

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

MAURÍCIO PRADO NETO

**RESÍDUOS DE CARBENDAZIM EM LARANJA E
NÉCTAR DE LARANJA: VALIDAÇÃO DE
MÉTODO E MONITORAMENTO EM MINAS
GERAIS**

**Belo Horizonte, MG
2014**

MAURÍCIO PRADO NETO

**RESÍDUOS DE CARBENDAZIM EM LARANJA E
NÉCTAR DE LARANJA: VALIDAÇÃO DE
MÉTODO E MONITORAMENTO EM MINAS
GERAIS**

Dissertação 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 de título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Scheilla Vitorino C. de Souza

Co-orientador: Roberto Gonçalves Junqueira

Área de concentração: Ciência de Alimentos

**Belo Horizonte, MG
2014**

P896r Prado Neto, Maurício.
Resíduos de carbendazim em laranja e néctar de laranja:
validação de método e monitoramento em Minas Gerais / Maurício
Prado Neto. – 2014.
109 f. : il.

Orientadora: Scheilla Vitorino C. de Souza.

Co-orientador: Roberto Gonçalves Junqueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos.

1. Alimentos – Contaminação – Teses. 2. Pesticidas – Resíduos
em alimentos – Teses. 3. Análise cromatográfica – Teses.
4. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 5. Produtos
químicos agrícolas – Teses. 6. Carbendazim – Teses. 7. Laranja –
Teses. 7. Validação de método – Teses. I. Souza, Scheilla Vitorino
Carvalho de. II. Junqueira, Roberto Gonçalves. III. Universidade
Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 615.954



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

MAURÍCIO PRADO NETO

**RESÍDUOS DE CARBENDAZIM EM LARANJA E NÉCTAR DE
LARANJA: VALIDAÇÃO DE MÉTODO E MONITORAMENTO
EM MINAS GERAIS**

APROVADA EM 30 DE MAIO DE 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

**Dra. SCHEILLA VITORINO CARVALHO DE SOUZA FERREIRA
(Orientadora e Presidente da Comissão)**

Dra. SILVANA DA MOTTA

**Dr. ROBERTO GONÇALVES JUNQUEIRA
(Coorientador)**

Dra. VERA REGINA ROSSI LEMES

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

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

Ao Laboratório de Análise de Resíduos e Agrotóxicos (LARA) do Laboratório de Química Agropecuária (LQA) da Gerência da Rede Laboratorial (DVLB) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) por viabilizar a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Pesticidas do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MG) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e ao Laboratório de Pesticidas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) pelo fornecimento dos padrões certificados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento deste projeto por meio da concessão de bolsa.

À Biblioteca da FAFAR, à Secretária do Departamento de Alimentos da FAFAR/UFMG e à Secretária do PPGCA pela assistência nas pesquisas bibliográficas e todo apoio e orientação na resolução de questões administrativas.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço primeiramente a Deus pela indescritível e inexplicável presença em todos os momentos da vida, por ser em mim, tudo aquilo que não sou e preciso. Esta vida e tudo no que ela há, só faz algum sentido quando olho para Ti.

Agradeço os meus pais Adriano Soares Prado e Ana Beatriz Caldeira Paulino pelo constante apoio e suporte nos meus projetos. Sou muito feliz por tê-los ao meu lado.

Aos amigos Leonardo, Tatiana, Thallyta, Ednalva e Jairo, que me acompanharam e entenderam, por muitas vezes, a minha ausência ao longo destes dois anos.

Aos novos colegas que, em decorrência desse projeto, tive a oportunidade de conhecer. Faltam palavras para agradecer a pronta disposição em ajudar. Vocês me ensinaram muito. Não posso deixar de citar toda a equipe do LARA do Instituto Mineiro de Agropecuária: Eliane, Alexandre, Leandro, Lucimere, Geovana, Isis e Dilma.

Ao professor Roberto Gonçalves Junqueira pela co-orientação que trouxe grandes benefícios para o trabalho.

À professora Scheilla Vitorino C. de Souza pela parceria desde a graduação. Sua orientação nesse projeto me fez sentir muito mais seguro. Obrigado por investir seu tempo em minha vida. Tenho certeza que o profissional que sou hoje tem grande influência do seu trabalho. Quando me tornar professor, se um dia assim acontecer, terei para com os meus alunos o mesmo olhar e dedicação que você teve hoje comigo.

Aos membros da Comissão Examinadora Dra. Vera Regina Rossi Lemes, professora Silvana da Motta e professor Roberto Gonçalves Junqueira pela disponibilidade e dedicação na leitura do trabalho e pelas sugestões que tanto enriqueceram a dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	11
RESUMO	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1. LARANJA, NÉCTAR E SUCO DE LARANJA.....	22
3.1.1. DEFINIÇÕES E PADRÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE.....	22
3.1.2. ASPECTOS NUTRICIONAIS E FUNCIONAIS.....	23
3.1.3. ASPECTOS ECONÔMICOS	27
3.1.4. CONSUMO.....	30
3.2. AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS	30
3.2.1. USO NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA	30
3.2.2. BENZIMIDAZÓIS - CARBENDAZIM.....	36
3.2.3. TOXICIDADE	39
3.2.4. REGULAMENTAÇÃO E MONITORAMENTOS	41
3.2.5. MÉTODOS DE ANÁLISE.....	44
3.3. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS.....	47
3.3.1. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE.....	47
3.3.2. DELINIAMENTO FATORIAL.....	47
3.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	47
3.4.1. IMPORTANCIA PARA O AGRONEGÓCIO	49
3.4.2. VALIDAÇÃO NO PROCESSO ANALÍTICO	50
3.4.3. VALIDAÇÃO EM SISTEMAS DE GESTÃO	51
3.4.4. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL.....	52
3.4.5. PARÂMETRO DE DESEMPENHO.....	53
3.4.5.1 Linearidade, sensibilidade e faixa	54
3.4.5.2 Efeitos de matriz e seletividade.....	54
3.4.5.3 Veracidade e precisão.....	55
3.4.5.4 Limites.....	56
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1. AMOSTRAS	58
4.2. EQUIPAMENTOS.....	59
4.3. REAGENTES, PADRÕES E SOLVENTES	60
4.4. SOLUÇÕES.....	60
4.5. MÉTODOS DE ENSAIO.....	62
4.5.1. PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DE CARBENDAZIM EM LARANJA.....	62
4.5.2. PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DE CARBENDAZIM EM NÉCTAR.....	64
4.5.3. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	66
4.6. OTIMIZAÇÃO	66
4.6.1 ENSAIOS PRELIMINARES.....	66
4.6.2 PLANEJAMENTO FATORIAL.....	66
4.7. VALIDAÇÃO	67
4.8. MONITORAMENTO	70
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71

5.1.	OTIMIZAÇÃO.....	71
5.1.1.	ENSAIOS PRELIMINARES.....	71
5.1.2.	PLANEJAMENTO FATORIAL.....	73
5.2.	VALIDAÇÃO.....	77
5.3.	MONITORAMENTO.....	89
6.	CONCLUSÃO.....	90
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal de diferentes variedades de laranja. Valores referentes a 100 g da fruta crua	24
Tabela 2. Composição centesimal do suco de laranja cru	25
Tabela 3. Evolução do consumo mundial de bebidas.....	31
Tabela 4. Classificação de praguicidas de acordo com o tipo de praga a que se destinam.....	33
Tabela 5. Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseada na Dose Letal50 e na Concentração Letal50 de formulações líquidas e sólidas.....	40
Tabela 6. Métodos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV ou espectrometria de massas publicados entre 2000 e 2012 para o escopo carbendazim em alimentos de origem vegetal.....	45
Tabela 7. Principais referências nacionais e internacionais relacionadas a validação intralaboratorial.....	53
Tabela 8. Fatores avaliados na etapa de otimização e seus níveis.....	67
Tabela 9. Valores de recuperação de carbendazim nas matrizes laranja e néctar, segundo delineamento fatorial 2^3 , com quatro repetições de ponto central.....	73
Tabela 10. Valores de resolução dos picos de carbendazim obtidos para as matrizes laranja e néctar de laranja durante a otimização do método, em relação aos picos adjacentes.....	75
Tabela 11. Estatísticas da análise de variância da regressão, incluindo teste de desvio de linearidade, para curvas de carbendazim usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 $\mu\text{g/mL}$	82
Tabela 12. Comparações entre as interseções e inclinações obtidas para as curvas matrizadas de laranja e de néctar de laranja com as estimadas para a curva usual, na faixa de 0,155 a 0,931 $\mu\text{g/mL}$	84

Tabela 13. Avaliação das premissas de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos obtidos nos estudos de recuperação aparente de carbendazim em matriz laranja e néctar de laranja em diferentes níveis de concentração.....87

Tabela 14. Médias de recuperação aparente e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e precisão intermediária, obtidos para amostras de laranja e néctar de laranja adicionadas de carbendazim em diferentes níveis de concentração.....88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais produtores mundiais de laranja e mercados da citricultura brasileira.....	29
Figura 2. Processo de biomagnificação de agrotóxicos.....	34
Figura 3. Oferta de crédito rural e consumo de agrotóxicos no Brasil.....	36
Figura 4. Fórmula estrutural dos principais fungicidas imidazólicos utilizados na agropecuária.....	37
Figura 5. Conversão de benomil e tiofanato metílico a carbendazim.....	38
Figura 6. Variação dos sintomas causados pela <i>Guignardia citricarpa</i> em laranja.....	39
Figura 7. Métodos de avaliação da influência de três fatores em um planejamento experimental.....	48
Figura 8. Divisão do processo analítico em pré-validação e validação.....	50
Figura 9. Variedades de laranja coletadas para monitoramento do carbendazim na laranja <i>in natura</i> disponível no mercado de Minas Gerais.....	59
Figura 10. Marcha analítica utilizada nas etapas de extração e purificação das amostras de laranja para determinação de carbendazim.....	64
Figura 11. Marcha analítica utilizada na determinação de carbendazim em néctar de laranja.....	65
Figura 12. Cromatogramas obtidos pela injeção de extratos de amostras de laranja em diferentes condições cromatográficas.....	72
Figura 13. Cromatogramas obtidos pela injeção de extratos de amostras de laranja e néctar de laranja brancos, sem a etapa de purificação dos extratos.....	72
Figura 14. Gráficos de pareto dos efeitos padronizados em relação aos fatores e interações estudados no planejamento fatorial ($t_{crit} = 3,182$, $n = 12$, $\alpha = 0,05$) para carbendazim nas matrizes laranja e néctar de laranja.....	74

Figura 15. Picos considerados no cálculo da resolução do pico referente ao carbendazim durante o processo de otimização da análise para as matrizes néctar de laranja e laranja.....	75
Figura 16. Cromatogramas típicos obtidos nas condições otimizadas para amostras brancas e adicionadas de padrão de carbendazim - matrizes laranja (516,7 µg/kg) e néctar de laranja (279 µg/kg).....	76
Figura 17. Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas de carbendzin usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 µg/mL, com indicação dos respectivos <i>outliers</i> diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.....	78
Figura 18. Gráficos de probabilidade normal das curvas de carbendazim usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 µg/mL.....	79
Figura 19. Gráficos de Durbin-Watson das curvas de carbendazim usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 µg/mL.....	80
Figura 20. Gráficos de Levene para curvas de carbendazim usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 µg/mL.....	81
Figura 21. Curvas de calibração do carbendazim usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 µg/mL.....	83
Figura 22. Curvas de calibração do analito no solvente e nas matrizes laranja e néctar de laranja, obtidas para carbendazim nos ensaios de avaliação dos efeitos de matriz, na faixa de 0,155 a 0,931 µg/mL.....	86

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANDEF	- Associação Nacional de Defesa Vegetal
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	- <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ARfD	- Acute Reference Dose
BH	- Belo Horizonte
BPA	- Boas Práticas Agrícolas
BRIC	- Brasil, Rússia, Índia e China
CEASA	- Centrais de Abastecimento de Minas Gerais
CG	- Cromatografia Gasosa
CGCRE	- Coordenadoria Geral de Acreditação
CG-EM	- Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CITRUSBR	- Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos
CL	- Cromatografia Líquida
CL50	- Concentração Letal
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	- Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
DAD	- Detector de arranjo de diodos
DL	- Dose Letal
DPR _r	- Desvio Padrão Relativo de Repetitividade
DPR _R	- Desvio Padrão Relativo de Precisão Intermediária
DVLB	- Divisão Laboratorial
EC	- Eletroforese Capilar
EM	- Espectrometria de Massas
EPA	- <i>Environmental Protection Agency of the United States</i>
EUA	- Estados Unidos da América
FAFAR	- Faculdade de Farmácia
FAO	- <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FAPEMIG	- Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais
FCOJ	- <i>Frozen Concentrate Oranje Juice</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FUNDECITRUZ	- Fundo de Defesa da Citricultura

FUNED	- Fundação Ezequiel Dias
HDL	- <i>Hight-density lipoproteins</i>
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	- Ingestão Diária Aceitável
IDTM	- Ingestão Diária Teórica Máxima
IEC	- <i>International Electrotechnical Commission</i>
IMA	- Instituto Mineiro de Agropecuária
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	- <i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	- <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JMPR	- <i>Joint Meeting on Pesticide Residues</i>
LANAGRO	- Laboratório Nacional Agropecuário
LARA	- Laboratório de Análise de Resíduo de Agrotóxico
LD	- Limite de Detecção
LDL	- <i>Low-density lipoproteins</i>
LMR	- Limite Máximo de Resíduo
LQ	- Limite de Quantificação
LQA	- Laboratório de Química Agropecuária
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	- Minas Gerais
MMR	- Método Multi-Resíduo
MRC	- Material de Referência Certificado
MS	- Ministério da Saúde
NOAEL	- <i>No Observed Adverse Effective Level</i>
NFC	- <i>Not From Concentrate</i>
OE	- Óleo essencial
PA	- Para Análise
PAR	- Para Análise de Resíduo
PARA	- Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos
PAS	- Programa Alimento Saudável
PIB	- Produto Interno Bruto
PIQ	- Padrão de identidade e qualidade
PPGCA	- Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada

SINDAG	- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SNVS	- Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SPE	- Solução Padrão Estoque
SPI	- Solução Padrão Intermediária
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
USDA	- <i>United States Department of Agriculture</i>
UV	- Ultra-violeta
WHO	- World Health Organization
u_{repro}	- Incerteza Padrão Devido à Precisão Intermediária
u_{curva}	- Incerteza Padrão Devido à Curva de Calibração
u_c	- Incerteza Combinada
U	- Incerteza Expandida

RESUMO

A citricultura é uma atividade de relevância para o agronegócio brasileiro, sendo Minas Gerais o segundo estado maior produtor de laranja. Sob o ponto de vista nutricional, a fruta *in natura* e seu suco constituem uma importante fonte de vitaminas, minerais, fibras e compostos com atividade funcional. O agrotóxico carbendazim é um fungicida permitido para uso na citricultura brasileira, mas proibido em outros países, como os Estados Unidos. Monitoramentos de resíduos deste composto em laranja têm sido realizados no âmbito de programas oficiais brasileiros, embora as informações relativas à laranja e néctar produzidos e comercializados no estado de Minas sejam restritas. Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram: otimizar e validar um método cromatográfico para determinação de carbendazim em laranja e néctar de laranja e aplicar o método validado no monitoramento de resíduos em amostras coletadas no estado de Minas Gerais. Dentre os fatores estudados no delineamento fatorial da otimização, somente o volume de solvente de eluição foi considerado significativo para a recuperação do carbendazim, na matriz laranja. Linearidade foi demonstrada na faixa de 0,155 a 0,931 µg/mL, com efeitos de matriz significativos para ambas as matrizes. Porcentagens de recuperação médias de 98,45 % foram obtidas para laranja (de 0,171 a 1,003 mg/kg) e de 91,41 % para néctar (de 0,093 a 0,558 mg/kg). Desvios padrão relativos máximos de 10,81 e 9,09 % foram obtidos sob condições de repetitividade e de 11,64 % e 15,72 % sob condições de precisão intermediária, para laranja e néctar, respectivamente. Não foram detectados resíduos de carbendazim em 20 amostras de laranja produzidas e 32 comercializadas no estado de Minas Gerais, além de 36 amostras de néctar de laranja coletadas no mercado de Belo Horizonte - MG, considerando os limites de detecção teóricos de 0,172 mg/kg para laranja e de 0,093 mg/kg para néctar.

Palavras-chave: cromatografia líquida de alta eficiência; laranja; néctar de laranja; carbendazim; resíduos; agrotóxicos; validação de métodos; monitoramento.

1. INTRODUÇÃO

A laranja é o fruto produzido pela árvore do gênero *Citrus*, que faz parte da família *Rutaceae*. Nativa do continente asiático (uma característica comum dos frutos cítricos), a laranja possui seu local de origem discutido por vários autores. Entretanto, a ideia de se tratar de uma fruta de origem chinesa, é aceita, uma vez que referências escritas à laranja foram encontradas em caracteres chineses, por volta de 2200 a.C. (WEBBER, 1967). Os portugueses trouxeram da Espanha as primeiras plantas cítricas para o Brasil com o objetivo de criar um abastecimento de vitamina C, utilizada no tratamento do escorbuto, doença que acometia a maioria das tripulações no período do descobrimento (NEVES & JUNK, 2006).

O consumo da laranja *in natura* é muito comum no Brasil, onde a fruta é abundante, porém na maioria dos países o que se consome é o suco de laranja fresco ou industrializado. Segundo a Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (CITRUSBR), aproximadamente 35 % de todo o suco e néctar consumido no mundo é de laranja (CITRUSBR, 2012a). A legislação brasileira estabelece a denominação de suco para a bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado. Já o néctar, é definido como sendo a bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável da parte comestível do vegetal ou de seu extrato, adicionado de açúcares, destinada ao consumo direto (BRASIL, 2009). Para a indústria processadora, o suco pode ainda ser classificado em dois tipos: suco concentrado congelado (FCOL - *Frozen Concentrate Orange Juice*), cuja água é parcialmente retirada do suco natural, ou não concentrado (NFC - *Not From Concentrate*), suco pasteurizado sem a retirada de água (CITRUSBR, 2012b).

O suco de laranja é considerado um alimento de alta qualidade devido a suas propriedades nutricionais e funcionais. A fruta é rica em vitamina C, vitaminas do complexo B (folato ou ácido fólico e tiamina), beta-caroteno, fibras, potássio e flavonóides. Estudos apontam que, de maneira geral, o suco de laranja pode ajudar a diminuir as lipoproteínas de baixa densidade (LDL – *low-density lipoproteins*), aumentar as lipoproteínas de alta densidade (HDL - *high-density lipoprotein*), aumentar a resistência do organismo às infecções e melhorar a atividade intestinal (RAPOSO FILHO, 2010).

Sob o ponto de vista econômico, nenhuma outra *commodity* possui tanta expressividade para o Brasil como a laranja. O suco de laranja é o único produto brasileiro que detém mais de 50 % da produção mundial, além de 85 % das exportações. Sua liderança é maior quando comparada a produtos como o café, a carne bovina, o frango e o açúcar (NUNES *et al.*, 2009). Ainda segundo Nunes, a força do suco de laranja brasileiro no comércio internacional é tão significativa que três em cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo são provenientes de laranjas brasileiras. Essa liderança se deve as favoráveis condições de clima e solo, além da alta tecnologia aplicada na produção do suco, que permite uma alta produtividade em um menor espaço de cultivo.

Geograficamente, a produção de laranja no Brasil está concentrada no estado de São Paulo e no Triângulo Mineiro. Esses dois estados são juntos responsáveis por 80 % da produção nacional de laranjas, sendo, por isso, a região conhecida como Cinturão Citrícola (*Citrus Belt*) (NUNES *et al.*, 2009). Por fazer parte do Cinturão Citrícola, Minas Gerais também assume destaque na produção nacional de laranja. No Triângulo Mineiro, encontra-se o grupo dos cinco municípios que mais produzem no estado: Frutal, Comendador Gomes, Prata, Uberlândia e Uberaba. Juntas essas cidades respondem por quase 68% de toda a oferta mineira de laranja (Agência Minas, 2008). As principais vantagens da região do Triângulo Mineiro para o cultivo da laranja são a proximidade com as indústrias citrícolas do estado de São Paulo, as idênticas condições pluviométricas, a fertilidade do solo e o menor valor da terra nua quando comparada com São Paulo (CONAB, 2011).

A partir da década de 50, o uso de agrotóxicos e fertilizantes associados à mecanização das lavouras, foi responsável pelo processo chamado de “Revolução Verde”. Durante esse período, os países responsáveis pelo abastecimento mundial de produtos agrícolas eram fortemente pressionados por órgãos financiadores internacionais a adquirirem e a usarem agrotóxicos em suas plantações, alegando ser essencial para combater a fome (LUCCHESI, 2005). Até a edição da Lei nº 7.802, de 1989, o uso de agrotóxicos no Brasil era regulamentado apenas por portarias ministeriais, principalmente dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Saúde (MS). De uma maneira simplificada, os agrotóxicos são definidos como os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, cuja

finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

O uso de agrotóxicos na produção citrícola tem sido justificado pela garantia da alta produtividade do setor e atendimento às demandas de mercado. Nesse sentido, a principal função dos agrotóxicos é proteger as plantações de possíveis doenças, o que comprometeria a produtividade e a qualidade dos pomares. Contudo, os agrotóxicos devem ser usados de acordo com as Boas Práticas Agrícolas (BPA), o que garante a segurança dos trabalhadores do setor, a segurança do meio ambiente, além de promover o bem estar animal e a segurança alimentar. Essa última, relacionada principalmente com o respeito aos períodos de carência de cada agrotóxico, visando evitar a presença de resíduos, em níveis tóxicos, nos alimentos que chegam à população (ANVISA, 2011a).

Os benzimidazóis constituem uma classe de agrotóxicos com a comercialização autorizada em vários países. As vantagens do uso das substâncias pertencentes a esse grupo incluem a baixa toxicidade, a eficácia em baixas concentrações, além de apresentarem um amplo espectro de ação no combate aos fungos (FRAC, 2005). O mecanismo de ação dessa classe envolve a inibição da formação da placa metafásica, durante a divisão celular (BEDOR, 2008). Alguns dos principais representantes dos benzimidazóis são: benomil, carbendazim, tiofanato metílico e tiabendazol. Mesmo com uma baixa toxicidade, estudos apontam uma relação entre a exposição crônica a agrotóxicos benzimidazólicos e a má formação congênita, diarreia, anemia, câncer e outras doenças (GARCIA *et al.*, 2005; IPCS, 2010b; EPA, 2012b). Desta forma, o seu potencial impacto no meio ambiente e na saúde pública devem ser considerados e monitorados.

No Brasil, alguns benzimidazóis são regulamentados para o uso em várias culturas, incluindo a citricultura. Limites máximos de resíduos (LMR) de agrotóxicos presentes na laranja, bem como o tempo de carência dessas substâncias, são determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) juntamente com o MAPA. Até o ano de 2011, o carbendazim era o principal benzimidazol empregado no cultivo da laranja no Brasil, utilizado principalmente no combate ao fungo *Guignardia citricarpa* Kiely, causador da doença conhecida como mancha preta, que se caracteriza por lesões na casca da fruta (RODRIGUES *et al.*, 2007).

No entanto, em 10 de janeiro de 2012, o *Food and Drug Administration* (FDA) suspendeu temporariamente as importações de suco de laranja brasileiro pelos Estados Unidos, segundo maior mercado importador do produto. Segundo a *Environmental Protection Agency* (EPA), resíduos do agrotóxico carbendazim estavam sendo encontrados no suco de laranja brasileiro na ordem de 35 µg/kg (ou ppb). Embora essa concentração seja inferior ao LMR estabelecido pela legislação brasileira e pela legislação de muitos outros importantes mercados, como o Canadá e Europa, o carbendazim, que tinha seu uso autorizado nos Estados Unidos até 2009, foi substituído por novos produtos. Atualmente, a legislação americana não permite a presença de carbendazim no suco de laranja comercializado no país (EPA, 2012).

Dados sobre a ocorrência de carbendazim em amostras de laranja do estado de Minas Gerais (MG) são restritos no âmbito dos monitoramentos nacionais. No Programa do MAPA ano safra 2010-2011 foram analisadas duas amostras produzidas no estado, enquanto no programa da ANVISA, nos anos 2010 e 2012, foram investigadas, respectivamente, seis e nove amostras de laranja comercializadas em Minas.

Diante desse contexto, a otimização e validação de um método cromatográfico para a determinação de resíduos de carbendazim em laranja e néctar de laranja, visando sua implantação nas ações de controle Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), podem ser caracterizadas como tópicos de grande importância para a segurança alimentar no estado de MG.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Otimizar e validar um método cromatográfico para determinação de resíduos de carbendazim em laranja e néctar de laranja, com aplicação no monitoramento da ocorrência desse agrotóxico em amostras de laranja produzidas em MG e de laranja e néctar disponíveis no mercado de Belo Horizonte - MG.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições experimentais das etapas de purificação e determinação de um método quantitativo para análise de resíduos de carbendazim em laranja e néctar de laranja empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultra-violeta (UV).
- Validar o método otimizado por processo intralaboratorial, incluindo os parâmetros linearidade, sensibilidade, seletividade e efeitos de matriz, veracidade, precisão e limites de detecção e quantificação e incerteza.
- Monitorar a ocorrência de resíduos de carbendazim em amostras de laranja produzidas no estado de Minas Gerais, coletadas diretamente nas propriedades rurais do Cinturão Citrícola por fiscais do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), empregando o método validado.
- Monitorar a ocorrência de resíduos de carbendazim em amostras de laranja e de néctar de laranja, coletadas na CEASAMG (Centrais de Abastecimento de Minas Gerais S.A.) e no mercado da cidade de Belo Horizonte/MG, respectivamente, empregando o método validado.
- Avaliar a adequação das amostras analisadas considerando os LMR permitidos pela legislação nacional e internacional.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. LARANJA, NÉCTAR E SUCO DE LARANJA

3.1.1. DEFINIÇÕES E PADRÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE

De acordo com a classificação taxionômica, *Citrus* é um gênero na família *Rutaceae*. Vários sistemas de taxonomia para o gênero *Citrus* têm sido propostos. Esses sistemas se diferem principalmente no número de espécies que compõe o gênero (BASTIANEL et al., 2001). Grande parte da complexidade em classificar as espécies de *Citrus* se deve à variedade de mutações naturais ocorridas ao longo da evolução e ao grande número de hibridações provocadas pelo homem nas últimas décadas (MANNER, 2006). *Citrus* ssp. é composto de várias espécies produtoras de frutos muito conhecidos e consumidos pelo homem, como a laranja, o limão, a tangerina e o *grapefruit*.

As principais espécies de *Citrus* de interesse para o setor citrícola são *C. sinensis* (laranjas doces) e *C. aurantium* (laranjas azedas). No Brasil, oito espécies são predominantes. Entre elas, as principais diferenças dizem respeito ao tempo de colheita e a acidez. Na produção do suco de laranja, as variedades popularmente conhecidas como Hamlin, Pêra, Valência e Pêra-Natal são as mais comuns, enquanto variedades como Baía e Lima são normalmente destinadas ao consumo *in natura* (CITRUSBR, 2012b).

No Brasil, as bebidas, incluindo sucos e bebidas à base de frutas, são regulamentadas pela Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, do MAPA. Até 2009, as bebidas eram regulamentadas pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispunha sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Devido à publicação de sucessivos decretos que alteraram dispositivos do referido decreto, foi instituído o Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que revogou o decreto de 1997 e suas alterações, unificando o regimento da Lei nº 8.918 em um documento único (BRASIL 1994; BRASIL 2009).

A Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000, aprova o Regulamento Técnico geral para fixação dos Padrões de Identidade de Qualidade (PIQ) para sucos de diferentes frutas. Segundo esse regulamento, o suco de laranja é definido como a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da laranja (*Citrus sinensis*) por meio de processo tecnológico adequado, podendo ser incorporadas células da própria fruta (BRASIL, 2000). Ainda segundo o PIQ, dentre outras características, o suco deve apresentar teores mínimos de ácido ascórbico (25 mg para cada 100 g de suco) e de sólidos solúveis (10,5 °Brix), além de uma concentração de açúcares totais (naturais da laranja) não superior a 25 g para cada 100 g de suco. Para a comercialização do suco de laranja, a indústria exportadora utiliza as classificações NFC e FCOL. O suco tipo NFC passa por uma pasteurização, ou seja, é aquecido e resfriado para desativar enzimas que podem afetar a aparência e o sabor, além de matar micro-organismos com o potencial para causar prejuízos à saúde do homem. Já o suco tipo FCOL, responsável pelo maior volume de venda, é apenas concentrado e congelado (CITRUSBR, 2012b).

O suco de laranja pode ser comercializado também na forma de néctar e refresco. A legislação brasileira não define um padrão de identidade e qualidade para o néctar de laranja, mas define um PIQ para os néctares de uma maneira geral, podendo este ser aplicado quando não existir regulamento específico. Nesse contexto, a diferença entre o suco e o néctar de laranja está na adição de água potável, permitida apenas para o néctar, e na adição de açúcar, obrigatória para o néctar, mas opcional para o suco com o propósito de correção de Brix. Devido ao grande excedente de suco de laranja no mercado nacional, em Agosto de 2012, foi publicada a Instrução Normativa nº 21, que fixou a quantidade mínima de 50 % (m/m) de suco de laranja no néctar de laranja, sendo esse valor definido em 30 % (m/m), anteriormente (BRASIL, 2012). Já o refresco de laranja é constituído do suco da fruta e da adição de água potável, podendo ser ou não adoçado, garantindo a presença de no mínimo 30 % (m/m) do suco de laranja (BRASIL, 2009).

3.1.2. ASPECTOS NUTRICIONAIS E FUNCIONAIS

É possível observar diferença na composição da laranja segundo suas variedades, conforme mostrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Composição centesimal de diferentes variedades de laranja. Valores referentes a 100 g da fruta crua

Espécie da laranja	Variedade da laranja	Componente							
		Umidade (%)	Energia (kcal)	Proteína (g)	Lipídeo (g)	Carboidrato (g)	Fibra alimentar (g)	Cálcio (mg)	Vitamina C (mg)
<i>Citrus sinensis</i>	Baía	87,1	45	1,0	0,1	11,5	1,1	35	56,9
<i>Citrus aurantium</i>	Terra	85,4	51	1,1	0,2	12,9	4,0	51	34,7
<i>Citrus sinensis</i>	Lima	87,0	46	1,1	0,1	11,5	1,8	31	43,5
<i>Citrus sinensis</i>	Pêra	89,6	37	1,0	0,1	8,9	0,8	22	53,7
<i>Citrus sinensis</i>	Valência	86,9	46	0,8	0,2	11,7	1,7	34	47,8

Fonte: TACO, 2011.

O suco de laranja é um produto complexo formado por uma mistura aquosa de vários componentes orgânicos, tais como proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas (C, complexo B e A), além de minerais (cálcio e ferro, por exemplo), folato, carotenoides, compostos fenólicos e fibras, que podem ter diversos efeitos biológicos desejáveis para a saúde do homem (FRANKE *et al.*, 2005). A qualidade do suco de laranja é influenciada por fatores microbiológicos, enzimáticos, químicos e físicos, que comprometem as características sensoriais (aroma, sabor, aparência e consistência), físico-químicas (estabilidade da turbidez e separação de fases sólido/líquido), nutricionais e funcionais do suco (CORREA NETO & FARIA, 1999).

Sem levar em consideração as diferentes variedades, o *National Nutrient Database for Standard Reference do United States Department of Agriculture (USDA)*, estabelece a composição centesimal básica e a concentração de alguns importantes nutrientes presentes no suco de laranja natural, conforme mostrado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Composição centesimal do suco de laranja cru

Componentes	Unidade	Valor referente a 1 copo ou 248 g
Açúcares totais	g	8,26
Fibra	g	0,1
Carboidratos	g	10,20
Lipídeos totais	g	0,30
Proteína	g	0,60
Energia	kcal	45
Água	g	88,5
Cálcio	mg	12
Ferro	mg	0,17
Magnésio	mg	9
Fósforo	mg	11
Potássio	mg	187
Sódio	mg	0
Zinco	mg	0,06
Vitamina C	mg	62,5
Tiamina	mg	0,045
Niacina	mg	0,239
Riboflavina	mg	0,028
Vitamina A	IU	55
Vitamina B-6	mg	0,054
Vitamina K	µg	0,1

Fonte: USDA, 2012.

Bonifácio & César (2009) afirmam que as frutas cítricas e seus sucos têm sido reconhecidos como importantes coadjuvantes no tratamento da hipertensão. Tais autores atribuem os benefícios do suco de laranja sobre a pressão arterial à vitamina C e aos flavonoides (hesperidina), que apresentam ação antioxidante e vasoprotetora, respectivamente. As flavanonas cítricas, hesperidina e naringina, são encontradas, mutuamente, apenas no suco de laranja, sendo essa combinação responsável por um efeito sinérgico associado à ação antioxidante, hipolipidêmica e anti-inflamatória do suco da fruta (LIMA, 2010). A vitamina C atua removendo e interrompendo as reações dos radicais livres, enquanto a hesperidina atua no aumento da diurese e na manutenção da função endotelial (BRANCO *et al.*, 2007).

Estudos sugerem que os flavonoides apresentam potencial de ação contra diversos fatores de risco para as doenças arteriais coronarianas *in vitro*, sendo poucos

os trabalhos envolvendo estudos *in vivo*. Em pesquisa realizada por Kurowskasto e colaboradores (2000), homens e mulheres, moderadamente hipercolesterolêmicos, foram submetidos ao consumo de diferentes quantidades de suco de laranja por quatro semanas, mostrando que 750 mL/dia de suco de laranja aumentou em 21 % o HDL e diminuiu 16 % a razão LDL/HDL. Estudo com células hepáticas da linhagem HepG2 mostrou que, em sua forma aglicona, a hesperidina foi capaz de reduzir a síntese de éster de colesterol pelos hepatócitos, através inibição da acetil-coenzima-A acil transferase (BORRADAILE *et al.*, 1999). Bonifácio (2007) sugere que os efeitos da redução do LDL pelas flavanonas presentes no suco de laranja se devem ao fato dessas substâncias atuarem primariamente no fígado, reduzindo o conteúdo de colesterol hepático, que por sua vez aumentaria a captação das lipoproteínas ricas em colesterol.

O folato atua como coenzima no metabolismo dos aminoácidos e síntese de ácidos nucléicos, sendo considerado essencial para o crescimento. A concentração sérica de folato está inversamente associada com a concentração de homocisteína, sendo a hiper-homocisteinemia relacionada, em alguns trabalhos, a danos vasculares e acúmulo de colesterol (BONIFÁCIO, 2007).

Silveira (2011) ressalta, ainda, a importância do licopeno e dos carotenos em geral presentes na laranja. Atualmente, esses compostos são considerados como um dos mais potentes agentes antioxidantes, sendo sugeridos na prevenção de carcinogênese e aterogênese, devido a sua capacidade de proteger moléculas, inclusive o DNA, da ação de radicais livres. Licopeno e carotenos são encontrados em uma gama restrita de alimentos e, além disso, o organismo não é capaz de sintetizá-los, ou seja, eles são obtidos exclusivamente por meio da alimentação. Os frutos cítricos são considerados como importantes reservatórios de carotenoides, com a identificação de mais de 115 tipos diferentes, presentes na casca e na polpa dos frutos (BRANCO *et al.*, 2007).

Dessa forma, levando em consideração as características nutricionais e os aspectos funcionais, a laranja é caracterizada como uma importante matriz a ser monitorada.

3.1.3. ASPECTOS ECONÔMICOS

Dados econômicos mundiais sugerem que a participação da agropecuária no produto interno bruto (PIB) de um país apresenta tendência de queda ao longo do tempo. Essa diminuição na participação de geração de riqueza para o país é entendida como uma consequência natural do crescimento de outros setores da economia, como indústria e serviços (CARVALHO & SILVA, 2005). Segundo Brugnaro & Bacha (2009), neste século, países desenvolvidos como Japão, Inglaterra e Estados Unidos apresentam participação da agropecuária no PIB inferior a 2 % e com tendência, apesar das oscilações, de declínio nas últimas cinco décadas. Países em desenvolvimento como a Bolívia, Colômbia e Equador também apresentam tendência declinante da participação da agropecuária no PIB.

No cenário brasileiro, a participação da agropecuária no PIB apresentou tendência de oscilação negativa até 1993, conforme esperado segundo o padrão mundial. Entretanto, essa situação foi revertida de forma consistente a partir de meados da década de 90 (BRUGNARO & BACHA, 2009). Bacha & Rocha (1998) explicaram que o comportamento atípico do aumento da participação da agropecuária no PIB brasileiro se deve à junção de três fatores: aumento da produtividade na agropecuária, aumento da relação de preços agrícolas/preços industriais e aumento da relação de preços recebidos/preços pagos pela agropecuária. Em 2011, o PIB da agropecuária cresceu 3,9 % em relação ao mesmo período do ano anterior. Em valores correntes, chegou a R\$ 192,7 bilhões. O percentual ficou acima do PIB da economia que, em igual período, cresceu 2,7 %, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Dados do mesmo levantamento mostram que no período, a indústria cresceu 1,6 % e os serviços 2,7 % (IBGE, 2012). Já em 2012, o PIB da agropecuária recuou 2,3 % comparado a 2011, refletindo diretamente na variação do PIB total, que cresceu 0,9 % no mesmo período (IBGE, 2014). Sendo assim, a análise dos números da agropecuária brasileira evidencia a importância desse setor na economia.

Entre as várias culturas consolidadas e competitivas existentes na agroindústria brasileira, a citricultura tem grande destaque, sendo responsável por 60 % da produção mundial de suco de laranja. Segundo estudo conduzido por Nunes e colaboradores (2009) sobre a citricultura brasileira, o suco de laranja é o suco de fruta mais

consumido no mundo. Neste mesmo estudo, foi indicado que no período entre 1962 e 2009, a citricultura exportou, em valores de 2009, quase US\$ 60 bilhões, ou R\$ 111 bilhões, trazendo, em média, US\$ 1,3 bilhão por ano em divisas ao país.

A primeira fábrica de suco de laranja nacional foi montada durante a Segunda Guerra Mundial (1939/1945), para o abastecimento do mercado interno. Mesmo com o crescimento ocorrido no pós-guerra, as exportações de laranja já eram insuficientes para absorver toda a fruta produzida durante as safras. Para contornar o problema do excedente de produção, devido a um mercado interno pouco desenvolvido, a ideia da industrialização do suco de laranja ganhou atenção. Em 1959, instalou-se a primeira fábrica de suco concentrado no Brasil, a Companhia Mineira de Bebidas. Em 1961, a Citrosuco Paulista exportou para os Estados Unidos as primeiras mil toneladas de suco concentrado (MUNHOS *et al.*, 2012; AGROANALYSIS, 2009).

A indústria citrícola também produz diversos subprodutos a partir da produção do suco, como os óleos essenciais (OE) e o farelo de polpa cítrica. Esses produtos possuem diferentes aplicações no mercado, tais como a fabricação de solventes, aromas e fragrâncias, tintas, cosméticos e complemento para ração animal (BOTEON, 1998). O Brasil aparece entre os principais exportadores mundiais de OE de laranja, destacando o comércio com a União Europeia. Considerando apenas o óleo de laranja, dos US\$ 62 milhões gastos com a importação do produto pelo bloco europeu, 38 % desse valor foram destinados ao OE do Brasil. No período de janeiro de 2005 a outubro de 2008, a exportação de OE de cítricos pelo Brasil foi de, aproximadamente, 200.000 toneladas (MÜLLER, 2011).

A exportação do suco de laranja brasileiro é parcialmente influenciada pela safra da laranja nos Estados Unidos. Conforme mostrado na **Figura 1**, a citricultura americana ocupa a segunda posição mundial em volume de produção do fruto, sendo o estado da Flórida a grande região produtora. Entretanto, diferentemente do Brasil, a maior parte da produção americana é destinada ao abastecimento do mercado interno, e não à exportação. O impacto da safra americana na exportação do suco brasileiro se deve ao fato do Brasil depender de um desempenho ruim dos pomares da Flórida, para que os EUA comprem o suco brasileiro, com o objetivo de suprir a demanda interna. Caso a produção americana seja suficiente para o seu abastecimento, as indústrias brasileiras ficam com grande quantidade de suco sem um mercado certo para

exportação, gerando um estoque ocioso, impulsionando assim o preço do produto para baixo. Para se tornarem menos suscetíveis à influência americana, os citricultores brasileiros vêm buscando uma diversificação no mercado. A safra 2009-2010, por exemplo, foi exportada para mais de 70 países (CITRUSBR, 2012c).

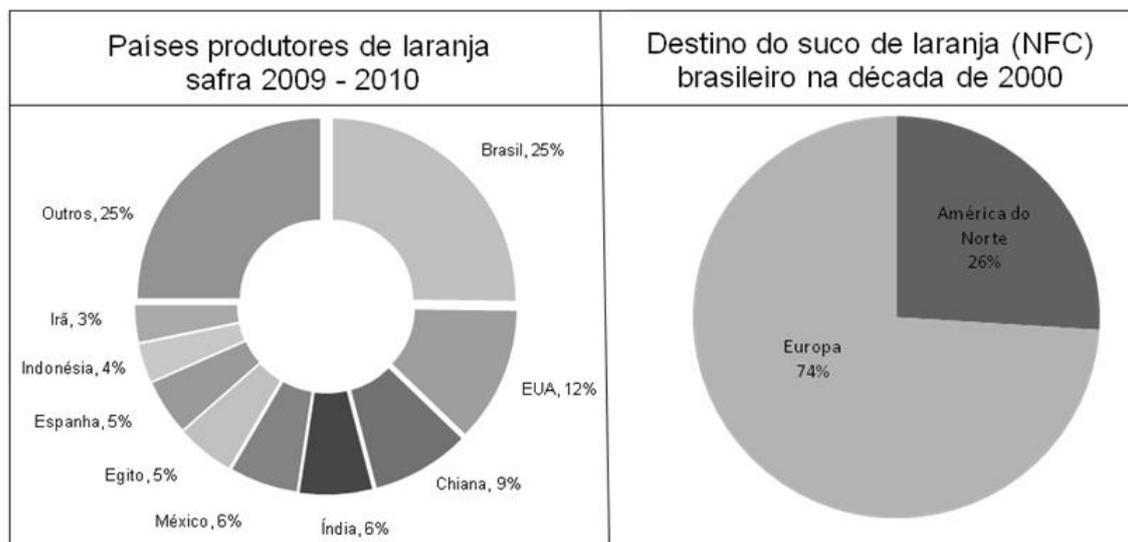


Figura 1. Principais produtores mundiais de laranja e mercados da citricultura brasileira.

Fonte: CITRUSBR, 2012c.

Segundo projeções do MAPA, a produção de laranja deverá passar de 20,2 milhões de toneladas da safra 2013 para 23,8 milhões de toneladas em 2023. Essa variação corresponde a uma taxa anual de crescimento de 1,7 %. A área colhida com laranja deve expandir-se nos próximos anos, dos atuais 811 mil para 906 mil hectares em 2023. O Brasil deve exportar 2,6 milhões de toneladas de suco de laranja no final do período das projeções. Mas esse número poderá chegar, em seu limite superior, a 3,2 milhões de toneladas de suco (MAPA, 2013a).

Restrições comerciais na forma de barreiras ao comércio, impostos de importação, são os principais fatores limitantes à expansão do suco de laranja brasileiro. Sendo assim, para manter o volume de suco já exportado e até mesmo alcançar as expectativas de crescimento do setor, é preciso que grandes mercados, como os Estados Unidos, maiores consumidores mundiais de suco de laranja, continuem comprando o suco brasileiro. Entretanto, o FDA suspendeu temporariamente as importações de suco de laranja brasileiro, no dia 10 de janeiro de

2012, ao serem detectados traços de carbendazim, aproximadamente 35 µg/kg, em embarques oriundos do Brasil (EPA, 2012). Vale destacar que a EPA considera que, mesmo com até 80 µg/kg, o suco não suscita quaisquer riscos para a saúde dos consumidores (ANDEF, 2012). O *Codex Alimentarius* preconiza limites máximos em torno de 1 mg/kg de resíduo de carbendazim (CODEX, 2008). O Brasil exporta suco de laranja também para a Europa, que tolera 0,2 mg/kg, e para o Canadá, que permite resíduos até 1 mg/kg (EPA, 2012). A ANVISA determina um limite de até 5 mg/kg (ANVISA, 2009). Os Estados Unidos aceitavam os mesmos 5 mg/kg de carbendazim no suco de laranja até 2009, quando numa intervenção da EPA, definiram tolerância zero para resíduos do agrotóxico. Porém, o país continuou recebendo as produções brasileiras, que apresentam em média indicadores em torno de 30 µg/kg (FUNDECITRUS, 2012). A pulverização do carbendazim foi proibida nos Estados Unidos, mas o fato não foi incluído nos registros do *Safety Concern*, sendo o tiofanato metílico, agrotóxico que é convertido a carbendazim na natureza, ainda usado pelos americanos na produção de maçã, pêssigo, morango e outros. A proibição foi exclusiva para a citricultura (TEJON, 2012). Mediante a esse impasse comercial, o Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) tem orientado os citricultores brasileiros a suspenderem o uso dos fungicidas carbedazim e o tiofanato metílico (FUNDECITRUS, 2012).

3.1.4. CONSUMO

Conforme apresentado na **Tabela 3**, em 2009, a comercialização mundial de bebidas atingiu o marco dos 1.500 bilhões de litros, o equivalente a 231 litros por habitante por ano. As categorias líderes em participação nesse ano foram os chás quentes (21 %), as águas engarrafadas (15 %) e o leite (12,9 %). Os sucos, refrescos e néctares atingiram, conjuntamente, uma participação de cerca de 5 %, sendo o sabor laranja responsável por 35 % do comércio dos sucos e néctares. Este cenário reflete uma tendência observada nos últimos anos, onde o maior crescimento do mercado está voltado para bebidas de menor valor agregado e baixo teor calórico (CITRUSBR, 2012c).

Tabela 3. Evolução do consumo mundial de bebidas

Ano	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
TOTAL (bilhões de litros)	1.310	1.368	1.431	1.492	1.529	1.563	1.611
Bebida	Percentual (%)						
Bebidas à Base de Leite	3,5	3,3	3,4	3,6	3,6	3,7	3,9
Outros	6,8	6,6	6,7	6,8	6,9	7,0	7,2
Café Quente	8,9	10,0	9,8	9,6	9,5	9,5	9,5
Chá Quente	20,6	21,0	21,1	21,0	21,1	21,0	20,9
Vinho	1,8	2,0	2,0	2,0	2,0	2,2	2,2
Cerveja	11,2	11,0	11,1	11,3	11,2	10,9	10,8
Água	13,3	13,3	13,8	14,3	14,7	15,0	15,3
Bebidas Carbonatadas	13,9	13,5	13,2	13,0	12,8	12,5	12,3
Refrescos	1,8	1,9	2,0	2,1	2,2	2,3	2,4
Sucos & Néctares	2,6	2,6	2,5	2,5	2,5	2,4	2,4
Leite Aromatizado	1,0	0,7	0,7	0,6	0,5	0,6	0,4
Leite Branco	14,6	14,1	13,7	13,2	13,0	12,9	12,7

Fonte: MARKESTRAR, 2010.

Observa-se nos últimos anos um declínio no consumo mundial do suco de laranja, estimado em 12,3 % entre 2003 a 2012 em levantamento realizado pela Markestrar® e divulgado pela Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (CITRUSBR, 2014). Tal redução pode ser explicada pelo aumento da concorrência de outras bebidas como os isotônicos, energéticos e *blends*, somada ao baixo estímulo pelo consumo do suco de laranja (CITRUSBR, 2012c). Os quatro principais mercados, Estados Unidos, Alemanha, França e Reino Unido, deixaram de consumir 15 % do suco de laranja, representando 232 mil toneladas a menos. Já no grupo dos BRICs (Brasil, Rússia, Índia e China) mais o México, o consumo do suco aumentou 41 %, porém esse volume adicional significou apenas 75 mil toneladas, deixando ainda um grande déficit no mercado (CITRUSBR, 2012a).

No Brasil, entre 1999 e 2005, o maior desenvolvimento no consumo de bebidas ocorreu entre os produtos à base de soja, que cresceram 39 %, seguido dos sucos, néctares e refrescos e água de coco, que juntos somaram um crescimento de 19 % (NEVES & JANK, 2006).

A análise do consumo alimentar pessoal do brasileiro, realizada pelo IBGE, referente aos anos de 2008 e 2009, apontou que 7,1 % da população consome laranja *in natura*, totalizando um consumo médio de 274,1 g da fruta por pessoa durante o período avaliado. Ainda segundo o IBGE, o consumo de laranja médio *per capita* foi de 22,1 g da fruta por dia na região sudeste. O consumo do suco de laranja pode ser estimado pelo mesmo levantamento mencionado anteriormente, onde foi indicado um consumo alimentar médio *per capita* de sucos, refrescos e sucos em pó reconstituídos de 146,8 g por dia na região sudeste, sendo esta quantidade definida para o somatório de todos os sabores de fruta, e não apenas os de laranja (IBGE, 2011b).

O significativo consumo de laranja e suco de laranja pela população brasileira, apesar da recente redução no consumo deste suco, associado à importância da citricultura para a economia nacional e à questão do embargo do suco brasileiro no mercado americano, devido à presença do carbendazim, justificam um monitoramento desse resíduo nos produtos supracitados.

3.2. AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

3.2.1. USO NA PRODUÇÃO AGRÍCOLA

Além das novas técnicas de plantio, o uso de equipamentos de semeadura e colheita de alta tecnologia, e de pesquisas no campo da agropecuária, a agricultura moderna utiliza uma diversidade de insumos, como praguicidas e fertilizantes. O crescimento da população observado a partir de 1800 e o surgimento da indústria química moderna no século XX alteraram significativamente a produção agrícola mundial. A demanda cada vez maior de alimentos implicou na justificativa para a utilização de produtos químicos no controle de organismos que possam afetar a produção. A partir do desenvolvimento técnico-científico e industrial ocorrido após a II Guerra Mundial, a síntese de compostos químicos bioativos ficou mais rápida e barata, tornando o modelo agrícola mundial dependente dessa tecnologia (BEDOR, 2008).

O termo praguicida tem o significado literal de produto com a capacidade de destruir pragas. Por sua vez, o termo praga aplica-se aos organismos animais e

vegetais, capazes de reduzir a quantidade ou prejudicar a qualidade dos alimentos, das sementes, rações, forragens, plantas e madeiras, durante todo o processo produtivo, ou que podem transmitir doenças ao homem e aos animais (LARINE, 1999). Dentro do grande grupo dos praguicidas estão os agrotóxicos, termo geral que classifica os compostos químicos usados na agricultura, cuja finalidade é alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Conforme mostrado na **Tabela 4**, os praguicidas podem ser denominados segundo o tipo de praga a que se destinam. Entretanto, essas substâncias não são, por via de regra, seletivas para o combate de apenas a um tipo de praga. Por isso, recentemente, também receberam o nome de biocidas (MIDIO & MARTINS, 2000).

Tabela 4. Classificação de praguicidas de acordo com o tipo de praga a que se destinam

<i>Praga alvo</i>	<i>Classificação</i>
Animais invertebrados	
Insetos	Inseticidas
Ácaros	Acaricidas
Nematóides	Nematicidas
Moluscos	Moluscicidas
Animais vertebrados	
Roedores	Raticidas
Aves	Avicidas
Peixes	Piscicidas
Vegetais superiores	
Ervas daninhas	Herbicidas
	Reguladores do crescimento
Culturas	Desfolhantes
	Dessecantes
Outros	
Fungos	Fungicidas
Algas	Algicidas

Fonte: MIDIO & MARTINS, 2000.

A incorporação de novas substâncias na agropecuária trouxe uma mudança radical no pensamento do impacto da atividade agrária no ambiente em que ela se faz presente (STOPPELLI & MAGALHÃES, 2005). A acumulação de agrotóxicos ao longo da cadeia alimentar, por exemplo, leva a um fenômeno ecológico chamado de

biomagnificação, definido como o aumento das concentrações de uma determinada substância de acordo com o aumento do nível trófico, conforme ilustrado na **Figura 2**.

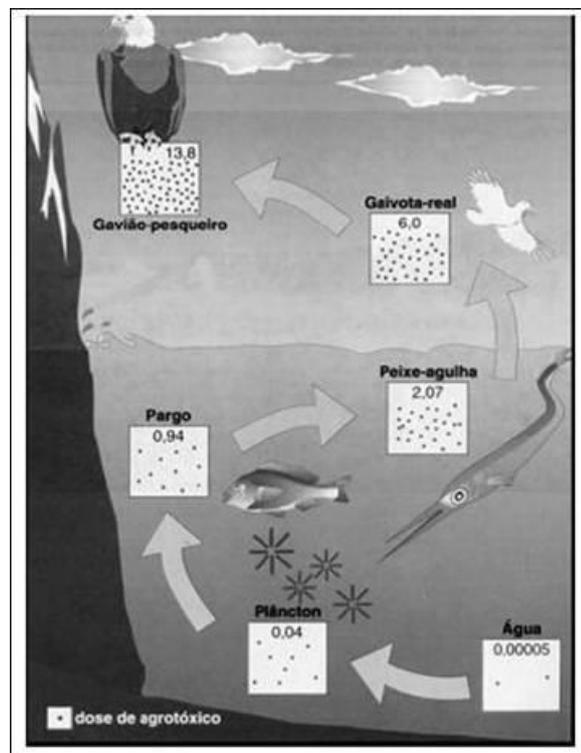


Figura 2: Processo de biomagnificação de agrotóxicos.

Fonte: SARRIEGO, 2004.

O homem pode ser exposto aos agrotóxicos de maneira direta ou indireta. A contaminação direta, também chamada de exposição primária, ocorre por meio da manipulação de agrotóxicos, como, por exemplo, durante a aplicação desses compostos em uma determinada cultura. Já a contaminação indireta ou secundária pode ocorrer no meio ambiente ou pela ingestão de alimentos contaminados. Assim, a biomagnificação, acompanhada de outros fatores, como o comprometimento da saúde dos agricultores, devido à manipulação direta de grandes quantidades de agrotóxicos ao longo de sua atividade laboral, e a contaminação de alimentos e leitos de água, são exemplos de problemas oriundos do uso de agrotóxicos de maneira não racional, ou seja, sem respeitar as BPA (TADEO, 2008).

As BPA são baseadas em quatro pilares fundamentais: a viabilidade econômica, a sustentabilidade ambiental, a adesão social e a segurança e qualidade na produção de alimentos. As recomendações presentes nas BPA compreendem as necessidades das indústrias de alimentos, dos produtores e dos órgãos governamentais, que buscam estabelecer regulamentos e padrões para o melhor uso dos recursos naturais, a preservação da saúde e das boas condições de trabalho dos produtores, melhoramento da qualidade e segurança alimentar, bem como a criação de novas oportunidades de mercado (FAO/WHO, 2003).

Numa abordagem específica ao uso de agrotóxicos, as BPA são entendidas como um conjunto de medidas preventivas para o risco químico, físico e microbiológico inerentes ao uso de praguicidas. Entre essas medidas estão o uso apenas de produtos registrados para determinada cultura, a calibração adequada de equipamentos aplicadores, uso da substância na dosagem correta, o respeito do tempo de carência, o uso de equipamentos de proteção individual e o descarte apropriado das embalagens (ANVISA, 2011a).

Segundo Tadeo (2008), o desenvolvimento de uma nova substância química, para o uso como agrotóxico, requer, aproximadamente, 15 anos de estudo e um investimento na ordem dos 20 milhões de dólares, sendo que apenas um componente de cada 10.000 avaliados, em média, chega a ser aprovado para a produção comercial. O alto rigor no processo de desenvolvimento é necessário, uma vez que o registro de um agrotóxico envolve a comprovação uma série de informações que atestem a eficácia e segurança da substância envolvida. Informações como propriedades físico-químicas, métodos de análise, eficácia, toxicologia e o comportamento e a degradação do composto no meio ambiente são essenciais para que o agrotóxico obtenha o seu registro para o uso e comercialização em diferentes países.

De acordo com Soares (2010), houve um crescimento exponencial do consumo de agrotóxicos no Brasil nas últimas décadas, conforme representado na **Figura 3**. Com a diminuição do crédito rural concedido pelo governo, as empresas agroquímicas entraram de forma maciça no financiamento, conferindo elas mesmas o crédito para a aquisição de insumos, com prazos, em geral, iguais aos do período de safra, o que possibilitou uma mudança na agricultura brasileira no que diz respeito à dependência da oferta de crédito rural.

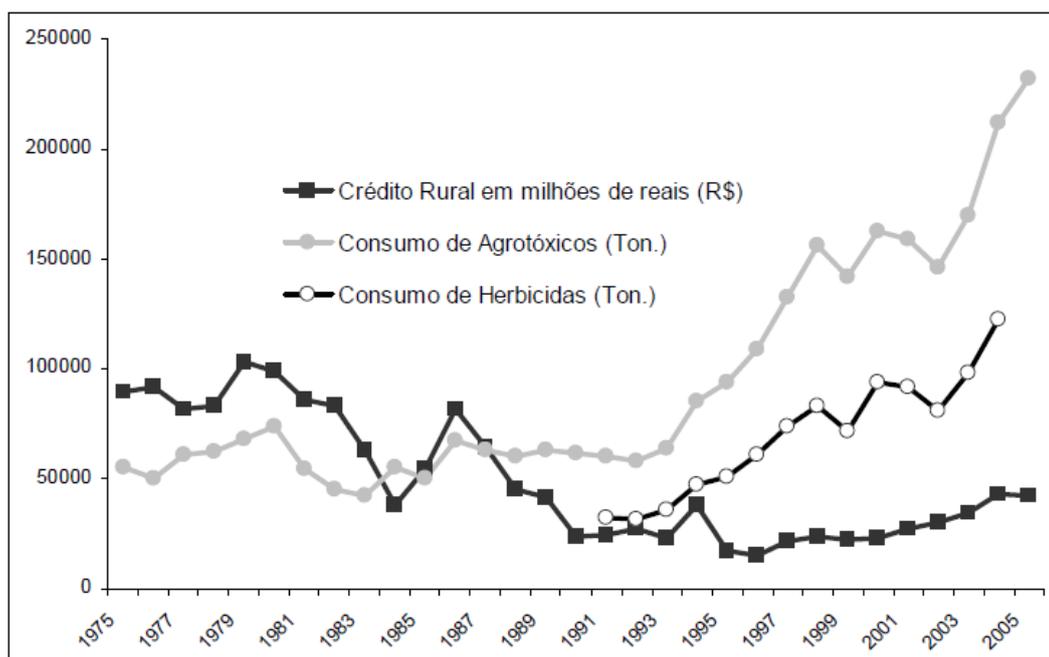


Figura 3. Oferta de crédito rural e consumo de agrotóxicos no Brasil.
 Fonte: SOARES, 2010.

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), em 2008, o Brasil tornou-se o principal mercado consumidor de agrotóxicos, ficando à frente dos EUA e consumindo 733,9 milhões de toneladas (SINDAG, 2009). As estimativas de venda somaram R\$ 10,199 bilhões no acumulado de janeiro a outubro de 2011, 10 % a mais que os R\$ 9,278 bilhões do mesmo período do ano anterior. Ainda segundo o sindicato, em 2011, as vendas de herbicidas, inseticidas e acaricidas somaram 3.455, 3.512 e 147 milhões de reais, respectivamente. Já as vendas de fungicidas subiram 3 % de 2010 a 2011, no mesmo período acumulado (SINDAG, 2011).

3.2.2. BENZIMIDAZÓIS - CARBENDAZIM

Imidazóis são compostos heterocíclicos formados por um anel insaturado de cinco membros, constituído de três átomos de carbono e dois átomos de nitrogênio. O exemplo mais simples desse grupo é o próprio imidazol. Entre as várias substâncias que contêm o anel imidazol em suas estruturas, estão os fungicidas imidazólicos, sendo esses constituídos de radicais volumosos ligados ao átomo de nitrogênio

(procloraz e imazalil) ou apresentam uma estrutura benzimidazol (benomil, carbendazim, tiabendazol e tiofanato metílico), conforme mostrado na **Figura 4** (LARINE, 1999).

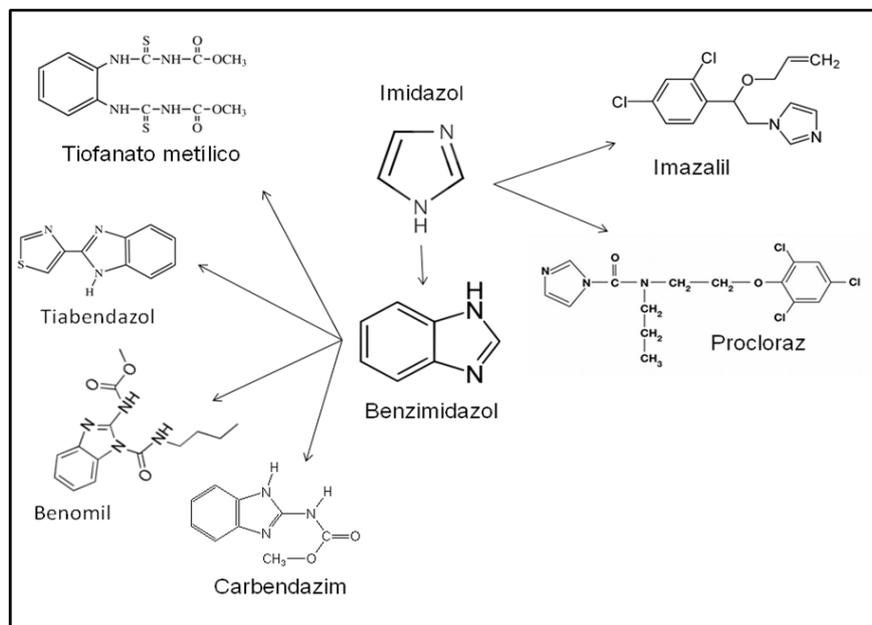


Figura 4. Fórmula estrutural dos principais fungicidas imidazólicos utilizados na agropecuária.

Os fungicidas benzimidazóis são largamente utilizados na agricultura devido ao seu amplo espectro de ação e eficácia em baixas concentrações, sendo aplicados nos períodos pré e pós-colheita. Esse grupo de agrotóxicos foi primeiramente utilizado na Europa na década de 70 para o controle da mancha ocular (*eyespot*) em cereais (MAZELLIER *et al.*, 2003). Quando foram introduzidos no mercado, os benzimidazóis representaram uma classe inovadora de fungicidas com propriedades únicas. Entre essas propriedades destacava-se a ação sistêmica nos vegetais, sendo absorvidos rapidamente pela raiz e folhas, permitindo assim longos intervalos entre as aplicações (FRAC, 2005). No Brasil, em 2001, 23 % dos fungicidas utilizados pertenciam à classe dos benzimidazóis, que continuam entre os principais fungicidas utilizados na agricultura por controlar diversos fungos patogênicos, além de apresentar características acaricidas (FARIA *et al.*, 2007).

Carbendazim, benomil e tiofanato metílico são, na maioria das vezes, avaliados em conjunto quanto a suas características e toxicidade devido ao fato do benomil e do

tiofanato metílico serem rapidamente convertidos em carbendazim na natureza, conforme demonstrado na **Figura 5** (NAKAMURA *et al.*, 2011).

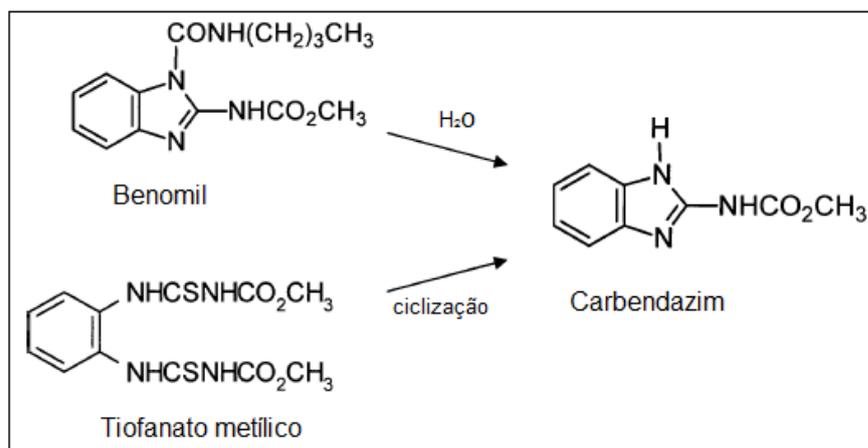


Figura 5. Conversão de benomil e tiofanato metílico a carbendazim.

Fonte: NAKAMURA *et al.*, 2011.

O carbendazim possui a massa molecular de 191,2 g/mol, sendo caracterizado como um sólido cristalino branco, inodoro, com pressão de vapor menor que 100 nPa a 20 °C, baixa solubilidade em água (8 mg/L a 20 °C e pH 7) e alta estabilidade em meio ácido. O carbendazim possui estabilidade térmica entre 35 a 50 °C (IPCS, 1996).

O benomil tem um tempo de meia vida, em condições aeróbicas, de duas horas em água e de 19 horas no solo. Já o tiofanato metílico possui o tempo de meia vida de dois dias na água e menos de um dia no solo, também em condições aeróbicas (IPCS, 2010a). A degradação dos benzimidazóis no solo segue os mecanismos gerais da degradação de agrotóxicos, sendo que a rota principal é a microbiológica. Uma completa degradação é alcançada apenas por meio de um pequeno número de linhagens microbianas que são capazes de crescer utilizando o agrotóxico como única fonte de carbono (SILVA *et al.*, 1999).

A legislação brasileira não autoriza a comercialização do benomil, apenas do tiofanato metílico e do carbendazim, sendo esses utilizados em várias culturas (ANVISA, 2009). Na produção da laranja, são os principais agrotóxicos utilizados para o combate das doenças pinta preta e podridão floral, ambas causadas pelo fungo *Guignardia citricarpa* (**Figura 6**). A pinta preta é caracterizada por lesões na casca do

fruto, podendo diminuir o rendimento de suco por unidade de fruta, além de causar a queda prematura do pé, reduzindo assim a produtividade (RODRIGUES *et al.*, 2007).



Figura 6: Variação dos sintomas causados pela *Guignardia citricarpa* em laranja.

Fonte: FUNDECITRUS, 2012.

3.2.3. TOXICIDADE

Segundo Larine (1999), em grau variável, todo composto com atividade praguicida é potencialmente tóxico ao homem e aos organismos vivos relacionados com seus ecossistemas. A avaliação do risco é baseada em estudos qualitativos e quantitativos, em que são considerados os dados toxicológicos, o tipo de dano provocado, as doses utilizadas e os efeitos correspondentes, bem como os dados de exposição e de eficácia, para inferir o grau de segurança do agrotóxico.

A toxidade aguda de um agrotóxico se refere à capacidade que um determinado princípio ativo possui em causar dano a uma pessoa ou animal, mediante a uma única exposição, geralmente em um curto período de tempo (LOREZ, 2009). A toxidade aguda é expressa pela quantidade necessária, em miligramas por quilo de peso corpóreo, para provocar a morte de 50 % de um lote de animais. É representada pela sigla DL_{50} nos estudos pela via oral e cutânea e CL_{50} nos estudos pela via respiratória (LARINE, 1999). A toxidade crônica é determinada a partir da submissão de animais a longos períodos de exposição a uma determinada substância. Qualquer dano ocorrido por repetidas e pequenas doses em um determinado período de tempo é chamado de efeito crônico. Alguns dos efeitos crônicos comuns causados pela intoxicação por agrotóxicos são: má formação congênita, surgimento de tumores benignos e malignos, desordens sanguíneas e endócrinas, além de alterações no sistema reprodutor (LOREZ, 2009).

Os agrotóxicos são classificados pela ANVISA em quatro classes de perigo para sua saúde, sendo cada classe representada por uma cor no rótulo e na bula do produto, conforme mostrado na **Tabela 5**.

Tabela 5. Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseada na Dose Letal50 e na Concentração Letal50 de formulações líquidas e sólidas

Classe	Cor	Toxicidade	DL ₅₀ oral		DL ₅₀ dérmica		CL ₅₀ inalatória mg/L
			mg/kg		mg/kg		
			Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	
I	Vermelho	Extremamente tóxico	≤ 20	≤ 5	≤ 40	≤ 10	≤ 0,2
II	Amarelo	Altamente tóxico	20 – 200	5 –50	40 -400	10 –100	0,2 – 2,0
III	Azul	Mediamente tóxico	200 – 2.000	50-500	400-4000	100-1000	2,0 – 20,0
IV	Verde	Pouco tóxico	> 2.000	> 500	> 4000	> 1000	> 20,0

Fonte: BRASIL, 1989.

O carbendazim está cadastrado na ANVISA sob o número 10605-21-7, sendo considerado um antifúngico de aplicação foliar nas culturas de algodão, citros, feijão, maçã, soja e trigo e de aplicação em sementes de algodão, arroz, feijão, milho e soja. Sua classificação toxicológica é classe III, ou seja, mediamente tóxico. O LMR definido para citros é de 5 mg/kg e o intervalo de segurança é fixado em sete dias (ANVISA, 2009). Para fins de monitoramento de resíduos, devem ser considerados os LMR estabelecidos nas monografias de carbendazim e tiofanato metílico, cujos resíduos são expressos conjuntamente como carbendazim.

A toxicidade do carbendazim foi avaliada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (WHO) em 1995, na Suíça, onde foi estabelecida uma ingestão diária aceitável (IDA) de 0 a 0,03 mg/kg, baseado em um nível no qual não foram observados efeitos adversos (NOAEL) de 2,5 mg/kg por dia (FAO/WHO, 2005). Esses valores foram estabelecidos por meio da avaliação de um estudo, com duração de dois anos, realizado em cães, sendo utilizado um fator de segurança de 100 vezes ao estabelecer os limites para o homem. O comitê da FAO/WHO estabeleceu ainda uma dose de referência aguda (ARfD) de 0,5 mg/kg de peso corporal, baseado em um NOAEL de 50 mg/kg de peso corporal, para a população em geral, incluindo crianças, e uma ARfD de 0,1 mg/kg de

peso corporal para mulheres na idade fértil, baseado em um NOAEL de 10 mg/kg. A ARfD é definida como dose de determinada substância às quais a população pode estar exposta diariamente sem apresentar risco de aparecimento de efeito nocivo à saúde durante toda a vida (OGA, 2003). Para definição dos valores de ARfD, o comitê da FAO/WHO avaliou os resultados de 4 estudos envolvendo ratos e coelhos. Por fim, ainda em 2005, os conselheiros da JMPR concluíram que a exposição de resíduos de carbendazim, por curto período de tempo, pelo uso de benomil, carbendazim e tiofanato metílico em *commodities*, não apresentava risco significativo para a saúde pública, considerando os valores máximos de resíduos encontrados em 31 *commodities* em 1998 e 2003 por levantamentos feitos pela JMPR (FAO/WHO, 2005). O *Codex Alimentarius* preconiza limites máximos em torno de 1 mg/kg de peso corporal de resíduo de carbendazim (CODEX, 2008).

3.2.4. REGULAMENTAÇÃO E MONITORAMENTOS

Substâncias químicas empregadas para o controle de pragas e doenças da agricultura são regulamentadas pela Lei nº 7.802, conhecida como “Lei dos Agrotóxicos”, promulgada em 11 de julho 1989. Anteriormente a essa lei, a legislação que regulamentava o setor apresentava como base um decreto promulgado 55 anos antes, o Decreto nº 24.114, de 14 de abril de 1934, época em que os produtos organossintéticos, hoje largamente empregados, sequer eram utilizados como agrotóxicos (GARCIA *et al.*, 2005; BRASIL, 1989; BRASIL, 2000).

A Lei nº 7.802 foi considerada um avanço para a preservação da saúde pública e do ambiente. Entre os vários pontos importantes da lei, destaca-se a exigência de registro prévio dos agrotóxicos para sua produção, importação, exportação ou comercialização, de acordo com os requisitos e diretrizes dos órgãos federais responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura, além de só ser permitido o registro de um novo produto agrotóxico se for comprovadamente igual ou de menor toxicidade aos já registrados para o mesmo fim (BRASIL, 1989). Em 2002, a Lei nº 7.802 foi alterada pelo Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamentou mais detalhadamente questões como: embalagens e acondicionamentos de agrotóxicos, fontes de grandes intoxicações e contaminações ambientais e humanas, rótulos e bulas, propaganda, fiscalização e a responsabilidade civil e penal

por danos causados à saúde das pessoas e ao meio ambiente, para o profissional prescritor, o usuário, o comerciante, o titular do registro, o produtor e o empregador (BRASIL, 2002).

Com o objetivo principal de promoção da saúde por meio do consumo de alimentos de qualidade e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis causadas pela ingestão cotidiana de quantidades perigosas de agrotóxicos, foi criado, em 2003, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). O PARA originou-se do Projeto de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, iniciado em 2001 com o objetivo de estruturar um serviço para avaliar a qualidade dos alimentos e implementar ações de controle de resíduos. Em 2003, o projeto transformou-se em Programa, através da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 119, e passou a ser desenvolvido dentro do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), sob a coordenação da ANVISA e em conjunto com os órgãos de vigilância sanitária estaduais (ANVISA, 2010).

Em 2010, no âmbito do PARA foram monitorados resíduos de agrotóxicos em dezoito culturas, incluindo 148 amostras laranja, das quais seis foram provenientes do estado de MG. Do total de 2.488 amostras analisadas, em 37 % não foram detectados resíduos, 35 % apresentaram resíduos abaixo do LMR estabelecido e 28 % foram consideradas insatisfatórias por apresentarem resíduos de produtos não autorizados ou, autorizados, mas acima do LMR. Das 694 amostras consideradas insatisfatórias (28 %), destacou-se o carbendazim com 176 amostras apresentando resíduos desse agrotóxico. Contudo, segundo o relatório do PARA referente ao ano de 2010, não foram encontrados resíduos de carbendazim acima do LMR estabelecido pela legislação brasileira nas amostras de laranja avaliadas (ANVISA, 2011b).

No PARA, em 2011, foram contempladas 1.628 amostras de 13 matrizes, dentre as quais não estava incluída a laranja. Já no ano de 2012, a cultura laranja foi monitorada dentre 13 matrizes. Das 3.067 amostras coletadas, somente foram reportados resultados para 1.665, sendo 22 % sem detecção resíduos, 42 % com resíduos abaixo do LMR estabelecido e 36 % consideradas insatisfatórias por apresentarem resíduos de produtos não autorizados ou, autorizados, mas acima do LMR. Também não foram encontrados resíduos de carbendazim acima do LMR

estabelecido pela legislação brasileira nas 227 amostras de laranja avaliadas, das quais nove eram do estado de MG (ANVISA, 2013a).

Até 2007, o MAPA realizava apenas o controle de resíduos de agrotóxicos em produtos de origem animal (MAPA, 1999; MAPA, 2010), 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). Inicialmente, o programa monitorava apenas as culturas de maçã e mamão, com investigação de resíduos de carbendazim, entre outros. Para o ano-safra 2009-2010 houve uma ampliação considerável, com monitoramento de 17 culturas, sendo que a matriz laranja não foi incluída (MAPA, 2009). A partir do ano-safra 2010-2011 houve nova ampliação do número de matrizes pesquisadas, totalizando 23 culturas, com inclusão da laranja. Neste monitoramento, dentre as 30 amostras de laranja analisadas, das quais duas eram do estado de MG, não houve quantificações de teores superiores ao LMR estabelecido em nenhum caso, embora sete amostras tenham apresentado resíduos de agrotóxicos não autorizados (MAPA, 2011b). No ano safra 2011-2012, as culturas foram mantidas e 21 amostras de laranja foram analisadas, das quais 16 foram consideradas conformes. Nenhuma amostra foi proveniente do estado de MG, no referido ano safra (MAPA, 2013).

Além do MAPA, 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 agrônômica e os resultados das análises laboratoriais. A laranja é parte das matrizes monitoradas neste programa,

contudo o carbendazim ainda não foi incluído na relação de analitos investigados (IMA, 2011).

Não foram encontrados na literatura estudos de monitoramento de resíduos de carbendazim em laranja ou néctar realizados no Brasil.

Os dados relativos aos monitoramentos oficiais de resíduos de carbendazim na matriz laranja permitem identificar a conformidade em relação aos limites regulamentados para carbendazim, mas não os teores detectados. Também, os números relativos à laranja do estado de MG são restritos, sugerindo que um monitoramento focado na produção mineira, bem como nos produtos disponíveis para consumo neste mercado se torna relevante.

3.2.5. MÉTODOS DE ANÁLISE

A partir da década de 70, a maior parte dos métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos envolvia a cromatografia gasosa (CG), acoplada a diferentes detectores, destacando a espectrometria de massas (EM). Entretanto, com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas, a incorporação da cromatografia líquida (CL) nos protocolos de análise de resíduos de agrotóxicos ganhou notoriedade tanto nos métodos individuais quanto nos métodos multiresíduos (MMR) (SOLER & PICÓ, 2007).

Segundo Jardim e colaboradores (2006), para a separação de compostos por meio da técnica de CG, é necessário que a amostra seja suficientemente volátil, a fim de passar através da coluna na forma de vapor, e estável termicamente, para não se decompor nas condições da separação. Por isso, somente os gases e cerca de 20 % dos compostos orgânicos conhecidos podem ser analisados por CG, sem modificar suas estruturas para aumentar-lhes a volatilidade. Já a CL requer somente que a amostra seja solúvel na fase móvel. Separações complexas são, frequentemente, desenvolvidas mais facilmente pela CL do que pela CG, devido a maior diversidade de mecanismos de separação. Assim, a CLAE constitui uma técnica indicada para a separação de espécies iônicas, macromoléculas, compostos de alto ponto de ebulição e de baixa estabilidade térmica.

Os MMR para análise de agrotóxicos são capazes de determinar, simultaneamente, mais de um resíduo em uma única análise. Essa capacidade é proporcionada pela separação dos resíduos ocorrida durante a passagem da amostra pela coluna cromatográfica, seja na CL ou na CG. Sempre que uma amostra apresenta um histórico desconhecido sobre o uso de agrotóxicos, os MMR devem ser utilizados para fornecer um amplo cromatograma, cobrindo os potenciais resíduos. Por meio da análise desse cromatograma, é possível determinar um método de análise mais específico para a confirmação da amostra em questão (MALIK *et al.*, 2010).

Na **Tabela 6** encontram-se relacionadas publicações de métodos para determinação da presença de carbendazim em laranja e produto à base de fruta, bem como outros vegetais *in natura*.

Tabela 6: Métodos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta ou espectrometria de massas publicados para o escopo de carbendazim em alimentos de origem vegetal.

<i>Referência</i>	<i>Analito</i>	<i>Matriz</i>	<i>Técnica</i>	<i>Determinação</i>
GARRIDO <i>et. al.</i> (1995)	Imazalil e carbendazim	Laranja	Cromatografia líquida	Detector ultravioleta
THARSIS <i>et. al.</i> (1997)	Tiabendazol e carbendazim	Mix de frutas	Cromatografia líquida	Detector ultravioleta
FERNANDES <i>et. al.</i> (2001)	Imazalil, tiabendazol, benomil, carbendazim e tiofanato-metilico	Laranja	Cromatografia líquida	Espectrometria de massas
BLASCO <i>et. al.</i> (2002)	Carbendazim, hexitiazox, imidaclopride e metiocarbe	Pêssego e ameixa	Cromatografia líquida	Espectrometria de massas
LIU <i>et. al.</i> (2006)	Carbendazim e tiabendazol	Mexerica	Cromatografia líquida	Detector de arranjo de diodos (DAD)
BLASCO <i>et. al.</i> (2006)	Bitertanol, carbendazim, hexitiazox, imazalil, imidacloprid, metildation, metiocarbe, piriproxifen,	Laranja e tangerina	Cromatografia líquida	Espectrometria de massas

	tiabendazil e triclorfon			
HE <i>et. al.</i> (2008)	Tiabendazol, benomil, carbendazim	Suco de maçã concentrado	Cromatografia líquida	Detector de arranjo de diodos (DAD)
DREASSI <i>et. al.</i> (2010)	Tiabendazol, carbendazim, tiofanato-metílico, imazalil e procloraz	Laranja, limão e grapefruit	Cromatografia líquida	Espectrometria de massas
NAKAMURA <i>et.</i> <i>al.</i> (2010)	Benomill, carbendazim, tiofanato -metílico, tiofanato, etilenobisditiocarbamatos	Batata, espinafre, laranja, repolho, berinjela e maçã	Cromatografia líquida	Espectrometria de massas
LÓPEZ <i>et. al.</i> (2012)	30 agrotóxicos, estando o carbendazim neste grupo	Refrigerante de fruta	Cromatografia líquida	Espectrometria de massas
PARANTHAMAN <i>et. al.</i> (2012)	Carbendazim, endosulfan e clorpirifós	Banana	Cromatografia líquida	Detector ultravioleta

Para a análise por MMR em matrizes complexas como os alimentos e amostras ambientais, a CLAE-EM tem sido utilizada em vários estudos, sendo também adotada em protocolos oficiais para monitoramento de resíduos de diferentes agrotóxicos em países como Estados Unidos, Alemanha, Austrália e Holanda (LÓPEZ, 2012).

Na CLAE, os detectores UV e de arranjo de diodos (DAD) também são reportados na literatura, sendo de grande importância, uma vez que são técnicas menos complexas e mais baratas quando comparadas a detecção por EM (KAIHARA *et al.*, 2002; TSENG *et al.*, 2007; TUAN *et al.*, 2009; PARANTHAMAN *et al.*, 2012).

O espectrômetro de massas é um instrumento sofisticado onde amostras são injetadas, ocorrendo produção de íons pela fonte de ionização. Uma vez formados, os íons são analisados pelo analisador de massas de acordo com a sua razão massa/carga. O uso da CLAE-UV, como técnica de separação e detecção, seguida de EM, como técnica de confirmação para presença de carbendazim em frutas e produtos derivados, apresenta vantagens para a análise do resíduo desse agrotóxico, uma vez que o conjunto possui alta seletividade e a boa detectabilidade (JARDIM *et al.*, 2006; TUAN *et al.*, 2009; KAIHARA *et al.*, 2002). Ao utilizar um detector UV antes do EM é possível reduzir o custo e o tempo das análises, uma vez que as amostras que não

apresentarem sinal de detecção no tempo de retenção esperado para o analito no UV não precisam ser submetidas à confirmação no EM.

A extração e purificação da amostra são etapas que antecedem a separação cromatográfica, sendo responsáveis, em grande parte, pelo sucesso da técnica. Uma extração inadequada pode, por exemplo, levar a subestimação da real quantidade do analito presente na amostra. Já uma purificação mal sucedida pode resultar em um cromatograma com grande quantidade de picos, dificultando a identificação e quantificação do analito. Recente revisão publicada por Jin e colaboradores (2012) aponta a extração líquido-líquido, extração em fase sólida, microextração em fase sólida, extração sortiva em barra de agitação e dispersão da matriz em fase sólida como as principais técnicas de extração de resíduo de agrotóxico em alimentos, sendo a acetonitrila, acetona, acetato de etila e o metanol os solventes orgânicos mais comumente envolvidos nesses processos.

3.3. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS

3.3.1. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE

Otimizar um método analítico significa desenvolver condições favoráveis de modo a obter o melhor resultado possível para determinada análise. Atualmente, a constante necessidade de otimização de processos tem levado a busca de técnicas de planejamento experimental com o objetivo de determinar e quantificar a influência das variáveis sobre as respostas desejadas (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

O planejamento experimental pode ser utilizado para aprimorar metodologias analíticas e tem possibilitado uma melhor performance das análises por CLAE, obtendo, por exemplo, maior resolução dos picos, bem como a minimização do gasto de reagentes caros e tóxicos, sem, contudo, prejuízo na qualidade dos resultados.

3.3.2. DELINIAMENTO FATORIAL

Experimentos delineados em esquemas fatoriais são aqueles que envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais fatores, sendo os fatores às variáveis independentes que se deseja avaliar (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

Segundo Haaland (1989), existem três abordagens adotadas para a resolução de problemas experimentais, conforme mostrado na **Figura 7**.

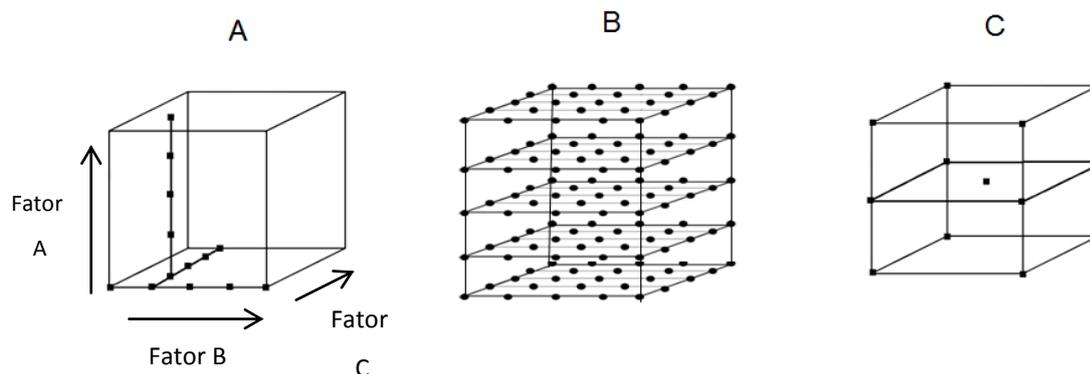


Figura 7: Métodos de avaliação da influência de três fatores em um planejamento experimental.

No primeiro procedimento (**Figura 7.a**), existem três variáveis independentes a serem estudadas em cinco situações diferentes, totalizando um número mínimo de 13 ensaios para obter a melhor condição. Entretanto, as condições ficam limitadas a determinada região espacial, não sendo possível detectar efeitos de interação entre elas. Nesses casos, o resultado obtido fica aquém do valor otimizado.

No segundo método (**Figura 7.b**), todas as combinações são investigadas. Este método tem a vantagem de explorar todo o espaço experimental, porém tem a desvantagem de necessitar de um grande número de ensaios, 125 ($5 \times 5 \times 5$). Além disso, por não ter repetição, não é possível calcular erro padrão inerente ao experimento.

Já no terceiro método (**Figura 7.c**), os cinco níveis de cada fator foram substituídos por apenas dois níveis (valores mínimos e máximos). Sendo assim, seria necessário a realização de 12 ensaios (8 ensaios fatoriais representados pelos vértices do cubo e mais 4 ensaios repetidos na condição central). Dessa maneira, a região estudada no espaço experimental é maior, quando comparada ao primeiro método, e o número de ensaios é menor quando comparado ao segundo método.

Esse método é classificado como experimento delineado inteiramente ao acaso, com esquema fatorial 2^k , sem repetição, com adição de ponto central e repetição nesse ponto. A adição de pontos centrais torna possível a inferência estatística, viabilizando o cálculo de resíduo e, conseqüentemente, do erro padrão. Tal delineamento possui a

vantagem de reduzir o número de experimentos ou repetições, implicando na diminuição do trabalho, tempo e custo final. Além disso, por serem analisados simultaneamente, é possível observar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores (TEÓFILO & FERREIRA 2006).

3.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

3.4.1. IMPORTÂNCIA PARA O AGRONEGÓCIO

Em um cenário de crescente expansão das relações comerciais brasileiras com o restante do mundo, torna-se essencial o desenvolvimento de uma estrutura organizacional que permita aos países defenderem seus interesses junto aos órgãos internacionais que regulamentam as práticas comerciais agrícolas. Além do grande peso das barreiras tarifárias impostas aos produtos brasileiros, as barreiras não tarifárias também são limitantes para o crescimento da exportação nacional. São inúmeras as possibilidades de restrições que se abrem nesse cenário, como as restrições ambientais, sanitárias e as relacionadas aos distintos padrões de qualidade adotados por diferentes países. Nesse contexto, aspectos relacionados à qualidade dos produtos, segurança alimentar, BPA e à tecnologia são temas recorrentes no setor agroindustrial, tendo reflexos imediatos no desenvolvimento de políticas públicas direcionadas ao setor agroindustrial (FARINA, 2001).

As ações de política agrícola direcionadas apenas para o aumento da produção, embora importantes, não são suficientes para o êxito do agronegócio em um mercado globalizado e competitivo. Um bom exemplo dessa situação vem ocorrendo com a citricultura brasileira. Devido à alta produtividade dos pomares e queda do consumo mundial de laranja, as grandes safras não conseguem mercado de compra, gerando excedente de produção e queda nos preços da fruta. Para solucionar o problema, novos mercados precisam ser abertos para a comercialização da laranja, bem como o consumo da fruta pela população deve ser incentivado. Sendo assim, fica clara a necessidade de ações de caráter público e privado visando o aumento da competitividade do agronegócio brasileiro, seja pela garantia da qualidade, conquista de novos mercados ou agregando valor ao produto (REIS, 2010). Todo esse cenário

cria um novo padrão de concorrência, onde a existência de um baixo custo e alta produtividade, embora necessários, deixam de ser condição suficiente.

Dentro da gestão da qualidade no agronegócio, a análise de alimentos por métodos validados e o desenvolvimento de uma rede laboratorial de forte qualidade metrológica é uma necessidade, visto que os resultados dos ensaios subsidiam a formulação de políticas públicas que, do ponto de vista sanitário, levam a adequação do país às regras do comércio internacional (SOUZA, 2007).

3.4.2. VALIDAÇÃO NO PROCESSO ANALÍTICO

O processo analítico pode ser didaticamente dividido nas etapas de desenvolvimento, otimização, validação, aplicação e revalidação do método (BRUCE *et al.*, 1998). Entretanto, do ponto de vista prático, é difícil separar o processo analítico em fases, sendo a validação muitas vezes tratada como parte integrante do desenvolvimento. O desenvolvimento do método somente poderia ser considerado completo após avaliação e demonstração de performance analítica aceitável, ou seja, o desenvolvimento e validação de métodos são considerados processos iterativos (GREEN, 1996; HUBER, 1998). Sendo assim, conforme mostrado na **Figura 8**, o processo de validação pode ser dividido, ainda, em dois estágios, sendo uma “pré-validação” conduzida durante o desenvolvimento do método e outra validação “formal” após o desenvolvimento ter sido completado (JENKE, 1996).

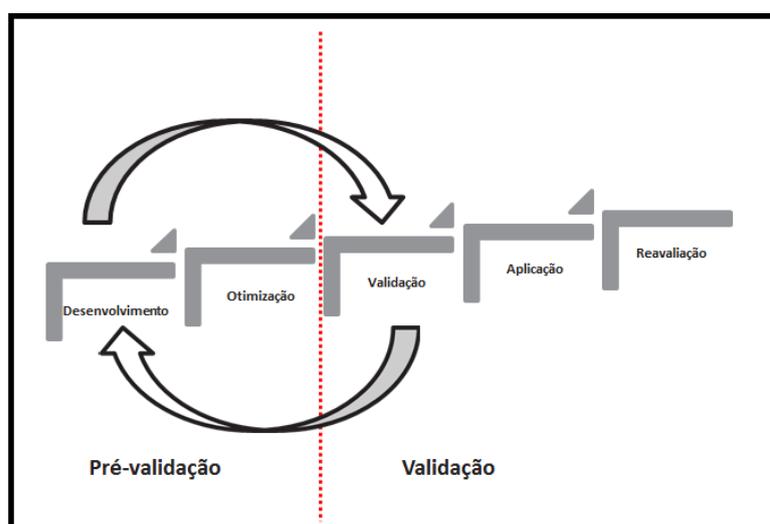


Figura 8: Divisão do processo analítico em pré-validação e validação.

Diversas definições são encontradas na literatura para o termo “validação de métodos”. De uma maneira geral, todas as definições trazem a ideia da demonstração de que um método analítico é aceitável para o seu propósito pretendido, sendo um componente essencial a ser implementado nos laboratórios a fim de garantir dados confiáveis (SOUZA, 2007).

3.4.3. VALIDAÇÃO EM SISTEMAS DE GESTÃO

A ISO (*International Organization for Standardization*) é uma organização não governamental, presente em mais de 160 países, cuja função é a elaboração de padrões, através de um consenso internacional, visando atender aos requisitos de qualidade determinados em diversos setores (ISO, 2012). A norma ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005b) representa a síntese da experiência acumulada em todo o mundo em avaliações e na demonstração da competência de laboratórios. Essa norma contém requisitos de direção e técnicos que devem ser atendidos pelos laboratórios para a implementação e manutenção de um sistema de gestão laboratorial adequado, conferindo assim, validade técnica para as análises realizadas. Dentre os requisitos técnicos abordados estão: pessoal, acomodações e condições ambientais, métodos e validação de métodos, equipamentos rastreabilidade da medição, amostragem, manuseio de itens (amostras), garantia da qualidade de resultados e apresentação dos resultados (SOUZA, 2007).

Métodos normalizados são aqueles desenvolvidos por um organismo de normalização ou outras organizações, cujos métodos sejam aceitos pelo setor técnico em questão. Métodos não normalizados são aqueles desenvolvidos pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptados a partir de métodos normalizados e validados (ILAC, 2010). A ISO/IEC 17025 estabelece que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados, métodos não normalizados e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados. Assume-se que os métodos classificados como normalizados já tenham sido submetidos a validações prévias por estudos colaborativos, visto que a escolha de um método como oficial requer que dados de precisão sejam obtidos de estudos colaborativos (WOOD, 1999; HUND *et al.*, 2000; MAC NEIL *et al.*, 2000).

3.4.4. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

Validações intralaboratoriais correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar a mesma ou diferentes amostras, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado. Estes estudos permitem a avaliação do desempenho de métodos com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes combinações de analitos, concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo, facilmente adaptáveis à diferentes situações. As validações intralaboratoriais atendem um importante nicho de processos de validação de métodos devido à sua flexibilidade e habilidade em fornecer resultados rápidos para novos métodos (EC, 2002; VAN DER VOET *et al.*, 1999, SOUZA, 2007).

A validação completa de um método analítico inclui a avaliação de reprodutibilidade por meio de estudos interlaboratoriais. Uma validação intralaboratorial é indicada para garantir a viabilidade do método antes de um ensaio interlaboratorial ou fornecer evidências de confiabilidade quando estudos interlaboratoriais não forem disponíveis ou praticáveis. Apesar da impossibilidade de estudo do parâmetro reprodutibilidade nas validações intralaboratoriais, essa informação nem sempre é necessária. Muitas vezes, estudos de reprodutibilidade parcial são suficientes. Também é possível ter uma estimativa da comparabilidade de resultados de medição de qualquer método com outros métodos pelo ensaio de materiais de referência certificados ou pela comparação do método em estudo com outro para o qual a validação já tenha sido feita (EURACHEM, 1998; VAN DER VOET *et al.*, 1999; THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA, 2007).

Procedimentos de validação intralaboratoriais têm sido internacionalmente aceitos, uma vez que diferentes organismos internacionais EURACHEM (1998); EC (2002); *Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)*, *International Standards Organization (ISO)* e *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* (THOMPSON *et al.*, 2002) e nacionais INMETRO (2010) e MAPA (2011) têm proposto documentos orientativos para este tipo de validação, conforme apresentado na **Tabela 7**. Especificamente para análises de resíduos de agrotóxicos, a EC

(SANCO, 2012; SANCO, 2013) estabeleceu um documento com os parâmetros de desempenho requeridos.

Tabela 7: Principais referências nacionais e internacionais relacionadas a validação intralaboratorial

Origem	Órgão emite	Título	Referência
Internacional	EURACHEM <i>Working Group. A focus for Analytical Chemistry in Europe</i>	The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics	EURACHEM (1998)
	<i>The Commission of the European Communities (EC)</i>	<i>Commission decision 2002/657/EC</i>	EC (2002)
	<i>Association of Official Analytical Chemists (AOAC International), International Standards Organization (ISO) e International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)</i>	Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis	THOMPSON, ELLISON & WOOD (2002)
	European Commission and Health & Consumer Protection Directorate-General	Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed	SANCO (2013)
Nacional	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – Brasil (INMETRO)	DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos	INMETRO (2010)
	Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)	Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"	ANVISA (2003b)
	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA),	Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários	BRASIL (2011)

3.4.5. PARÂMETRO DE DESEMPENHO

Parâmetro de desempenho é definido pela EC (2002) como uma qualidade funcional que pode ser atribuída a um método de ensaio.

Os parâmetros de desempenho típicos na validação intralaboratorial de métodos de ensaio quantitativos são: aplicabilidade, seletividade, linearidade da curva de calibração, sensibilidade, faixa de trabalho, efeitos de matriz, veracidade, precisão, limites de detecção e quantificação e robustez (THOMPSON *et al.*, 2002).

3.3.5.1 Linearidade, sensibilidade e faixa

Calibração é um procedimento que determina a diferença sistemática existente entre um sistema de medição e um sistema de referência representado por um material de referência e seus valores aceitos (ISO, 1996). Considerando que a maioria dos métodos de ensaio em análises de alimentos utiliza relações lineares, a determinação da equação de calibração é extremamente importante tanto em ensaios de rotina quanto em procedimentos de validação de métodos (RSC, 2005).

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração (EURACHEM, 1998). Uma adequada avaliação da linearidade é fundamental para a qualidade dos demais parâmetros de desempenho estabelecidos para métodos quantitativos (como sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, veracidade, precisão e limites) (SOUZA, 2007). Entretanto, exceto quando ocorrem grandes erros no preparo das curvas, os erros devidos à calibração correspondem aos menores componentes na compilação da incerteza total (THOMPSON *et al.*, 2002).

A sensibilidade é a alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na concentração do analito, ou seja, é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, expresso pela inclinação da curva obtida por regressão linear (EURACHEM, 1998; THOMPSON *et al.*, 2002).

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade (INMETRO, 2010).

3.3.5.2 Efeitos de matriz e seletividade

Uma amostra é constituída do analito, a ser medido, e de outros componentes da matriz que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer detectar ou quantificar (BRUCE *et al.*, 1998; INMETRO, 2010). A seletividade é um parâmetro de

desempenho relacionado ao evento de detecção do analito na presença desses componentes. Tal parâmetro possui grande importância, principalmente quando se considera a análise de alimentos, na qual as matrizes são misturas de constituições químicas complexas (SOUZA, 2007).

Dependendo de como a identidade do analito é estabelecida, interferentes podem inibir a detecção distorcendo o sinal proveniente do analito. Diferentemente, os interferentes também podem contribuir para o sinal atribuído ao analito, com efeito de aumentar a concentração do mesmo (EURACHEM, 1998). A medição pode ser alterada porque matriz, reagentes ou outros componentes afetam a sensibilidade do detector que mede o analito ou porque estes compostos afetam diretamente a resposta. Assim, efeitos de erros constantes devidos a interferentes e erros proporcionais à calibração devidos a efeitos de matriz podem estar presentes ao mesmo tempo (BRUCE *et al.*, 1998).

Estudos dos efeitos de matriz correspondem um tipo específico de estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz da amostra. A observação de efeitos de matriz não significativos simplificam o processo de validação e de rotina analítica, visto que os padrões dos analitos podem ser preparados diretamente no solvente, dispensando uma curva de adição de padrão em amostra branca (THOMPSON *et al.*, 2002).

3.3.5.3 Veracidade e precisão

Veracidade e precisão são consideradas os parâmetros de validação mais importantes (TAVERNIERS *et al.*, 2004). A precisão diz respeito à distribuição dos erros aleatórios de um sistema de medição, enquanto a veracidade expressa os erros sistemáticos (ISO, 1993; RSC, 2003).

A veracidade é o grau de concordância entre o valor médio de uma grande série de resultados de ensaios e o valor de referência aceito, sendo geralmente expressa como erro sistemático ou tendência. É declarada quantitativamente em termos de tendência (*bias*) ou erro sistemático, com pequenas tendências indicando veracidade (EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002). Para avaliação da veracidade de um método são utilizados materiais de referência certificados, materiais de referência, métodos de

referência ou ensaios de adição/recuperação (THOMPSON *et al.*, 2002). Na ausência de materiais de referência, a veracidade pode ser investigada por meio de experimentos de adição de padrões, mas esta técnica pode ser fortemente influenciada por erros de observação (RIBANI *et al.*, 2004).

Precisão é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições, pré-estabelecidas, específicas. O valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de um desvio padrão do resultado do ensaio. Uma menor precisão é indicada através de um elevado desvio padrão (EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002). As três condições mais comuns para obtenção da precisão são repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2010). A repetitividade avalia a variabilidade encontrada quando resultados independentes são obtidos utilizando o mesmo método, em um mesmo laboratório, com 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. A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando condições como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos. A precisão, tanto sob condições de repetitividade quanto de reprodutibilidade é dependente da concentração do analito (EURACHEM, 1998; THOMPSON *et al.*, 2002).

3.4.5.4 Limites

A habilidade em detectar um composto presente na amostra, mesmo em concentrações extremamente baixas, é relacionada aos limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção (EC, 2002). Uma detecção ou quantificação, realizada abaixo dos limites, leva a obtenção de incerteza da medição que pode ser maior que o próprio valor da medição (TAVERNIERS *et al.*, 2004). Limites não são diretamente relevantes na estimativa de incerteza, porém a incerteza abaixo do limite de detecção e próxima ao limite de quantificação pode exigir cuidados especiais (EURACHEM/CITAC, 2000).

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser significativamente distinguida de zero. Esse limite corresponde a média mais

três desvios padrão das respostas obtidas para as amostras brancas ou de concentração baixa do analito, podendo ainda ser estimado como três vezes o desvio padrão do intercepto dividido pela inclinação da curva de calibração (THOMPSON *et al.*, 2002).

Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de uma substância que pode ser quantificada com veracidade e precisão aceitáveis nas condições estipuladas do teste (EC, 2002) ou a concentração abaixo da qual o método analítico não pode operar com precisão e veracidade aceitáveis. Esse limite corresponde a média mais dez desvios padrão das respostas obtidas para as amostras brancas ou de concentração baixa do analito, podendo ainda ser estimado como dez vezes o desvio padrão do intercepto dividido pela inclinação da curva de calibração (THOMPSON *et al.*, 2002).

A incerteza de uma medida pode ser entendida como o parâmetro, associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos a um mensurando. Já a incerteza expandida pode ser definida como um intervalo em torno do resultado de uma medição com o qual se espera abranger uma grande fração da distribuição dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. A expressão do valor de incerteza de uma medição tem como propósito aumentar a confiança na validade do resultado encontrado (EURACHEM/CITAC, 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas experimentais do presente trabalho foram conduzidas no Laboratório de Análise de Resíduos e Agrotóxicos (LARA) do Laboratório de Química Agropecuária (LQA) da Gerência da Rede Laboratorial (DVLB) do IMA.

4.1. AMOSTRAS

Para a otimização e validação do método foram utilizadas amostras de laranja e néctar consideradas brancas para carbendazim. As laranjas foram coletadas em produções sabidamente isentas de aplicação de agrotóxicos no estado de MG e o néctar foi adquirido no mercado de Belo Horizonte - MG, ambos com certificação de produto orgânico.

Para o estudo de monitoramento dos resíduos em amostras de laranja produzidas no estado de MG, as amostras foram coletadas por fiscais do IMA, sendo seguidos os procedimentos preconizados pelo *Codex Alimentarius* (1999). Foram coletadas 20 amostras de laranja (1 kg ou 10 unidades), diretamente nas propriedades rurais, sendo representadas as Coordenadorias de Uberaba e Uberlândia, maiores produtoras de laranja do estado. Foram coletadas amostras de laranja nos municípios de Frutal, Uberlândia, Monte Alegre de Minas, Prata, Comendador Gomes, Ibiraci, Campos Gerais e Ituiutaba, entre maio e dezembro de 2013.

Para o monitoramento do carbendazim nas amostras de laranja comercializadas em Belo Horizonte - MG, foram coletadas 32 amostras (1 kg ou 10 unidades), na Unidade Grande BH da CEASAMG, sendo duas amostras, de quatro variedades (Serra d'água, Pêra-rio, Seleta e Bahia - **Figura 9**), nas quatro estações do ano, ao longo de 2013. A Unidade Grande BH, localizada no município de Contagem, é uma das seis Unidades da CEASAMG, responsável pela distribuição de produtos hortigranjeiros na região metropolitana da capital.

As amostras de laranja foram trituradas (com casca), homogeneizadas, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenadas, sob congelamento entre -14 e -25 °C, até o momento dos ensaios.

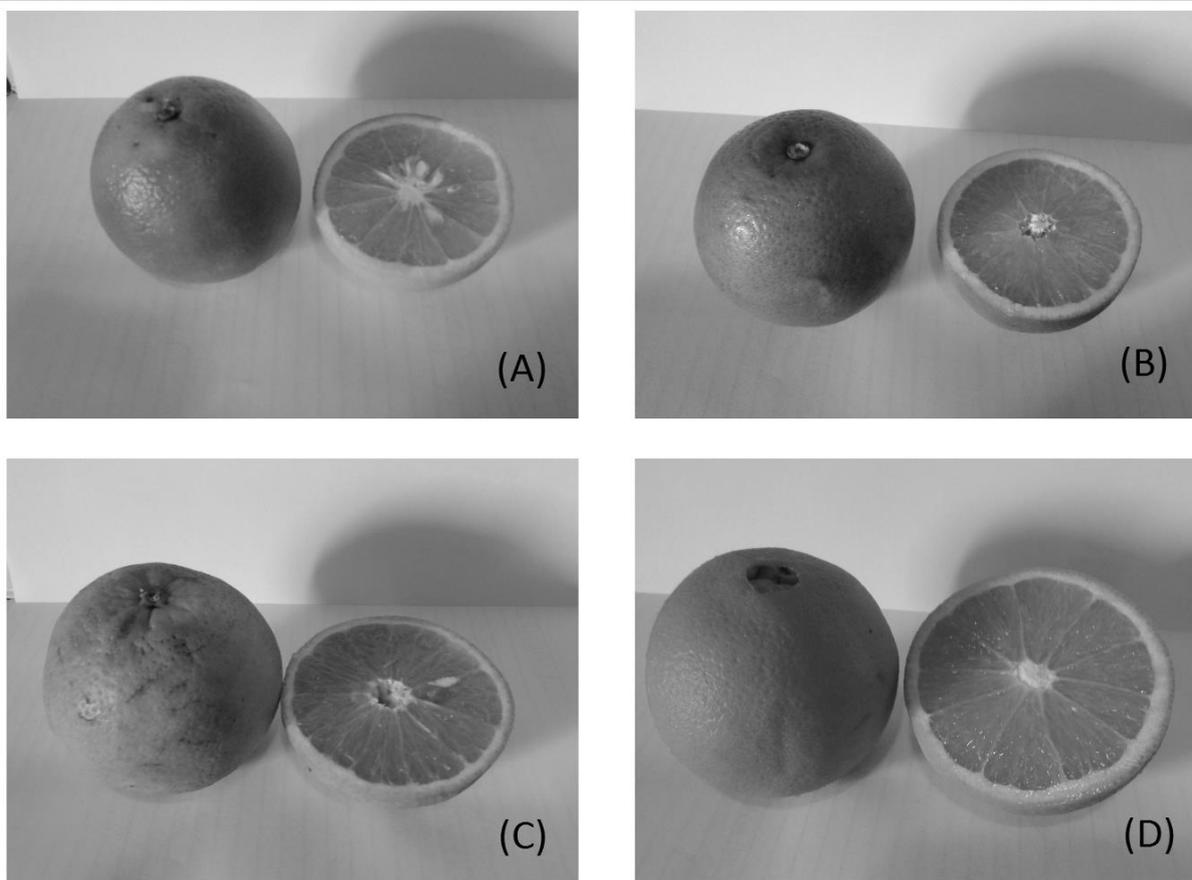


Figura 9: Variedades de laranja coletadas para monitoramento do carbendazim na laranja *in natura* disponível no mercado de Minas Gerais. (A) Laranja Serra d'água, (B) Laranja Pêra-rio, (C) Laranja Seleta, (D) Laranja Bahia.

Para monitoramento dos resíduos no néctar de laranja comercializado, as amostras foram coletadas no mercado de Belo Horizonte - Minas Gerais, entre março e novembro de 2013. Foram coletadas 36 amostras (embalagens de 1 L), sendo três marcas de abrangência nacional, dois lotes de cada marca e duas repetições de cada lote, em três estações do ano (verão, outono e inverno). As amostras de néctar foram homogeneizadas, abertas e acondicionadas em frascos de vidro âmbar de 100 mL com tampa de rosca devidamente identificados e armazenadas, sob congelamento entre -14 e -25 °C, até o momento dos ensaios.

4.2. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados foram agitador tipo vortex marca Biomatic (Porto Alegre, Brasil), balança analítica marca Gehaka (São Paulo, Brasil), balança semi-

analítica marca Mettler (Zürich, Switzerland) modelo P1210, bomba de vácuo marca Marconi (São Paulo, Brasil) modelo MA057, capela de segurança química marca Veco (São Paulo, Brasil) modelo VLFS-09, centrífuga marca FANEM (São Paulo, Brasil) modelo 206BI, congelador Consul (Joinville, Brasil), estufa de secagem marca FANEM (São Paulo, Brasil) modelo 315SE, evaporador rotatório marca Büchi (Flawil, Switzerland) modelo W240N, homogeneizador tipo ultra turrax marca Marconi (São Paulo, Brasil) modelo MA102E, macro e micropipetas automáticas de volume variável marca Gilson (Villiers-le-Bel, France), mufla Fornitc (São Paulo, Brasil), termômetros de máxima e mínima tipo cabo sensor e espeto marca Incoterm (São Paulo, Brasil), triturador de amostras marca Skymesen (Santa Catarina, Brasil) modelo CR-4L, ultrapurificador de água marca Barnstead (Barnstead, USA).

O sistema CLAE foi da marca Thermo Separation Products - TSP (New York, USA) equipado com: degaseificador modelo SCM1000; bomba de gradiente quaternária modelo P4000, amostrador automático modelo AS3000, detector UV modelo UV3000, sistema controlador modelo SN4000.

As balanças, termômetros, micropipetas e vidrarias volumétricas foram calibrados por laboratórios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do INMETRO, de acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025.

4.3. PADRÕES, REAGENTES E SOLVENTES

Foram utilizados padrões certificados Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e Ehrenstofer (Augsburg, Alemanha).

Os reagentes e solventes utilizados atenderam aos padrões mínimos requeridos para a análise, com certificados de qualidade e pureza. Acetona grau para análise de resíduos (PAR), diclorometano PAR, n-hexano PAR e acetona grau para análise (PA) foram da marca Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de sódio anidro PAR e acetonitrila grau CLAE foram da marca Êxodo Científica (Hortolândia, Brasil), metanol grau CLAE foi da marca Skience (Darmstadt, Alemanha) e florisil da marca Riedel-de Haën (Hanover, Alemanha).

4.4. SOLUÇÕES

4.4.1. Solução padrão estoque (SPE)

Foram utilizados três soluções estoque de carbendazim ao longo da otimização e validação dos métodos de análise. A solução de 116,05 µg/mL foi preparada pela dissolução de 0,01164 g de padrão em 100 mL de metanol, considerando a pureza de 99,7 % do padrão. A solução de 206,96 µg/mL foi preparada pela dissolução de 0,0104 g de padrão em 50 mL de metanol, considerando 99,5 % de pureza do padrão. Enquanto a solução de 398,80 µg/mL foi preparada pela dissolução de 0,010 g de padrão em 25 mL de metanol, considerando a pureza de 99,7 % do padrão.

4.4.2. Solução padrão intermediária (SPI)

Foram utilizadas quatro soluções intermediárias de padrão ao longo da otimização e da validação dos métodos de análise. A solução de 1,74 µg/mL foi preparada pela diluição de 150 µL da SPE de 116,05 µg/mL em balão volumétrico de 10 mL com metanol. A solução de 12,42 µg/mL foi preparada pela diluição de 1500 µL da SPE de 206,96 µg/mL em balão volumétrico de 25 mL com metanol. Soluções de 39,88 e 19,94 µg.mL⁻¹ foram preparadas pela diluição de 1 e 0,5 mL, respectivamente, da SPE de 398,80 µg.mL⁻¹ em balão volumétrico de 10 mL com metanol.

4.4.3. Curva de calibração usual - 0,155, 0,310, 0,466, 0,621, 0,776 e 0,931 µg/mL

Alíquotas de 125, 250, 375, 500, 625 e 750 µL, respectivamente, da SPI de 12,42 µg/mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Foram preparadas três replicatas independentes de cada nível de concentração, além do branco de solvente. Os volumes foram completados com solução de metanol a 40 % em água ultrapura.

4.4.4. Curva de calibração matrizada - 0,155, 0,310, 0,466, 0,621, 0,776 e 0,931 µg/mL

Aos extratos purificados de amostras de laranja e néctar de laranja foram adicionadas alíquotas de 25, 50, 75, 100, 125 e 150 µL da SPI de 12,42 µg/mL, logo após o processo de secagem em rotavapor. Em seguida procedeu-se a retomada com 2 mL de fase móvel. Foram preparadas três replicatas independentes de cada ponto da curva de calibração matrizada, além do branco (extrato purificado sem adição).

4.4.5. Solução extratora - diclorometano:n-hexano (50:50, v/v)

500 mL de n-hexano e 500 mL de diclorometano foram medidos em proveta e transferidos, com auxílio de funil, para um frasco de vidro âmbar de 1000 mL, com tampa de rosca, devidamente identificado. A solução foi homogeneizada, armazenada à temperatura ambiente e preparada com frequência diária.

4.4.6. Solução de eluição na purificação - diclorometano:metanol (90:10, v/v)

360 mL de diclorometano e 40 mL de metanol foram medidos em proveta e transferidos, com auxílio de funil, para um frasco de vidro âmbar de 500 mL, com tampa de rosca, devidamente identificado. A solução foi homogeneizada, armazenada à temperatura ambiente e preparada com frequência diária.

4.4.7. Solução de lavagem na purificação - diclorometano:acetonitrila (95:5, v/v)

190 mL de diclorometano e 10 mL de acetonitrila foram medidos em proveta e transferidos, com auxílio de funil, para um frasco de vidro âmbar de 250 mL, com tampa de rosca, devidamente identificado. A solução foi homogeneizada, armazenada à temperatura ambiente e preparada com frequência diária.

4.4.8. Fase móvel - água ultrapura:metanol (60:40, v/v)

240 mL de água ultrapura e 160 mL de metanol foram medidos em proveta e transferidos para um erlenmeyer de 1000 mL e homogeneizados. Em seguida, procedeu-se a filtração a vácuo através de membrana de Nylon de 0,45 µm x 47 mm (Supelco Inc., Bellefonte, USA) e borbulhamento com nitrogênio gasoso por aproximadamente 5 min. A fase móvel foi preparada com frequência diária.

4.5. MÉTODO DE ENSAIO

4.5.1. Procedimento de análise de carbendazim em laranja

O método utilizado para análise de carbendazim em laranja foi baseado em Analytical Methods for Pesticides Residues in Foodstuffs, 6a Ed. Ministry of Public

Health, Welfare and Sport, (NETHERLANDS, 1996) (**Figura 10**). Este procedimento de extração foi selecionado visto que o mesmo era praticado pelo LARA/DVLB/IMA para na análise de outros agrotóxicos na matriz laranja.

Uma alíquota de $15,00 \pm 0,10$ g da amostra de laranja previamente preparada foi pesada em um béquer de 400 mL e adicionada de $15 \pm 0,1$ g de sulfato de sódio anidro previamente ativado em mufla a 500°C por 9 horas, agitando-se, cuidadosamente, para que toda a amostra entrasse em contato com o sulfato de sódio. A extração foi realizada em homogeneizador do tipo ultra turrax com 40 mL de acetona por 30 s e com 60 mL de solução extratora de diclorometano:hexano (50:50, v/v) por mais 30 s, ambos medidos em proveta de 100 mL. Em seguida, procedeu-se a filtração a vácuo, através de funil de Buchner e papel de filtro com porosidade $0,5 \mu\text{m}$ (Tedia, Fairfield, EUA), para um kitasato, lavando-se a haste do ultra turrax e o béquer com a solução extratora. O extrato foi transferido para uma proveta de 100 mL e o volume completado com a solução extratora.

Uma alíquota de 12 mL do extrato, medida com macropipeta automática, foi transferida para um balão de fundo chato de 100 mL e concentrada até quase secura em evaporador rotatório, sendo retomada em 2 mL da solução extratora.

O extrato concentrado foi, então, submetido a uma etapa de purificação em coluna com placa porosa (Rio-Lab, Rio de Janeiro, Brasil) contendo uma quantidade otimizada de Florsil previamente ativado em estufa e acondicionado com 3 mL de solução extratora. Foram utilizadas duas frações durante a purificação - lavagem e eluição. A primeira foi constituída de 10 mL da solução de diclorometano:acetonitrila (95:5, v/v), que foram descartados, e a segunda de um volume otimizado de solução de diclorometano:metanol (90:10, v/v), que foi recolhido em balão de fundo chato de 100 mL. O eluato foi concentrado até quase secura em evaporador rotatório, seco em ar comprimido e retomado em 2 mL da fase móvel. O extrato purificado foi, então, filtrado em membrana de Nylon de $0,45 \mu\text{m}$ x 47 mm através de uma seringa de vidro e recolhido em um vial de 2 mL para injeção no sistema CLAE.

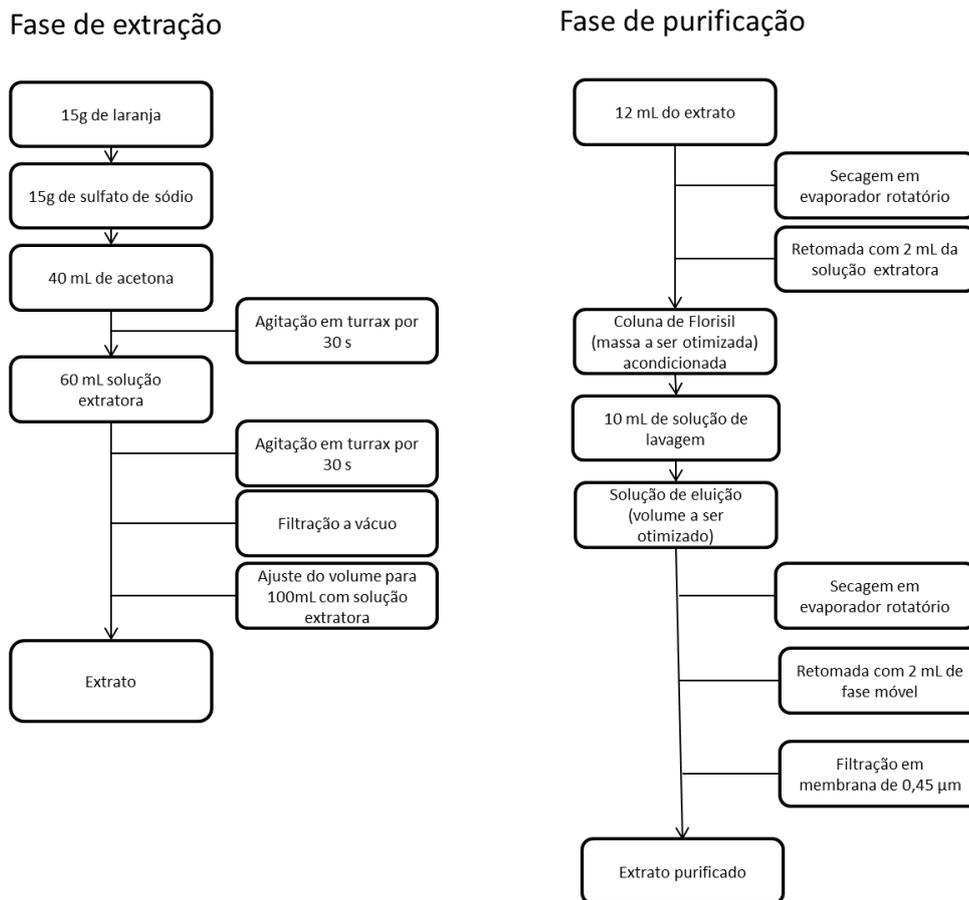


Figura 10: Marcha analítica utilizada nas etapas de extração e purificação das amostras de laranja para determinação de carbendazim.

4.5.2. Procedimento de análise de carbendazim em néctar de laranja

O método utilizado para análise de carbendazim em néctar de laranja foi elaborado com base em métodos propostos por CHIARADIA (2009) e LEE (2012).

Alíquota de $5,00 \pm 0,05$ g da amostra de néctar previamente preparada foi pesada em um tubo tipo Falcon de 100 mL e adicionada de 4 mL de acetona, 8 mL de solução extratora de diclorometano:hexano (50:50, v/v) e de $5,0 \pm 0,1$ g de sulfato de sódio anidro. Em seguida, a mistura foi homogeneizada por 1 min em agitador tipo Vortex e centrifugada por 15 min a 10.000 rpm.

Com auxílio de uma micropipeta automática, uma alíquota de 8 mL do extrato foi transferida para um balão de fundo chato de 100 mL e concentrada até quase secura em evaporador rotatório, sendo retomada em 2 mL da solução extratora-

O extrato concentrado foi, então, submetido a uma etapa de purificação em coluna com placa porosa (Rio-Lab, Rio de Janeiro, Brasil), contendo uma quantidade otimizada de Florisil previamente ativado em mufla a 500°C por 9 horas e acondicionado com 3 mL de solução extratora. Após completo escoamento do extrato foi feita a eluição com um volume otimizado da solução de diclorometano:metanol (90:10, v/v), o qual foi recolhido em balão de fundo chato de 100 mL. O eluato foi concentrado até quase secura em evaporador rotatório, seco em ar comprimido e retomado em 2 mL da fase móvel. O extrato purificado foi, então, filtrado em membrana de Nylon de 0,45 µm x 47 mm através de uma seringa de vidro e recolhido em um vial de 2 mL para injeção no sistema CLAE (**Figura 11**).

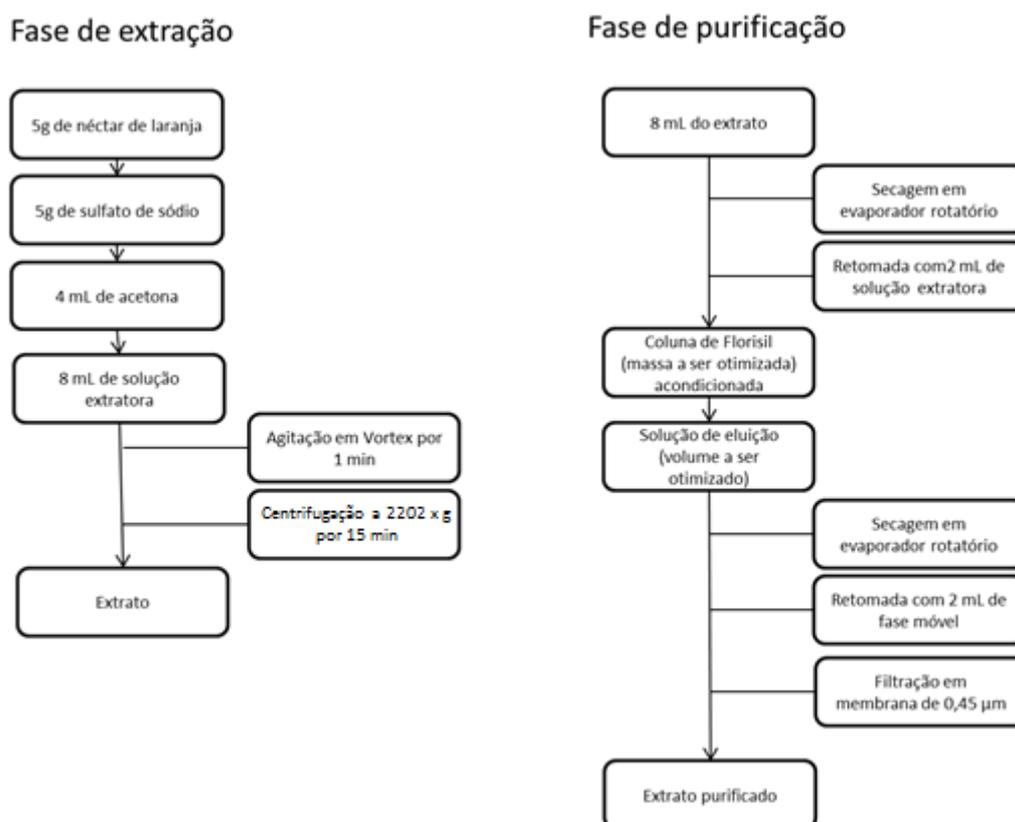


Figura 11: Marcha analítica utilizada na determinação de carbendazim em néctar de laranja.

4.5.3. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram: volume de injeção a ser otimizado, fase móvel água ultrapura:metanol (60:40, v/v), fluxo de 0,6 mL/min, coluna cromatográfica em aço inox Betasil C18 com 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno, 5 µm de tamanho de partícula e 100 Å de tamanho de poro da marca Thermo Scientific (Waltham, Estados Unidos), comprimento de onda 286 nm, tempo total de corrida de 35 min. A temperatura durante a corrida cromatográfica foi monitorada por meio do controle da temperatura ambiente, entre 18 e 22°C.

4.6. OTIMIZAÇÃO

4.6.1 Ensaios preliminares

O comprimento de onda utilizado no sistema de detecção UV foi estabelecido pela avaliação do espectro de absorção da molécula de carbendazim, utilizando lâmpada de deutério emitindo radiação na faixa de 200 a 350 nm.

Com base nos trabalhos mostrados na **Tabela 6**, foram avaliadas diferentes composições de fase móvel, incluindo: água ultrapura:metanol nas proporções 50:50, 60:40 e 70:30 (v/v) e água ultrapura:acetonitrila 30:70 (v/v). Os fluxos de 0,6; 0,8 e 1,0 mL/min foram estudados em cada uma destas condições.

Extratos de amostras de laranja e néctar adicionados de carbendazim foram injetados nas condições otimizadas

A solução padrão de 0,466 µg/mL foi injetada, em triplicata, nas diferentes condições avaliadas. O tempo de retenção, a resolução do pico do carbendazim, o tempo total de corrida e aspectos como custo e impacto ambiental foram consideradas para escolha da condição cromatográfica.

4.6.2 Planejamento fatorial

Definidas as condições cromatográficas, foi delineado um experimento fatorial do tipo 2³, com quatro replicatas no ponto central, sendo avaliados três fatores

considerados críticos para o método: massa de Florisil (0,5; 0,75 e 1,0 g) na etapa de purificação, volume de solução de eluição na etapa de purificação (10, 15 e 20 mL) e volume de injeção (40, 50 e 60 μ L) (**Tabela 8**).

Nesses experimentos foram utilizadas amostras brancas de laranja e néctar de laranja adicionadas de solução padrão de carbendazim para obtenção de concentrações 0,517 e 0,332 mg/kg, respectivamente. O valor de adição definido para a matriz laranja correspondeu a 50 % do LMR (1 mg/kg).

Tabela 8: Fatores avaliados na etapa de otimização e seus níveis.

	Tratamento	Ordem de análise	Massa de Florisil (g)	Volume de eluente (mL)	Volume de injeção (μ L)
Fatorial	[1]	1	0,5	10	40
	A	3	1	10	40
	B	7	0,5	20	40
	AB	6	1	20	40
	C	12	0,5	10	60
	AC	9	1	10	60
	BC	2	0,5	20	60
	ABC	5	1	20	60
Ponto central	M	4	0,75	15	50
	M	10	0,75	15	50
	M	8	0,75	15	50
	M	11	0,75	15	50

As avaliações de significância para a decisão estatística dos efeitos dos fatores na recuperação do carbendazim foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), gráfico de probabilidade normal e teste t (distribuição de Student), sendo estabelecido o nível de significância $\alpha = 0,05$.

4.7. VALIDAÇÃO

Os parâmetros linearidade, sensibilidade, efeitos de matriz e seletividade, veracidade, precisão, limites de detecção, de quantificação e incerteza foram estabelecidos em ensaios intralaboratoriais com soluções padrão de carbendazim e amostras brancas adicionadas de padrão. A adequação para o propósito de uso do

método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos (EC, 2002; THOMPSON et al., 2002; SOUZA, 2007; SANCO, 2012). O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$.

A linearidade dos métodos foi avaliada em experimentos com curvas de calibração do analito, conforme procedimento descrito por SOUZA & JUNQUEIRA (2005). Após a definição da faixa de interesse, soluções do analito foram preparadas, de forma independente e aleatória, em seis níveis de concentração, igualmente espaçados (0,155; 0,310; 0,466; 0,621; 0,776 e 0,931 $\mu\text{g/mL}$, correspondentes a 0,172; 0,344; 0,517; 0,689; 0,861 e 1,033 mg/kg de laranja e a 0,093; 0,186; 0,279; 0,372; 0,465 e 0,558 mg/kg de néctar), sendo três replicatas independentes de cada nível. Brancos de solvente foram preparados, em triplicata, como ferramenta de controle de qualidade interno e ajuste do zero do equipamento. *Outliers* foram investigados pelo teste de Jackknife. Os parâmetros das curvas foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, sendo verificadas as premissas de normalidade (teste de Ryan & Joiner), homoscedasticidade (teste de Brown & Forsythe), independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin & Watson), significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (ANOVA).

Para avaliação dos efeitos de matriz foi empregado o método de adição de padrão. Três curvas de calibração foram preparadas, com mesmas concentrações dos analitos, sendo uma preparada com o solvente e as outras duas em extratos purificados de amostras de laranja e néctar de laranja, respectivamente. As curvas foram avaliadas como descrito para o estudo da linearidade. A interferência da matriz foi investigada pela comparação das inclinações e interseções das curvas preparadas em solvente com aquelas obtidas para as curvas matrizadas, pelo teste de t (THOMPSON et al., 2002; SOUZA, 2007).

Para determinação da seletividade, amostras brancas foram analisadas para verificar possíveis interferências tais como sinais ou picos na região em que se prevê a eluição do analito pesquisado.

Como não havia material de referência certificado (MRC) disponível para o escopo analítico em questão, no estudo da veracidade (recuperação) e da precisão, sob condições de repetitividade e precisão intermediária, foram preparadas amostras brancas adicionadas de solução padrão de carbendazim, em três níveis de

concentração (correspondentes a 0,172; 0,517; e 1,033 mg/kg para laranja e a 0,093; 0,279; e 0,558 mg/kg de néctar). Para cada nível de concentração estudado, em cada matriz, doze replicatas independentes foram divididas em três lotes de quatro replicatas, sendo cada lote analisado em diferentes dias, por diferentes analistas, simulando condições de precisão intermediária (EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA, 2007; SANCO, 2012). Os resultados foram avaliados por ANOVA para estimativa dos desvios padrão relativos obtidos sob condições de repetitividade (DPR_r) e de precisão intermediária (DPR_R), para cada nível de concentração, com verificação prévia de *outliers* pelo teste de Grubbs e das premissas de normalidade e homoscedasticidade (SOUZA, 2007). Os valores adotados como referência para avaliação da recuperação foram os estabelecidos pela SANCO (2012), enquanto para a precisão intermediária foram os definidos pela SANCO (2012) e aqueles obtidos pelas equações de HORWITZ (1980) ou de THOMPSON (2002), dependendo da faixa de concentração do analito, sendo adotado 2/3 destes valores para avaliação da precisão em condições de repetitividade.

Para cada matriz foram estimados os limites teóricos de detecção e de quantificação do método, os quais corresponderam, respectivamente, à três e dez vezes os desvios padrão dos interceptos obtidos para as curvas de calibração matrizadas, divididos pelas inclinações (THOMPSON *et al.*, 2002).

Para a estimativa da incerteza foi utilizada a abordagem *Top Down*, considerando os dados obtidos nos estudos de validação. Os componentes considerados foram: a incerteza-padrão devida à precisão intermediária ou reprodutibilidade parcial (u_{repro}) obtida nos estudos de precisão e a incerteza-padrão devida à curva de calibração (u_{curva}) obtida no estudo da linearidade (**Equação 1**).

$$u_{curva} = \sqrt{c_a^2 u^2(a) + c_b^2 u^2(b) + 2c_a c_b u(a)u(b)r(a,b)} \quad (\text{Eq. 1})$$

sendo

c_a o coeficiente de sensibilidade de da interseção (a) dado por $-1/b$, $u(a)$ a incerteza-padrão de a , c_b o coeficiente de sensibilidade da inclinação (b) dado por $(a-y)/b^2$, $u(b)$ a incerteza-padrão de b , $r(a, b)$ o coeficiente de correlação entre a e b , y_i variável dependente, x_i variável independente, s_{res} o desvio padrão dos resíduos da regressão, e n o número de observações.

$$r_{(a,b)} = - \frac{\sum x_i}{\sqrt{n \sum x_i^2}} \quad u_{(a)} = \sqrt{\frac{s_{res}^2 \sum x_i^2}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} \quad u_{(b)} = \sqrt{\frac{s_{res}^2}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}}$$

As incertezas-padrão foram somadas, de acordo com a Lei da Propagação das Incertezas, para estimativa da incerteza combinada (u_c) (**Equação 2**):

$$u_c = \sqrt{(u_{repro})^2 + (u_{curva})^2} \quad (\text{Eq. 2})$$

A incerteza expandida (U) (**Equação 3**), associada aos resultados de medição, foi obtida multiplicando-se a incerteza combinada (u_c) pelo fator de abrangência ($k=2$, para um nível de confiança aproximado de 95 %) (EURACHEM/CITAC, 2000).

$$U = k * u_c \quad (\text{Eq. 3})$$

4.8. MONITORAMENTO

As 52 amostras de laranja (20 produzidas no estado de MG e 32 comercializadas na Unidade grande BH do CEASAMG) e as 36 amostras de néctar de laranja (comercializadas em Belo Horizonte - MG) foram analisadas pelo método otimizado e validado, visando à aplicação do método e o monitoramento da ocorrência de resíduos de carbendazim em função das diferentes fontes de variação consideradas no planejamento amostral.

No caso de quantificação de carbendazin, os resultados obtidos seriam submetidos à ANOVA e Teste de Tukey no nível de significância $\alpha=0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OTIMIZAÇÃO

5.1.1 Ensaios preliminares

O comprimento de onda de 286 nm foi selecionado por possuir maior intensidade de absorção ao longo do espectro obtido para o carbendazim.

As composições de fase móvel água ultrapura:metanol nas proporções 50:50 e 70:30 (v/v) forneceram cromatogramas com maior número de interferências que a condição 60:40 (v/v), de forma que a resolução do pico do analito carbendazim foi prejudicada. A composição água ultrapura:acetonitrila 30:70 (v/v) gerou cromatogramas com concentração dos interferentes e do analito de interesse no início da corrida, que se completou com 6,78 minutos (Figura 12).

Assim, água ultrapura:metanol na proporção 60:40 (v/v) com um fluxo de 0,6 mL/min foram as condições selecionadas por gerarem cromatogramas com resolução satisfatória, menor tempo de retenção do carbendazim e de corrida, além de um menor impacto ambiental devido ao descarte de compostos tóxicos.

Devido à presença de interferentes próximos e na região equivalente ao tempo de retenção do carbendazim (15 min), foi observada a necessidade de uma etapa de purificação dos extratos de laranja e néctar de laranja (Figura 13).

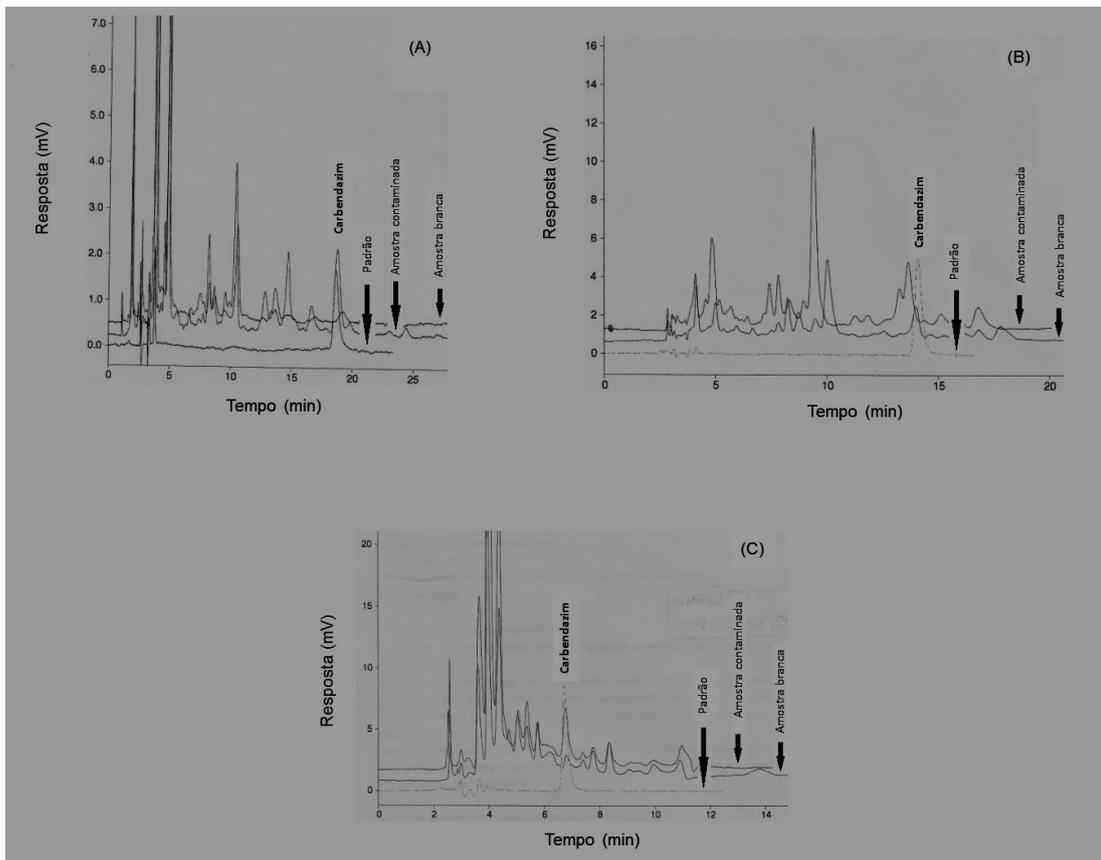


Figura 12: Cromatogramas obtidos pela injeção de extrato de amostras de laranja em diferentes condições cromatográficas.

Condições experimentais: Fase móvel (A) água ultrapura:metanol 50:50 v/v; (B) água ultrapura:metanol 70:30 v/v e (C) água ultrapura:acetonitrila 30:70 v/v, volume de injeção: 40 μ L, fase móvel água ultrapura:metanol (A: 60:40, v/v), fluxo de 0,6 mL/min, comprimento de onda: 286 nm, tempo total de corrida de 30 min.

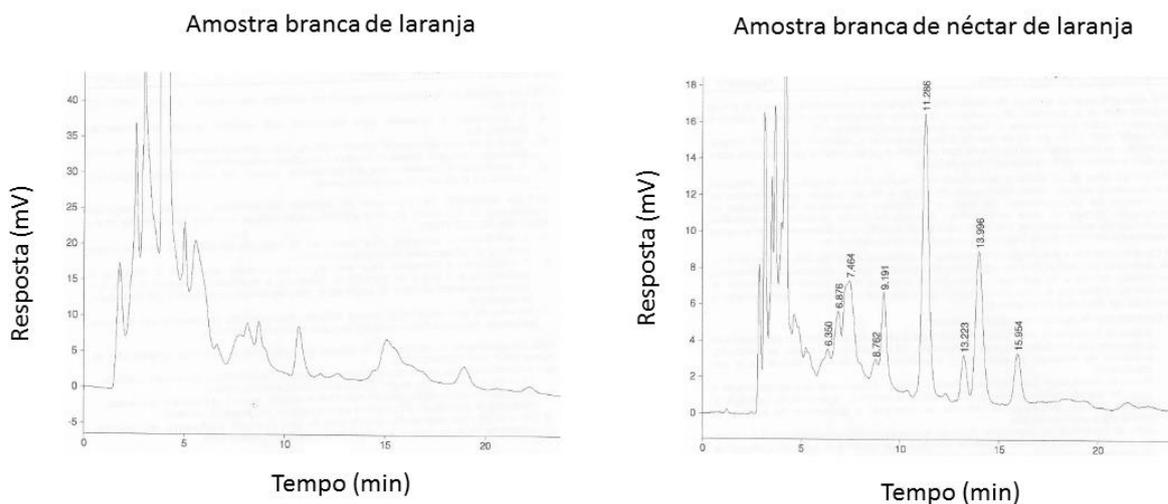


Figura 13: Cromatogramas obtidos pela injeção de extrato de amostras de laranja e néctar de laranja brancos, sem a etapa de purificação dos extratos.

Condições experimentais: volume de injeção: 40 μ L, fase móvel água ultrapura:metanol (60:40, v/v), fluxo de 0,6 mL/min, comprimento de onda: 286 nm, tempo total de corrida de 30 min.

5.1.2 Delineamento fatorial

Os valores de porcentagem de recuperação de carbendazim obtidos nos experimentos do delineamento fatorial para otimização de condições analíticas, considerando as matrizes laranja e néctar de laranja, são mostrados na **Tabela 9**. Para a laranja, os valores de recuperações variaram de 91,7 a 121,7 %, enquanto para o néctar, a variação observada encontrou-se entre 75,4 a 103,8 %.

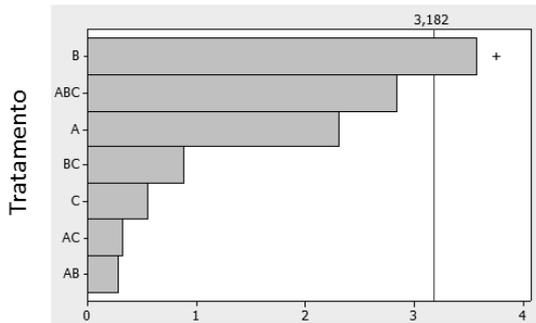
Tabela 9: Valores de recuperação de carbendazim nas matrizes laranja e néctar, segundo delineamento fatorial 2^3 , com quatro repetições de ponto central.

	Tratamento	Recuperação (%)	
		Laranja	Néctar
Fatorial	[1]	93,9	75,4
	A	95,7	79,6
	B	121,7	88,0
	AB	100,6	81,7
	C	108,4	98,7
	AC	91,7	89,9
	BC	108,9	100,1
	ABC	111,0	87,3
Ponto central	M	115,1	98,0
	M	116,8	103,8
	M	106,9	102,6
	M	118,7	89,4

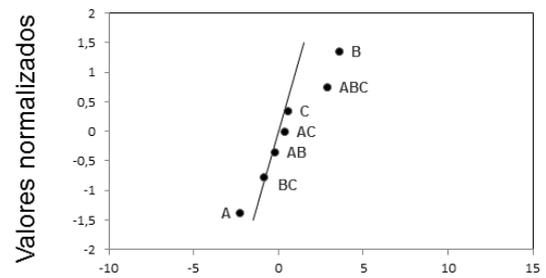
A: massa de Florisil, B: volume do solvente de eluição, e C: volume de injeção.

Os resultados do planejamento fatorial mostraram que apenas o volume do solvente de eluição (tratamento B) contribuiu significativamente e de forma positiva para a recuperação do analito na matriz laranja ($p < 0,05$). Os demais fatores, massa de Florisil e volume de injeção, não apresentaram influência significativa ($p > 0,05$) para a recuperação do carbendazim (**Figura 14**). Sendo assim, o volume máximo de 20 mL do solvente de eluição foi adotado como condição otimizada na fase de purificação da matriz laranja. Na matriz néctar de laranja, nenhum fator estudado interferiu significativamente na recuperação do analito ($p > 0,05$).

Matriz laranja

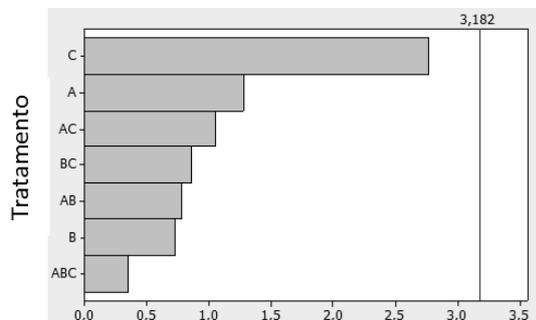


Efeito padronizado

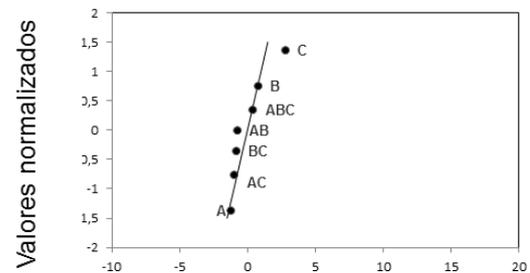


Efeito padronizado

Matriz néctar de laranja



Efeito padronizado



Efeito padronizado

Figura 14: Gráficos de pareto e da probabilidade normal dos efeitos padronizados em relação aos fatores e interações estudados no planejamento fatorial ($t_{crit} = 3,182$, $n = 12$, $\alpha = 0,05$) para carbendazim nas matrizes laranja e néctar de laranja.

A: massa de Florisil, B: volume do solvente de eluição, e C: volume de injeção, +: influência positiva.

Uma vez observada a não influência da maioria dos fatores avaliados na recuperação do carbendazim, as condições de purificação e cromatográficas foram estabelecidas considerando a maior resolução do pico do carbendazim em relação aos picos adjacentes (direita e esquerda), conforme mostrado na **Figura 15**, como também aspectos de custo-benefício analítico. Na **Tabela 10** estão representados os valores de resolução dos picos.

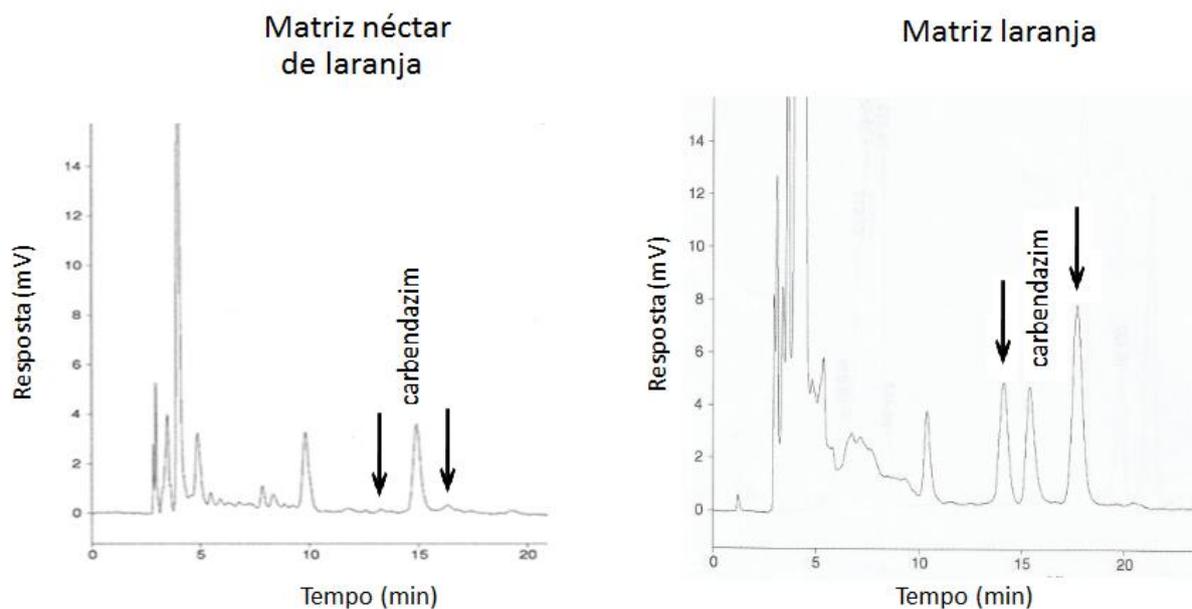


Figura 15: Picos considerados no cálculo da resolução do pico referente ao carbendazim durante o processo de otimização da análise para as matrizes néctar de laranja e laranja.

Condições experimentais: volume de injeção: 50 μ L, fase móvel água ultrapura:metanol (60:40, v/v), fluxo de 0,6 mL/min, comprimento de onda: 286 nm, tempo total de corrida de 30 min.

Tabela 10: Valores de resolução dos picos de carbendazim obtidos para as matrizes laranja e néctar de laranja durante a otimização do método, em relação aos picos adjacentes

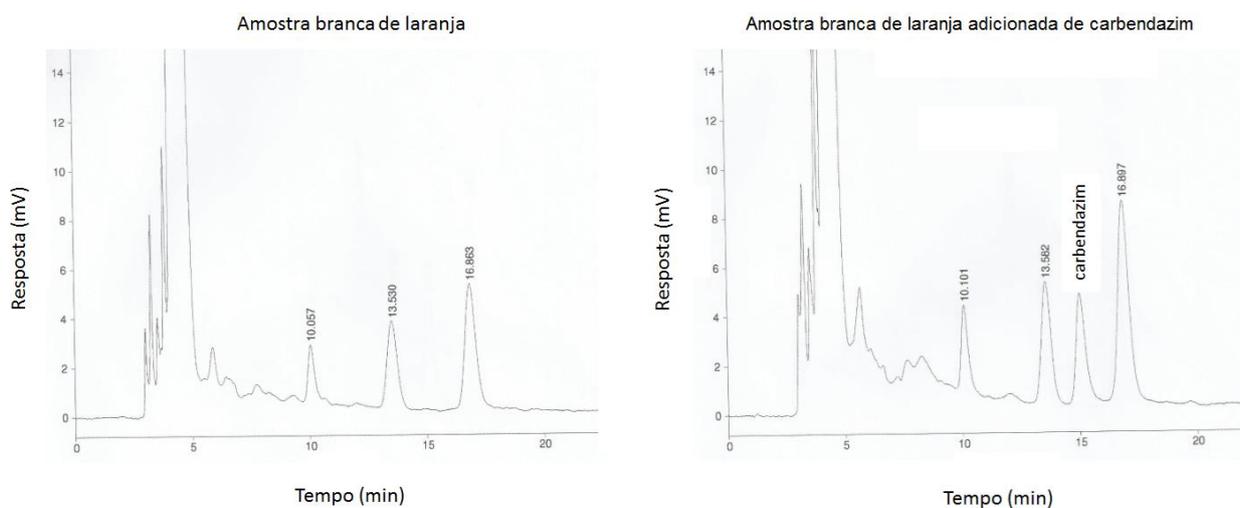
Tratamento	Laranja		Néctar	
	R_s Pico da esquerda	R_s Pico da direita	R_s Pico da esquerda	R_s Pico da Direita
[1]	1,31	2,01	1,35	2,81
A	2,00	1,37	2,06	1,96
B	1,42	1,74	Sem pico	1,63
AB	1,60	1,50	Sem pico	2,04
C	1,29	1,90	1,64	1,79
AC	2,10	2,23	2,25	Sem pico
BC	1,46	2,12	1,13	2,32
ABC	1,90	1,31	2,05	2,25
M	1,52	1,85	2,59	2,08
M	1,19	1,75	1,96	Sem pico
M	1,35	1,64	2,16	1,62
M	1,37	1,50	2,46	Sem pico

Resolução estimada como $R_s = \frac{2(t_{rC} - t_{rA})}{W_C + W_A}$, onde t_{rC} : tempo de retenção do pico do carbendazim, t_{rA} : tempo de retenção do pico adjacente, W_C : largura da base do pico do carbendazim e W_A : largura da base do pico adjacente.

Foram selecionadas as condições de análise que geraram cromatogramas com resolução do pico referente ao carbendazim maior ou igual a 1,50. Para a matriz laranja, fixando o volume do solvente de arraste em 20 mL (condição otimizada), a única condição no delineamento fatorial que gerou cromatogramas com resolução superior ou igual a 1,5, em relação ao pico referente ao carbendazim, foi o tratamento AB. Sendo assim, para a análise do carbendazim na matriz laranja, as condições adotadas foram: 1,0 g de Florisil, 20 mL de volume de solvente de eluição e 40 μ L de volume de injeção.

Para a matriz néctar de laranja, resolução superior ou igual a 1,5 foi obtida em mais de um tratamento. Sendo assim, o segundo critério adotado foi o custo-benefício, optando por um menor uso de solvente. Então, para a análise do carbendazim na matriz néctar de laranja, as condições selecionadas foram: 1,0 g de Florisil, 10 mL de volume de solvente de eluição e 40 μ L de volume de injeção.

Na **Figura 16** são apresentados cromatogramas típicos obtidos para as matrizes laranja e néctar de laranja, brancas e adicionadas de padrão em 0,517 e 0,332 mg/kg, respectivamente, nas condições otimizadas.



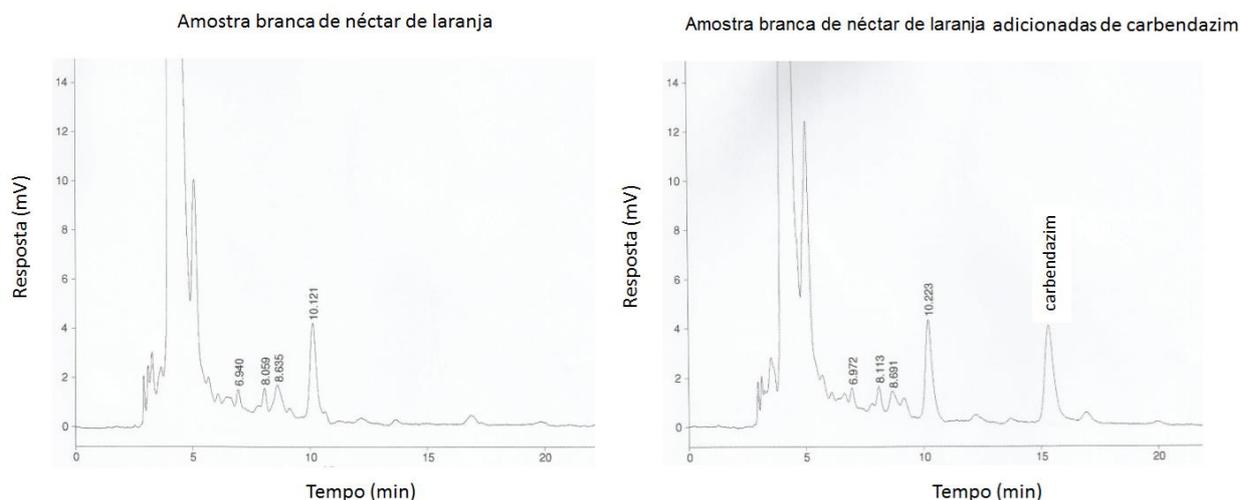


Figura 16: Cromatogramas típicos obtidos nas condições otimizadas para amostras brancas e adicionadas de padrão de carbendazim - matrizes laranja (0,517 mg/kg) e néctar de laranja (0,332 mg/kg).

Condições experimentais: volume de injeção: 40 μ L, fase móvel água ultrapura:metanol (60:40, v/v), fluxo de 0,6 mL/min, comprimento de onda: 286 nm, tempo total de corrida de 30 min.

5.2 VALIDAÇÃO

A linearidade foi demonstrada por meio da comprovação das premissas da regressão linear simples tanto para a curva usual quanto para as matrizadas.

Os gráficos dos resíduos da regressão, com indicação dos *outliers* detectados e removidos, são apresentados na **Figura 17**. Três *outliers* foram detectados na curva usual nos níveis 0,466; 0,776 e 0,931 μ g/mL, dois na curva matrizada para laranja nos níveis 0,776 e 0,931 μ g/mL e três na curva matrizada para néctar nos níveis 0,466; 0,776 e 0,931 μ g/mL. O número máximo de *outliers* removidos por curva foi de três, atendendo ao limite de 22,2 % dos dezoito dados originais. Conforme observado na **Figura 20**, não foram observadas tendências pela inspeção visual dos gráficos exploratórios dos resíduos da regressão, após o tratamento dos valores dispersos.

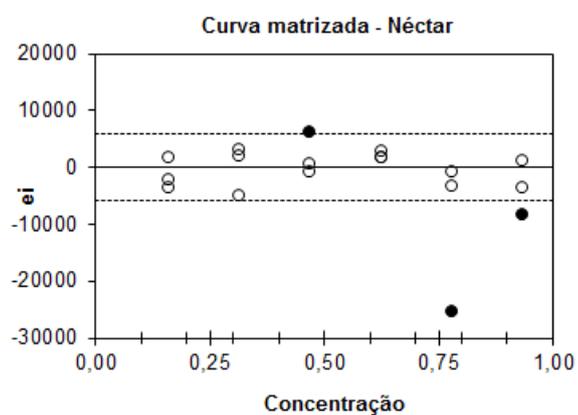
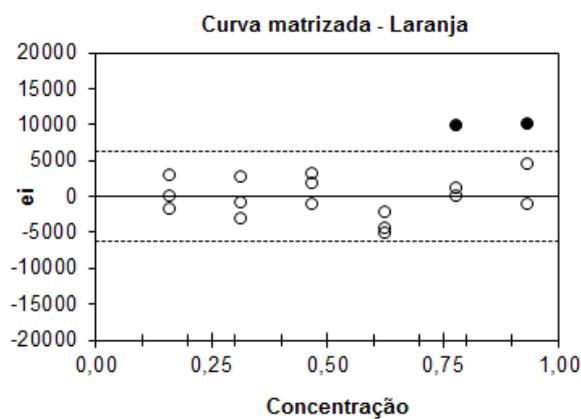
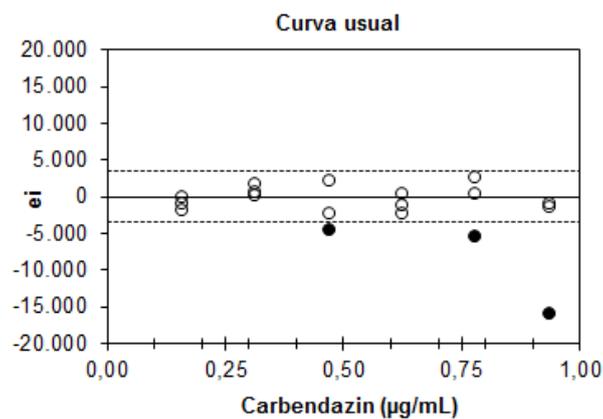


Figura 17 - Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas de carbendzin usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 µg/mL, com indicação dos respectivos *outliers* diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

e_i : resíduo da regressão, ● : valor disperso, - - - : $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} s_{res}$.

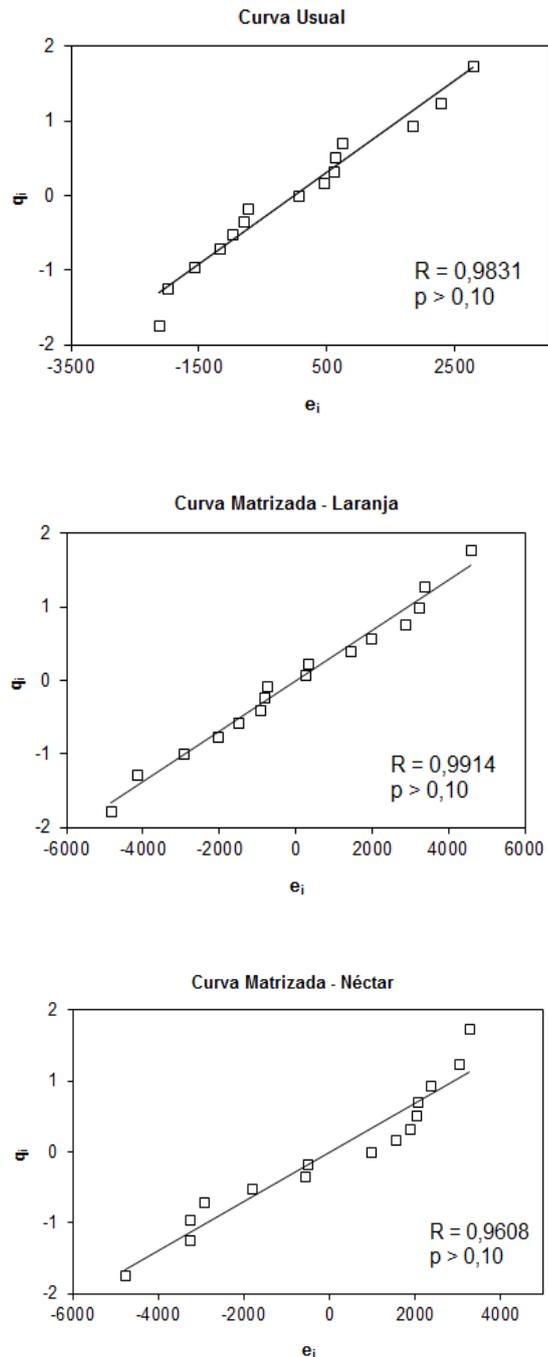


Figura 18 - Gráficos de probabilidade normal das curvas de carbendazim usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 $\mu\text{g/mL}$.

e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado, R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner

O teste de Ryan-Joiner foi empregado para verificar a premissa da distribuição normal dos resíduos da regressão. Os coeficientes de correlação obtidos foram 0,9831; 0,9914 e 0,9608, superiores aos valores críticos de 0,9506; 0,9529 e 0,9506, estimados para para as curvas usual, matrizada para laranja e matrizada para néctar,

respectivamente. Tais resultados indicaram que o desvio da normalidade não foi significativo ($p > 0,10$). Os gráficos de probabilidade normal referentes às curvas acima citadas são mostrados na **Figura 18**.

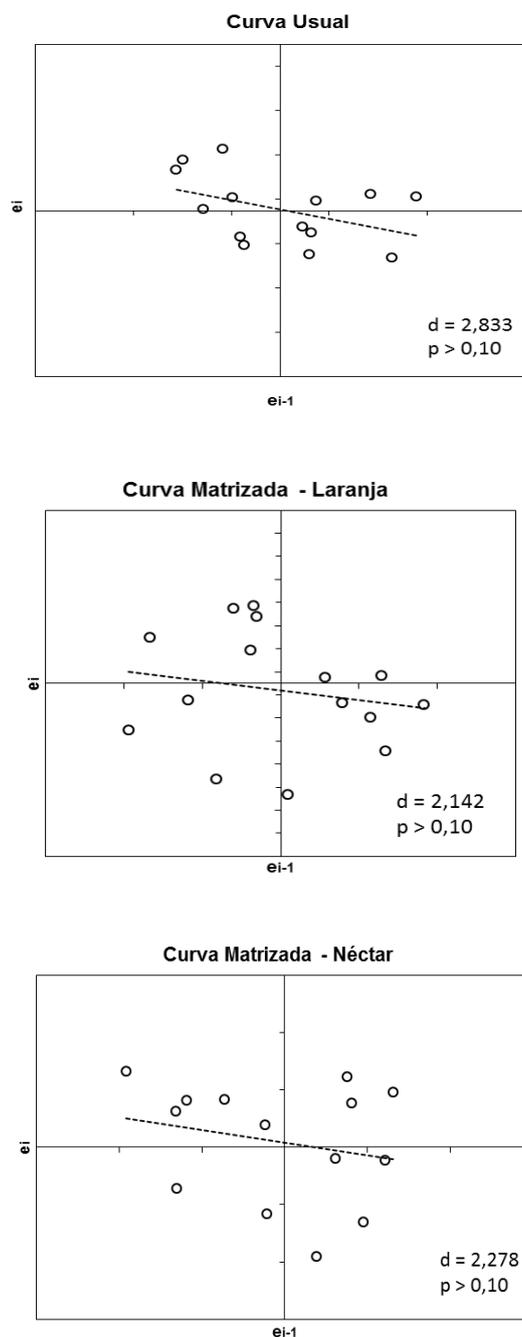


Figura 19 - Gráficos de Durbin-Watson das curvas de carbendazim usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 $\mu\text{g/mL}$.

A independência dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson. Conforme mostrado na **Figura 19**, o perfil homogêneo de distribuição dos pontos nos quatro quadrantes dos gráficos de Durbin-Watson sugeriu que não houve tendências positivas ou negativas em nenhuma das três curvas avaliadas ($p > 0,10$). As estatísticas calculadas foram 2,833 para a curva usual, 2,142 para a curva matrizada para laranja e 2,278 para a curva matrizada para néctar.

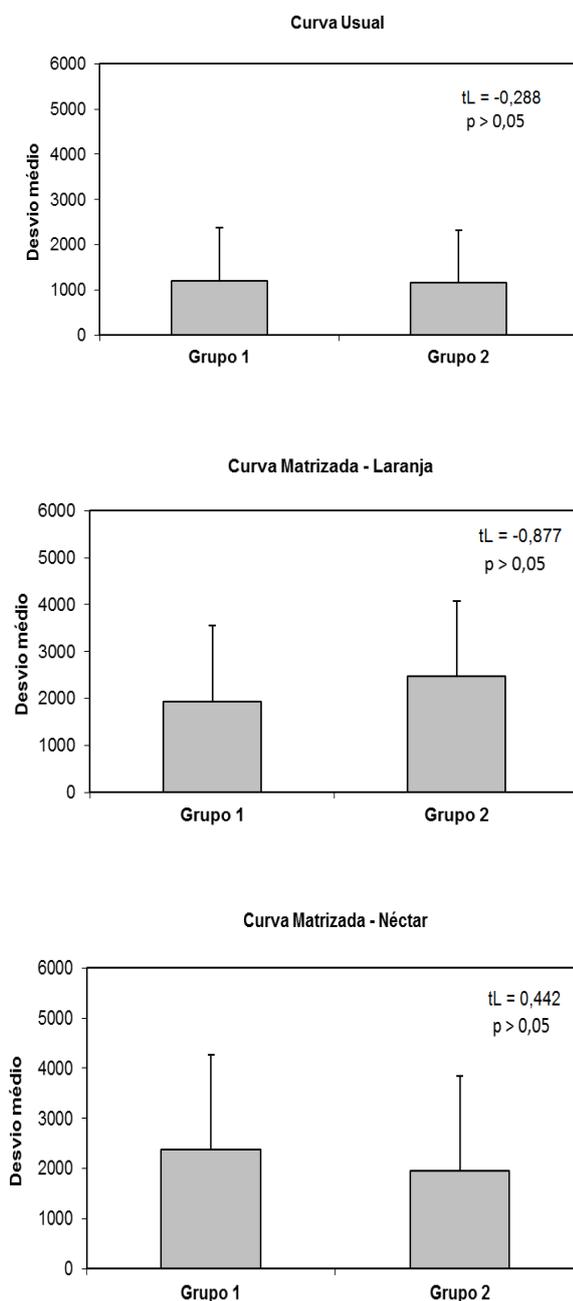


Figura 20 - Gráficos de Levene para curvas de carbendazim usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A homoscedasticidade foi demonstrada pela variabilidade constante dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados. As estatísticas *t* de Levene não foram significativas ($p > 0,05$) em todas as curvas estudadas (**Figura 20**), com valores estimados em -0,288 para curva usual, -0,877 para a matrizada em laranja e 0,442 para matrizada em néctar de laranja, com valores críticos de 2,160; 2,145 e 2,160 (para 13, 14 e 13 GL), respectivamente.

A comprovação das premissas de homoscedasticidade e independência dos resíduos tornou adequado o uso do método dos mínimos quadrados ordinais (MMQO), sem ponderações, para estimativa dos parâmetros da regressão.

Conforme indicado na **Tabela 11**, a regressão foi significativa ($p < 0,001$), com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$), para todas as curvas avaliadas. Tal fato indicou que a regressão linear explicou, adequadamente, a dispersão dos dados encontrados na faixa pesquisada de 0,155 a 0,931 $\mu\text{g/mL}$, correspondente às faixas de 93 a 558 $\mu\text{g/kg}$ e de 172,2 a 1033,3 $\mu\text{g/kg}$ para as matrizes néctar e laranja, respectivamente. As curvas de calibração com suas respectivas equações e coeficientes de determinação estão demonstrados na **Figura 21**.

Tabela 11 - Estatísticas da análise de variância da regressão, incluindo teste de desvio de linearidade, para curvas de carbendazim usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 $\mu\text{g/mL}$

Estatística	Curva usual	Curva matrizada laranja	Curva matrizada néctar
Regressão			
<i>F</i>	$2,185 \times 10^4$	$6,076 \times 10^3$	$6,486 \times 10^3$
<i>p</i>	$2,340 \times 10^{-22}$	$7,111 \times 10^{-20}$	$6,220 \times 10^{-19}$
Desvio da linearidade			
<i>F</i>	1,818	2,464	0,863
<i>p</i>	0,209	0,113	0,521

F = razão entre variâncias, *p* = significância.

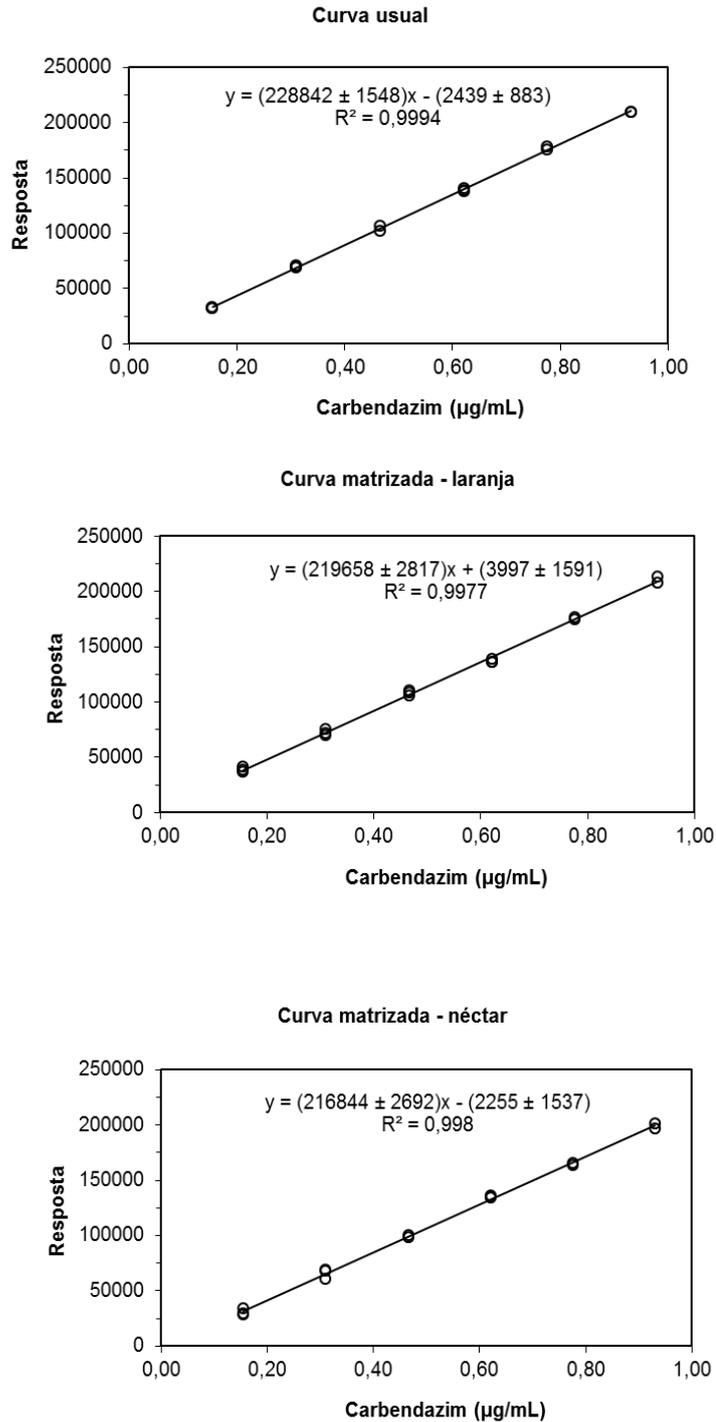


Figura 21 - Curvas de calibração do carbendazim usual e matrizadas para laranja e néctar de laranja, na faixa de 0,155 a 0,931 µg/mL.

y = resposta em área do pico, x = concentração de carbendazim em µg/mL, R^2 = coeficiente de determinação.

A literatura apresenta número significativo de trabalhos que avaliam a linearidade em função apenas dos valores estimados para os coeficientes de correlação (r) ou de determinação (R^2). Entretanto, é equivocado assumir a adequação de um modelo linear tendo como base apenas as referidas estimativas. Se os pontos de uma calibração estiverem bem ajustados a uma curva qualquer, o valor experimental de R^2 será próximo de um. Contudo, R^2 próximo a um não necessariamente significa que o modelo matemático que melhor explica a dispersão dos dados seja uma regressão linear (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Baseado em um valor de R^2 de 0,998, DREASSI e colaboradores (2010) demonstraram que a técnica LC-MS/MS foi capaz de obter uma faixa linear para a quantificação de carbendazim em suco de laranja que variou de 0,06 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Blasco e colaboradores (2005) encontraram faixa linear entre 0,005 e 0,5 mg/kg para quantificação de carbendazim em laranja pelo método LC-MS, adotando também R^2 como estimativa da linearidade (0,996). Utilizando CLAE acoplada a detector de UV, Garrido e colaboradores (1997) obtiveram, pela avaliação de r estimado em 0,990, faixa linear na faixa entre 0,2 e 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para a avaliação do efeito de matriz na faixa linear (0,155 a 0,931 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o teste de t foi adotado para comparar os parâmetros interseção e inclinação, levando em consideração que as variâncias dos resíduos da regressão de todos os pares de curvas comparadas foram consideradas heterogêneas pelo teste de F ($p < 0,05$). Diferenças significativas entre os parâmetros de interseção e inclinação estimados para a curva usual com aqueles obtidos para a curva matrizada de laranja ($p < 0,05$). Para a matriz néctar de laranja, foi observada diferença significativa apenas para o parâmetro inclinação, quando comparado com a curva de solvente ($p < 0,05$), não sendo observada diferença significativa para o parâmetro interseção ($p > 0,05$). Estes resultados encontram-se mostrados na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Comparações entre as interseções e inclinações obtidas para as curvas matrizadas de laranja e de néctar de laranja com as estimadas para a curva usual, na faixa de 0,155 a 0,931 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Estatística	Curva matrizada laranja versus usual	Curva matrizada néctar de laranja versus usual	Curva matrizada laranja versus néctar de laranja
t_c	2,080	2,086	2,052

t_a	3,535	0,104	2,822
p	0,002	0,918	0,009
t_b	2,857	3,863	0,721
p	0,010	0,001	0,477

t_a = estatística t para contrastes entre interseções, t_b = estatística t para contrastes entre inclinações, t_c = valor crítico para a estatística t, p = significância.

Desta forma, foi possível concluir que a curva usual analisada forneceu respostas que diferiram significativamente daquelas obtidas para curvas feitas com as matrizes laranja e néctar de laranja, nos mesmos níveis de concentração. Logo, há a necessidade do uso de curvas de matriz para estimar concentrações de carbendazim.

Considerando a possibilidade de emprego intercambiável das curvas das matrizes estudadas, uma comparação entre os parâmetros estimados para as duas curvas matrizadas também foi feita. As variâncias dos resíduos da regressão destas curvas foram consideradas homogêneas pelo teste de F ($p > 0,05$). Contudo, diferenças significativas foram observadas entre as interseções das curvas matrizadas para laranja e para néctar de laranja ($p < 0,05$), embora não tenham sido detectadas diferenças entre as inclinações das referidas curvas ($p > 0,05$).

Na **Figura 22** estão representadas as curvas obtidas durante a avaliação do efeito matriz.

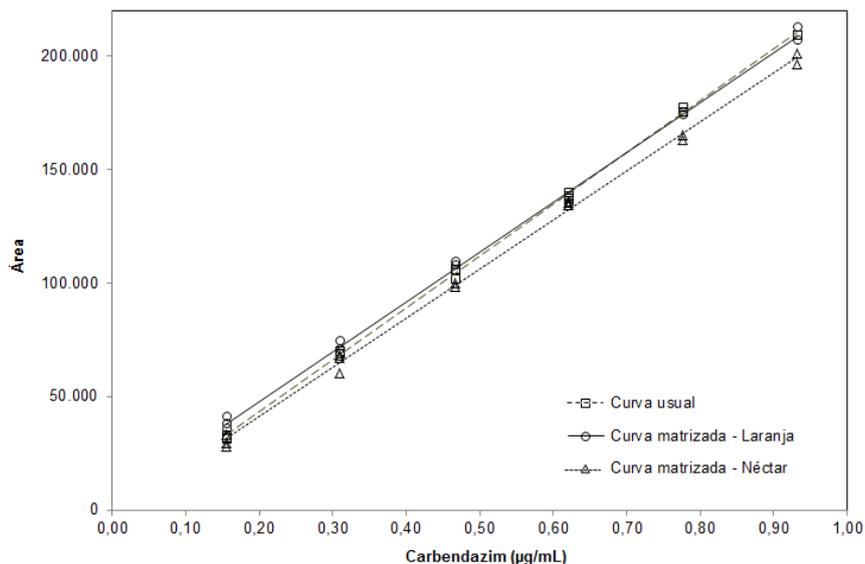


Figura 22 - Curvas de calibração do analito no solvente e nas matrizes laranja e néctar de laranja, obtidas para carbendazim nos ensaios de avaliação dos efeitos de matriz, na faixa de 0,155 a 0,931 µg/mL.

Parâmetros da regressão: $y = (228842 \pm 1548)x - (2439 \pm 883)$ para a curva usual, $y = (219658 \pm 2817)x + (3997 \pm 1591)$ para a curva matrizada para laranja, e $y = (216844 \pm 2692)x - (2255 \pm 1537)$ para a curva matrizada para néctar, sendo y = resposta em área do pico, x = concentração de carbendazim em µg/mL.

Existe na literatura uma grande tendência em assumir a existência de efeito das matrizes laranja e néctar de laranja na resposta gerada pelo carbendazim, uma vez que a maioria dos autores optaram pelo uso da técnica de adição de padrão em amostras brancas, antes mesmo de avaliarem a significância do efeito das matrizes (GARRIDO *et.al.*, 1995; THARSIS *et.al.*, 1997; KALTSONOUDIS *et.al.*, 2003; DREASSI *et.al.*, 2010, BLASCO *et.al.*, 2005; NAKAMURA *et.al.*, 2010; BLASCO *et.al.*, 2002, LÓPEZ *et.al.*, 2012, FERNANDEZ *et.al.*, 2001, PARANTHAMAN *et.al.*, 2012; BARAHONA *et.al.*, 2010 e BEDANDO *et.al.*, 2011). No caso de MMR e multi-analitos, esta abordagem muitas vezes se justifica, visto a inviabilidade de estudar os efeitos para cada matriz. Contudo, no presente estudo, cujo escopo foi restrito a um analito específico e duas matrizes, esta investigação foi considerada pertinente, visto que a ausência de efeitos de matriz, com conseqüente possibilidade de emprego de curva usual nas análises de rotina, simplificaria enormemente a calibração (THOMPSON *et al.*, 2002).

As evidências do presente estudo acerca da diferença entre as curvas matrizadas de alimentos de natureza tão similar como laranja e néctar de laranja, trazem à tona a discussão sobre uma prática muito comum na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, que consta do emprego de curvas matrizadas elaboradas com produtos representativos dos alimentos de cada grupo classificado pelo *Codex Alimentarius* (CODEX ALIMENTARIUM, 1999).

Dentre os resultados de recuperação de carbendazim na matriz laranja, somente um *outlier* foi identificado pelo teste de Grubbs ($p > 0,05$) dentre as doze repetições do menor nível de concentração estudado. Para a matriz néctar de laranja, não foram identificados *outliers* em nenhum dos três níveis estudados ($p > 0,05$). Normalidade e homoscedasticidade dos resíduos dos resultados de recuperação foram observadas pelos testes de Ryan-Joiner e Levene modificado (Tabela 13), respectivamente, permitindo a estimativa dos desvios padrão relativos de repetitividade e precisão intermediária por análise de variância.

Tabela 13 - Avaliação das premissas de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos obtidos nos estudos de recuperação aparente de carbendazim em matriz laranja e néctar de laranja em diferentes níveis de concentração.

Estatística	Concentração (mg/kg)					
	Laranja			Néctar		
	0,172	0,517	1,033	0,093	0,279	0,558
Normalidade dos resíduos						
R	0,9664	0,9704	0,9863	0,9795	0,9591	0,9817
p	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
Homoscedasticidade dos resíduos						
F_L	0,765	0,474	0,571	0,179	1,071	0,092
p	0,496	0,637	0,584	0,839	0,382	0,913

R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, p = significância, F_L = estatística F de Levene.

Os valores médios de porcentagem de recuperação, bem como dos DPR_r e DPR_R , foram calculados para cada nível de concentração avaliado (**Tabela 14**). Para a matriz laranja, as médias de recuperação variaram entre 92,0 e 104,3 %, com DPR_r entre 7,23 e 10,81 % e DPR_R entre 7,26 e 11,64 %. Para a matriz néctar de laranja, as médias de recuperação encontraram-se entre 88,2 e 95,8 %, com DPR_r entre 6,47 e 9,09 % e DPR_R entre 12,53 e 15,72 %.

Tabela 14 - Médias de recuperação aparente e desvios padrão relativos, sob condições de repetitividade e precisão intermediária, obtidos para amostras de laranja e néctar de laranja adicionadas de carbendazim em diferentes níveis de concentração

Concentração (mg/kg)	n	Valores calculados			Critério de aceitabilidade		
		R (%)	DPR_r (%)	DPR_R (%)	R (%)	DPR_r (%)	DPR_R (%)
Laranja							
0,172	11	92,03	10,81	11,64	80 a 110	< 13,74	< 20,61
0,517	12	104,28	7,26	7,26	80 a 110	< 11,78	< 17,66
1,033	12	99,04	7,23	8,15	80 a 110	< 10,61	< 15,91
Néctar							
0,093	12	88,20	8,19	15,61	80 a 110	< 15,21	< 22,82
0,279	12	90,19	6,47	12,53	80 a 110	< 12,92	< 19,37
0,558	12	95,83	9,09	15,72	80 a 110	< 11,64	< 17,46

n = número de observações, R = média de recuperação, DPR_r = desvio padrão relativo de repetitividade, DPR_R = desvio padrão relativo de precisão intermediária.

Valores médios de recuperação aparente encontraram-se dentro dos critérios de aceitabilidade em toda a faixa examinada para as matrizes laranja e néctar de laranja. Com base nos critérios utilizados, pôde-se concluir que não houve falta de veracidade e que a precisão do método foi adequada nas faixas de concentração de 0,172 a 1,033 mg/kg e de 0,093 a 0,558 mg/kg para as matrizes laranja e néctar de laranja, respectivamente.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com aqueles reportados na literatura. Garrido e colaboradores obtiveram, pela técnica CLAE-UV, recuperações médias de carbendazim em mix de frutas de 77 e 82 % para os níveis 0,06 e 1,00 mg/kg, respectivamente, considerando 10 amostras analisadas em duplicata. DPR_r de 5,7 % e DPR_R de 7,6 % foram reportados por estes autores para os níveis 0,06 e 1,00 mg/kg, respectivamente.(GARRIDO *et.al.*,1997).

Blasco e colaboradores obtiveram recuperação média de 84 % e DPR máximo de 5 %, por CL-MS, realizando a repetição de cinco análises de uma mesma amostra branca de laranja contaminada com padrão de carbendazim em cinco níveis na faixa de 0,001 a 1 mg/kg (BLASCO *et.al.*, 2006). Fernández e colaboradores obtiveram recuperação média de 79 % e DPR máximo de 10 % para carbendazim em suco de laranja. A recuperação e o desvio padrão relativo foram avaliados pela quintuplicata de amostras contaminadas nos níveis 0,05; 0,5 e 5 mg/kg (FERNÁNDEZ *et.al.*, 2001).

Os limites teóricos de detecção foram de 0,024 e 0,013 mg/kg, enquanto os limites de quantificação corresponderam a 0,172 e 0,093 mg/kg, respectivamente, para as matrizes laranja e néctar de laranja.

Por CLAE-UV, Garrido e colaboradores encontraram LD de 0,010 mg/kg e LQ de 0,020 mg/kg (GARRIDO *et.al.*, 1997). LD de 0,020 mg/kg foi observado por Fernández e colaboradores na matriz laranja por CLAE-MS (FERNÁNDEZ *et.al.*, 2001). Bendendo e colaboradores encontraram LD e LQ de 0,03 e 0,35 mg/L, respectivamente, na matriz suco de laranja pela técnica CLAE-MS/MS (BEDENDO *et.al.*, 2012).

Incertezas expandidas de 23,28; 14,52 e 16,30 % foram estimadas para laranja nos níveis 0,172; 0,517 e 1,033 mg/kg e de 31,22; 25,06 e 31,44 % para néctar de laranja nos níveis 0,093; 0,279 e 0,558 mg/kg, respectivamente. Foram adotados os valores máximos de 23,28 % para laranja e de 31,44 % para néctar.

5.3 MONITORAMENTO

Tendo como base os limites de detecção de carbendazim nas matrizes laranja e néctar de laranja (0,024 e 0,013 mg/kg, respectivamente), não foram encontradas amostras contaminadas entre as 20 amostras de laranja coletadas por fiscais do IMA,

as 32 amostras de laranja coletadas na Unidade Grande BH da CEASAMG e as 36 amostras de néctar coletadas no mercado de Belo Horizonte. Esse resultado está de acordo com os dados mais recentes publicados pela ANVISA, por meio do PARA, onde não foram reportadas não conformidades relacionadas à presença de resíduos de carbendazim nas amostras analisadas de laranja (ANVISA, 2011b; ANVISA, 2013a).

6. CONCLUSÃO

Com a otimização das condições experimentais das etapas de purificação e determinação de resíduos de carbendazim em laranja e néctar de laranja foi observado que aumento do volume de eluição contribuiu positivamente para a recuperação do analito na matriz laranja.

A validação do método otimizado para análise de carbendazim em laranja e néctar de laranja demonstrou adequação ao propósito de uso para as duas matrizes estudadas, considerando a legislação vigente no Brasil e a internacional.

A linearidade foi demonstrada por meio da comprovação das premissas da regressão linear simples na faixa de 0,155 a 0,931 $\mu\text{g/mL}$ para as curvas usual e matrizadas com laranja e néctar de laranja.

Efeito de matriz significativo foi observado para as duas matrizes quando comparadas a com a curva usual. Diferenças significativas também foram obtidas quando as curvas das duas matrizes foram comparadas.

Recuperações e DPR dentro dos critérios de aceitabilidade foram obtidos para laranja na faixa de 0,172 a 1,003 mg/kg e para néctar na faixa de 0,093 a 0,558 mg/kg.

Incertezas expandidas máximas de 23,28 e 31,44 % foram estimadas para laranja e néctar de laranja, respectivamente, na faixa validada.

Não foi observada ocorrência de resíduos de carbendazim em amostras de laranja produzidas no estado de Minas Gerais, bem como em amostras coletadas na Unidade Grande BH da CEASAMG e em amostras de néctar de laranja coletadas em Belo

horizonte, tendo como base os limites de detecção teóricos de 0,024 e 0,013 mg/kg para as matrizes laranja e néctar de laranja, respectivamente.

O embargo do suco de laranja nacional pelo governo americano pode ter provocado uma suspensão no uso do carbendazim nos pomares brasileiros. Fato sustentado pelas recomendações de substituição do uso do carbendazim na citricultura brasileira.

A manutenção no monitoramento de resíduos de carbendazim é justificada pelo fato desse agrotóxico ainda ser permitido para a cultura da laranja, tendo os seus limites regulamentados no Brasil e em outros países.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) ISO (International Standard Organization). *ABNT NBR ISO 9000:2005*. Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 35 p. (a)

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) ISO (International Standard Organization). *ABNT NBR ISO/IEC 17025*. Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31 p. (b)

AGÊNCIA MINAS. Notícias do governo do estado de Minas Gerais. *Triângulo Mineiro se destaca no volume de laranjas produzidas*. 2008. Disponível em: <<http://www.agenciaminas.mg.gov.br/noticias/triangulo-mineiro-se-destaca-no-volume-de-laranjas-produzidas>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

AGROANALYSIS. Suco de laranja brasileiro: liderança e tecnologia. Centro de agronegócio da Fundação Getúlio Vargas. *Revista Agroanalysis*, Setembro de 2009. Disponível em: <http://www.agroanalysis.com.br/especiais_detalhe.php?idEspecial=49>. Acesso em: 09 ago. 2012.

ANDEF (Associação Nacional da Defesa Vegetal). *Posicionamento carbendazim*. 2012. Disponível em <<http://www.undef.com.br/noticias/noticia.asp?cod=441>>. Acesso em: 18 mar. 2012.

ANTIGNAC, J.P.; LE BIZEC, B.; MONTEAU, F.; ANDRE, F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the “2002/657/EC” european decision: guideline and application. *Anal. Chim. Acta*, v. 483, p. 325-334, 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). *Cartilha sobre agrotóxicos*. Série trilhas do campo. 2011. 26 p. (a)

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos*. Relatório de atividades de 2010. Brasília: ANVISA, 2011. (b)

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos*. Relatório de atividades de 2011-2012. Brasília: ANVISA, 2013 (a).

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). *Resolução nº 635 de 27 de fevereiro de 2009*. Aprova monografia do Carbendazim. 2009.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". 2013 (b).

BACHA, C.J.C.; ROCHA, M.T. O comportamento da agropecuária brasileira no período de 1987 a 1996. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, Brasília. v. 36, n. 1, p. 35-59, jan./mar. 1998.

BASTIANEL, M.B.; DORNELLES, A.L.C.; MACHADO, M.A.; WICKERT, E.; MARASCHIN, S.F.; FILHO, H.D.C.; SCHÄFER, G. Caracterização de genótipos de Citrus spp. através de marcadores RAPD. *Cienc. Rural*, v. 31, n. 5, p. 763-768, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782001000500004>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

BEDOR, C.N.G. *Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na fruticultura e sua implicação para a vigilância da saúde*. Recife: Fundação Oswaldo Cruz. 2008. 115 p. (Tese, Doutorado em Saúde Pública).

BLASCO, C.; FERNANDÉZ, M.; PICÓ, Y.; FONT, G.; MAÑES, J. Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. v. 461, p. 109-116, 2002.

BLASCO, C.; FONT, G.; PICÓ, Y. Evaluation of 10 pesticide residues in oranges and tangerines from Valencia (Spain). *Food Control*, v. 17, p. 841-846. 2006.

BONIFÁCIO N.P.A.; CÉSAR T.B. Influência da ingestão crônica do suco de laranja na pressão arterial e na composição corporal. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 16, n. 2, p.76-81, 2009.

BONIFÁCIO, N.P.A. *Influência do consumo de suco de laranja no perfil sérico dos lípidos, apolipoproteínas e homocisteína em homens normais e hiperlipidêmicos*.

Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2007. 88 p. (Tese, Doutorado em Alimentos e Nutrição).

BORRADAILE, N.M. ; CARROLL, K.K. ; KUROWSKA, E.M. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanonas hesperetin and naringenin. *Lipids*, v. 34, p. 591-598, 1999.

BOTEOM, M. *Cadeia agroindustrial de citrus*. CEPEA. 1998. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/citros/cadeia_citros.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2012.

BRANCO, I.G.; SANJINEZ-ARGANDONA, E.J.; SILVA, M.M.A.P, TALISSA, M. Avaliação sensorial e estabilidade físico-química de um blend de laranja e cenoura. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n.1, p. 7-12, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000100002>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

BRASIL, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que 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, e dá outras providências. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em: 24 fev. 2014.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, 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, e dá outras providências. Brasília, DF, 1989.

BRASIL. Lei nº 9974 de 06 de Junho de 2000. Altera a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que 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, e dá outras providências. Disponível em: <

<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id =382&word>>. Acesso em: 28 mar. 2012 (b)

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº1, de 7 de Janeiro de 2000. Complementa padrões de identidade e qualidade para suco de laranja. Brasília, 10 de Janeiro de 2000. (a)

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Decreto n. 6.871, de 4 de junho de 2009. Padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas. Brasília, DF, 05 jun. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2011.72 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 21, de 27 de Agosto de 2012. Fixa a quantidade mínima de cinquenta por cento de suco de laranja no Néctar de Laranja. Diário Oficial da União. Brasília, 28 de Agosto de 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 8.918, de 14 de Julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersetorial de Bebidas e dá outras providências. Brasília, 15 de Julho de 1994. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1265003>>. Acesso em: 12 set. 2012.

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

BRUGNARO, R.; BACHA, C.J.C. Análise da participação da agropecuária no PIB do Brasil de 1986 a 2004. *Estud. Econ.*, v. 39, n. 1, p. 127-159, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-41612009000100005>>. Acesso em: 12 mar. 2012.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. Planejamento de experimentos usando *Statística*. Rio de Janeiro: E-Paper Serviços Editoriais. 2003.

CALDAS, E.D.; SOUZA, L.C.K.R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Rev. Saúde Pública*, v. 34, n.5, p. 529-534, 2000.

CARVALHO, M.A.; SILVA, C.R.L. Vulnerabilidade do comércio agrícola brasileiro. *Rev. Econ. Sociol. Rural*, v. 43, n. 1, p. 9-28, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-20032005000100001>>. Acesso em: 12 mar. 2012.

CITRUSBR (Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos). *Resumo do consumo mundial de bebida*. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/consumo/estatisticas-de-consumo-228460-1.asp>>. Acesso em: 05 mar. 2012.
(a)

CITRUSBR (Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos). *Benefícios do consumo da laranja*. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/consumidor/beneficios-do-suco-de-laranja-151241-1.asp>>. Acesso em: 05 mar. 2012 (b)

CITRUSBR (Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos). *A indústria brasileira de suco de laranja*. Publicação institucional, 69 p, 2012. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/download/CITRUS_APEX_PORTUGUES.pdf>. Acesso em: 07 mar. 2012 (c)

CITRUSBR (Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos). Consumo de suco de laranja - Dados 2013. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/exportadores-citricos/consumo/suco-de-laranja-sumario-264754-1.asp>. Acesso em: 24 fev. 2014.

CODEX ALIMENTARIUS. *Pesticide Residues in Food and Feed: Commodity details - Oranges, Sweet, Sour (including Orange-like hybrids): several cultivars*. 2008. Disponível em <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/commodities/details.html;jsessionid=4A274523C4156CC09BDF0E0349E03301?id=127>>. Acesso em: 18 mar. 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs, CAC/GL 33. 1999. Disponível em:

<http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/>. Acesso em: 25 out. 2012.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). *Acompanhamento da safra brasileira de laranja 2011-12*. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_13_11_54_04_boletim_dez_2011_laranja>. Acesso em: 05 mar. 2012.

CORREA NETO, R.S.; FARIA, J.A.F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 19, n. 1, p. 153-161. 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611999000100028>>. Acesso em: 11 mar. 2012.

DREASSI, E.; ZANFINI, A.; ZIZZARI, A.T.; ROSA, C.L.; BOTTA, M.; CORBINI, G. Lc/Esi/Ms/Ms determination of postharvest fungicide residues in citrus juices. *Food Science and Technology*, v. 43, p. 1301-1306. 2010.

EC (European Commission). *Commission decision 2002/657/EC 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.

EPA (Environmental Protection Agency). *Pesticides: Topical & Chemical Fact Sheets. Risk Assessment for Safety of Orange Juice Containing Fungicide Carbendazim*, 2012. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/chemicals/carbendazim-fs.htm>>. Acesso em: 07 mar. 2012.

EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC, 1998. 61 p.

EURACHEM/CITAC. *Quantifying uncertainty in analytical measurements*. Teddington: LGC, 2000. 120 p.

FAO/WHO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial da Saúde). *Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues*. Geneva, Switzerland, 20–29 September 2005.

FAO/WHO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Organização Mundial da Saúde). Summary analysis of Codes, guidelines, and standards related to Good Agricultural Practices. Background paper for the FAO Expert Consultation on a Good Agricultural Practice approach. Rome: FAO. 2003. 36 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/prods/GAP/Docs/PDF/2-SummaryAnalysisRelevantCodesEXTERNAL.pdf>> Acesso em: 10 out.2012.

FARIA, N.M.X.; FASSA, A.G.; FACCHINI, L.A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. *Ciênc. Saúde Coletiva*, v. 12, n. 1, p. 25-38, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232007000100008>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

FARINA, E.M.M.Q. Challenges for Brazil's food industry in the context of globalization and Mercosur consolidation. *International Food and Agribusiness Management Review*, v. 2, p. 315-330, 2001.

FERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; PICÓ, J. Liquid chromatographic-mass spectrometric of post harvest fungicides in citrus fruits. *Journal of Chromatography A*. v. 912, p. 301-310, 2001.

FRAC. Fungicide Resistance Actin Committee. Benzimidazoles, 2005. Disponível em: <http://www.frac.info/frac/work/work_benz.htm>. Acesso em: 07 mar. 2012.

FRANKE, A.A.; COONEY, R.V; HENNING, M.; CUSTER, L.J. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice in humans. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, p.5170-5178, 2005.

FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura). *Fundecitrus orienta para a substituição de fungicida rejeitado pelos EUA*. 2012. Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br/Noticias/07.02.12---Fundecitrus-orienta-para-a-substituicao-de-fungicida-rejeitado-pelos-EUA,248>>. Acesso em: 18 mar. 2012.

GARCIA, E.; BUSSACOS, M. A.; FISCHER, F. M. Impacto da legislação no registro de agrotóxicos de maior toxicidade no Brasil. *Rev. Saúde Pública*. v. 39, n. 5, p. 832-839, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102005000500020>>. Acesso em: 06 mar. 2012.

GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.*, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

HAALAND, P. D. *Experimental Design in Biotechnology*. Nova York: Marcel Dekker. 1989.

HE, Q.; KONG, X.H.; ZHAO, J.; LI, J.; YUE, A.; ZHANG, Y. Determination of benomyl, carbendazim and thiabendazole in apple juice concentrate using solid-phase extraction coupled with ion exchange chromatography. *Se Pu*, v. 26, n. 5, p. 563-567, 2008.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal. Chem.*, v. 54, p. 67A-76A, 1982.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC/GC Int.*, Feb., p. 96-105, 1998.

HUND, E.; MASSART, D.L.; SMEYERS-VERBEKE, J. Inter-laboratory studies in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta*, v. 423, p. 145-165, 2000.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Contas Nacionais Trimestrais-Indicadores de Volume e Valores Correntes: Em 2011, PIB cresce 2,7% e totaliza R\$ 4,143 trilhões. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2093>. Acesso em: 30 ago. 2012. (a)

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Contas Nacionais Trimestrais-Indicadores de Volume e Valores Correntes. 2012. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Contas_Nacionais/Contas_Nacionais_Trimestrais/Fasciculo_Indicadores_IBGE/2012/pib-vol-val_201203caderno.pdf. Acesso em: 24 fev. 2014.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa de orçamentos familiares: Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Rio de Janeiro. 2011. (b)

ILAC (International Laboratory Accreditation Conference). Disponível em: <<http://www.ilac.org>>. Acesso em: 30.08.2010.

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 jun. 2011.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). *DOQ-CGCRE-008*. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 35 p.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). *Carbendazim, benomyl, and thiophanate-methyl*: summary Identity, physical and chemical properties, and analytical methods. 2010. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr19.htm>>. Acesso: 17 mar. 2012. (a)

IPCS (International Programme on Chemical Safety). Environmental health criteria: carbendazim. 2010. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc149.htm>>. Acesso: 02 set. 2012. (b)

IPCS (International Programme on Chemical Safety). WHO/FAO data sheets on pesticides nº 82. Carbendazim. 1996. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest89_e.htm>. Acesso: 17 maio 2014.

ISO (International Organization for Standardization). About ISO. Disponível em: <<http://www.iso.org/iso/home/about.htm>>. Acesso em: 05 set. 2012.

ISO (International Standards Organization). *International vocabulary of basic and general terms in metrology - VIM*. Geneva: ISO, 1993. 59 p.

ISO (International Standards Organization). *ISO 11095. Linear calibration using reference materials*. Geneva: ISO, 1996. 29 p.

JARDIM, I.C.S.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. *Cromatografia líquida de alta eficiência*. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. 1 ed. Campinas: Unicamp, 2006. Capítulo 9, p. 273-397.

JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, v. 19, p. 719-736, 1996.

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

KAIHARA, A.; YOSHII, K.; TSUMURA, Y.; ISHIMITSU, S.; TONOGAI, Y. Multi-residue Analysis of 18 Pesticides in Fresh Fruits, Vegetables and Rice by Supercritical Fluid Extraction and Liquid Chromatography – Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Health Science*, v. 48, n. 2, p. 173-178. 2002.

KUROWSKA, E.M.; SPENCE, J.D.; JORDAN, J.; WETMORE, S.; FREEMAN, D.J.; PICHÉ, L.A.; SERRATORE, P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 72, p. 1095-1100, 2000.

LARINI, L. *Toxicologia dos praguicidas*. 1 ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 9-18.

LEE, K. G.; LEE, S. K. *Monitoring and risk assessment of pesticide residues in yuza fruits (Citrus junos Sieb. ex Tanaka) and yuza tea samples produced in Korea. Food Chemistry*, Vol. 135, 2930–2933, 2012.

LIMA, C.G. Atividade protetora cardiovascular do suco de laranja vermelha em indivíduos adultos. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2010. 78 p. (Dissertação, Mestrado em Alimentação e Nutrição).

LIU, X.S.; GAO, X.; TONG, Z.F.; LIU, J.Y. Simultaneous determination of thiabendazole and carbendazim residues in concentrated mandarin juice by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *Chemical Analysis And Meterage*, v. 15, p. 19-21, 2006.

LÓPEZ, B.G.; MARTOS, L.J.; REYES, J.F.G.; PULIDO, M.V.; POLGAR, L.; MARTOS, N.R.; DÍAZ, A.M. Study on the occurrence of pesticide residues in fruit-based soft drinks from the EU market and morocco using liquid chromatographyemass spectrometry. *Food Control*, v.26, p. 341-346. 2012.

LOREZ, E.S. *Pesticide safety fact sheet: potential health effects of pesticides*. The Pennsylvania State University. 2009.

LUCCHESI, G. *Agrotóxicos - Construção da legislação*. Consultorias Legislativa da Câmara dos Deputados, 2005. Disponível em: <http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/2227/agrotoxicos_construcao_lucchese.pdf?sequence=1>. Acesso em: 06 mar. 2012.

MAC NEIL, J.D.; PATTERSON, J.; MARTZ, V. *Validation of analytical methods – Providing your method is “fit for purpose”*. In: FAJGELJ, A.; AMBRUS, A. (Ed.) Principles and practices of method validation. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. p. 100-107.

MALIK, A. K.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 4018-4040, 2010.

MANNER, H.I.; BUKER, R.S.; SMITH, V.E; ELEVITCH, C.R. 2006. *Citrus species (citrus)*, ver. 2.1. In: ELEVITCH, C.R. (ed.). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Hōlualoa, Hawai. Disponível em: <<http://www.traditionaltree.org>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Brasil projeções do agronegócio 2012/2013 a 2022/2023. Brasília, julho de 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOES%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%202_0.pdf>. Acesso em : 24 fev. 2014.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução normativa nº 1 de janeiro de 2013. Disponível em < [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%20de%20Resultados%20ano%20safra%202011-2012%20\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%20de%20Resultados%20ano%20safra%202011-2012%20(1).pdf)>. Acesso em 19 de maio de 2014.

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 mai. 2011.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Sislegis - Sistema de consulta à legislação. Instrução Normativa nº 35, de 10 de outubro de 2009. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 25 mai. 2011.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Sislegis - Sistema de consulta à legislação. Instrução normativa nº 40, de 11 de novembro de 2011. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em 25 de maio de 2011. (b)

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

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 mai. 2011.

MARKESTRAT. Resumo do consumo mundial de bebidas. Elaborado por Markestrat a partir de Tetra Pak e Euromonitor. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/consumo/bebidas-em-geral-264757-1.asp>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

MAROTO, A.; RIU, J.; BOQUÉ, R.; RIUS, F.X. Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. *Analytica Chimica Acta*, v. 391, p. 173-185, 1999.

MAZELLIER, P.; LEROY, E.; DE LAAT, J.; LEGUBE, B. Degradation of carbendazim by UV/H₂O₂ investigated by kinetic modeling. *Environmental Chemistry Letter*, v. 1, p. 68-74, 2003.

MÍDIO, A.F.; MARTINS, D.I. *Toxicologia de Alimentos*. 1 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2000. p.190-200.

MÜLLER, P.S. Microencapsulação do óleo essencial de laranja. Curitiba: Faculdade de Farmácia da UFPR. 2011. 99 p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos).

MUNHOZ, J. R.; MORABITO, R. Uma abordagem de otimização robusta no planejamento agregado de produção na indústria cítrica. *PROD. [ONLINE]. AHEAD OF PRINT*, PP. 0-0. EPUB AUG 02, 2012. ISSN 0103-6513. <[HTTP://DX.DOI.ORG/10.1590/S0103-65132012005000054](http://dx.doi.org/10.1590/S0103-65132012005000054)>. Acesso em: 09 ago. 2012.

NAKAMURA, M.; FURUMI, Y.; WATANABE, F.; MIZUKOSHI, K.; TANIGUCHI, M.; NEMOTO, S. Determination of carbendazim, thiophanate, thiophanate-methyl and

benomyl residues in agricultural products by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Food Hyg. Saf. Sci.*, v. 52, n.3, p. 148-155, 2011.

NETHERLANDS, MINISTRY OF PUBLIC HEALTH, WELFARE AND SPORT. *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*, 6a Ed. Amsterdam: RIVM, 1996.

NEVES, M.F.; JANK, M.S. Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015. São Paulo. 2006. Disponível em: < http://www.fundace.org.br/arquivos_diversos/agenda_estrategica/Agenda_Citrus_2015_PENSAICONE.pdf>. Acesso em: 07 set. 2012.

NUNES, M.F.; KALAKI, R.B.; TROMBIN, V.G. *O retrato da citricultura brasileira*. 2009. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com.br/exportadores-citricos/saiba-mais/o-retrato-da-citricultura-brasileira-189513-1.asp>>. Acesso em: 02 mar. 2012.

OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 72-74. 2003.

OLIVEIRA, S.S. O papel da avaliação de risco no gerenciamento de produtos agrotóxicos: diretrizes para a formação de políticas públicas. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 2005. 252p. (Tese: Doutorado em Saúde Pública)

PARANTHAMAN, R.; SUDHA, A.; KUMARAVEL, S. Determination of pesticide residues in banana by using high performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v. 8, n. 1, p. 1-6. 2012.

REIS, L.F.S.D. Agronegócios: qualidade na gestão. 1^a.ed. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2010. 400 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G; COLLINS, C.H; JARDIM, I.C.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, M.B.C.; ANDREOTE, F.D.; SPÓSITO, M.B.;VILDOSO, C.I.A.; ARAÚJO; W.L.; KLEINER, A.A.P. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 42, n. 3, p.323-327, mar. 2007.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos. 1ed. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005

RSC (Royal Society of Chemistry). Analytical Methods Committee Technical Brief: *Is my calibration linear?*. RSC, 2005. 2 p.

RSC (Royal Society of Chemistry). Analytical Methods Committee Technical Brief: *Terminology - the key to understanding the analytical science*. Part 1: accuracy, precision and uncertainty. RSC, 2003. 2 p.

RSC (Royal Society of Chemistry). Analytical Methods Committee Technical Brief: *What should be done with results below the detection limit?* Mentioning the unmentionable. RSC, 2001. 2 p.

SANCO. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document N° SANCO/12571/2013. 2013. 42p.

SANCO. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Document N° SANCO/12495/2011. 2012. 41 p.

SARIEGO, J.C. *Educação ambiental*. As ameaças ao planeta azul. São Paulo: Ed. Scipione, 2004. p.137, 2004.

SILVA, C.M.S.; MELO, I.S.; MAIA, A.H.N.; ABAKERLI, R.B. Isolamento de fungos degradadores de carbendazim. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 34, n.7, p. 1255-1264, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X1999000700019>>. Acesso em : 17 mar. 2012.

SILVEIRA, J. K. Ingestão habitual do suco de laranja vermelha e fatores de risco para a síndrome metabólica. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêutica da UNESP. 2011. 245 p. (Dissertação, Mestrado em Alimentos e Nutrição).

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). Dados de mercado: Vendas janeiro/outubro de 2011. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br/upload/Vendasjaneiro-outubro2011.ppt>>. Acesso em: 03 set. 2012.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). Uso de defensivos é intensificada no Brasil. 2009. Disponível em; <http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2278>. Acesso em: 03 set. 2012.

SOARES, W.L. *Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. 2010. 163 p. (Tese, Doutorado em Saúde Pública).

SOLER, C.; PICÓ, Y. Recent trend in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 2, p. 103-115, 2007.

SOUZA, S.V.C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 296 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos)

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, 2005.

STOPPELLI, I.M.B.S.; MAGALHÃES, C.P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. *Ciênc. Saúde Coletiva*, v.10, p. 91-100, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232005000500012>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

TACO. (Tabela brasileira de composição de alimentos). NEPA –UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPAUNICAMP, 2011. 161 p.

TADEO, J. L. (Ed.) *Analysis of pesticides in food and environmental samples*. Boca Raton: CRC Press. 2008. 282 p.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.*, v. 23, p. 535-552, 2004.

TEJON, J. L. Tempestade em copo de laranja. Associação Brasileira de Marketing Rural e Agronegócio. Publicado em 13 de jan. de 2012. Disponível em: <<http://abmra.org.br/abmrablog/?p=189>>. Acesso em: 30 de out. De 2012.

TEÓFILO, R. S.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 2, 338-350, 2006.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, p. 835-855, 2002.

TSENG, S.H.; LIN, Y.J.; LEE, H.F.; SUL, S.C.; CHOUL, S.S.; HWANG, D.F.A. Multiresidue method for determining 136 pesticides and metabolites in fruits and vegetables: application of macroporous diatomaceous earth column. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 15, n. 3, p. 316-324. 2007.

TUAN, S.J.; TSAI, H.M.; MEI HSU, S.; LI, H.P. Multiresidue analysis of 176 pesticides and metabolites in pre-harvested fruits and vegetables for ensuring food safety by gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 17, n. 3, p. 163-177. 2009.

USDA (United States Department of Agriculture). National Nutrient Database for Standard Reference. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2390?fg=&man=&facet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Abridged&new=>>>. Acesso EM: 10/03/2012.

VAN LOCO, J.; BEERNAERT, H. An alternative method validation strategy for the European Decision 2002/657/EC. In: Proceedings of European Food Chemistry, 12, 2003. *Proceedings...* Brugges: European Food Chemistry, 2003. p. 91-94.

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.

WEBBER, J.H. History and development of the Citrus industry. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEEBER, H.J. The citrus industry. 2 ed. Berkeley: University of California Press, 1967. Volume 1. Disponível em: 107

<<http://websites.lib.ucr.edu/agnic/webber/Vol1/Vol1TOC.html>>. Acesso em: 27 mar. 2012.

WHO (World Health Organization). Global Environment Monitoring System/Codex Alimentarius Commission. Guidelines for predicting dietary intake of pesticides residues. Geneva; 1997. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/pesticide_en.pdf>. Acesso em : 09 out. 2012.

WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends Anal. Chem.*, v. 18, p. 624-632, 1999.

RAPOSO FILHO, J.J.R. Suco de laranja tem efeito sinérgico à estatina e ao genfibrozila no tratamento da aterosclerose. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2010. 88p. (Tese, Doutorado em Ciência).

KALTSOUNOUDIS, C.K.; LAMARI, F.N.; PROUSALIS, K.P.; KARAMANOS, N.K.; TSEGENIDIS, T. Analysis of Carbendazim and Thiabendazole in Lemons by CE-DAD. *Chromatographia*, v. 57, p. 181-184, 2003.

GARRIDO, J.; ALBA, M.; JIMENEZ, I.; CASADO, E.; FOLGUEIRAS, M.L. Chromatographic analysis of imazil and carbendazim in fruits: Method validation and residue monitoring program 1995. *Journal of Chromatography*, v.765, p. 91-97, 1997.

BORAHONA, H.; GJELSTAD, A.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Hollow fiber-liquid-phase microextraction of fungicides from orange juices. *Journal of Chromatography A*, v.1217, p. 1989-1994, 2010.

THARSIS, N.; PORTILLO, J.L.; BROTO-PUIG, F.; COMELLAS, L. Simplified reversed-phase conditions for the determination of benzimidazole fungicides in fruits by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, v.78, p. 95-101, 1997.

BEDENDO, G.C.; JARDIM, I.C.S.F.; CARASEK, E. Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction and detection by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v.88, p. 573-580, 2012.

