86	92	95	6	5	4	12	6	4	0,005	0,01	NA
Clomazone	87	95	101	6	5	4	14	5	4	0,005	0,01	NA
Clotianidina	78	88	99	8	5	4	17	6	6	0,005	0,01	0,02
Cianazine	88	95	103	7	6	4	15	6	5	0,005	0,01	NA
Ciazofamida	71	89	101	6	6	4	15	7	4	0,005	0,01	NA
Cimoxanil	77	91	100	8	4	4	17	5	4	0,005	0,01	NA
Ciproconazol	86	93	100	5	6	4	14	7	5	0,01	0,02	NA
Ciprodinil	82	86	87	7	3	5	11	7	11	0,005	0,01	0,3
Diazinona	70	91	103	7	7	4	18	7	4	0,005	0,01	NA
Diclorvós	76	89	99	7	5	4	18	6	4	0,01	0,02	NA
Dicrotofós	62	88	105	8	5	4	21	5	5	0,01	0,02	NA
Diflubenzurom	84	90	97	6	6	4	14	7	5	0,005	0,01	NA
Dimetoato	85	94	101	6	4	4	14	4	4	0,005	0,01	NA
Diniconazole	71	87	100	3	9	3	8	9	4	0,01	0,02	NA
Dissulfotom	70	89	100	10	7	6	16	8	6	0,01	0,02	NA
Dissulfoton sulfona	78	92	102	7	5	4	16	5	4	0,005	0,01	NA
Dissulfoton sulfóxido	86	95	102	7	6	4	13	6	4	0,005	0,01	NA
Diuróm	82	92	99	7	5	4	15	5	4	0,005	0,01	NA
Etofemproxi	119	114	100	4	6	6	7	9	13	0,005	0,01	0,5
Etoprofós	86	99	106	6	6	4	15	6	4	0,005	0,01	NA
Etrinfós	85	88	86	7	5	7	10	14	19	0,005	0,01	NA
Femproximato	77	87	96	6	5	4	16	6	5	0,005	0,01	NA
Fenamifós	70	91	104	8	7	4	19	8	4	0,005	0,01	NA
Fentiona	78	89	95	8	7	4	17	7	4	0,005	0,01	NA
Flazassulfurom	38	47	61	13	16	13	30	24	21	0,010	-	NA
Fluazifope-p-butílico	72	89	98	7	6	4	16	6	4	0,005	0,01	0,04

Agrotóxico	MR (%)			DPR <sub>r</sub> (%)			DPR <sub>R</sub> (%)			Limites (mg/kg)		
	1	2	6	1	2	6	1	2	6	LD	LQ	LMR
Flutriafol	83	90	96	7	4	4	14	4	5	0,005	0,01	0,1
Heptenofós	83	93	101	7	5	4	15	6	4	0,005	0,01	NA
Hexaconazol	71	85	99	5	5	3	11	5	3	0,005	0,01	0,05
Hexitiazoxi	95	93	91	6	4	4	11	5	4	0,005	0,01	NA
Imazalil	74	86	95	5	5	4	12	6	4	0,01	0,02	NA
Imibenconazol	88	82	74	9	4	11	11	19	16	0,005	0,01	0,3
Imidacloprido	84	90	100	10	7	3	20	10	6	0,005	0,01	0,07
Indoxacarbe	65	80	95	12	14	8	15	20	8	0,01	0,02	NA
Iprovalicarbe	80	94	103	7	6	4	16	6	4	0,005	0,01	NA
Linuron	93	97	99	7	5	4	13	5	4	0,005	0,01	NA
Malaoxon	81	95	105	7	5	4	16	6	4	0,005	0,01	NE
Malationa	68	87	102	4	6	4	10	7	4	0,01	0,02	8
Metalaxil	78	91	101	8	5	4	16	5	4	0,005	0,01	0,01
Metconazol	58	86	101	11	6	4	22	6	4	0,005	0,02	0,05
Metamidofós	94	82	79	4	7	16	5	8	20	0,005	0,01	NA
Metidationa	76	89	98	7	5	4	16	5	5	0,005	0,01	NA
Metiocarbe	76	91	100	7	5	4	17	5	5	0,005	0,01	NA
Mevinfós	92	98	104	6	4	4	13	5	4	0,005	0,01	0,1
Monocrotofós	87	94	96	6	4	5	13	4	6	0,005	0,01	NA
Miclobutanil	95	96	99	5	5	4	12	6	4	0,005	0,01	NA
Ometoato	98	96	99	6	4	11	8	4	13	0,005	0,01	NA
Paraoxon-etil	79	90	101	3	5	4	6	5	4	0,005	0,01	NA
Paraoxon-metil	72	89	103	4	6	4	11	7	5	0,005	0,01	NE
Pencicurom	71	88	100	4	6	4	8	6	4	0,005	0,01	0,05
Pendimetalina	102	98	94	4	5	4	11	6	4	0,005	0,01	0,1
Fentoato	70	88	102	3	7	4	9	7	4	0,01	0,02	NA
Forato	74	88	96	7	5	4	18	5	5	0,04	0,08	0,1
Fosmete	86	93	98	6	5	4	15	6	4	0,005	0,01	NA
Fosfamidona	86	95	103	7	5	4	15	5	4	0,005	0,01	NA

Agrotóxico	MR (%)			DPR <sub>r</sub> (%)			DPR <sub>R</sub> (%)			Limites (mg/kg)		
	1	2	6	1	2	6	1	2	6	LD	LQ	LMR
Picoxistrobina	76	92	103	7	6	4	17	6	4	0,005	0,01	0,01
Pirimicarbe	87	96	103	6	5	4	14	5	4	0,005	0,01	0,1
Pirimifós-etílico	60	73	79	10	5	6	16	17	16	0,02	0,04	NA
Pirimifós-metílico	78	89	96	7	5	4	15	5	6	0,005	0,01	0,5
Procloraz	72	83	95	3	7	4	8	7	4	0,005	0,01	NA
Propargito	90	98	101	6	5	4	12	5	4	0,005	0,01	NA
Propiconazol	83	91	100	6	5	3	12	6	3	0,005	0,01	0,05
Propoxur	89	97	103	7	5	3	14	5	4	0,005	0,01	NA
Piraclostrobina	68	87	102	5	7	4	10	7	4	0,01	0,02	0,1
Pirazofós	66	89	112	8	13	6	21	19	18	0,01	0,02	NA
Pirimetanil	86	87	86	6	4	5	12	6	12	0,005	0,01	NA
Piriproxifem	83	92	95	6	5	4	13	5	4	0,005	0,01	0,01
Quizalofop-e-p-etílico	72	87	97	3	6	4	10	7	4	0,005	0,01	0,03
Simazina	83	93	100	7	5	4	14	6	4	0,005	0,01	NA
Tebuconazol	81	93	107	8	8	5	19	13	10	0,005	0,01	0,1
Temefós	64	74	90	4	7	5	14	9	5	0,04	0,08	NA
Terbufós	79	84	76	12	4	12	15	19	19	0,02	0,04	0,05
Tetraconazol	95	97	100	5	5	4	13	6	4	0,005	0,01	0,2
Tiabendazol	77	80	86	6	5	4	13	6	4	0,005	0,01	0,01
Tiacloprido	81	91	95	7	4	5	15	4	6	0,005	0,01	0,1
Tiametoxam	63	76	86	9	4	7	16	4	10	0,01	0,02	0,02
Tiobencarbe	73	87	97	3	5	4	8	6	4	0,005	0,01	NA
Triadimefom	72	89	102	4	8	4	11	8	4	0,005	0,01	NA
Triazofós	75	92	101	7	6	4	17	6	4	0,005	0,01	0,01
Triclorfom	73	87	100	4	6	4	7	6	5	0,005	0,01	NA
Trifloxistrobina	82	94	101	6	6	4	14	6	4	0,005	0,01	0,2
Triflumizol	83	89	92	6	4	4	11	6	8	0,005	0,01	NA
Vamidotiona	66	84	101	4	5	4	9	5	4	0,01	0,02	NA
Zoxamida	72	83	92	3	5	5	3	10	14	0,005	0,01	NA

MR: média de recuperação, DPR<sub>r</sub>: desvio padrão relativo em condições de repetibilidade, DPR<sub>R</sub>: desvio padrão relativo em condições de precisão intermediária (determinado para 3 concentrações: 1(LQ), 2(2LQ) e 6(10LQ)), LD: limite de detecção, LQ: limite de quantificação e LMR: limite máximo de resíduo estabelecido pela legislação brasileira, NA: Não autorizado, NE: limite não estabelecido.

A estimativa de incerteza foi realizada segundo MEDINA-PASTOR e colaboradores em 2011 e SANTE 2015. Foram utilizados dados das recuperações da validação do método e do ensaio de proficiência para determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão realizado entre laboratórios brasileiros. Como resultado, foi obtida uma incerteza expandida de 42%. A estimativa apresentada concorda com a incerteza de 50% feita a partir dos resultados dos ensaios de proficiência realizados pela União Europeia (MEDINA-PASTOR *et al.*, 2011; SANTE, 2015).

É comum que métodos multirresíduos apresentem incertezas amplas. Tais métodos se prestam a analisar um amplo número de compostos em uma mesma corrida o que torna razoável considerar aceitável que os mesmos não podem ser otimizados para cada um dos analitos (DEHOUCK *et al.*, 2015).

### 3.2 Análise das amostras

Das 256 amostras analisadas, 176 (69%) apresentaram resíduos dos agrotóxicos pesquisados e 24 (9%) apresentaram resultado insatisfatório. Foram encontrados 25 resíduos não autorizados (22 amostras) e 2 resíduos acima do LMR (2 amostras). Os resultados são apresentados na Tabela I.3 e nas Figuras I.2 e I.3.

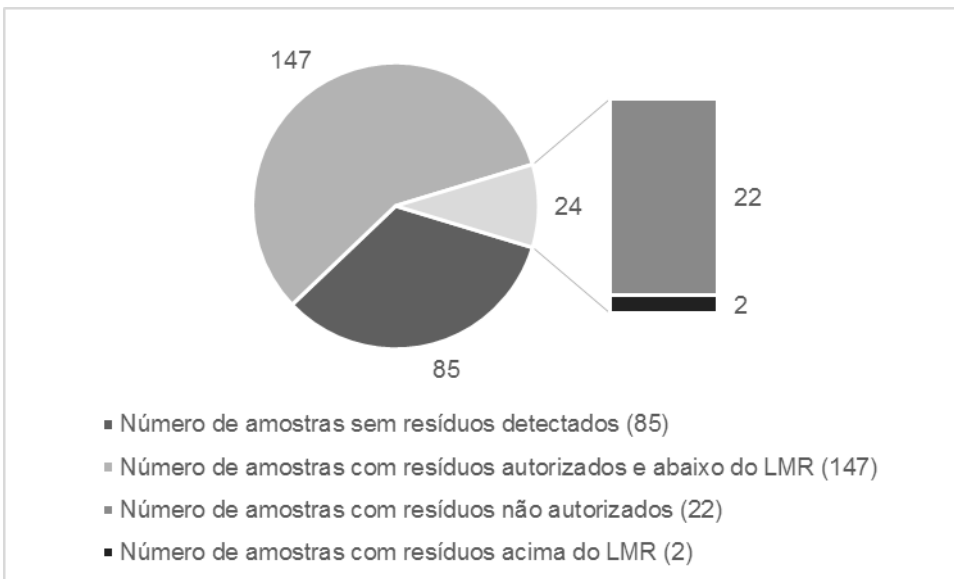
**Tabela I.3** - Resíduos de agrotóxicos encontrados nas amostras analisadas.

Agrotóxico	LMR (mg/kg)	AR	P (%)	RALQ	ARQ	FC (mg/kg)
Acefato	0,5	19	7,4	9	10	0,01 a 0,12
Acetamiprido	0,1	3	1,2	3	0	-
Ametrina	NA	2	0,8	0	2	0,01 a 0,02
Atrazina	NA	1	0,4	0	1	0,02
Carbendazim	2	176	68,8	43	133	0,01 a 0,19
Clorpirifós	0,1	3	1,2	3	0	-

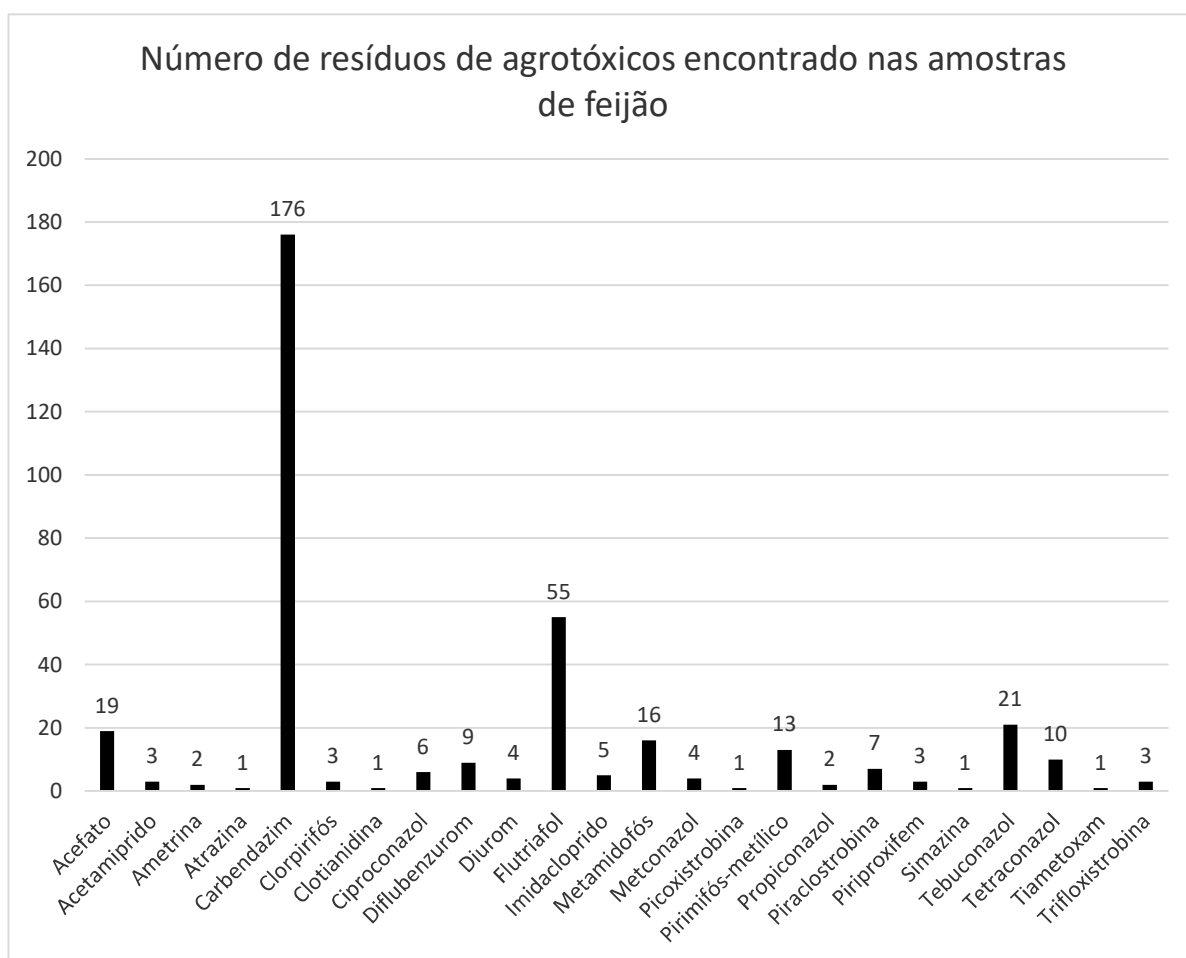
Agrotóxico	LMR (mg/kg)	AR	P (%)	RALQ	ARQ	FC (mg/kg)
Clotianidina	0,02	1	0,4	1	0	-
Ciproconazol	NA	6	2,3	6	0	-
Diflubenzurom	NA	9	3,5	8	1	0,01
Diurrom	NA	4	1,6	2	2	0,03 e 0,05
Flutriafol	0,1	55	21,5	12	43	0,01 a 0,12
Imidacloprido	0,07	5	2	4	1	0,01
Metconazol	0,05	4	1,6	4	0	-
Metamidofós	NA*	16	6,3	10	6	0,01 a 0,12
Picoxistrobina	0,01	1	0,4	1	0	-
Pirimifós-metílico	0,5	13	5,1	9	4	0,01 a 0,05
Propiconazol	0,05	2	0,8	2	0	-
Piraclostrobina	0,1	7	2,7	7	0	-
Piriproxifem	0,01	3	1,2	3	0	-
Simazina	NA	1	0,4	1	0	-
Tebuconazol	0,1	21	8,2	18	3	0,01 a 0,02
Tetraconazol	0,2	10	3,9	5	5	0,01 a 0,03
Tiametoxam	0,02	1	0,4	0	1	0,04
Trifloxistrobina	0,2	3	1,2	3	0	-

LMR: Limite máximo de resíduo (mg/kg), AR: número de amostras com resíduos, P: porcentagem (%), RALQ: número de amostras com resíduos abaixo do limite de quantificação, ARQ: número de amostras com resíduos quantificados e FC: faixa de concentração encontrada (mg/kg).

\*Para fins de monitoramento de resíduos, pela legislação brasileira, quando acefato e metamidofós são detectados na mesma amostra, para o caso em que o resíduo de acefato não exceda o LMR, apesar de não ser autorizado o uso de metamidofós, o resultado não é considerado insatisfatório, com relação a este metabólito, porque este pode ser proveniente da degradação do acefato.



**Figura I.2 – Distribuição dos resíduos detectados.**



**Figura I.3 - Número de resíduos de agrotóxicos encontrados amostras de feijão.**

Acompanhando a porcentagem dos resultados insatisfatórios obtidos pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil, verifica-se que em 2008, primeiro ano em que feijão foi analisado, 3% das amostras apresentaram resultado insatisfatório. A mesma porcentagem foi constatada em 2009. Em 2010 e em 2011, 6%. Em 2012, 7% (ANVISA, 2016). A diferença entre os resultados obtidos ao longo dos anos pode ser justificada, em parte, pelo crescente número de resíduos analisados pelos laboratórios devido ao aprimoramento dos métodos de extração e o uso de detectores específicos.

De 2009 a 2012, em seus relatórios de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, o FDA analisou 109 amostras de feijão e não encontrou resultados que violassem a legislação estadunidense (FDA, 2016). Não foram encontrados dados de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em feijão comum realizados pelo programa de monitoramento europeu de 2007 a 2013 (EFSA, 2016) e também ainda não foi organizado um ensaio de proficiência com esta matriz (EURL, 2016) ou com lentilha, por exemplo, que apresenta composição semelhante à do feijão.

#### **4 CONCLUSÃO**

Foi demonstrado que o método de extração e purificação QuEChERS associado ao uso de CL-EM/EM foi adequado para se realizar o monitoramento de 112 resíduos de agrotóxicos em amostras de feijão. O método validado permitiu a análise quantitativa de 105 agrotóxicos. Quanto ao estudo da linearidade, constatou-se que não deve ser realizado considerando apenas o coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 ou o resíduo relativo de até  $\pm 20\%$ , com pena da não detecção de desvios. As condições para declaração de amostras com resultados não detectados e com resultados apenas detectados foram claramente definidas e verificadas pela análise de recuperações e amostras brancas, condições essas que muitas vezes causam dúvidas na liberação de resultados não quantificáveis na rotina de análises devido às diversas definições encontradas para a determinação de limites de detecção. Das



256 amostras analisadas, aproximadamente 9% apresentaram resultado insatisfatório segundo a legislação brasileira.

## **CAPÍTULO II - ENSAIO DE PROFICIÊNCIA EM DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO (PHASEOLUS VULGARIS, L.) COM MÉTODO MULTIRRESÍDUOS: COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA PROFICIÊNCIA.**

### **RESUMO**

Um ensaio de proficiência foi organizado para avaliar o desempenho dos laboratórios brasileiros na determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão. A realização do ensaio de proficiência visou apoiar as ações de monitoramento e fiscalização do governo brasileiro, atendendo aos limites máximos de resíduos estabelecidos na Resolução RE N.º 165 de 29 de agosto de 2003. Treze laboratórios reportaram resultados, oito do governo brasileiro e cinco laboratórios privados. Duas amostras de feijão orgânico adicionadas de oito agrotóxicos foram enviadas a cada participante. Os resultados dos participantes foram avaliados por três diferentes métodos: Algoritmo A, mediana e interquartil normalizado e fatores h e k. Foi realizada uma comparação entre os métodos e escolhido o mais adequado à análise dos dados. Gráficos de Youden foram plotados para visualização do desempenho dos laboratórios. O método dos fatores h e k foi o escolhido tanto para a retirada de outliers a 95% quanto para a avaliação da proficiência pelo fator h. Comprovou-se que a incerteza para a estimativa do valor designado para ensaios com baixo número de participantes não atende ao critério estabelecido na ISO 13528:2015, mas foi proposta uma condição mínima a ser atendida para a avaliação da proficiência. Os resultados do ensaio de proficiência demonstraram um desempenho satisfatório dos participantes variando de 75% (Clorpirifós) a 100% (Carbendazim). Contudo, apenas 38% dos participantes analisaram todos os resíduos de agrotóxicos e de forma satisfatória.

Palavras-chaves: ensaio de proficiência, resíduos de agrotóxicos, feijão, comparação de métodos, avaliação da proficiência

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão é uma das principais fontes de proteínas para a maioria dos brasileiros (BURLE *et al.*, 2010). O Brasil é um grande produtor e também um dos principais consumidores com média de produção estimada em 3.112,2 milhares de toneladas na safra 2014/2015 (CONAB, 2016; HEINEMANN *et al.*, 2016). O feijão é cultivado por pequenos e grandes agricultores, mas predominantemente em um sistema de agricultura de subsistência (YOKOYAMA & STONE, 2000).

Uma das causas das perdas na produção do feijão é o ataque de pragas durante todo o cultivo e também durante a estocagem, o que torna comum o uso de inseticidas e fungicidas sistêmicos (CASTELLANI *et al.*, 1988). Assim, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em feijão é importante para a proteção da saúde pública. No Brasil, de 2004 a 2015, 1.543 amostras de feijão foram analisadas no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária com 6% de resultados insatisfatórios. O fungicidas Carbendazim, Procimidona, Flutriafol, Tebuconazol e o inseticida e acaricida Pirimifós-metilico foram encontrados em 54%, 18%, 15%, 11% e 8% das amostras, respectivamente (ANVISA, 2016).

A quantificação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é uma tarefa complexa (DAYARATHNA *et al.*, 2013). Para uma matriz específica, há um amplo número de agrotóxicos que precisam ser detectados e quantificados e suas concentrações são muito baixas (JIN *et al.*, 2012; SINHA *et al.*, 2012). Para um laboratório atingir uma medição confiável para a quantificação de resíduos de agrotóxicos, a implementação de um programa de garantia da qualidade e de monitoramento de desempenho é necessária. O ensaio de proficiência é um desses procedimentos, propiciando subsídios aos laboratórios para a identificação e solução de problemas analíticos (DAYARATHNA *et al.*, 2013; DEHOUCK *et al.*, 2015; MEDINA-PASTOR *et al.*, 2010b; THOMPSON *et al.*, 2006).

Métodos adequados à análise dos dados obtidos em um ensaio de proficiência têm sido discutido na literatura (DEHOUCK *et al.*, 2015; EURACHEM, 2011; ISO, 2015; ISO, 1994; OTAKE *et al.*, 2014; ROSARIO *et al.*, 2008; SYKES *et al.*, 2013; TRIPHATY *et al.*, 2013; VEITH, 1993; VISSER, 2006; YARITA *et al.*,

2015), constatando-se que a determinação do valor designado e do desvio padrão para a avaliação da proficiência a partir de um número reduzido de participantes deve ser tratada com cautela (ISO, 2015; KUSELMAN & FAJGELJ, 2010; SZEWCZAK & BONDARZEWSKI, 2016).

O objetivo deste trabalho foi organizar um ensaio de proficiência para a avaliação do desempenho dos laboratórios que realizam determinação de multirresíduos de agrotóxicos em feijão, apoiando as ações de monitoramento e fiscalização do governo brasileiro; e comparar métodos de análise de dados, definindo um que seja adequado às particularidades dos resultados obtidos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Reagentes e amostras**

Os padrões de agrotóxicos foram adquiridos do Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). Reagentes utilizados: acetona para análise (pa) foi adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha), acetona para análise de resíduo (par) foi adquirida de J.T.Baker (Phillipsburg, EUA), acetonitrila para cromatografia líquida de alta eficiência foi adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha), metanol para cromatografia líquida de alta eficiência foi adquirido de J.T. Baker (Center Valley, EUA), ácido fórmico e formiato de amônio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de magnésio anidro foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA), água ultrapura foi gerada pelo Milli-Q Gradient da Millipore (Billerica, EUA), sulfato de magnésio anidro foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha), cloreto de sódio pa foi adquirido de J.T.Baker (Phillipsburg, EUA) e amina primária secundária (PSA) com partículas de 40 µm foi adquirida da Agilent Technologies (Santa Clara, EUA). Equipamentos utilizados: Cromatógrafo líquido modelo 1200 acoplado a espectrômetro de massas sequencial (triploquadropolo) modelo 6460 da Agilent Technologies (Santa Clara, EUA) com software Masshunter versão B.07.01, moinho e banho termostaticados da Marconi (Piracicaba, Brasil) modelos MA 090/CFT e MA-184, respectivamente, homogeneizador em V da Marconi (Piracicaba, Brasil), câmara climática da Marconi (Piracicaba, Brasil) centrífuga refrigerada da

Thermo Scientific (Waltham, EUA) e pipetadores automáticos Thermo Scientific (Waltham, EUA) e HBL Lab Soluções (Warszawa, Polônia), centrífuga refrigerada Jouan Cr3i Thermo Scientific (Waltham, EUA), balança Sartorius TE 612 (Gottingen, Alemanha), balança Scientech AS 210 (Boulder, EUA), balança Sartorius BP 211 D (Gottingen, Alemanha), freezer Thermo Scientific (Waltham, EUA), capelas químicas de exaustão Poliscience e Engelab. Feijão orgânico foi adquirido em loja de produtos orgânicos de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O laboratório provedor é acreditado na NBR ISO/IEC 17025 para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças pelo INMETRO CRL 0322 desde 2011.

## **2.2 Divulgação do estudo**

O protocolo do ensaio foi elaborado e enviado por correio eletrônico a laboratórios de todo o Brasil junto com o convite para participação e o formulário de inscrição.

## **2.3 Preparo e armazenamento dos itens de ensaio**

O itens de ensaio foram preparados seguindo os requisitos da Norma NBR ISO/IEC 17043. Quatro quilos de feijão orgânico foram processados em moinho refrigerado. Uma solução com os padrões de agrotóxicos em acetona PAR foi preparada para que a concentração final do material fosse de 0,05 mg/kg para Carbaril, Carbendazim, Mevinfós, Miclobutanil, Pirimifós-metílico, Tebuconazol e Tiacloprido; e de 0,10 mg/kg para Clorpirifós. O feijão moído foi espalhado em quatro recipientes largos que comportavam um quilo cada e foi contaminado com pequenas gotas da solução também dividida em quatro volumes equivalentes por toda a extensão do material. Aguardou-se a evaporação do solvente e uma primeira homogeneização foi feita utilizando-se uma espátula para garantir que grumos, que por ventura tivessem sido formados, fossem eliminados. Após isso, o material foi homogeneizado em homogeneizador em V durante 5 dias. Foram pesados aproximadamente 40 g do material preparado em potes de prolipropileno. Os potes foram lacrados e armazenados em freezer. Para o preparo dos itens brancos foram seguidas as mesmas etapas, com exceção da etapa de contaminação.

## 2.4 Envio dos itens

Os itens foram envolvidos em plástico e enviados em caixas de isopor contendo gelo seco. O formulário de recebimento dos itens, as instruções para armazenamento e análise dos itens e o formulário para envio dos resultados que incluía um questionário sobre o método analítico que seria utilizado foram encaminhados por correio eletrônico aos participantes.

## 2.5 Estudo da homogeneidade

O estudo estatístico da homogeneidade foi realizado seguindo a norma ISO 13528:2005 (Anexo B). As análises foram realizadas com método de extração e purificação QuEChERS validado para 105 agrotóxicos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial triploquadrupolo. Foram estudados dez itens amostrados aleatoriamente e analisados em duplicata.

Foi calculado o desvio padrão entre as amostras  $s_s$  e estas foram consideradas adequadamente homogêneas quando

$$s_s \leq 0,3\hat{\sigma} \quad \text{Equação II.1}$$

onde,

$s_s$  é o desvio padrão entre as amostras e  $\hat{\sigma}$  é o desvio padrão da avaliação da proficiência.

## 2.6 Estudo da estabilidade

O estudo estatístico da estabilidade foi realizado seguindo a norma ISO 13528:2005 (Anexo B).

Foram estudados 3 itens de ensaio amostrados aleatoriamente e analisados em duplicata, a cada dois meses, até o envio dos resultados pelos participantes. O método de avaliação escolhido foi o do critério do desvio padrão alvo, segundo modelos de Horwitz (1982) e Thompson (2000).

Segundo a norma ISO 13528:2005, a diferença de médias da concentração do analito nos dois tempos deve ser menor ou igual a 0,3 vezes o desvio padrão, conforme equação a seguir

$$|\bar{x} - \bar{y}| \leq 0,3\hat{\sigma}$$

Equação II.2

onde,  $\bar{x}$  é a média da concentração do analito no tempo 1,  $\bar{y}$  é a média da concentração do analito no tempo 2 e  $\hat{\sigma}$  é o desvio padrão da avaliação da proficiência.

## 2.7 Determinação do valor designado e de seu desvio padrão

A estimativa do valor designado foi feita pelo valor de consenso dos participantes, utilizando-se:

- média robusta calculada pelo Algoritmo A e desvio padrão (13528:2005),
- mediana e interquartil normalizado,
- média e desvio padrão, após a retirada de outliers detectados pelos fatores h e k a 95% e até 2/9 dos dados originais (ISO 5725-2).

## 2.8 Z-escores, $Z_B$ e $Z_W$ , h e k

Os z-scores,  $Z_B$ ,  $Z_W$ , fatores h e k foram calculados para cada um dos resultados apresentados pelos laboratórios conforme as equações a seguir,

$$z = (x - X) / \hat{\sigma} \quad \text{Equação II.3}$$

$$Z_B = \frac{S - \text{mediana}(S)}{\text{normIQR}(S)} \quad \text{Equação II.4}$$

$$Z_W = \frac{D - \text{mediana}(D)}{\text{normIQR}(D)} \quad \text{Equação II.5}$$

$$IQR = Q3 - Q1 \quad \text{Equação II.6}$$

$$h = (x - X) / \hat{\sigma} \quad \text{Equação II.7}$$

$$h_{crit} = \frac{(p-1)t}{\sqrt{p(t^2+p-2)}} \quad \text{Equação II.8}$$

$$k = \frac{s}{s_r} \quad \text{Equação II.9}$$

$$s = \frac{|D|}{1,128} \quad \text{Equação II.10}$$

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p s_i^2}{p}} \quad \text{Equação II.11}$$

$$k_{crit} = \sqrt{\frac{p}{1 + \frac{(p-1)}{p}}} \quad \text{Equação II.12}$$



$$F = F[\alpha, (n - 1), (p - 1)(n - 1)]$$

Equação II.13

onde  $x$  é o valor declarado pelo participante,  $X$  é o valor designado,  $\sigma$  é o desvio padrão da avaliação da proficiência,  $S$  é a soma do par de resultados,  $D$  é a diferença do par de resultados,  $\text{normIQR}(S)$  e  $\text{normIQR}(D)$  são os interquartis normalizados ( $\text{IQR} \times 0,7413$ ),  $Q3$  é o terceiro quartil e  $Q1$  o primeiro quartil,  $t$  com  $p-2$  graus de liberdade,  $p$  é o número de laboratórios e  $n$  é o número de replicatas por laboratório.

## 2.9 Avaliação da proficiência

A avaliação da proficiência foi realizada da seguinte forma:

### Algoritmo A

- ✓  $Z\text{-SCORE} \leq |2|$  Resultado satisfatório
- ✓  $|2| < Z\text{-SCORE} < |3|$  Resultado questionável
- ✓  $Z\text{-SCORE} \geq |3|$  Resultado insatisfatório

### Método NATA

- ✓  $ZB \leq |2|$  e  $Zw \leq |2|$  Resultado satisfatório
- ✓  $|2| < ZB < |3|$  e  $|2| < Zw < |3|$  Resultado questionável
- ✓  $ZB \geq |3|$  e  $Zw \geq |3|$  Resultado insatisfatório

### Fatores h e k

- ✓  $h \leq |h_{\text{crit}95\%}|$  e  $k \leq |k_{\text{crit}95\%}|$  Resultado satisfatório
- ✓  $|h_{\text{crit}95\%}| < h \leq |h_{\text{crit}99\%}|$  e  $|k_{\text{crit}95\%}| < k \leq |k_{\text{crit}99\%}|$  Resultado questionável
- ✓  $h > |h_{\text{crit}99\%}|$  e  $k > |k_{\text{crit}99\%}|$  Resultado insatisfatório

## 2.10 Representação gráfica dos resultados

Gráficos de Youden foram plotados para auxiliar na interpretação dos resultados pelos participantes. Nos gráficos de Youden, quanto mais o ponto que

representa cada laboratório se afasta do zero ao longo da reta, maior é a diferença encontrada entre o resultado do laboratório e o valor designado (estimativa da veracidade); e quanto mais o ponto se afasta da reta, menor é a precisão dos resultados enviados pelo participante.

## 2.11 Incerteza do valor designado

A incerteza do valor designado foi estimada pela equação a seguir,

$$u_x = \frac{s}{\sqrt{p}} \quad \text{Equação II.14}$$

onde,

$u_x$  é a incerteza do valor designado,  $s$  é o desvio padrão calculado pelo consenso dos participantes e  $p$  é o número de laboratórios (ISO 13528, 2015).

A incerteza do valor designado deve ser menor do que o desvio padrão do ensaio, conforme a equação a seguir,

$$u_x < 0,3\hat{\sigma} \quad \text{Equação II.15}$$

onde,

$u_x$  é a incerteza do valor designado e  $\hat{\sigma}$  é o desvio padrão da avaliação da proficiência (ISO 13528: 2015).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Laboratórios participantes

Quinze laboratórios se inscreveram para participar do ensaio e treze laboratórios enviaram os resultados. Nove laboratórios eram acreditados pelo Inmetro segundo a ABNT NBR ISO/IEC 17025.

#### 3.2 Estudo da homogeneidade

O desvio padrão da avaliação da proficiência foi estimado pelos modelos de Horwitz (1982) e Thompson (2000) para o estudo da estabilidade.

O lote foi homogêneo para todos os analitos adicionados ao feijão orgânico (Tabelas II.1 e II.2).

**Tabela II.1** - Dados do estudo da homogeneidade (continua).

Amostra	Carbaril		Carbendazim		Clorpirifós		Mevinfós	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	0,038	0,038	0,045	0,046	0,079	0,080	0,008	0,008
2	0,041	0,04	0,049	0,047	0,086	0,084	0,009	0,009
3	0,038	0,037	0,047	0,045	0,077	0,082	0,009	0,008
4	0,035	0,036	0,042	0,042	0,075	0,075	0,008	0,008
5	0,037	0,038	0,044	0,045	0,075	0,080	0,008	0,008
6	0,037	0,041	0,044	0,049	0,077	0,082	0,008	0,009
7	0,035	0,039	0,041	0,047	0,072	0,080	0,007	0,008
8	0,035	0,041	0,041	0,048	0,072	0,082	0,008	0,009
9	0,038	0,038	0,044	0,043	0,076	0,077	0,008	0,008
10	0,039	0,040	0,045	0,045	0,078	0,079	0,008	0,009

**Tabela II.1 - Dados do estudo da homogeneidade (conclusão).**

Amostra	Miclobutanil		Pirimifós-metílico		Tebuconazole		Tiacloprido	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	0,047	0,048	0,039	0,040	0,043	0,043	0,051	0,052
2	0,051	0,050	0,043	0,042	0,047	0,046	0,055	0,054
3	0,047	0,046	0,038	0,04	0,043	0,043	0,052	0,050
4	0,044	0,043	0,037	0,038	0,039	0,040	0,046	0,045
5	0,045	0,046	0,038	0,039	0,04	0,042	0,048	0,049
6	0,046	0,050	0,039	0,042	0,041	0,045	0,048	0,054
7	0,044	0,048	0,037	0,041	0,039	0,044	0,046	0,052
8	0,042	0,049	0,036	0,041	0,038	0,047	0,044	0,052
9	0,045	0,046	0,039	0,039	0,041	0,042	0,048	0,048
10	0,047	0,048	0,040	0,041	0,043	0,043	0,050	0,051

**Tabela II.2 - Resultados do estudo da homogeneidade.**

Agrotóxico	Desvio padrão entre amostras (mg/kg)	0,3 x desvio padrão estimado por Horwitz e Thompson (mg/kg)
Carbaril	0,0007	0,0025
Carbendazim	0,0005	0,0030
Clorpirifós	0,0012	0,0052
Mevinfós	0,0002	0,0005
Miclobutanil	0,0009	0,0031
Pirimifós-metílico	0,0005	0,0026
Tebuconazol	0,0009	0,0028
Tiacloprido	0,0015	0,0033

### 3.3 Estudo da estabilidade

O desvio padrão da avaliação da proficiência foi estimado pelos modelos de Horwitz (1982) e Thompson (2000) para o estudo da estabilidade.

Os resultados do estudo da estabilidade estão apresentados nas Tabelas II.3 e II.4.

**Tabela II.3 - Dados do estudo da estabilidade.**

	Carbaril	Carbendazim	Clorpirifós	Mevinfós	Miclobutanil	Pirimifós-metílico	Tebuconazole	Tiacloprido
	Resposta (mg/kg)							
1	0,039	0,039	0,082	0,010	0,053	0,042	0,042	0,057
	0,040	0,040	0,086	0,010	0,054	0,043	0,044	0,058
	0,037	0,037	0,082	0,010	0,051	0,041	0,040	0,053
	0,041	0,041	0,090	0,010	0,055	0,044	0,045	0,057
	0,035	0,035	0,075	0,009	0,047	0,039	0,038	0,050
	0,042	0,042	0,088	0,011	0,056	0,044	0,047	0,058
	0,032	0,045	-	0,009	0,039	0,031	0,032	0,047
2	0,033	0,046	-	0,009	0,041	0,034	0,034	0,049
	0,032	0,045	-	0,009	0,040	0,032	0,033	0,048
	0,033	0,046	-	0,009	0,040	0,032	0,034	0,049
	0,030	0,043	-	0,008	0,037	0,030	0,031	0,044
	0,034	0,047	-	0,009	0,042	0,033	0,036	0,049
	0,039	0,051	0,079	0,009	0,053	0,038	0,043	0,055
3	0,041	0,053	0,088	0,010	0,056	0,042	0,049	0,057
	0,037	0,048	0,080	0,009	0,050	0,038	0,043	0,052
	0,039	0,050	0,084	0,009	0,053	0,039	0,048	0,053
	0,038	0,051	0,084	0,009	0,054	0,039	0,046	0,056
	0,039	0,051	0,088	0,009	0,054	0,039	0,048	0,055
4	0,051	0,050	0,098	0,011	0,058	0,043	0,058	0,052
	0,053	0,052	0,102	0,012	0,061	0,045	0,062	0,055
	0,050	0,049	0,100	0,010	0,059	0,044	0,060	0,053
	0,048	0,049	0,099	0,011	0,057	0,044	0,058	0,051

	Carbaril	Carbendazim	Clorpirifós	Mevinfós	Miclobutanil	Pirimifós-metílico	Tebuconazole	Tiacloprido
	Resposta (mg/kg)							
	0,043	0,047	0,088	0,009	0,054	0,040	0,055	0,049
	0,050	0,054	0,103	0,011	0,062	0,048	0,063	0,056
	0,036	0,046	0,073	0,011	0,046	0,036	0,045	0,048
	0,038	0,049	0,080	0,011	0,050	0,038	0,049	0,052
5	0,036	0,046	0,073	0,011	0,047	0,036	0,044	0,050
	0,040	0,050	0,082	0,012	0,050	0,039	0,049	0,053
	0,036	0,046	0,074	0,011	0,047	0,036	0,045	0,048
	0,037	0,048	0,076	0,011	0,048	0,037	0,046	0,050
	0,031	0,042	0,070	0,006	0,041	0,033	0,034	0,043
	0,033	0,044	0,073	0,007	0,043	0,034	0,037	0,046
6	0,034	0,045	0,076	0,007	0,044	0,036	0,037	0,047
	0,032	0,043	0,069	0,006	0,041	0,033	0,035	0,044
	0,032	0,043	0,072	0,006	0,042	0,034	0,035	0,044
	0,032	0,043	0,073	0,007	0,042	0,033	0,036	0,044

**Tabela II.4 - Resultados do estudo da estabilidade.**

Agrotóxico	Diferença de médias (mg/kg)	0,3 x desvio padrão estimado por Horwitz e Thompson (mg/kg)
Carbaril	$5,32 \times 10^{-5}$	$2,51 \times 10^{-3}$
Carbendazim	$9,88 \times 10^{-4}$	$2,97 \times 10^{-3}$
Clorpirifós	$4,22 \times 10^{-3}$	$5,19 \times 10^{-3}$
Mevinfós	$1,11 \times 10^{-3}$	$5,48 \times 10^{-4}$
Miclobutanil	$2,50 \times 10^{-3}$	$3,08 \times 10^{-3}$
Pirimifós-metílico	$1,50 \times 10^{-3}$	$2,60 \times 10^{-3}$
Tebuconazol	$1,36 \times 10^{-3}$	$2,80 \times 10^{-3}$
Tiacloprido	$1,26 \times 10^{-3}$	$3,28 \times 10^{-3}$

O lote foi estável para todos os analitos, com exceção do Mevinfós.

Três itens amostrados aleatoriamente do material foram armazenados em câmara climática por 6 dias a 50°C e foram analisados em duplicata para simular as condições de transporte. Análise de variância foi realizada e o lote foi estável para todos os analitos ( $p > 0,05$ ), com exceção do Mevinfós ( $p < 0,05$ ). Assim, os resultados dos participantes que receberam os itens em até seis dias foram utilizados para o cálculo do valor designado e avaliados quanto à proficiência. Um reenvio de amostra foi necessário.

### **3.4 Número de laboratórios participantes**

Treze laboratórios reportaram os resultados. Os laboratórios receberam uma lista com os possíveis agrotóxicos presentes nos itens de ensaio, mas nem todos reportaram resultados para todos os analitos. Foram recebidos 8 resultados para Miclobutanil, 9 para Tebuconazol e Tiacloprido, 10 para Carbaril e Carbendazim, 12 para Clorpirifós e 13 para Pirimifós-metílico (Apêndice).

### **3.5 Eliminação de *outliers***

Foram retirados os *outliers* utilizando-se os fatores  $k$  (a 95%) e  $h$  (a 95%) obedecendo o limite de  $2/9$  dos dados originais. Para o tratamento de *outliers*, fez-se uma comparação dos fatores  $h$  e  $k$  com os testes mais comuns sugeridos na literatura: Cochran e Grubbs a 95%. Constatou-se que os testes de Cochran e Grubbs não foram eficientes para a detecção dos *outliers* (Tabela II.5). Portanto, para ensaios realizados com número pequeno de participantes, sugere-se a utilização dos valores  $h$  e  $k$  a 95% para o tratamento de *outliers*.

**Tabela II.5** - Número de outliers detectados por Grubbs, Cochram e pelo cálculo dos fatores h e k.

Agrotóxico	Cochram	k	Grubbs	h
Carbaril	1	1	1	1
Carbendazim	1	2	0	0
Clorpirifós	0	2	0	1
Miclobutanil	0	0	0	0
Pirimifós-metílico	0	1	0	2
Tebuconazol	0	0	0	1
Tiacloprido	1	1	0	1

### 3.6 Comparação dos valores designados e dos desvios padrões

Os resultados das determinações dos valores designados e de seus desvios são apresentados nas Tabelas II.6 e II.7.



**Tabela II.6** - Resultados das determinações dos valores designados.

Valor designado (mg/kg)	Algoritmo A	Mediana e	Mediana e	Fatores h e k
		interquartil normalizado A	interquartil normalizado B	
Carbaril	0,036	0,035	0,036	0,034
Carbendazim	0,037	0,037	0,036	0,038
Clorpirifós	0,098	0,091	0,090	0,082
Miclobutanil	0,047	0,048	0,050	0,047
Pirimifós-metílico	0,047	0,043	0,048	0,047
Tebuconazol	0,049	0,043	0,047	0,040
Tiacloprido	0,042	0,043	0,043	0,040

**Tabela II.7** - Resultados das determinações dos desvios padrões.

Desvio padrão (%)	Algoritmo A	Mediana e	Mediana e	Fatores h e k
		interquartil normalizado A	interquartil normalizado B	
Carbaril	30	14	23	24
Carbendazim	22	12	15	14
Clorpirifós	38	36	32	23
Miclobutanil	29	22	30	26
Pirimifós-metílico	33	23	20	24
Tebuconazol	30	30	31	26
Tiacloprido	28	20	31	21

### 3.7 Avaliação da proficiência

Os resultados da avaliação da proficiência são apresentados nas Tabelas II.8, II.9 e II.10.

**Tabela II.8** - Resultados satisfatórios.

Resultados satisfatórios (%)	Algoritmo A	Mediana e interquartil normalizado	Fatores h e k $\hat{\sigma}$ calculado	Fatores h e k $\hat{\sigma} = 25\%$
Carbaril	90	70	90	90
Carbendazim	100	80	70	100
Clorpirifós	100	92	75	75
Miclobutanil	100	100	100	100
Pirimifós-metílico	100	77	85	85
Tebuconazol	100	89	89	89
Tiacloprido	89	89	89	89

**Tabela II.9** - Resultados insatisfatórios.

Resultados insatisfatórios (%)	Algoritmo A	Mediana e interquartil normalizado	Fatores h e k $\hat{\sigma}$ calculado	Fatores h e k $\hat{\sigma} = 25\%$
Carbaril	10	10	10	10
Carbendazim	0	0	20	0
Clorpirifós	0	0	25	25
Miclobutanil	0	0	0	0
Pirimifós-metílico	0	8	15	15
Tebuconazol	0	0	11	11
Tiacloprido	0	0	11	11

**Tabela II.10** - Resultados questionáveis.

Resultados questionáveis (%)	Algoritmo A	Mediana e interquartil normalizado	Fatores h e k $\sigma$ calculado	Fatores h e k $\sigma = 25\%$
Carbaril	0	20	0	0
Carbendazim	0	20	10	0
Clorpirifós	0	8	0	0
Miclobutanil	0	0	0	0
Pirimifós-metílico	0	15	0	0
Tebuconazol	0	11	0	0
Tiacloprido	11	11	0	0

Observando-se os dados apresentados, pode-se perceber que os resultados satisfatórios foram mais frequentes pela análise dos dados pelo Algoritmo A com a obtenção de desvios altos e valores designados visivelmente influenciados por valores extremos. Quanto ao uso da mediana e do interquartil normalizado, observa-se uma melhor distinção entre resultados satisfatórios e não satisfatórios, mas ainda com muitos resultados classificados como questionáveis, ou seja, sem uma definição clara da proficiência dos participantes. Já com o uso dos fatores k e h para a avaliação da proficiência, constata-se uma distinção clara entre resultados satisfatórios e insatisfatórios. Além disso, observam-se desvios muito próximos dos praticados pelos provedores de ensaio para os laboratórios de referência da União Europeia (25%), sendo o mais baixo encontrado para Carbendazim (14%). Como observaram-se resultados questionável e insatisfatórios equivocados para carbendazim ao se utilizar o desvio calculado que é baixo e incomum para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, recomenda-se a adoção do desvio de 25% para todos os agrotóxicos. Constata-se que assim corrige-se o equívoco quanto ao carbendazim e mantêm-se as mesmas conclusões quanto aos outros agrotóxicos.

Os resultados do ensaio de proficiência demonstraram um desempenho satisfatório dos participantes variando de 75% (Clorpirifós) a 100% (Carbendazim).

Contudo apenas 38% dos participantes analisaram todos os resíduos de agrotóxicos de forma satisfatória.

### **3.8 Incerteza do valor designado**

A incerteza para a determinação do valor designado foi calculada como o desvio padrão da estimativa do valor designado dividido pela raiz do número de laboratórios, pois assumiu-se que o desvio padrão estimado pelo consenso dos participantes apresenta os componentes da homogeneidade, estabilidade e transporte em grande parte refletidos nos resultados utilizados, sendo considerada sua estimativa suficiente para representá-los. Essa estimativa da incerteza foi comparada ao desvio padrão adotado para a avaliação da proficiência multiplicado por 0,3 conforme a ISO 13528 2015 recomenda (Tabela II.11). Como já esperado para um número pequeno de participantes em um ensaio de proficiência para análise de multirresíduos de agrotóxicos, apenas para carbendazim obteve-se um resultado satisfatório devido ao baixo desvio que o mesmo apresentou na estimativa do valor designado. Sugere-se aqui que para limitar a incerteza da estimativa do valor designado para a avaliação da proficiência, a incerteza expandida dos valores designados calculados e os desvios padrões da avaliação da proficiência adotados sejam comparados (Tabela II.12). Assim, quando os resultados dos laboratórios participantes utilizados para o cálculo do valor designado forem superiores aos desvios padrões adotados para a avaliação da proficiência, não se recomenda a avaliação do desempenho dos participantes. Abordagem semelhante foi utilizada por DEHOUCK e colaboradores em 2015, na qual o desvio padrão alvo para avaliação da proficiência foi definido pelo provedor como a incerteza padrão máxima aceitável. Assim, mesmo quando apenas resultados de laboratórios especialistas são utilizados para a determinação do valor designado, como no estudo citado, há uma incerteza alta proveniente da caracterização, o que demonstra que a análise de multirresíduos de agrotóxicos apresenta uma incerteza padrão elevada. Esclare-se que esses métodos analisam um amplo número de agrotóxicos em uma única corrida analítica e, devido a isso, é razoável reconhecer que não podem ser otimizados para cada analito.

**Tabela II.11** - Incerteza padrão do valor designado e 0,3 x desvio padrão da avaliação da proficiência adotado.

Agrotóxico	Incerteza padrão do valor designado (mg/kg)	0,3 x desvio padrão da avaliação da proficiência (mg/kg)
Carbaril	0,00270	0,00253
Carbendazim	0,00179	0,00274
Clorpirifós	0,00635	0,00618
Miclobutanil	0,00435	0,00355
Pirimifós-metílico	0,00358	0,00355
Tebuconazol	0,00361	0,00299
Tiacloprido	0,00304	0,00301

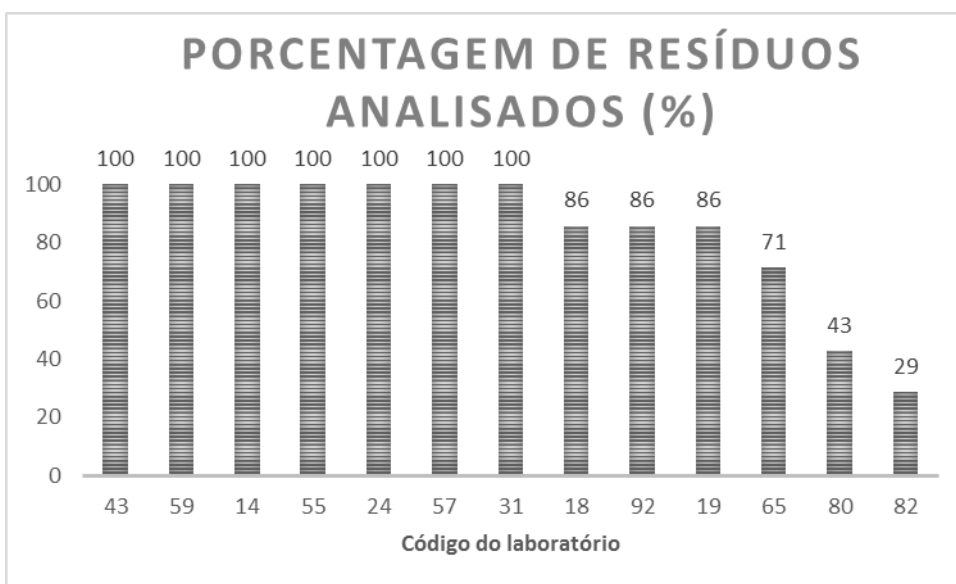
**Tabela II.12** - Incerteza expandida do valor designado e desvio padrão da avaliação da proficiência adotado.

Agrotóxico	Incerteza expandida do desvio padrão do valor designado (mg/kg)	Desvio padrão da avaliação da proficiência (mg/kg)
Carbaril	0,0061	0,0084
Carbendazim	0,0041	0,0091
Clorpirifós	0,0144	0,0206
Miclobutanil	0,0100	0,0118
Pirimifós-metílico	0,0080	0,0118
Tebuconazol	0,0083	0,0100
Tiacloprido	0,0070	0,0100

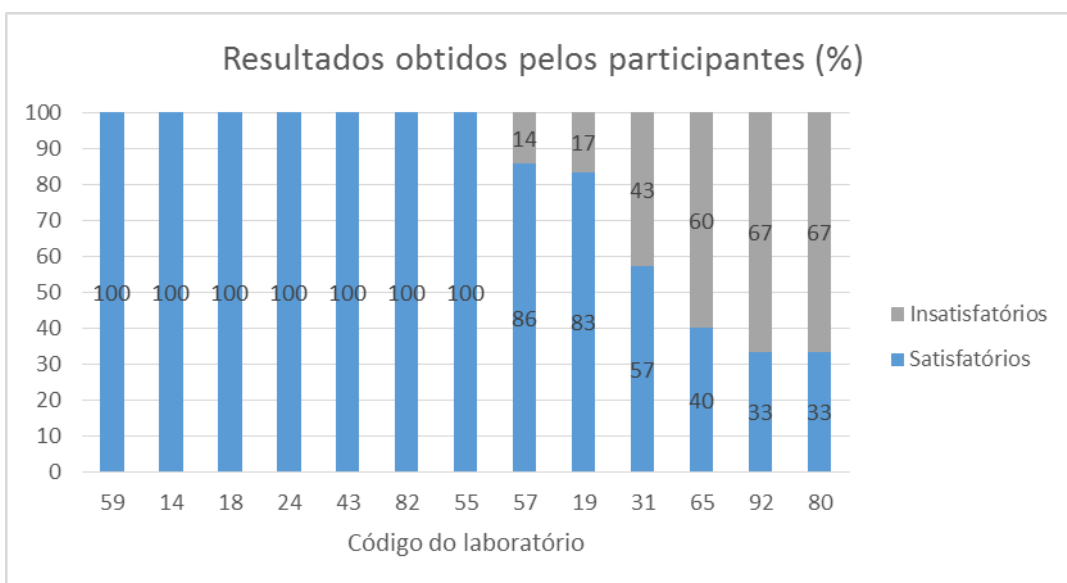
Observações sobre o desempenho dos laboratórios são apresentadas a seguir conforme os dados apresentados na Tabela II.13 e nas Figuras II.1 e II.2.

**Tabela II.13** - Dados analíticos declarados pelos participantes.

Código	Extração	Purificação	Técnica cromatográfica	Detector	Calibração	Matriz na calibração
59	QuEChERS- Acetato	MgSO <sub>4</sub> , C18 e PSA	LC	MS/MS	Único ponto	Sim
14	QuEChERS- Citrato	PSA	LC	MS/MS	Curva	Sim
18	QuEChERS	PSA e MgSO <sub>4</sub>	HPLC	MS/MS	Curva	Não
92	DFG-S19	GPC	GC/CL	MS/MS- ECD-NPD- FPD	Único ponto	Não
80	Estático	Não	CG	FPD-ECD	Curva	Não
24	QuEChERS- Acetato	MgSO <sub>4</sub> , C18 e PSA	UPLC	MS/MS	Curva	Sim
43	Mini-Luke	Não	LC	MS/MS	Curva	Sim
57	QuEChERS	MgSO <sub>4</sub> e PSA	HPLC	MS/MS	Curva	Sim
31	QuEChERS	150mg de MgSO <sub>4</sub> e 50mg de PSA / 1mL extrato	UPLC/GC	MS/MS	Curva	Sim
19	QuEChERS- Acetato	MgSO <sub>4</sub> e C18	LC	MS/MS	Curva	Sim
82	GPC	GPC	CG	FPD	Único ponto	Não
65	QuEChERS	Não	HPLC	MS/MS	Curva	Não
55	QuEChERS	PSA e MgSO <sub>4</sub>	LC	MS/MS	Curva	Sim



**Figura II.1** - Porcentagem dos resíduos do escopo analisados pelos participantes.



**Figura II.2** - Resumo dos resultados obtidos pelos participantes.

### 3.9 Não declaração de limites de detecção e de quantificação

O laboratório que não declarou seus limites de detecção e de quantificação teve esses resultados considerados insatisfatórios, pois as concentrações dos agrotóxicos presentes nos itens de ensaio eram pelo menos duas vezes superiores

aos limites de quantificação (0,01mg/kg) que têm sido utilizados nos programas de monitoramento e fiscalização dos alimentos que chegam à população brasileira.

### **3.10 Calibração em matriz**

Alguns aspectos chamam a atenção para laboratórios que obtiveram resultados insatisfatórios. Comparando-se as informações fornecidas pelos laboratórios (Tabela II.13), pode-se verificar que os três laboratórios que obtiveram a maior porcentagem de resultados insatisfatórios não utilizaram padrão em matriz para fazer a quantificação. A importância da matriz na calibração para uma quantificação eficiente foi relatada por YARITA e colaboradores em 2015, quando foi constatado que mesmo para a quantificação utilizando-se diluição isotópica por espectrometria de massas a presença de matriz na calibração é determinante. O efeito negativo da não utilização de calibração em matriz também já foi observado em um ensaio de proficiência de resíduos de agrotóxicos em arroz realizado com a participação de 57 laboratórios japoneses (OTAKE et al, 2014). Já no estudo realizado por YARITA e colaboradores em 2015, a utilização ou não de calibração em matriz ou o uso de protetores de analitos não foram significativos para a obtenção de resultados satisfatórios na determinação de resíduos de agrotóxicos em soja. Ressalta-se aqui o fato de que a combinação dos agrotóxicos e das matrizes em um ensaio de proficiência são limitados e que o efeito de matriz é importante para a quantificação de muitos compostos. Como trata-se de método de multirresíduos, recomenda-se que a calibração seja sempre feita em matriz (SANTE, 2015). Observa-se que todos declararam ter o método validado. Destaca-se aqui a importância dos ensaios interlaboratoriais para a detecção de problemas analíticos em diferentes matrizes e concentrações e que a utilização de material de referência certificado é altamente recomendável (SANTE, 2015), para a verificação da exatidão da medição. Infelizmente a oferta de tais materiais tão valiosos para a garantia da qualidade analítica dos resultados gerados por um laboratório é escassa, devido a isso, um dos objetivos deste estudo foi também identificar os laboratórios especialistas para a produção de um material de referência certificado.



### **3.11 Falsos positivos**

Neste estudo não foram reportados resultados falso positivos, possivelmente pela maioria dos laboratórios já utilizarem detectores específicos. A diminuição no número de falso positivos foi relatada por MEDINA-PASTOR e colaboradores em 2010 ao constatar que de 1996 a 2008 o uso de detectores não específicos entre os participantes veio diminuindo.

### **3.12 Falsos negativos**

Quanto aos falsos negativos, dos quatro laboratórios que apresentaram tais resultados, três não utilizaram matriz no padrão de calibração e dois utilizaram detectores não específicos. A diminuição do uso de detectores não específicos foi apontada no estudo realizado por MEDINA-PASTOR e colaboradores em 2010 como uma das causas de ao longo dos ensaios de proficiência realizados na União Europeia verificar-se a diminuição do número de resultados falso negativos.

### **3.13 Método de extração**

Quanto ao método de extração, 9 dos 13 laboratórios utilizaram o método Quechers, mas não se conclui que seja o melhor método, pois um dos laboratórios que analisaram todos os agrotóxicos e de maneira satisfatória utilizou o método Mini-Luke.

### **3.14 Curva de calibração ou único ponto**

Quanto ao uso de curva de calibração ou único ponto para quantificação, não se conclui que a quantificação com o único ponto é inadequada, como já previsto no documento SANTE 2015, tomadas as devidas precauções, pois um dos laboratórios que analisou todos os resíduos e de maneira satisfatória também utilizou esta forma de quantificação.

### **3.15 CL-EM/EM**

CL-EM/EM foi utilizada por 11 dos 13 laboratórios, comprovando o predomínio da utilização desta técnica em análise de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos.

### **3.16 Considerações finais**

Neste estudo, 38% dos laboratórios que participaram do ensaio de proficiência analisaram todos os resíduos presentes nos itens de ensaio de forma satisfatória. Porcentagem semelhante foi obtida no estudo de DEHOUCK e colaboradores, em 2015, quando 30% dos laboratórios que participaram do ensaio de proficiência de resíduos de agrotóxicos em uva analisaram todos os resíduos acrescentados aos itens de ensaio de forma satisfatória. Assim, nos resultados dos dois estudos constata-se que ainda é necessário aprimoramento no desenvolvimento dos métodos multirresíduos para que sejam capazes de analisar um amplo número de resíduos de agrotóxicos com maior acurácia. Essas baixas porcentagens também refletem as dificuldades para a obtenção de resultados satisfatórios para todos os compostos analisados em métodos multirresíduos (MEDINA-PASTOR et al, 2010).

## **4 CONCLUSÃO**

A determinação do valor designado e do desvio padrão para a avaliação da proficiência deve ser realizada com muita cautela para ensaios de proficiência com número reduzido de participantes. Comprovou-se que a utilização dos fatores h e k foram eficazes tanto para o tratamento de outliers quanto para a avaliação da proficiência dos participantes, mas que, mesmo assim, a análise crítica do provedor quanto aos resultados é extremamente importante tanto para não gerar alertas desnecessários quanto para não deixar de contribuir com o aprimoramento da qualidade das análises dos participantes. Ressalta-se também que as advertências

não foram necessárias ao se utilizar este método, pois o mesmo foi capaz de distinguir claramente os resultados satisfatórios dos insatisfatórios.

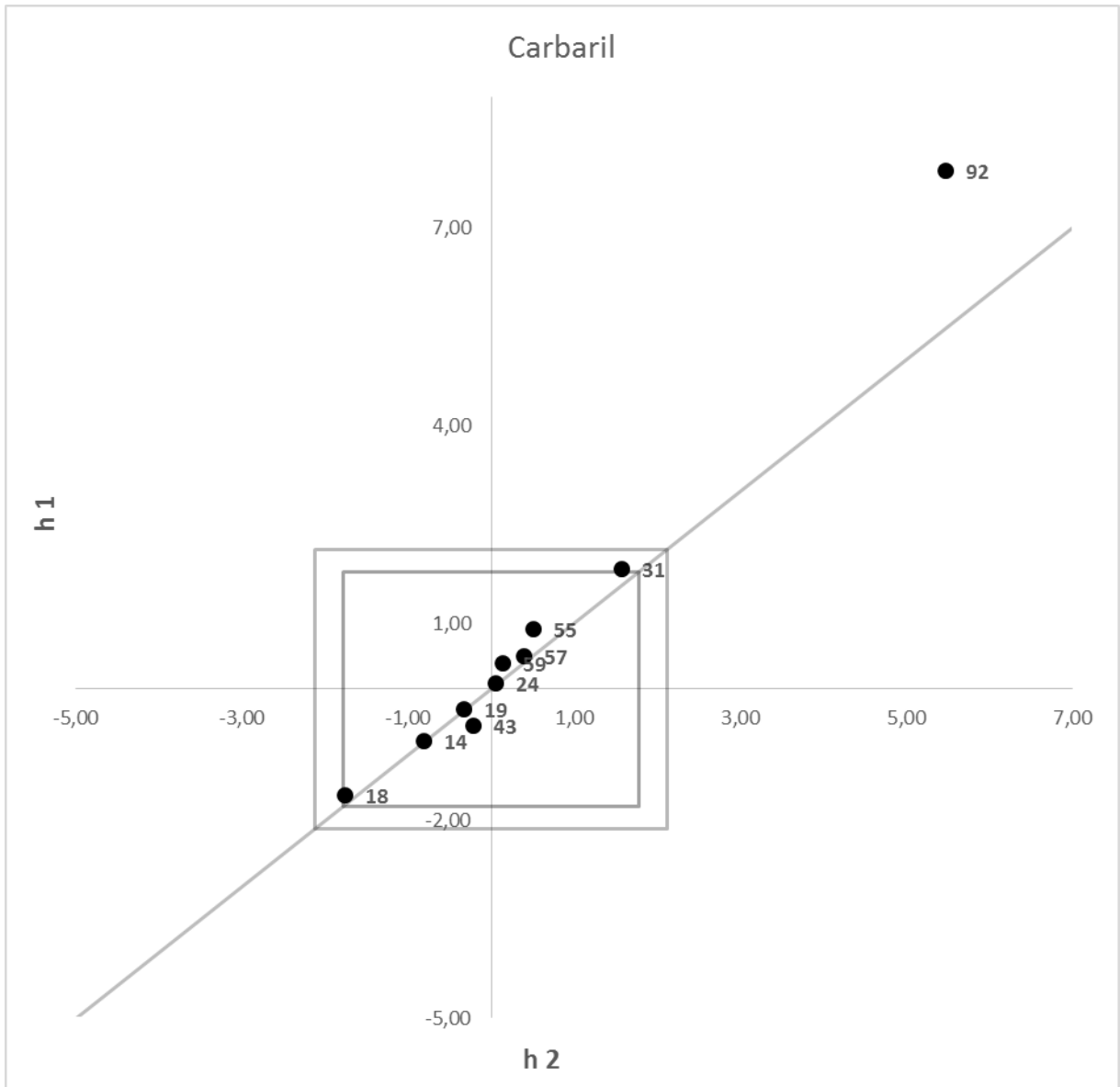
## 5 APÊNDICE

**Tabela II.A.1** - Dados do Carbaril.

Carbaril							
Código	Item 1	Item 2	R	LD	LQ	h	k
59	0,035	0,037	97	0,003	0,010	0,270	1,115
14	0,027	0,027	86	0,005	0,010	-0,797	0,000
18	0,019	0,020	96	0,005	0,010	-1,687	0,558
92	0,080	0,100	81	0,025	0,050	6,676	11,152
80	NT	NT	-	-	-	-	-
24	0,034	0,034	92	0,008	0,010	0,069	0,112
43	0,032	0,029	88	0,003	0,010	-0,382	1,673
57	0,037	0,038	95	0,002	0,010	0,448	0,454
31	0,047	0,049	99	0,005	0,010	1,694	1,115
19	0,031	0,031	73	0,009	0,030	-0,323	0,000
82	NT	NT	-	-	-	-	-
65	ND	ND	-	0,003	-	-	-
55	0,038	0,041	94	0,005	0,010	0,709	1,784

R - Recuperação (%); LD - Limite de detecção (mg/kg); LQ - Limite de quantificação (mg/kg);

ND - Não detectado; NT - Não testado



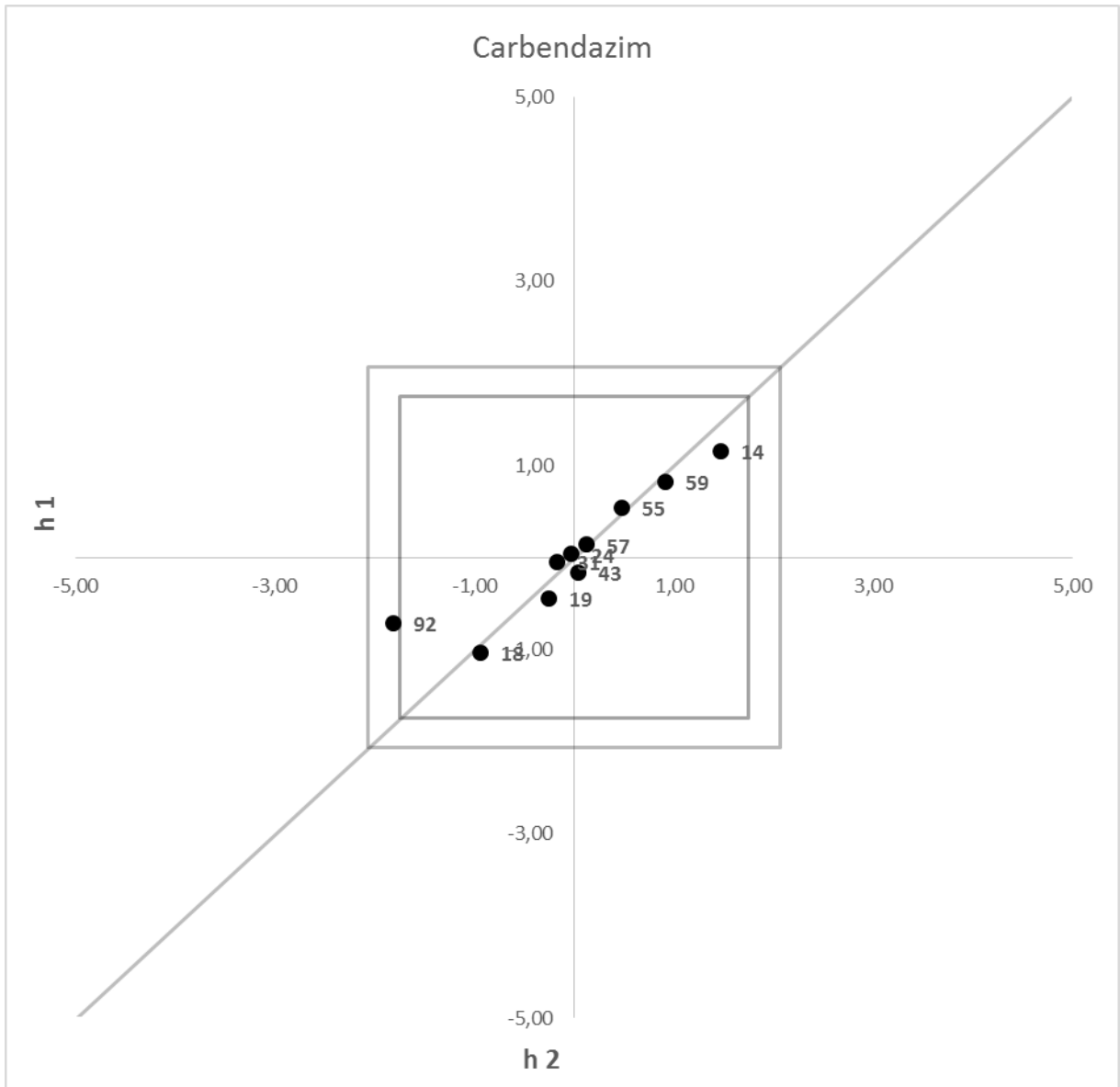
**Figura II.A.1 - Gráfico de Youden para Carbaril.**

**Tabela II.A.2 - Dados do Carbendazim.**

Carbendazim							
Código	Item 1	Item 2	R	LD	LQ	h	k
59	0,045	0,044	97	0,003	0,010	0,871	0,858
14	0,050	0,047	76	0,005	0,010	1,309	2,573
18	0,028	0,027	93	0,005	0,010	-0,990	0,858
92	0,020	0,030	90	0,005	0,010	-1,264	8,578
80	NT	NT	-	-	-	-	-
24	0,036	0,037	94	0,008	0,010	0,001	0,429
43	0,037	0,035	99	0,003	0,010	-0,060	1,716
57	0,038	0,038	86	0,003	0,010	0,132	0,039
31	0,035	0,036	107	0,005	0,010	-0,114	0,858
19	0,034	0,032	77	0,009	0,030	-0,350	1,596
82	NT	NT	-	-	-	-	-
65	NT	NT	-	-	-	-	-
55	0,041	0,041	81	0,005	0,010	0,510	0,343

R - Recuperação (%); LD - Limite de detecção (mg/kg); LQ - Limite de quantificação (mg/kg);

ND - Não detectado; NT - Não testado



**Figura II.A.2 - Gráfico de Youden para Carbendazim.**

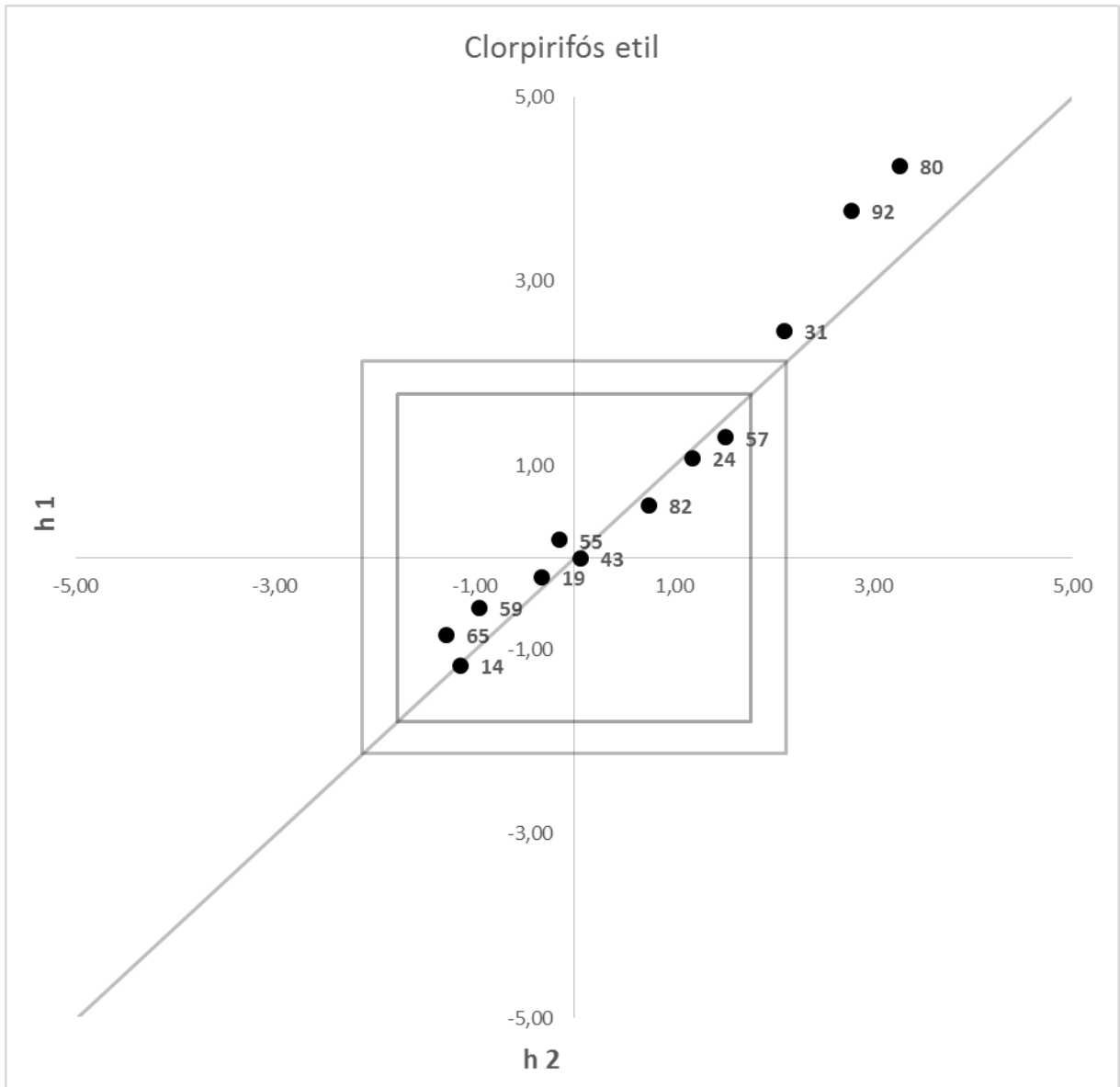
**Tabela II.A.3 - Dados do Clorpirifós.**

Clorpirifós							
Código	Item 1	Item 2	R	LD	LQ	h	k
59	0,063	0,071	106	0,003	0,010	-0,750	1,533
14	0,059	0,058	91	0,005	0,010	-1,162	0,192
18	NT	NT	-	-	-	-	-
92	0,140	0,160	95	0,005	0,010	3,277	3,833
80	0,150	0,170	104	0,030	0,100	3,762	3,833
24	0,107	0,105	99	0,008	0,010	1,133	0,498
43	0,084	0,082	100	0,003	0,010	0,026	0,383
57	0,114	0,109	94	0,002	0,010	1,411	0,929
31	0,126	0,133	85	0,005	0,010	2,282	1,342
19	0,076	0,078	75	0,009	0,030	-0,270	0,378
82	0,098	0,094	NA	0,008	0,010	0,657	0,767
65	0,056	0,065	70	0,003	0,010	-1,065	1,725
55	0,080	0,086	95	0,010	0,020	0,019	1,284

R - Recuperação (%); LD - Limite de detecção (mg/kg); LQ - Limite de quantificação (mg/kg);

ND - Não detectado; NT - Não testado





**Figura II.A.3** - Gráfico de Youden para Clorpirifós.

**Tabela II.A.4 - Dados do Miclobutanil.**

Miclobutanil							
Código	Item 1	Item 2	R	LD	LQ	h	k
59	0,052	0,058	91	0,003	0,010	0,648	1,819
14	0,039	0,038	94	0,005	0,010	-0,746	0,303
18	0,031	0,028	77	0,005	0,010	-1,507	0,910
92	NT	NT	-	-	-	-	-
80	ND	ND	-	0,010	0,020	-	-
24	0,049	0,049	101	0,008	0,010	0,166	0,061
43	0,037	0,033	86	0,003	0,010	-1,042	1,213
57	0,067	0,067	92	0,003	0,010	1,649	0,012
31	0,054	0,057	89	0,005	0,010	0,690	0,910
19	ND	ND	72	0,018	0,060	-	-
82	NT	NT	-	-	-	-	-
65	NT	NT	-	-	-	-	-
55	0,047	0,051	96	0,005	0,010	0,141	1,213

R - Recuperação (%); LD - Limite de detecção (mg/kg); LQ - Limite de quantificação (mg/kg);

ND - Não detectado; NT - Não testado

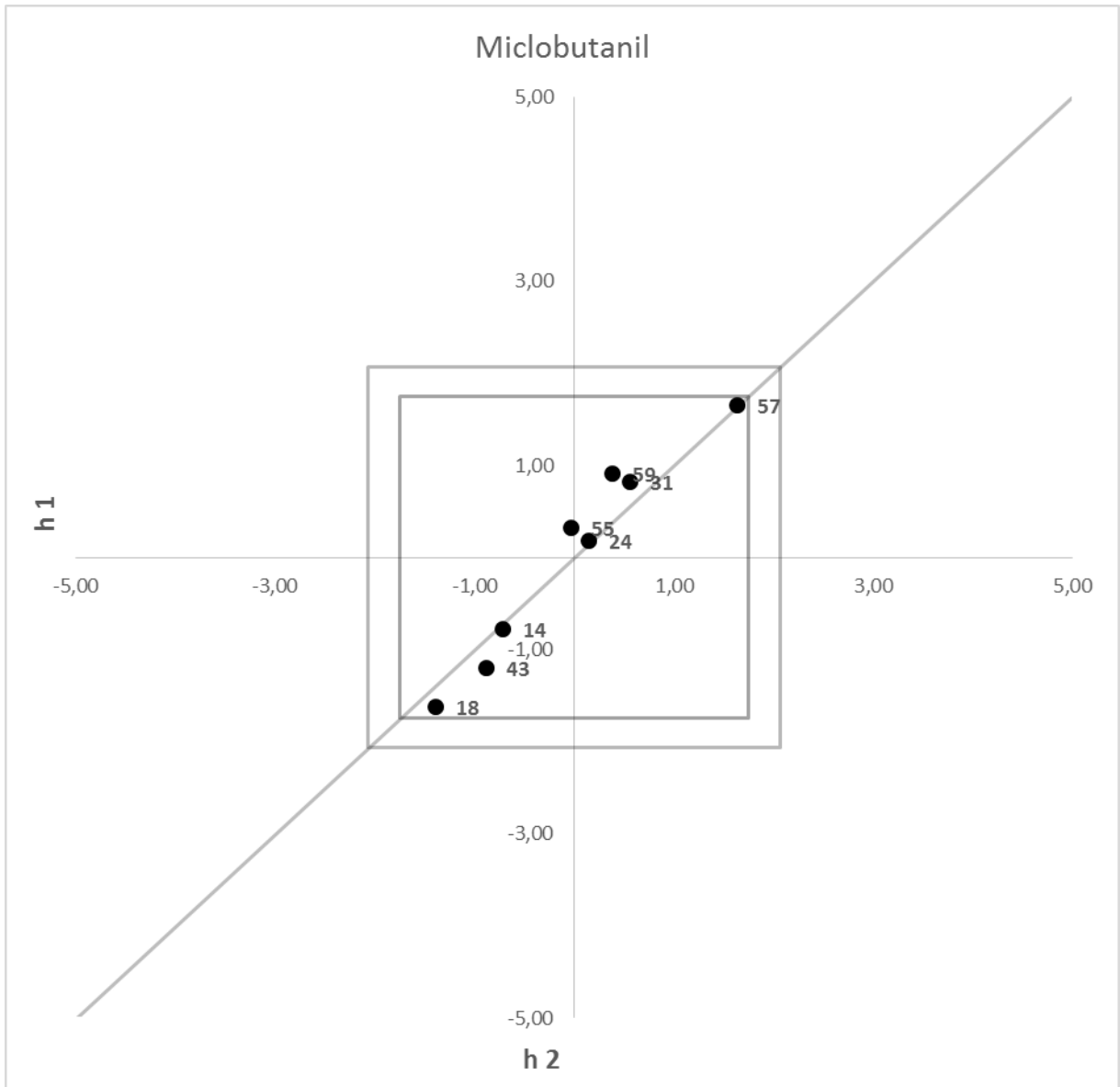


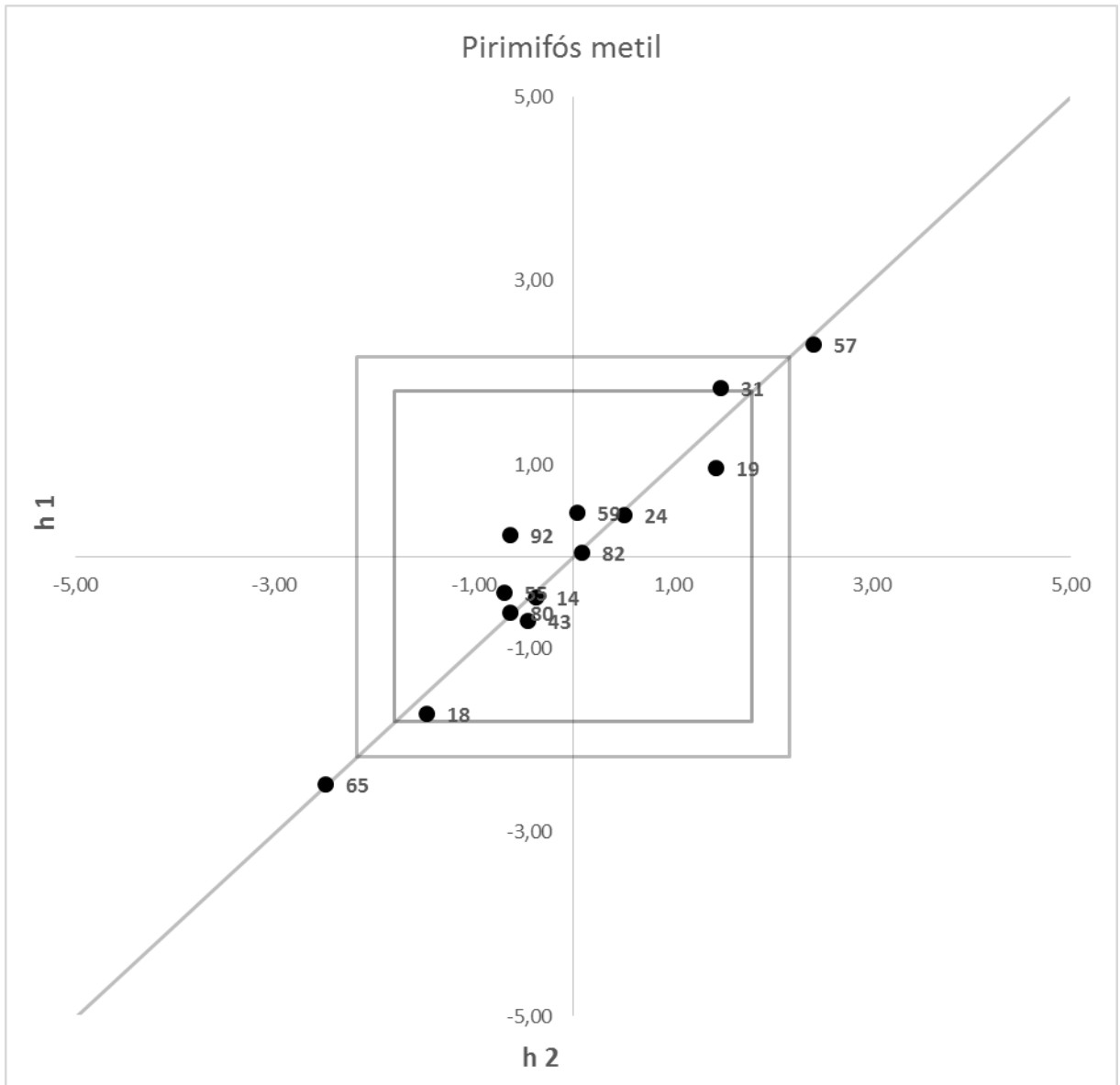
Figura II.A.4 - Gráfico de Youden para Miclobutanil.

**Tabela II.A.5 - Dados do Pirimifós-metílico.**

Pirimifós-metílico							
Código	Item 1	Item 2	R	LD	LQ	h	k
59	0,048	0,053	94	0,003	0,010	0,263	1,533
14	0,043	0,042	82	0,005	0,010	-0,412	0,307
18	0,030	0,027	102	0,005	0,010	-1,594	0,920
92	0,040	0,050	92	0,001	0,010	-0,201	3,066
80	0,040	0,040	109	0,030	0,100	-0,623	0,000
24	0,054	0,053	98	0,008	0,010	0,483	0,307
43	0,042	0,039	83	0,003	0,010	-0,581	0,920
57	0,076	0,075	89	0,003	0,010	2,359	0,439
31	0,065	0,069	95	0,005	0,010	1,656	1,227
19	0,065	0,059	77	0,009	0,030	1,202	1,768
82	0,049	0,048	104	0,008	0,010	0,065	0,228
65	0,018	0,018	70	0,003	0,010	-2,480	0,000
55	0,039	0,043	89	0,005	0,010	-0,547	1,043

R - Recuperação (%); LD - Limite de detecção (mg/kg); LQ - Limite de quantificação (mg/kg);

ND - Não detectado; NT - Não testado



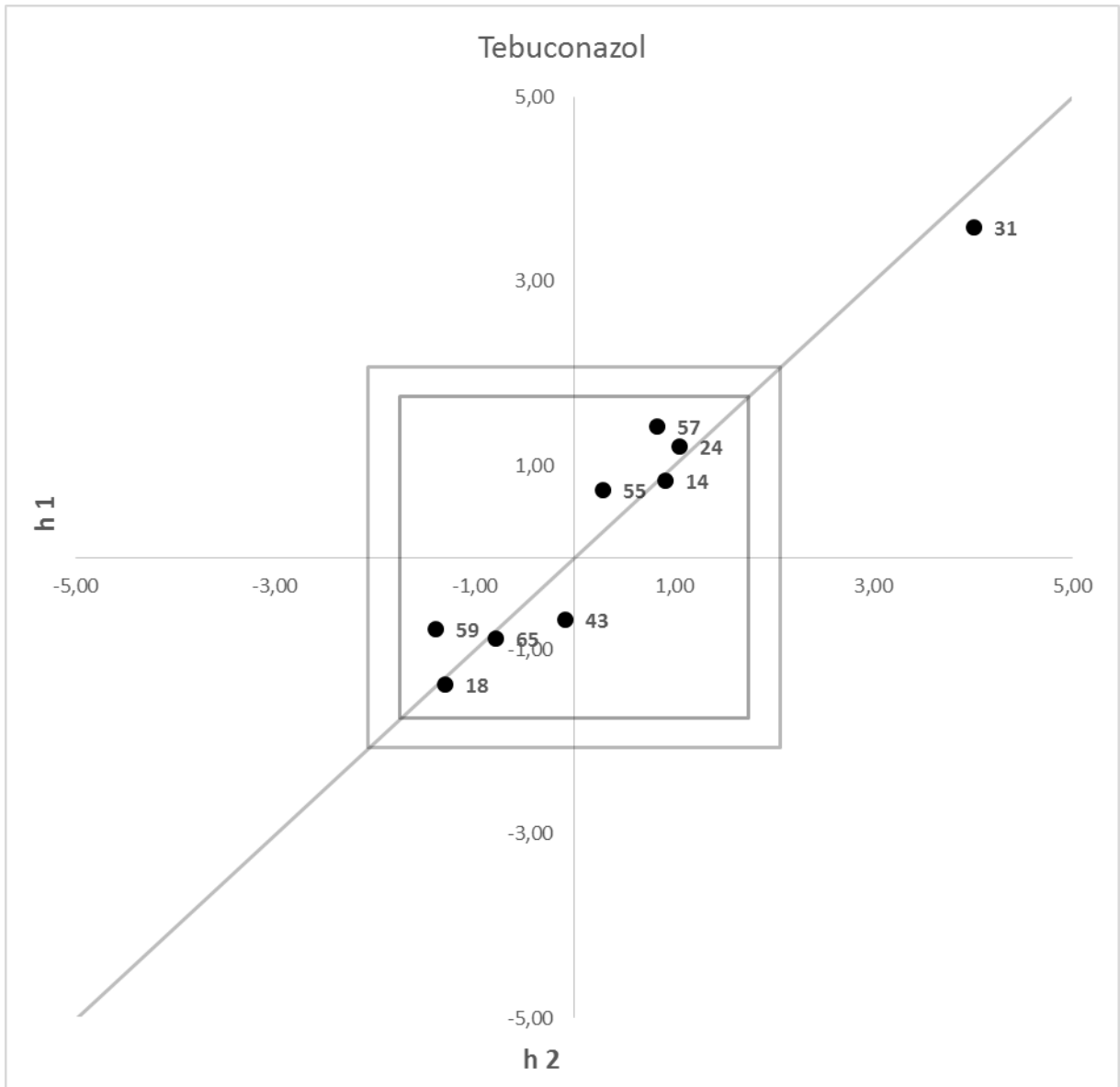
**Figura II.A.5 - Gráfico de Youden para Pirimifós-metílico.**

**Tabela II.A.6 - Dados do Tebuconazol.**

Tebuconazol							
Código	Item 1	Item 2	R	LD	LQ	h	k
59	0,026	0,032	96	0,003	0,010	-1,086	1,499
14	0,049	0,048	93	0,005	0,010	0,874	0,250
18	0,027	0,026	87	0,005	0,010	-1,337	0,250
92	ND	ND	-	-	-	-	-
80	NT	NT	-	-	-	-	-
24	0,050	0,052	105	0,008	0,010	1,130	0,325
43	0,039	0,033	84	0,003	0,010	-0,382	1,499
57	0,048	0,054	91	0,004	0,010	1,128	1,434
31	0,080	0,075	97	0,005	0,010	3,798	1,099
19	NT	NT	-	-	-	-	-
82	NT	NT	-	-	-	-	-
65	0,032	0,031	104	0,003	0,010	-0,834	0,250
55	0,043	0,047	93	0,005	0,010	0,507	1,074

R - Recuperação (%); LD - Limite de detecção (mg/kg); LQ - Limite de quantificação (mg/kg);

ND - Não detectado; NT - Não testado



**Figura II.A.6 - Gráfico de Youden para Tebuconazol**

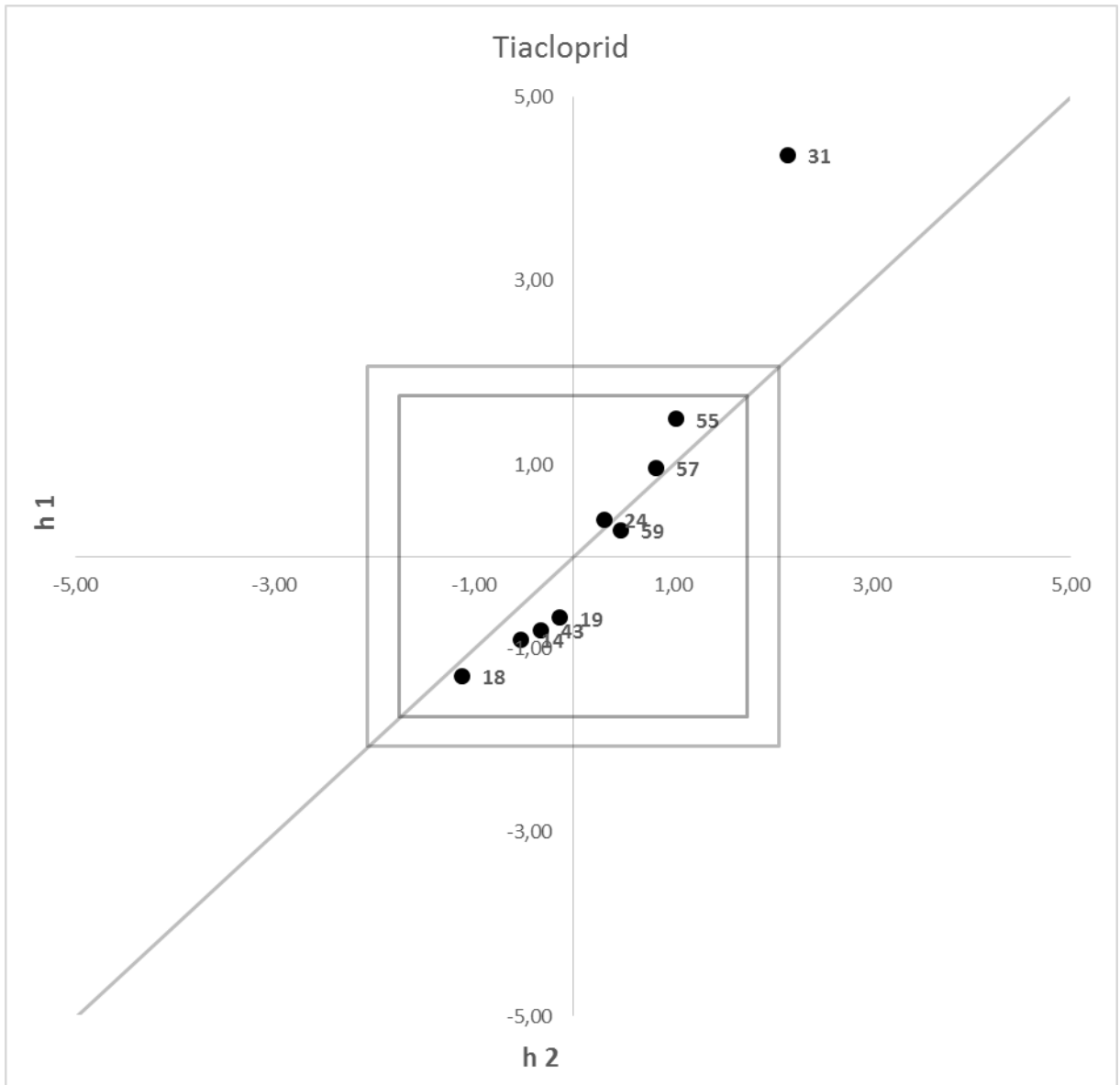
**Tabela II.A.7 - Dados do Tiacloprido.**

Tiacloprido							
Código	Item 1	Item 2	R	LD	LQ	h	k
59	0,045	0,043	107	0,003	0,010	0,381	0,564
14	0,035	0,031	92	0,005	0,010	-0,714	1,127
18	0,029	0,027	115	0,005	0,010	-1,212	0,564
92	ND	ND	-	-	-	-	-
80	NT	NT	-	-	-	-	-
24	0,043	0,044	98	0,008	0,010	0,356	0,197
43	0,037	0,032	87	0,003	0,010	-0,565	1,409
57	0,049	0,050	92	0,003	0,010	0,898	0,323
31	0,062	0,084	107	0,005	0,010	3,263	6,227
19	0,039	0,033	83	0,009	0,030	-0,405	1,536
82	NT	NT	-	-	-	-	-
65	ND	ND	-	0,003	0,010	-	-
55	0,051	0,055	91	0,005	0,010	1,262	1,268

R - Recuperação (%); LD - Limite de detecção (mg/kg); LQ - Limite de quantificação (mg/kg);

ND - Não detectado; NT - Não testado





**Figura II.A.7 - Gráfico de Youden para Tiacloprido.**

### **CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FEIJÃO (PHASEOLUS VULGARIS, L.).**

#### **RESUMO**

Material de referência certificado para multirresíduos de agrotóxicos em feijão foi desenvolvido. Acetamiprido, Ciproconazol, Flutriafol, Piraclostrobina, Pirimifós-etílico, Pirimifós-metílico, Piriproxifem, Propargite, Propiconazol, Tebuconazol e Tetraconazol foram adicionados a feijão orgânico. Dois laboratórios selecionados a partir dos resultados de um ensaio de proficiência produziram os dados utilizados na caracterização. Os valores certificados e suas respectivas incertezas foram: 0,061 mg/kg  $\pm$  0,011 mg/kg para acetamiprido; 0,082 mg/kg  $\pm$  0,037 mg/kg para ciproconazol; 0,065 mg/kg  $\pm$  0,018 mg/kg para flutriafol; 0,072 mg/kg  $\pm$  0,013 mg/kg para imidacloprido; 0,048  $\pm$  0,022 para piraclostrobina; 0,049 mg/kg  $\pm$  0,023 mg/kg para piriproxifem; 0,079 mg/kg  $\pm$  0,009 mg/kg para propiconazol. Pirimifós-etílico, pirimifós-metílico e propargite não obtiveram resultados satisfatórios na avaliação da estabilidade ao transporte e o prazo de validade do padrão de tebuconazol expirou durante a produção do material. Tetraconazol não apresentou incerteza adequada ao uso para análise de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos.

Palavras-chave: validação de método, ensaio de proficiência, material de referência certificado, método multirresíduos, feijão, agrotóxicos.

## 1 INTRODUÇÃO

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos para investigar a relação entre exposição e riscos à saúde é importante, e para uma avaliação correta, resultados analíticos com acurácia são necessários (OTAKE *et al.*, 2013).

A análise de multirresíduos de agrotóxicos é complexa, pois há uma ampla faixa de diferentes estruturas químicas presente entre os agrotóxicos que pode comprometer a acurácia dos métodos multirresíduos para certos analitos (GRIMALT *et al.*, 2015; OTAKE *et al.*, 2013).

O uso de materiais de referência certificados é recomendado para garantir a qualidade dos resultados analíticos produzidos pelos laboratórios que analisam resíduos de agrotóxicos em alimentos (ISO, 2005; SANTE, 2015).

O material de referência certificado pode ser utilizado na validação de um método para avaliação da veracidade e para assegurar a rastreabilidade dos resultados, além de poder ser utilizado para monitorar o desempenho do método validado ao longo do tempo (GRIMALT *et al.*, 2015).

Esforços têm sido feitos para a produção desses materiais, mas ainda é rara a sua oferta e, conseqüentemente, seu uso entre os laboratórios. Na literatura, já foram produzidos materiais de referência de resíduos de agrotóxicos em arroz integral, soja, maçã, repolho e chá verde (GRIMALT *et al.*, 2015; OTAKE *et al.*, 2013; OTAKE *et al.*, 2011; OTAKE *et al.*, 2009; SANTE, 2015; SIN *et al.*, 2015; SIN *et al.*, 2012; YARITA *et al.*, 2014).

Com o objetivo de contribuir para a garantia da qualidade dos dados gerados pelos laboratórios brasileiros para alimentos que apresentam alto consumo pela população, foi produzido um material de referência certificado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em feijão.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e amostras

Os padrões de agrotóxicos foram adquiridos do Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). Reagentes utilizados: acetona para análise (pa) foi adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha), acetona para análise de resíduo (par) foi adquirida de J.T.Baker (Phillipsburg, EUA), acetonitrila para cromatografia líquida de alta eficiência foi adquirida da Merck (Darmstadt, Alemanha), metanol para cromatografia líquida de alta eficiência foi adquirido de J.T. Baker (Center Valley, EUA), ácido fórmico e formiato de amônio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de magnésio anidro foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA), água ultrapura foi gerada pelo Milli-Q Gradient da Millipore (Billerica, EUA), sulfato de magnésio anidro foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha), cloreto de sódio pa foi adquirido de J.T.Baker (Phillipsburg, EUA) e amina primária secundária (PSA) com partículas de 40 µm foi adquirida da Agilent Technologies (Santa Clara, EUA). Equipamentos utilizados: Cromatógrafo líquido modelo 1200 acoplado a espectrômetro de massas sequencial (triploquadrupolo) modelo 6460 da Agilent Technologies (Santa Clara, EUA) com software Masshunter versão B.07.01, moinho e banho termostatizados da Marconi (Piracicaba, Brasil) modelos MA 090/CFT e MA-184, respectivamente, homogeneizador em V da Marconi (Piracicaba, Brasil), câmara climática da Marconi (Piracicaba, Brasil) centrífuga refrigerada da Thermo Scientific (Waltham, EUA) e pipetadores automáticos Thermo Scientific (Waltham, EUA) e HBL Lab Soluções (Warszawa, Polônia), centrífuga refrigerada Jouan Cr3i Thermo Scientific (Waltham, EUA), balança Sartorius TE 612 (Gottingen, Alemanha), balança Scientech AS 210 (Boulder, EUA), balança Sartorius BP 211 D (Gottingen, Alemanha), freezer Thermo Scientific (Waltham, EUA), capelas químicas de exaustão Poliscience e Engelab. Feijão orgânico foi adquirido em loja de produtos orgânicos de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O laboratório produtor é acreditado na NBR ISO/IEC 17025 para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças pelo INMETRO CRL 0322 desde 2011.

## **2.2 Preparo e armazenamento do material**

O material foi preparado seguindo os requisitos da Norma ABNT ISO GUIA 34.

Sete quilos de feijão orgânico foram processados em moinho refrigerado.

Uma solução com os padrões de agrotóxicos em acetona PAR foi preparada para se obter uma concentração teórica de 0,04 mg/kg para Piraclostrobina, Pirimifós-etílico e Pirimifós-metílico; 0,05 mg/kg para Acetamiprido; 0,06 mg/kg para Piriproxifem, Propargite e Tetraconazol; 0,07 mg/kg para Ciproconazol e Flutriafol; 0,08 mg/kg para Propiconazol; e 0,10 mg/kg para Tebuconazol.

O feijão moído foi espalhado em sete recipientes largos que comportavam um quilo cada. Logo após, o feijão foi contaminado com gotas da solução, também dividida em sete volumes equivalentes, por toda a extensão do material. Aguardou-se a evaporação do solvente e uma primeira homogeneização foi feita utilizando-se uma espátula para garantir que grumos que por ventura tivessem sido formados fossem eliminados. Após isso, o material foi homogeneizado em homogeneizador durante 5 dias.

Foram pesados aproximadamente 40 g do material preparado em potes de prolipropileno. Os potes foram lacrados e armazenados em freezer.

## **2.3 Estudo da homogeneidade**

O estudo estatístico da homogeneidade foi realizado seguindo a ISO GUIA 35. Foram utilizados 17 itens de ensaio selecionados de forma aleatória e cada item foi analisado em triplicata. Análise de variância de fator único foi realizada.

## **2.4 Estudo da estabilidade**

O estudo estatístico da estabilidade foi realizado seguindo a ISO GUIA 35, utilizando-se a análise de variância a partir da regressão. Foram estudados 3 itens do ensaio, amostrados aleatoriamente e analisados em duplicata, a cada 4 meses, durante 12 meses.

Para simular as condições de transporte, três itens amostrados aleatoriamente do material foram armazenados em câmara climática por 6 dias a 50°C e foram analisados em duplicata. Os dados foram avaliados por análise de variância.

## **2.5 Convite aos laboratórios**

O convite para participação da caracterização foi feito a cinco laboratórios que analisaram todos os analitos e obtiveram apenas resultados satisfatórios em um ensaio de proficiência de resíduos de agrotóxicos em feijão realizado entre os laboratórios brasileiros.

## **2.6 Envio dos itens**

Foram enviados cinco itens contaminados e um item com amostra branca de feijão. Cada item continha aproximadamente 40g de amostra. Os itens foram envolvidos em plástico e enviados em caixas de isopor contendo gelo seco. O formulário de recebimento dos itens, as instruções para armazenamento e análise dos itens e o formulário para envio dos resultados que incluía um questionário sobre o método analítico que seria utilizado foram encaminhados por correio eletrônico aos laboratórios.

## **2.7 Determinação do valor de propriedade**

A estimativa do valor de propriedade foi feita pelo cálculo da média dos resultados enviados pelos laboratórios.

## **2.8 Determinação da incerteza do valor de propriedade**

A incerteza do valor de propriedade foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$U_{MRC} = k \sqrt{u_{lab}^2 + u_{repe}^2 + u_{homo}^2 + u_{estab}^2}$$

(Equação III.1)

$$v_{eff} = \frac{U_{MRC}^4}{\frac{U_{lab}^4}{g_{lab}} + \frac{U_{repe}^4}{g_{repe}} + \frac{U_{homo}^4}{g_{homo}} + \frac{U_{estab}^4}{g_{estab}}}$$

(Equação III.2)

onde,

$U_{MRC}$  = incerteza expandida a 95% de confiança do material de referência certificado;

$k$  = fator de abrangência de acordo com graus de liberdade efetivos ( $v_{eff}$ );

$u_{lab}$  = incerteza padrão relacionada aos resultados entre laboratórios;

$u_{repe}$  = incerteza padrão relacionada à repetibilidade dos resultados;

$u_{homo}$  = incerteza padrão relacionada à homogeneidade;

$u_{estab}$  = incerteza padrão relacionada à estabilidade;

$U_{MRC}$  = incerteza combinada do material de referência certificado;

$g_l$  = graus de liberdade.

A incerteza relacionada à estabilidade ao transporte não foi inserida no cálculo da estimativa da incerteza, pois as condições de transporte foram escolhidas de modo que não precisassem ser levadas em consideração.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

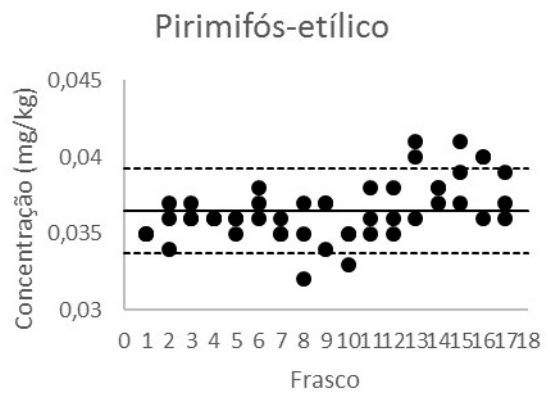
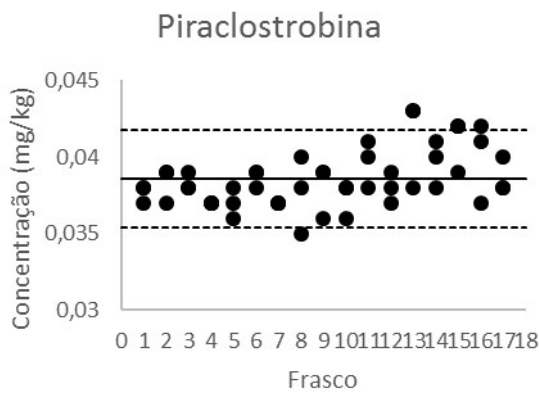
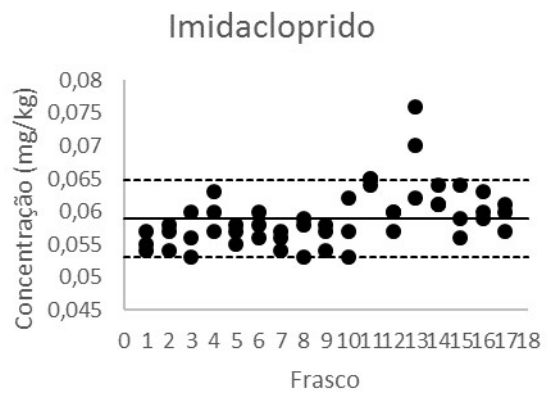
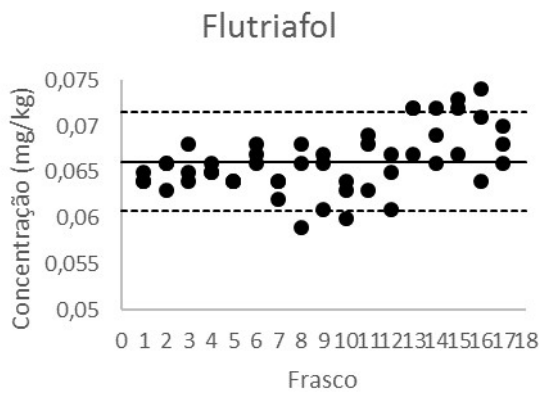
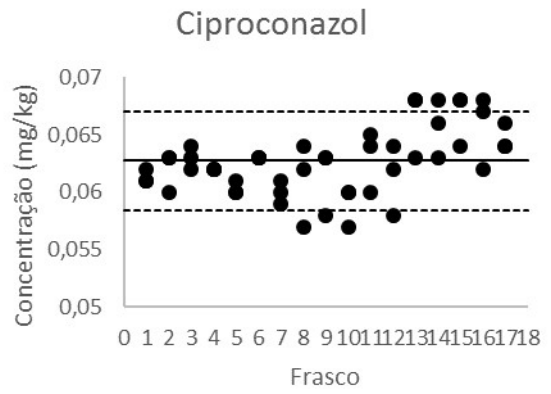
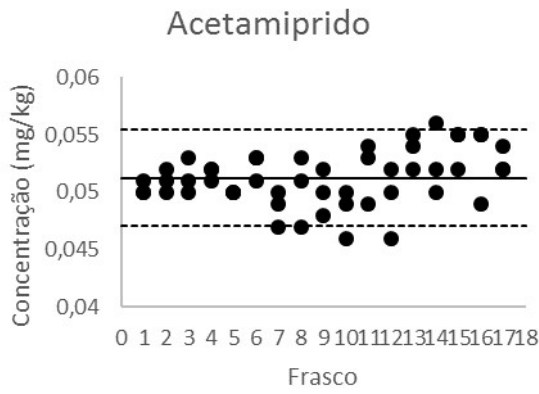
### **3.1 Laboratórios participantes**

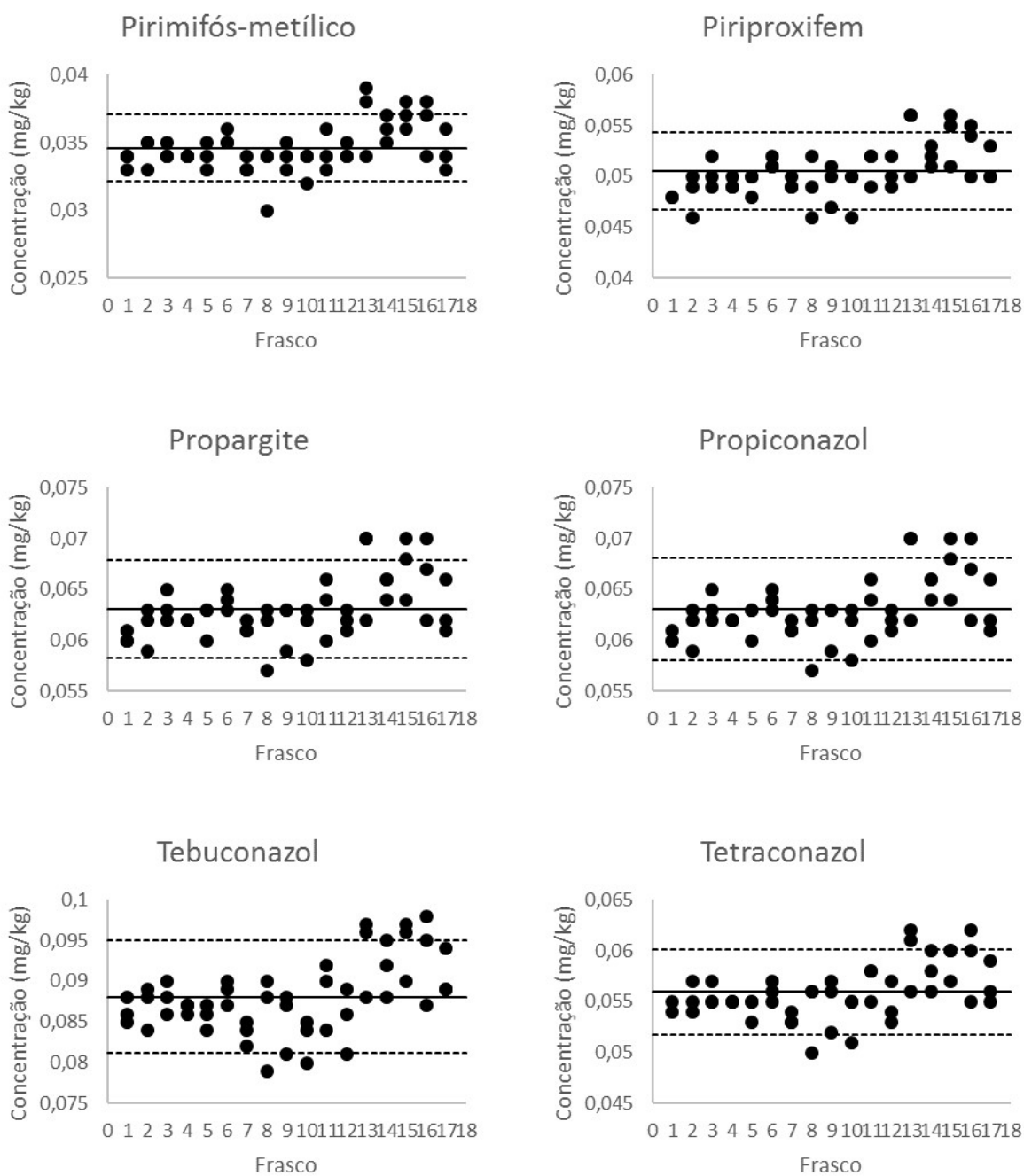
Três laboratórios aceitaram o convite para participar da caracterização do material de referência e enviaram os resultados, mas um deles não tinha o método validado e não era acreditado pelo Inmetro segundo a ISO 17025, portanto, os resultados tiveram que ser desconsiderados.

### **3.2 Estudo da homogeneidade**

Os dados obtidos no estudo da homogeneidade são apresentados na Figura III.1 e a contribuição da falta de homogeneidade para a incerteza do valor de propriedade é apresentada na tabela III.2. O quadrado médio entre frascos foi maior que o de dentro dos frascos para todos os analitos, portanto, a variância da homogeneidade não foi mascarada pela variância da repetibilidade do método.



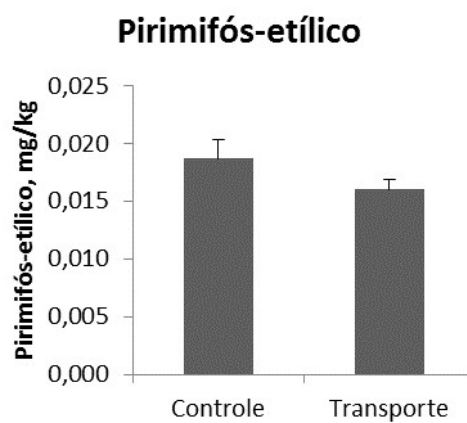
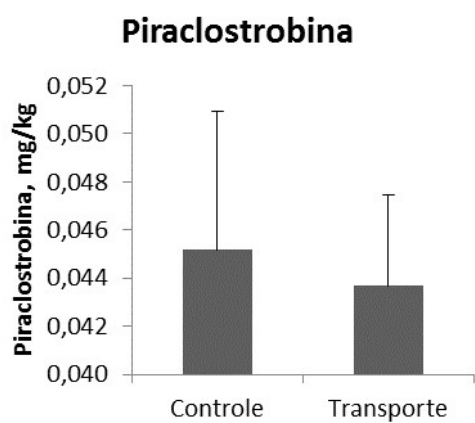
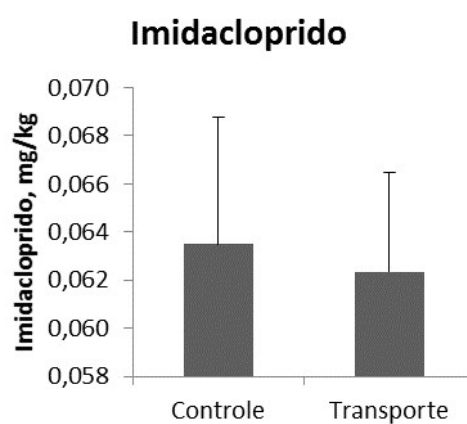
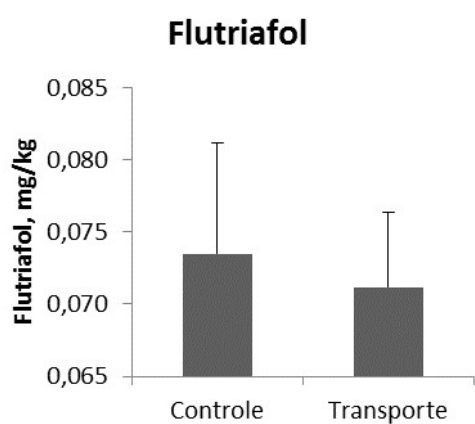
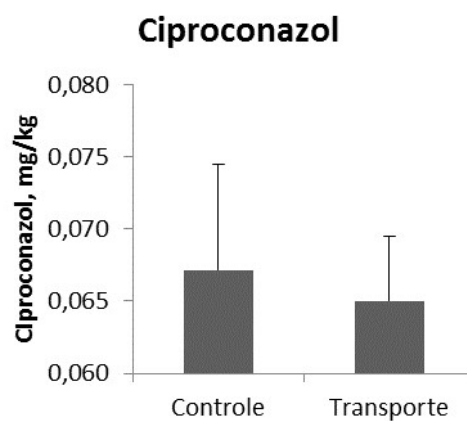
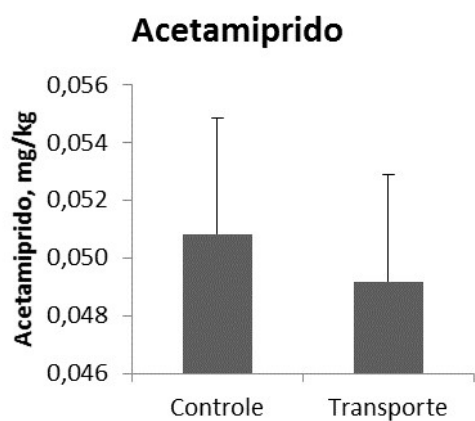


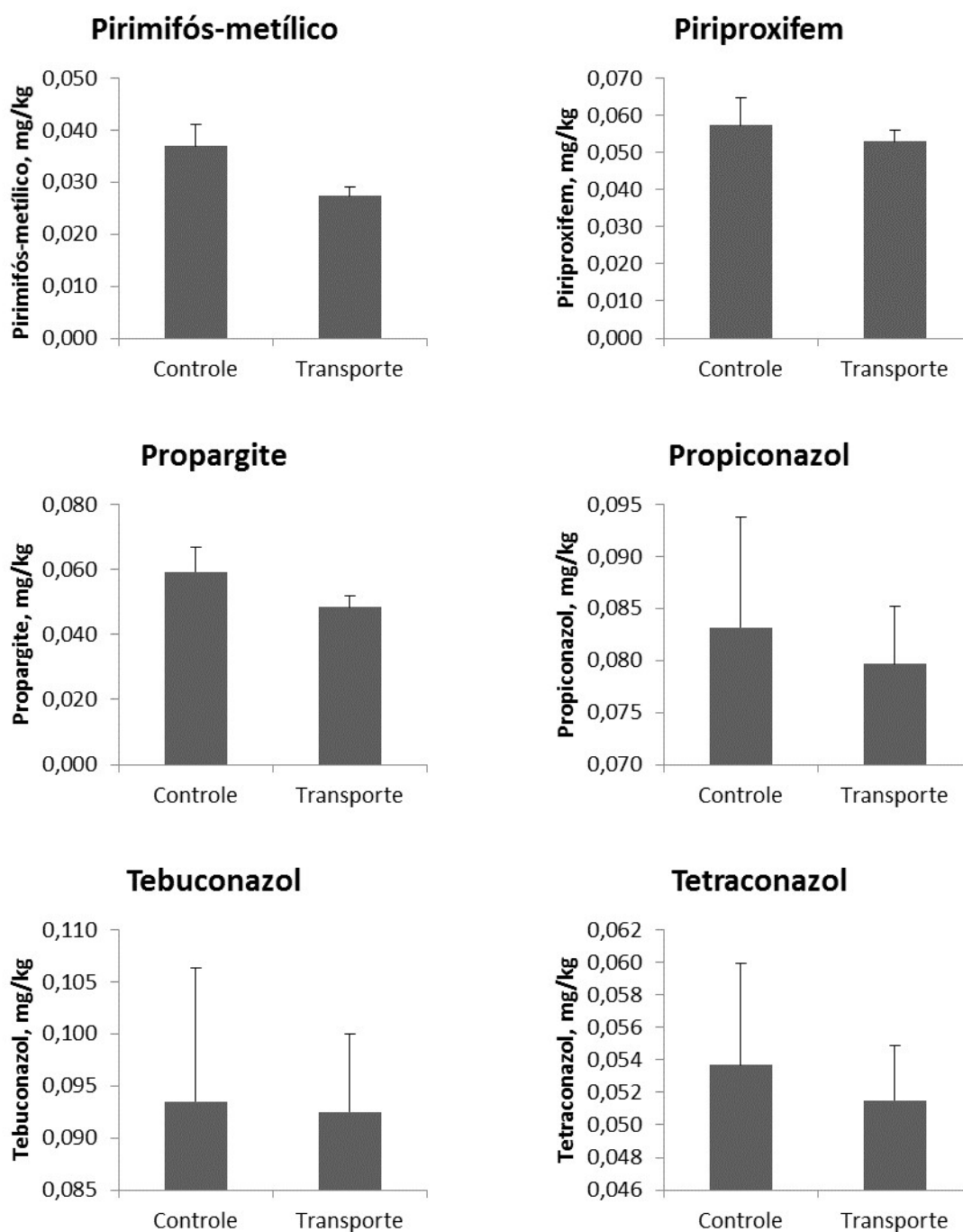


**Figura III.1** – Gráficos do estudo da homogeneidade.

### 3.3 Estudo da estabilidade

Quanto à avaliação da estabilidade ao transporte, o lote foi estável para todos os analitos, com exceção de Pirimifós-etílico, Pirimifós-metílico e Propargite (Figura III.2).

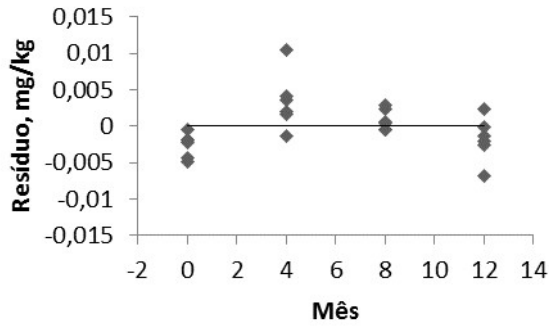




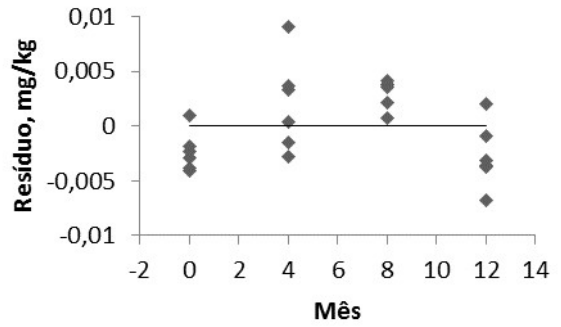
**Figura III.2** – Gráficos do estudo da estabilidade ao transporte.

Todos os agrotóxicos avaliados apresentaram resultados aceitáveis quanto à estabilidade a longo prazo. Os resultados são apresentados na figura III.3.

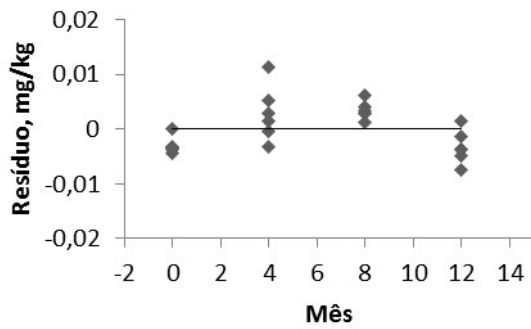
### Acetamiprido



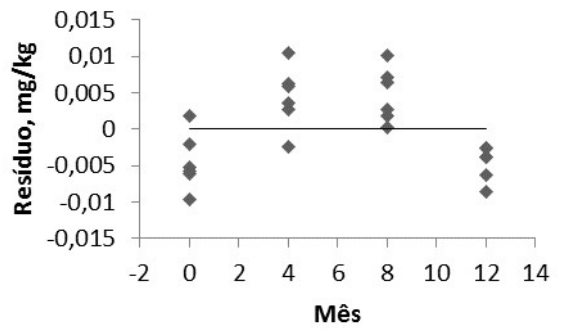
### Ciproconazol



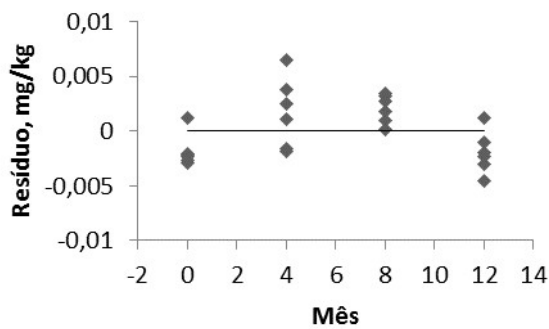
### Flutriafol



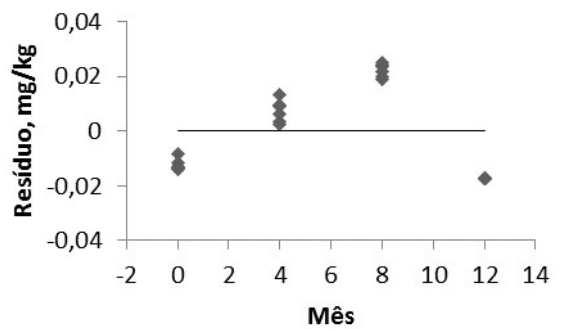
### Imidacloprido

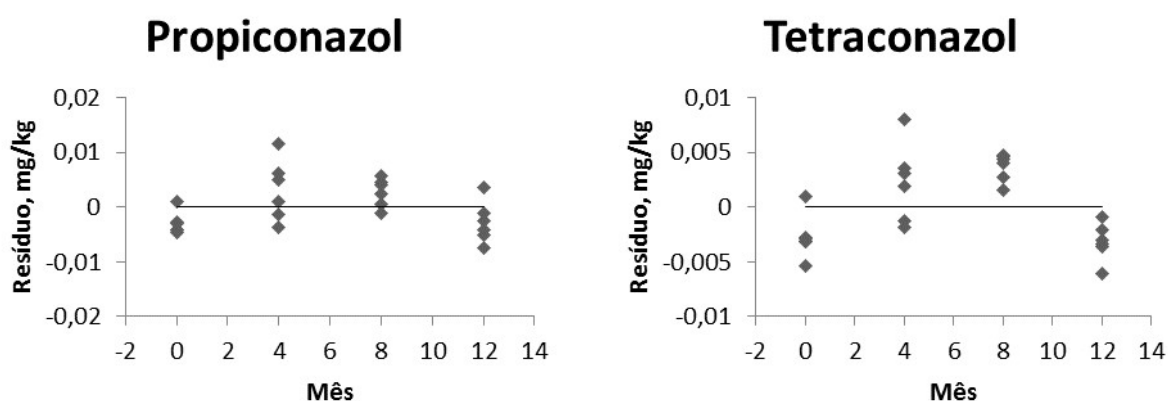


### Piraclostrobina



### Piriproxifem





**FIGURA III.3** – Avaliação da estabilidade a longo prazo.

Tebuconazol teve que ser desconsiderado, pois o prazo de validade do padrão expirou durante o desenvolvimento do material de referência certificado.

### 3.4 Determinação do valor de propriedade e da incerteza associada

Os valores de propriedade determinados e suas respectivas incertezas são apresentados na tabela III.1.

**Tabela III.1** – Dados do material de referência certificado.

Agrotóxico	Concentração		Valor certificado (mg/kg)	Incerteza (mg/kg)	Incerteza (%)	LMR (mg/kg)
	teórica (mg/kg)					
Acetamiprido	0,050		0,061	0,011	18	0,1
Ciproconazol	0,070		0,082	0,037	45	NA
Flutriafol	0,070		0,065	0,018	28	0,1
Imidacloprido	0,070		0,072	0,013	18	0,07
Piraclostrobina	0,040		0,048	0,022	46	0,1
Piriproxifem	0,060		0,049	0,023	47	0,01
Propiconazol	0,080		0,079	0,009	11	0,05
Tetraconazol	0,060		0,080	0,074	92	0,2

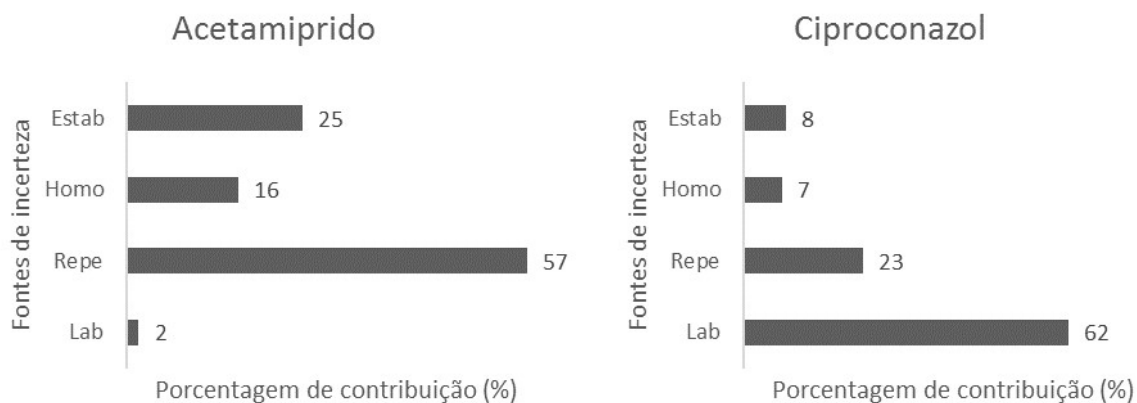
LMR – Limite máximo de resíduo, NA – Não autorizado.

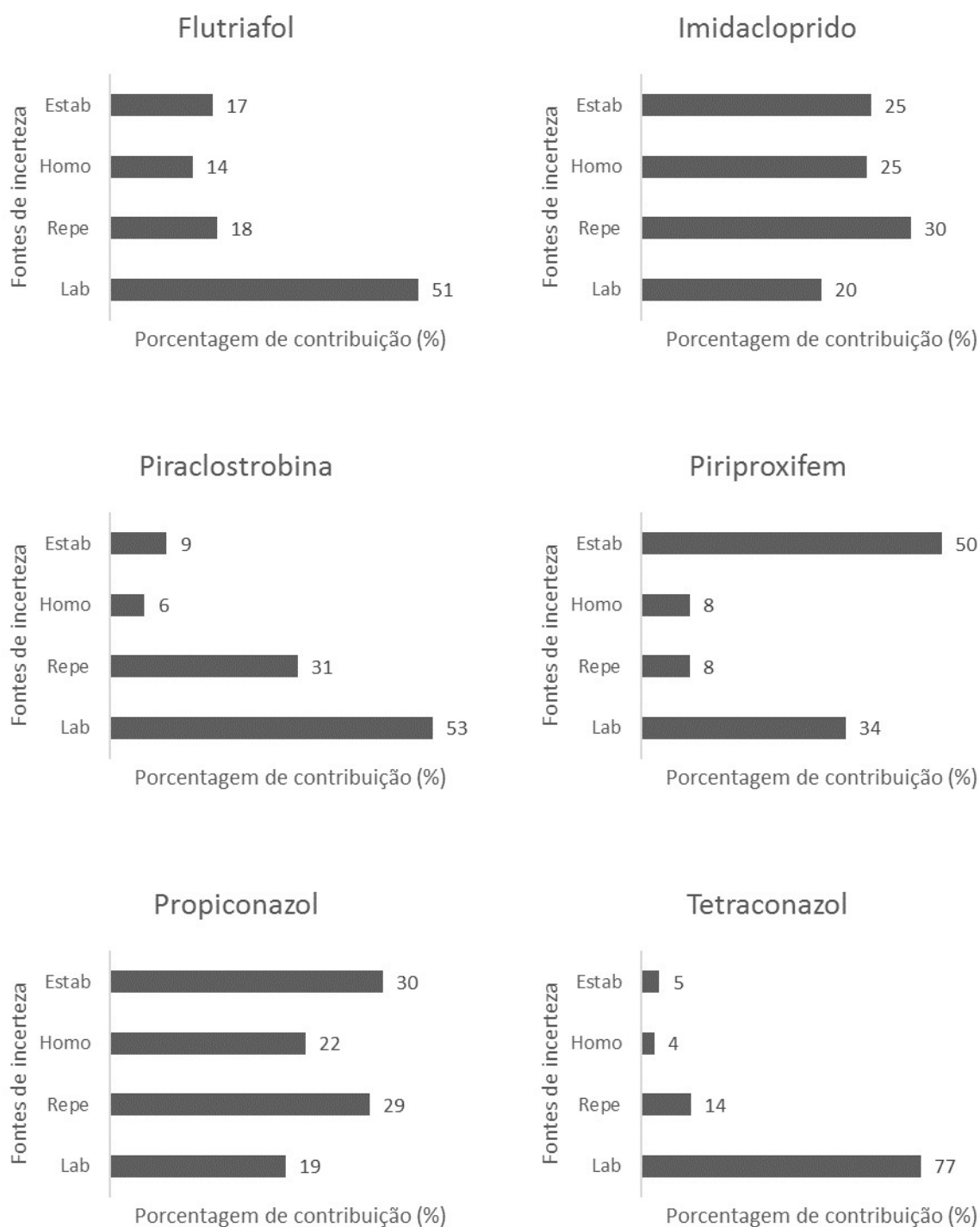
Os componentes das incertezas são apresentados na tabela III.2 e a porcentagem de contribuição de cada componente é apresentada na figura III.4.

**Tabela III.2** – Componentes das incertezas do material de referência certificado.

Agrotóxico	S <sub>lab</sub> (mg/kg)	S <sub>repe</sub> (mg/kg)	S <sub>homo</sub> (mg/kg)	S <sub>estab</sub> (mg/kg)	incerteza combinada (mg/kg)	V <sub>eff</sub>	k	incerteza expandida (mg/kg)
Acetamiprido	0,000	0,004	0,001	0,002	0,005	16	2,13	0,011
Ciproconazol	0,016	0,006	0,002	0,002	0,017	12	2,18	0,037
Flutriafol	0,007	0,003	0,002	0,002	0,008	15	2,13	0,018
Imidacloprido	0,003	0,004	0,003	0,003	0,006	54	2,01	0,013
Piraclostrobina	0,009	0,005	0,001	0,002	0,010	16	2,13	0,022
Piriproxifem	0,006	0,001	0,001	0,009	0,011	35	2,03	0,023
Propiconazol	0,002	0,003	0,002	0,003	0,004	54	2,01	0,009
Tetraconazol	0,032	0,006	0,002	0,002	0,033	10	2,26	0,074

s<sub>lab</sub>: incerteza associada aos laboratórios, s<sub>repe</sub>: incerteza associada à repetibilidade, s<sub>homo</sub>: incerteza associada à homogeneidade, s<sub>estab</sub>: incerteza associada à estabilidade, V<sub>eff</sub>: graus de liberdade efetivos, k: fator de abrangência a 95%.





**Figura III.4 – Contribuição das fontes de incerteza.**

As incertezas dos valores certificados variaram de 11% a 92%. Sendo marcante a incerteza de 92% observada para Tetraconazol dominada pela variação



de resultados entre laboratórios. Como já esperado para análise de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, as incertezas encontradas são altas, pois os métodos se prestam a analisar um amplo número de compostos em uma mesma corrida o que torna razoável considerar aceitável que os mesmos não podem ser otimizados para cada um dos analitos (DEHOUCK *et al.*, 2015; MEDINA-PASTOR *et al.*, 2011; SANTE, 2015).

Os resultados obtidos atendem ao critério de aceitabilidade do guia SANTE 2015 (70% a 120%) para os agrotóxicos: acetamiprido, imidacloprido e propiconazol, pois as incertezas variaram de 11% a 18% e, portanto, são adequados para a verificação do desempenho de um método quanto à veracidade. Quanto à adequação aos limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação brasileira, o valor determinado para o acetamiprido representou 61% do seu LMR (0,1 mg/kg), para o imidacloprido representou 103% do seu LMR (0,07 mg/kg) e para propiconazol, 158% do seu LMR (0,05 mg/kg).

Em 2013, OTAKE e colaboradores produziram um material de referência certificado para a determinação de organofosforados e piretróides em maçã. Encontraram os seguintes valores: 2,28 mg/kg  $\pm$  0,82 mg/kg para diazinon; 3,14 mg/kg  $\pm$  0,79 mg/kg para fenitrotion; 1,55  $\pm$  0,81 para cipermetrina; e 2,81 mg/kg  $\pm$  0,70 mg/kg para permetrina. Portanto, as incertezas variaram de 25% a 52%, resultado semelhante ao obtido neste estudo. Quanto à adequação aos limites máximos de resíduos estabelecidos no Japão, os valores estabelecidos para diazinon (0,1 ppm) e fenitrotion (0,2 ppm) excederam os limites em até três vezes; e para cipermetrina (2,0 ppm) e permetrina (2,0 ppm) ficaram abaixo do limite estabelecido de cinco a dez vezes.

Yarita e colaboradores em 2014 prepararam um material de referência certificado para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em soja e encontraram incertezas expandidas variando de 14% a 29%. Quando comparadas com os limites máximos de resíduos, as concentrações certificadas foram de 22% para diazinon, 44% para fenitrotion, 3,7% para clorpirifós e 40% para permetrina. Os valores certificados foram: 21,7  $\pm$  3,2  $\mu$ g/kg para diazinon, 88  $\pm$  21  $\mu$ g/kg para fenitrotion, 11,1  $\pm$  3,2  $\mu$ g/kg para clorpirifós e 20,1  $\pm$  4,3  $\mu$ g/kg para permetrina.

## 4 CONCLUSÃO

Um material de referência certificado para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em feijão foi produzido. Para acetamiprido, imidacloprido e propiconazol foi possível obter resultados que atendessem aos critérios de aceitabilidade exigidos pelo SANTE 2015 quanto à avaliação da veracidade (70% a 120%). Observa-se que a incerteza na análise de resíduos de agrotóxicos é elevada mesmo entre laboratórios especialistas. O número reduzido de laboratórios especialistas também contribuiu para a incerteza elevada. O uso do material de referência certificado associado à validação de método e à participação em ensaios de proficiência garante a confiabilidade dos resultados gerados por um laboratório, pois abrange três pontos de grande importância: a garantia interna da qualidade dos resultados, a concordância dos resultados entre laboratórios e a verificação da veracidade dos resultados obtidos.

## CONCLUSÕES INTEGRADAS

O método desenvolvido foi adequado ao propósito de uso. Demonstrou-se que o estudo da linearidade deve ser realizado de forma criteriosa com pena da não detecção de desvios e a importância da clara definição das condições para declaração de amostras com resultados não detectados e com resultados apenas detectados. No estudo de ocorrência, aproximadamente 9% das amostras apresentaram resultado que viola a legislação brasileira.

Na segunda parte deste trabalho, constatou-se que a determinação do valor designado e do desvio padrão para a avaliação da proficiência deve ser realizada com muita cautela para ensaios de proficiência com número reduzido de participantes. Foi demonstrado que a utilização dos fatores  $h$  e  $k$  foram eficazes tanto para o tratamento de outliers quanto para a avaliação da proficiência dos participantes, mas que, ainda assim, a análise crítica do provedor quanto aos resultados é extremamente importante tanto para não gerar alertas desnecessários quanto para não deixar de contribuir com o aprimoramento da qualidade das análises dos participantes.

Finalmente, um material de referência certificado para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em feijão foi produzido com a certificação de valores de propriedade e de suas incertezas para sete analitos. Demonstrou-se a importância da avaliação adequada das fontes de incerteza, a adequação dos valores de propriedade aos limites máximos de resíduo estabelecidos para a cultura e das condições que tornam o material adequado à verificação da veracidade.

Sendo o Brasil o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, o uso de ferramentas de garantia da qualidade é essencial para o monitoramento eficaz dos resíduos no alimentos. A grande variedade de combinações agrotóxico, concentração e matriz torna o desafio da garantia da qualidade dos dados gerados ainda maior, mas constata-se a necessidade de produzir ferramentas adequadas aos hábitos de consumo de cada país. Neste estudo, foi possível desenvolver ferramentas que abrangessem o controle da qualidade intralaboratorial (validação do método), o controle da qualidade interlaboratorial (ensaio de proficiência) e a avaliação da veracidade dos resultados gerados (material de referência certificado)

para um dos alimentos mais consumidos pela população brasileira. A adequação das ferramentas de controle da qualidade à legislação brasileira e à realidade dos laboratórios brasileiros foi realizada, possibilitando assim a obtenção de dados consistentes para uma avaliação de risco adequada e, conseqüentemente, para alterações que se façam necessárias na legislação brasileira de uso de agrotóxicos.

## REFERÊNCIAS

- ALBANO, S.; RODRIGUES, P. G.; ZANOTTA, L.; MARTINELLI, S.; OLIVERAS, L. Y. Ensaio de proficiência e material de referência – ferramentas para a garantia da qualidade de ensaios Disponível em: [http://www.cientec.rs.gov.br/noticias/simposio2/EPMR\\_Garantia\\_qualidade\\_ensaios.pdf](http://www.cientec.rs.gov.br/noticias/simposio2/EPMR_Garantia_qualidade_ensaios.pdf). Acesso em 20 de junho de 2011.
- ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews*, v. 25, p. 838-865, 2006.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal AOAC International*, v. 86, p. 412-431, 2003.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – Relatórios anuais do programa – Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>. Acesso em 06/02/2016.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) Relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Relatório de atividades de 2009. Junho de 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d214350042f576d489399f536d6308db/RELAT%C3%93RIO+DO+PARA+2009.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 13 de fevereiro de 2011.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos. Relatório de Atividades, 2001 – 2007. Junho de 2008.

Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/38cffe804067a7c8833ceb137b78f2dc/relatorio+2001+2007.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 13 de fevereiro de 2011.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RE N.º 165 de 29 de agosto de 2003.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Peer-verified methods program. Manual on policies and procedures. AOAC International, 1998.

BASTOS, L. H. P.; CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; CRUZ, M. H. C.; NÓBREGA, A.; SANTOS, P. R. F.; SANTOS, D. S.; RODRIGUES, J. M.; VIOLANTE, F. G. M. The FIOCRUZ/INCQS – INMETRO proficiency testing provided for Brazilian pesticide residues laboratories. In: 8th EUROPEAN PESTICIDE RESIDUE WORKSHOP, 16, 2010. Book of abstracts, Estrasburgo, França: Palais de la Musique et des Congrès, 2010, p.249.

BASTOS, L. H. P.; GÓES, H. C. A.; CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; DIAS, D. P.; ALMEIDA, R. R. R.; NÓBREGA, A.; ABRANTES, S. Ensaio de Proficiência para análise de ditiocarbamatos em polpa de banana. *Quimica Nova*, v. 30 n. 1, p. 32-35, 2007.

BOTERO-COY, A. M.; MARÍN, J. M.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Multi-residue determination of pesticides in tropical fruits using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, p. 2287-2300, 2012.

BOTITSI, H. V.; GARBIS, S. D.; ECONOMOU, N.; TSIPI, D. F. Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices. *Mass Spectrometry Reviews*. Published online in Wiley Online Library ([wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)). DOI 10.1002/mas.20307, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei n. 7802 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 componentes e afins. Diário Oficial da União, Brasília, 12 jul. 1989, p. 11352-11415.

BRUCE, P.; MINNKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochim. Acta*, v. 128, p. 93-106, 1998.

BURLE, M. L.; FONSECA, J. R.; KAMI, J. A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. *Theoretical and applied genetics*, v. 121, p. 801-813, 2010.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Chronic dietary risk for pesticide residues in food in Brazil: an update. *Food Additives and Contaminants*, v. 21, n. 11, p. 1057-1064, 2004.

CARDOSO, M. H. W. M. Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2008. 191 p. (Tese, Doutorado).

CASTELLANI, P. D.; VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. Feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris*, L.): cultivo e produção de sementes. UNESP. 1988.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em 17 out 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Séries Históricas. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>>>. Acesso em 17 mai 2011.

DAYARATHNA, D.; THIRIMANNA, C.; MUBARAK, A.; MACKAY, L.; ROGERSON, J.; TANG, H.; FENG, J.; SIN, D. W. M.; WONG, Y. C. Food Research International, v. 53, p. 931-937, 2013.

DEHOUK, P.; GRIMALT, S.; DABRIO, M.; CORDEIRO, F; FIAMEGOS, Y.; ROBOUCH, P.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; Calle, B. Proficiency tests on the determination of pesticide residues in grapes with multi-residue methods. Journal of Chromatography A, v. 1395, p. 143-151, 2015.

EFSA – European Food Safety Authority - Annual report on Pesticide Residues. Disponível em [http://www.efsa.europa.eu/en/publications/advanced-search/report?keys=report&subject=62081&type=scientific\\_report&text=%22Annual%20Report%20on%20Pesticide%20Residues%22&scdtype=streport&panel=praper](http://www.efsa.europa.eu/en/publications/advanced-search/report?keys=report&subject=62081&type=scientific_report&text=%22Annual%20Report%20on%20Pesticide%20Residues%22&scdtype=streport&panel=praper). Acesso em 08 de fevereiro de 2016.

EMBRAPA. Agência de informação Embrapa 2005-2007. Feijão. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/Abertura.html>>.. Acesso em: 17 fev. 2011.

EMBRAPA. Cultivo do feijoeiro comum. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/agrotoxicos.htm>> Acesso em 20 de junho de 2011a.

EMBRAPA. Rumos para o mercado de feijão. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/eventosenoticias/anteriores/anteriores2007/071018.htm>. Acesso em 4 de julho de 2011b.

EPTIS. EPTIS database. Disponível em < <https://www.eptis.bam.de/en/index.htm>>. Acesso em 23 ago 2016.

EURACHEM. Selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes. Second edition. 2011.



EURACHEM. The Fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics, 1998. 61p.

EURL (REFERENCE LABORATORIES FOR RESIDUES OF PESTICIDES). Pesticide EU-MRLs Database. Disponível em <[http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm?event=commodity.resultat](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=commodity.resultat)>. Acesso em 25 de maio de 2011.

EURL (EUROPEAN REFERENCE LABORATORIES FOR RESIDUES OF PESTICIDES). Data Pool. Disponível em: <<http://www.eurl-pesticides-datapool.eu>> Acesso em 6 de fevereiro de 2016.

EURL-PROFICIENCY TEST-FV-17, 2015 - Pesticide Residues in Broccoli Homogenate - Final Report - December 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, 2002, L 221/8.

EUROPEAN COMMISSION. Plant protection - Pesticide residues. Disponível em <[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm)>. Acesso em 20 de junho de 2011.

FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations). Pesticides residues in food – 1993. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues. Rome: FAO, 1994.

FEARN, T.; THOMPSON, M. A new test for sufficient homogeneity. Analyst, v. 126, p. 1414-1417, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Pesticide Monitoring Program. Disponível em <<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/Pesticides/ucm2006797.htm>> Acesso em 06 de fevereiro de 2016.

GOLGE, O.; KABAK, B. Evaluation of Quechers simple preparation and liquid chromatography triple-quadrupole mass spectrometry method for the determination of 109 pesticide residues in tomato. *Food Chemistry*, v. 176, p. 319-332, 2015.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. A.; DIONIS-DELGADO, S.; ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. Pesticide analysis in toasted barley and chickpea flours. *Journal of Separation Science*, v. 35, p. 299-307, 2012.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. A.; LEHOTAY, S. J.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A. Use of ammonium formate in QuEChERS for high-throughput analysis of pesticides in food by fast, low-pressure gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1358, p. 75-84, 2014.

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.

GRANDE-MARTÍNEZ, A.; ARREBOLA-LIÉBANAS, F. J.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L.; HERNÁNDEZ-TORRES, M. E.; GARRIDO-FRENICH, A. G. Optimization and validation of a multiresidue pesticide method in rice and wheat flour by modified Quechers and GC-MS/MS. *Food Anal. Methods*, DOI 10.1007/s12161-015-0214-7, 2015.

GRIMALT, S.; HARBECK, S.; SHEGUNOVA, P.; SEGHERS, J.; OLSEN, B. S.; EMTEBORG, H.; DABRIO, M. Development of a new cucumber reference

- material for pesticide residue analysis: feasibility study for material processing, homogeneity and stability assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 407, p. 3083-3091, 2015.
- HEINEMANN, A. B.; VILLEGAS, J. R.; SOUZA, T. L. P. O.; DIDONET, A. D.; STEFANO, J. G.; BOOTE, K. J.; JARVIS, A. Drought impact on rainfed common bean production areas in Brazil. *Agricultural and Forest Meteorology*, v. 225, p. 57-74, 2016.
- HEPPERLE, J.; DORK, D.; BARTH, A.; TASDELEN, B.; ANASTASSIADES, M. Studies to improve the extraction yields of incurred pesticide residues from crops using the QuEChERS method. *Journal of AOAC International*, v. 98, n.º 2, 2015.
- HILL, A.R.C.; REYNOLDS, S.L. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. *Analyst*, v. 124, p. 953-958, 1999.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal. Chem*, v. 54, p. 67-76, 1982.
- HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC/GC International*, p. 96-105, 1998.
- IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Projeto Alimento Seguro. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/component/content/article/304/1109-projeto-alimento-seguro>>. Acesso em 04 de junho de 2011.
- ISO (International Standard Organization). 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. 2015.
- ISO (International Standard Organization). 13528. Statistical Methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. 2005.

ISO (International Standard Organization). 5725-2. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. 1994.

ISO (International Standard Organization). ISO GUIDE 30. Termos e definições relacionados com materiais de referência. 2000.

ISO (International Standard Organization). ISO GUIDE 31. Materiais de referência – conteúdo de certificados e rótulos. 2004.

ISO (International Standard Organization). ISO GUIDE 32. Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados. 2000.

ISO (International Standard Organization). ISO GUIDE 33. Utilização de materiais de referência certificados. 2002.

ISO (International Standard Organization). ISO GUIDE 34. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. 2004.

ISO (International Standard Organization). ISO GUIDE 35, Reference materials – General and statistical principles for certification. 2006.

ISO (International Standard Organization). ISO/IEC 17025, general requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2005.

ISO (International Standard Organization). ISO/IEC 17043, conformity assessment – general requirements for proficiency testing. 2010.

JIN, B.; XIE, L.; GUO, Y.; PANG, G. Multi-residue detection of pesticides in juice and fruit wine: a review extraction and detection methods. Food Research International, v. 46(1), p. 399-409, 2012.

KMELLÁR, B.; FODOR, P.; PAREJA, L.; FERRER, C.; MARTÍNEZ-UROZ, M. A.; VALVERDE, A.; FERNANDEZ-ALBA, A.R. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1215, p. 37–50, 2008.

KUSELMAN, I.; FAJGELJ, A. IUPAC/CITAC guide: selection and use of proficiency testing schemes for a limited number of participants – chemical analytical laboratories (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem*, v. 82, p. 1099-1135, 2010.

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

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

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

LOZANO, A.; RAJSKI, L.; BELMONTE-VALLES, N.; UCLÉS, A.; UCLÉS, S.; MEZCUA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified Quechers method: validation and pilot survey in real samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1268, p. 109-122, 2012.

MAIER, E.A.; QUEVAUVILLER, P.; GRIEPINK, B. Interlaboratory studies as a toll for many purposes: proficiency testing, learning exercises, quality control and certification of matrix materials. *Anal. Chim. Acta*, v. 283, p. 590-599, 1993.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sislegis - Sistema de consulta à legislação. Instrução normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em 29 de maio de 2011.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sislegis - Sistema de consulta à legislação. Instrução normativa nº 42, de 31 de dezembro de 2008. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em 25 de maio de 2011.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sislegis - Sistema de consulta à legislação. Instrução normativa nº 22, de 8 de setembro de 2010a. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em 25 de maio de 2011.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sislegis - Sistema de consulta à legislação. Instrução normativa nº 8, de 29 de abril de 2010b. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em 29 de maio de 2011.

MEDINA-PASTOR, P.; MEZCUA, M.; RODRÍGUEZ-TORREBLANCA, C.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Laboratory assessment by combined z score values in proficiency tests: experience gained through the European Union proficiency tests for pesticide residues in fruits and vegetables. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, p. 3061–3070, 2010a.

MEDINA-PASTOR, P.; RODRÍGUEZ-TORREBLANCA, C.; ANDERSSON, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. European Commission proficiency tests for pesticide

residues in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 29, p. 70-83, 2010b.

MEDINA-PASTOR, P.; VALVERDE, A.; PIHLSTRÖM, T.; MASSETER, S.; GAMON, M.; MEZCUA, M.; RODRÍGUEZ-TORREBLANCA, C.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Comparative study of the main top-down approaches for the estimation of measurement uncertainty in multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 7609-7619, 2011.

MOJICA, L.; MEJÍA, E. G. Characterization and comparison of protein and peptide profiles and their biological activities of improved common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 70(2), p. 105-112, 2015.

MOL, H. G. J.; ZOMER, P.; LÓPEZ, M. G.; FUSSELL, R. J.; SCHOLTEN, J.; KOK, A.; WOLHEIM, A.; ANASTASSIADES, M.; LOZANO, A.; ALBA, A. F. Identification in residue analysis based on liquid chromatography with tandem mass spectrometry: experimental evidence to update performance criteria. *Analytica Chimica Acta*, v. 873, p. 1-13, 2015.

NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; FERRER, I.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Strategies for the multi-residue analysis of 100 pesticides by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1249, p. 164-180, 2012.

OTAKE, T.; ITOH, N.; AOYAGI, Y.; MATSUO, M.; HANARI, N.; OTSUKA, S.; YARITA, T. Development of certified reference material for quantification of two pesticides in brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 8208-8212, 2009.

OTAKE, T.; YARITA, T.; AOYAGI, Y.; KURODA, Y.; NUMATA, M.; IWATA, H.; MIZUKOSHI, K.; NAKAMURA, M.; WATAI, M.; MITSUDA, H.; FUJIKAWA, T.; OTA, H. Development of green onion and cabbage certified reference materials for quantification of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 8568-8574, 2011.

OTAKE, T.; YARITA, T.; AOYAGI, Y.; KURODA, Y.; NUMATA, M.; IWATA, H.; WATAI, M.; MITSUDA, H.; FUJIKAWA, T.; OTA, H. Development of apple certified reference material for quantification of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Food Chemistry*, v. 138, p. 1243-1249, 2013.

OTAKE, T.; YARITA, T. AOYAGI, Y.; NUMATA, M.; TAKATSU, A. Evaluation of the performance of 57 Japanese participating laboratories by two types of z-scores in proficiency test for the quantification of pesticide residues in brown rice. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 406, p. 7337-7344, 2014.

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

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

RIZZETTI, T. M.; KEMMERICH, M. MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in Orange juice by UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, v. 196, p. 25-33, 2016.



ROSARIO, P.; MARTÍNEZ, J. L.; SILVÁN, J. M. Comparison of different statistical methods for evaluation of proficiency test data. *Accred. Qaul. Assur*, v. 13, p. 493-499, 2008.

SANTE - EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE-GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY - Safety of the Food Chain Pesticides and biocides - Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015 - 2015.

SIN, D. W. M.; CHAN, P. K.; CHEUNG, S. T. C.; WONG, Y. L.; WONG, S. K.; MOK, C. S.; WONG, Y. C. Development of a candidate certified reference material of cypermethrin in green tea. *Analytica Chimica Acta*, v. 721, p. 110-114, 2012.

SIN, D.; WONG, Y. L.; CHENG, E.; LO, M. F.; HO, C.; MOK, C. S.; WONG, S. K. S1 certification of alpha-endosulfan, beta-endosulfan, and endosulfan sulfate in a candidate certified reference material (organochlorine pesticides in tea) by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 407, p. 3009-3021, 2015.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). 08/10/2010 - O setor de defensivos agrícolas no Brasil. Disponível em [http://www.sindag.com.br/dados\\_mercado.php](http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php). Acesso em 19 de junho de 2011.

SINHA, S. N.; RAO, M. V. V.; VASUDEV, K. Distribution of pesticides in different commonly used vegetables from Hyderabad, India. *Food Research International*, v. 45, p. 161-169, 2012.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552; p. 25-35, 2005a.

- SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. Proficiency testing in food analysis: an evaluation of the critical steps. Encontro para a Qualidade de Laboratórios. Rede Metrológica do Estado de São Paulo. São Paulo. Junho de 2005b.
- SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G.; GINN, R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) – In-house method validation. Journal of Chromatography A, v. 1077, p. 151-158, 2005.
- SOUZA, S. V. C.; PINTO, C. T.; JUNQUEIRA, R. G. In-house method validation in arsenic analysis. Journal of Food Composition and Analysis, v. 20, p. 241-247, 2007.
- SYKES, M.; THOMPSON, M.; REYNOLDS, S. Pesticide Residues in Food-Based Proficiency Test Materials, Spiking Values versus Consensus Assigned Values. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 61, p. 4205-4209, 2013.
- SZEWCZAK, E.; BONDARZEWSKI, A. Is the assessment of interlaboratory comparison results for a small number of tests and limited number of participants reliable and rational? Accred. Qual. Assur., v. 21, p. 91-100, 2016.
- TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos). Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. Unicamp. 2011.
- THOMPSON, M. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. Pure and Applied Chemistry, v.74, p. 835-855, 2002.
- THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. Analyst, v. 125, p. 385-386, 2000.

- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Appl. Chem.*, v. 78, n. 1, p. 145–196, 2006.
- THOMPSON, M.; LOWTHIAN, P.J. Effectiveness of analytical quality control is related to the subsequent performance of laboratories in proficiency tests. *Analyst*, v.118, p. 1495-1500, 1993.
- THOMPSON, M.; LOWTHIAN, P.J. Statistical aspects of proficiency testing in analytical laboratories. Part 2. Testing for sufficient homogeneity. *Analyst*, v.121, p. 1593-1596, 1996.
- TRIPHATY, S. S.; SAXENA, R. K.; GUPTA, P. K. Comparison of statistical methods for outlier detection in proficiency testing data on analysis of lead in aqueous solution. *American Journal of Theoretical and Applied Statistics*, v. 2(6), p. 233-242, 2013.
- VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J.A.; VAN DE WIEL, H.J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. *Anal. Chim. Acta*, v. 391, p. 159-171, 1999.
- VEITH, A. G. A new approach to evaluating inter-laboratory testing precision. *Polymer Testing*, v. 12, p. 113-184, 1993.
- VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia). Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. 2008.
- VISSER, R. Interpretation of interlaboratory comparison results to evaluate laboratory proficiency. *Accred. Qual. Assur.*, v. 10, p. 521-526, 2006.
- WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, v. 125, p. 803–812, 2011.

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

YARITA, T.; OTAKE, T.; AOYAGI, Y.; KUROIWA, T.; NUMATA, M.; TAKATSU, A. Proficiency testing for determination of pesticide residues in soybean: Comparison of assigned values from participants' results and isotope-dilution mass spectrometric determination. *Talanta*, v.132, p. 269-277, 2015.

YARITA, T.; OTAKE, T.; AOYAGI, Y.; KURODA, Y.; NUMATA, M.; IWATA, H.; WATAI, M.; MITSUDA, H.; FUJIKAWA, T.; OTA, H. Development of soybean certified reference material for pesticide residue analysis. *Talanta*, v. 119, p. 255-261, 2014.

YOKOYAMA, L. P.; STONE, L. F. *Cultura do feijoeiro no Brasil: características da produção*. Embrapa Arroz e Feijão. 2000.