

ALEXANDRE AUGUSTO SOARES

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS
ORGANOHALOGENADOS EM MORANGO POR
CROMATOGRÁFIA À GÁS: VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA E OCORRÊNCIA NO ESTADO
DE MINAS GERAIS**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2011

ALEXANDRE AUGUSTO SOARES

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS
ORGANOHALOGENADOS EM MORANGO POR
CROMATOGRÁFIA À GÁS: VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA E OCORRÊNCIA NO ESTADO
DE 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.

Orientador: Roberto Gonçalves Junqueira
Co-Orientador: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2011

S676r Soares, Alexandre Augusto
Resíduos de agrotóxicos organohalogenados em morango por cromatografia à gás: validação de metodologia e ocorrência no Estado de Minas Gerais/ Alexandre Augusto Soares. – 2011. 100 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira
Co-Orientador: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Cromatografia de gás – Teses. 2. Pesticidas - Resíduos em alimentos – Teses. 3. Análise cromatográfica – Teses. 4. Validação de método – Teses. 5. Morango – Cultivo – Teses I. Junqueira, Roberto Gonçalves. II. Souza, Scheilla Vitorino de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 544.92



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

ALEXANDRE AUGUSTO SOARES

**“RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOHALOGENADOS EM MORANGO
POR CROMATOGRÁFIA A GÁS: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E
OCORRÊNCIA NO ESTADO DE MINAS GERAIS”**

APROVADA EM 15 DE JULHO DE 2011

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. CHRISTIAN FERNANDES

Profa. Dra. VERA REGINA ROSSI LEMES

Profa. Dra. SILVANA DA MOTTA

Prof. Dr. ROBERTO GONÇALVES JUNQUEIRA
Orientador

Dedico este trabalho à minha
mãe que nunca poupou esforços
para a educação de seus filhos.

À Érika, pelo amor,
carinho e companheirismo.

Ao meu irmão Cláudio, ao meu
“primo irmão” Rodrigo e todos
meus amigos e familiares.

Agradecimentos

A Deus, por mais esta etapa vencida em minha vida.

ao Professor Doutor Roberto Gonçalves Junqueira, pela orientação deste trabalho, incentivo ao ingressar no programa, correções e sugestões. Muito obrigado;

à Professora Doutora Scheilla Vitorino Carvalho de Souza, pela co-orientação. Muito obrigado pelo incentivo, pelas correções, análises críticas e confiança no meu trabalho;

à Faculdade de Farmácia da UFMG, aos professores e funcionários do Departamento de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos;

ao Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA pela oportunidade de crescimento profissional;

à gerente da GRL, Ilka Maria Fernandes Fioravante Altoé, pela amizade, apoio e confiança em meu potencial;

à supervisora do Laboratório de Análise de Resíduos e Agrotóxicos, Eliane Hooper Amaral, por compartilhar sua experiência profissional, sugestões e pelo incentivo;

aos colegas Leandro Augusto Ferreira de Sousa, Isis Roseclaire de Carvalho, Regina Duque Estrada Carvalho, Dilma Borges Santos Alves e Marcelle Martins Silva do Laboratório de Análises de Resíduos e Agrotóxicos pelo apoio, sugestões e realização dos ensaios;

aos colegas do Laboratório de Química Agropecuária pelo apoio;

aos amigos e familiares;

à minha mãe, meu irmão e minha noiva sempre presentes;

e a todos que, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não diga que a vitória está perdida
se é de batalhas que se vive a vida.”

Raul Seixas

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 AGROTÓXICOS	18
2.1.1 Resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil e no mundo	22
2.1.2 Morangos	24
2.1.3 Agrotóxicos organohalogenados	25
2.1.3.1 Características e toxicidade dos agrotóxicos organohalogenados	26
2.2 TÉCNICAS DE ENSAIO	29
2.2.1 Métodos multirresíduos	30
2.2.2 Extração e purificação	31
2.2.3 Cromatografia	34
2.2.3.1 Cromatografia em fase gasosa (CG)	35
2.2.4 Métodos de confirmação	38
2.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	40
2.4 REVALIDAÇÃO	46
2.5 MATRIZES E ANALITOS REPRESENTATIVOS	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 EQUIPAMENTOS	48
3.2 PADRÕES E REAGENTES	48
3.3 SOLUÇÕES	49
3.3.1 Solução padrão estoque (SPE)	49
3.3.2 Solução padrão intermediária (SPI) de endossulfam alfa	49
3.3.3 SPI de endossulfam beta e trifluralina	49
3.3.4 SPI de endossulfam sulfato, lambdacialotrina e procimidona	50
3.3.5 Soluções da curva de calibração	50
3.3.6 Solução extratora	50
3.4 AMOSTRAS DE MORANGO	51
3.5 MÉTODO DE ENSAIO	52
3.5.1 Preparo da curva de calibração no extrato da matriz	53
3.5.2 Adição de padrão em amostras brancas para estudo de recuperação	54
3.5.3 Adição de padrão em amostras brancas para estudo do limite de detecção	54

3.6	VALIDAÇÃO	54
3.6.1	Seletividade	55
3.6.2	Linearidade	55
3.6.3	Efeito do dia	56
3.6.4	Efeito de matriz	56
3.6.5	Recuperação e precisão	57
3.6.6	Limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção	58
3.7	OCORRÊNCIA NO ESTADO DE MINAS GERAIS	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	ANALITOS E MATRIZES REPRESENTATIVOS	60
4.2	SELETIVIDADE	60
4.3	LINEARIDADE	64
4.4	EFEITO DO DIA	70
4.5	EFEITO DE MATRIZ	74
4.6	RECUPERAÇÃO E PRECISÃO	77
4.7	LIMITES DE DETECÇÃO, DE QUANTIFICAÇÃO, DE DECISÃO E CAPACIDADE DE DETECÇÃO	80
4.8	OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOHALOGENADOS EM MORANGO	82
5	CONCLUSÕES	85
6	SUGESTÕES	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE TABELAS

1	Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseada na Dose Letal e na Concentração Letal de formulações líquida e sólida, para diferentes vias de administração	19
2	Dados toxicológicos dos agrotóxicos organohalogenados utilizados no estudo de validação para a cultura de morango	27
3	Volume adicionado de solução intermediária 2 dos analitos nas amostras no estudo da recuperação	53
4	Níveis de concentração das curvas de calibração	54
5	Níveis de concentração das curvas de calibração correspondentes em mg kg^{-1} de alimento	55
6	Níveis de concentração de padrões em amostras brancas de morango	56
7	Características gerais dos agrotóxicos organohalogenados utilizados no estudo	59
8	Tempos de retenção e resolução dos picos dos analitos organohalogenados estudados utilizando coluna CP Sil 19 CB	60
9	Avaliação da linearidade para as três curvas de endossulfam alfa em solvente na faixa de 2,0 a 7,0 ng mL^{-1}	64
10	Avaliação da linearidade para as três curvas de endossulfam beta em solvente na faixa de 2,0 a 17,0 ng mL^{-1}	65
11	Avaliação da linearidade para as três curvas de endossulfam sulfato em solvente na faixa de 5,0 a 40,0 ng mL^{-1}	65
12	Avaliação da linearidade para as três curvas de lambda-cialotrina em solvente na faixa de 5,0 a 40,0 ng mL^{-1}	66
13	Avaliação da linearidade para as três curvas de procimidona em solvente na faixa de 5,0 a 40,0 ng mL^{-1}	66
14	Avaliação da linearidade para as três curvas de trifluralina em solvente na faixa de 2,0 a 17,0 ng mL^{-1}	67
15	Avaliação do efeito dia com três curvas de linearidade da solução padrão em solvente	70
16	Avaliação do efeito dia com três curvas de linearidade da solução padrão em extrato de matriz (morango)	70
17	Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz morango	73
18	Médias de recuperação, desvios padrão relativo, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de morango adicionadas de resíduos de organohalogenados em diferentes níveis de concentração	77
19	Limites de detecção dos organohalogenados estudados na matriz morango	79
20	Limites de quantificação dos organohalogenados estudados na matriz morango	80
21	Limite de decisão e capacidade de detecção para os analitos estudados na matriz morango	81

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química de agrotóxicos organohalogenados	25
2	Fluxograma do método de análise	52
3	Cromatograma do solvente hexano utilizado para retomar os extratos	61
4	Cromatograma de amostra branca de morango	61
5	Cromatograma da solução dos padrões em solvente hexano	62
6	Cromatograma da solução dos padrões em matriz	62
7	Cromatograma de recuperação em amostra branca de morango	63
8	Curvas de calibração obtidas nos ensaios de avaliação da linearidade, após a retirada dos outliers	68
9	Comparação das curvas de calibração das soluções padrões de agrotóxicos organohalogenados preparadas no solvente, obtidas em três dias	71
10	Comparação das curvas de calibração das soluções padrões de agrotóxicos organohalogenados preparadas no extrato da matriz, obtidas em três dias	72
11	Gráfico final das curvas de calibração preparadas em solvente e matriz	76
12	Porcentagem de amostras de morango com resíduos de agrotóxicos	82
13	Número de amostras de morango com resíduos de agrotóxicos	83

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemist</i>
BPA	Boas Práticas Agrícolas
CC α	Limite de decisão
CC β	Capacidade de detecção
CG	Cromatografia em fase gasosa
CL ₅₀	Concentração Letal ₅₀
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPG	Cromatografia de permeação em gel
DAD	Detector de arranjo de diodo
DCE	Detector de captura de elétrons
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DL ₅₀	Dose Letal ₅₀
DPR	Desvio padrão relativo
DPR _r	Desvio padrão relativo de repetitividade
DPR _R	Desvio padrão relativo de reprodutividade
EFS	Extração em fase sólida
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELL	Extração líquido-líquido
EM	Espectrômetro de massas
HCH	Hexaclorociclobenzeno
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kg	Quilograma
LARA	Laboratório de Análise de Resíduos e Agrotóxicos
LD	Limite de detecção
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LQ	Limite de quantificação

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEFS	Microextração em fase sólida
mg	Miligrama
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
MS	Ministério da Saúde
NOEL	<i>No observable effect level</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	para análise
PAR	para análise de resíduos
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PDP	<i>Pesticide Data Program</i>
PNCRC	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
RBC	Rede Brasileira de Calibração
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SPE	Solução padrão estoque
SPI	Solução padrão intermediária
Tr	tempo de retenção

RESUMO

Um método de cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons para determinação de multirresíduos de agrotóxicos organohalogenados em morango foi validado por procedimentos intralaboratoriais. Linearidade, efeitos de matriz e do dia foram verificados em experimentos com curvas de calibração dos analitos endossulfam alfa, endossulfam beta, endossulfam sulfato, lambda-cialotrina, procimidona e trifluralina, com e sem a matriz. Linearidade foi demonstrada, com efeitos de matriz significativos para alguns analitos, além do efeito do dia. A faixa linear variou de acordo com a resposta cromatográfica dos analitos. Seletividade, recuperação e precisão do método foram investigadas por adição de padrões dos analitos em amostras brancas. As porcentagens de recuperação variaram de 74,59 % a 115,41 %, com desvios padrão de repetitividade e reprodutibilidade parcial entre 1,63 % e 20,98 % e entre de 5,86 % e 20,98 %, respectivamente. Os limites de detecção, de quantificação, de decisão e a capacidade de detecção do método variaram entre $0,003 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,007 \text{ mg kg}^{-1}$; $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,013 \text{ mg kg}^{-1}$; $0,003 \text{ mg kg}^{-1}$ e $3,128 \text{ mg kg}^{-1}$; e $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ e $3,266 \text{ g kg}^{-1}$, respectivamente. Os parâmetros de desempenho estudados indicaram adequação do método validado para o propósito de monitoramento de resíduos de agrotóxicos organohalogenados em morango. Resíduos de agrotóxicos organohalogenados foram detectados em 47 das 75 amostras de morango analisadas no estudo de ocorrência realizado em 2010, no estado de Minas Gerais. Sendo que três estavam em desacordo com a legislação vigente, uma por apresentar resíduo de agrotóxico acima do limite máximo permitido e duas por conterem resíduos não autorizados para a cultura.

Palavras-chave: cromatografia em fase gasosa; detector de captura de elétrons; método multirresíduos; agrotóxicos organohalogenados; validação de métodos; morangos, ocorrência.

ABSTRACT

A method of gas chromatography with electron capture detection for multiresidue determination of organohalogen pesticides in strawberry was validated by in-house procedures. Linearity, matrix and day effects were observed in experiments with calibration curves of analytes alpha endosulfan, beta endosulfan, sulfate endosulfan, lambda-cyhalothrin, procymidone and trifluralin with and without the matrix. Linearity was demonstrated with significant matrix effects for some analytes, and day effect. The range varied depending on the chromatographic response of the analyte. Selectivity, recovery and precision of the method were investigated by adding standards references in blank samples. Recovery percentages ranged from 74.59 % to 115.41 % with standard deviations of repeatability between 1.63 % and 20.98 % and partial reproducibility between 5.86 % and 20.98 %. Detection limit, quantification limit, decision limit and detection capacity ranged from 0.003 mg kg⁻¹ to 0.007 mg kg⁻¹; 0.005 mg kg⁻¹ to 0.013 mg kg⁻¹; 0.003 mg kg⁻¹ to 3.128 mg kg⁻¹; and 0.005 mg kg⁻¹ to 3.266 mg kg⁻¹, respectively. The performance parameters studied indicated that the validated method is suitable for the purpose of monitoring organohalogen pesticide residues in strawberry. Organohalogen residues of pesticides were detected in 47 samples of strawberry. 75 samples were analyzed in the study conducted in 2010 in the state of Minas Gerais. Three of which did not comply with the current legislation, one presented pesticide residue above the maximum allowed and two contained unauthorized pesticide for the culture.

Key words: gas chromatography; electron capture detector; multiresidue method, organohalogen pesticides; validation methods; strawberries; occurrence.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e a demanda crescente de alimentos têm motivado o uso de grandes quantidades de agrotóxicos nas plantações, para prevenir ou combater pragas, visando assegurar maior produtividade (CALDAS & SOUZA, 2000). Diversas classes químicas de agrotóxicos são utilizadas buscando melhorar a qualidade da produção agrícola que é intensamente afetada pelo aparecimento de formas de vida indesejáveis, tais como insetos e ervas daninhas (SANCHES et al., 2003; COUTINHO et al., 2005).

As funções básicas dos agrotóxicos na agricultura incluem a elevação da produção com aumento da produtividade, a melhoria da qualidade dos produtos, além da redução do trabalho e dos gastos com energia. Sem dúvida, esses objetivos foram alcançados nas últimas décadas. No entanto, o uso indiscriminado e pouco criterioso de agrotóxicos trouxe e continua trazendo problemas muitos sérios para o ambiente e para a saúde humana (KRISTENSON et al., 2001; COUTINHO et al., 2005; JARDIM et al., 2009; PINHO et al., 2009).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o uso de agrotóxicos na produção agrícola e a conseqüente contaminação dos alimentos têm sido alvo de constante preocupação no âmbito da saúde pública, especialmente diante de um consumidor cada vez mais exigente quanto à presença de resíduos nos alimentos, gerando a necessidade de realização da avaliação toxicológica e do estabelecimento de parâmetros de segurança relativos à sua utilização. Sabe-se, contudo, que os agrotóxicos são muito utilizados na produção em larga escala, já que o processo orgânico, sem defensivos, continua caro e limitado, sendo praticamente impossível atender ao nível e volume de alimentos produzidos no país sem agrotóxicos (ANVISA, 2008).

Devido aos efeitos toxicológicos provocados pelos agrotóxicos, faz-se necessário o acompanhamento e a quantificação desses produtos na água (VIEIRA et al., 2007), no solo, nos alimentos (ALMEIDA et al., 2009; AMARAL, 2007; GORENSTEIN, 2008; JARDIM et al., 2009; BERRADA et al., 2010) e na atmosfera, como pressuposto para a rastreabilidade e proteção da saúde do homem e do meio ambiente. Resíduos desses compostos têm sido encontrados em alimentos, muitas vezes consumidos *in natura* pela população (USDA, 2009; SSEBUGERE et al., 2010).

No Brasil, existe o Programa de Análise de Agrotóxico em Alimentos (PARA) da ANVISA, que tem como objetivos avaliar, continuamente, os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor, fortalecendo a capacidade do governo em atender a segurança alimentar, evitando assim, possíveis agravos à saúde da população (ANVISA, 2010). Existe ainda o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que tem a finalidade de sistematizar os meios de controle da contaminação dos produtos de origem animal e vegetal por resíduos de compostos utilizados na agropecuária, incluindo os agrotóxicos (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2010b). No estado de Minas Gerais, esse controle em frutas, legumes e verduras é realizado no âmbito do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). O Laboratório de Análises de Resíduos e Agrotóxicos (LARA) é o responsável pelas análises de monitoramento, fiscalização e projetos.

Como os organohalogenados correspondem a um dos mais importantes grupos de inseticidas utilizados no Brasil, a análise de resíduos desses agrotóxicos em alimentos é de grande importância. Das 128 amostras de morango analisadas pelo PARA no ano de 2009, 65 % apresentaram resíduos de procimidona, um organohalogenado (ANVISA, 2010).

Métodos analíticos para a determinação de resíduos de agrotóxicos organohalogenados são baseados no uso de técnicas cromatográficas, principalmente cromatografia em fase gasosa (CG). Apesar de existirem vários sistemas de detecção, a presença de um ou mais halogênios na molécula faz com que o detector por captura de elétrons (DCE) seja o mais adequado nas análises quantitativas (CHEN & WANG, 1996; COLUMÉ et al., 2001; RIZOS et al., 2001; VIEIRA et al., 2007; ZAWIYAH et al., 2007; JARDIM et al., 2009; MENEZES et al., 2010).

A necessidade progressiva de dados analíticos comparáveis e confiáveis é essencial para a eliminação de barreiras técnicas entre os países. Uma vez efetuada a medição, para que ela seja aceita em qualquer país, requisitos legais e de acreditação devem ser observados. As normas nacionais e internacionais de sistemas de gestão da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao propósito de uso (ABNT, 2005). Assim, a validação de métodos é um requisito fundamental da gestão da qualidade analítica (THOMPSON et al., 2002), que assegura que um método analítico fornece resultados confiáveis, subsidiando corretamente às interpretações e tomadas de decisões (RIBANI et al., 2004).

Neste contexto, são objetivos deste trabalho a validação intralaboratorial de um método de análise de resíduos de agrotóxicos organohalogenados em morango por CG-DCE, em acordo com os requisitos normalizados pela ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005) e definidos na legislação vigente (ANVISA, 2011), e o emprego do método validado em estudos de ocorrência e atividades de monitoramento do IMA no estado de Minas Gerais, verificando se os níveis de resíduos de agrotóxicos organohalogenados estão dentro dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) e se são autorizados para a cultura analisada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGROTÓXICOS

O uso de substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas com o propósito de proteger as culturas agrícolas data de tempos antigos. O uso mais antigo de agrotóxicos que se tem registro, cerca do ano 1200 antes de Cristo, envolveu a utilização de sal e de cinzas em campos conquistados por exércitos bíblicos, para tornar as terras improdutivas. Sendo, provavelmente, o primeiro emprego de herbicidas não seletivos (JARDIM et al., 2009). Nos primórdios da agricultura, romanos e gregos descrevem o uso de produtos como o arsênio e o enxofre para o controle de pragas. A partir do século XVI até fins do século XIX, substâncias orgânicas, como a nicotina e os piretros, extraídas de plantas, eram constantemente utilizadas na Europa e nos Estados Unidos. No início do século XX, foram iniciados estudos buscando o emprego de substâncias inorgânicas à base de cobre, chumbo, mercúrio e cádmio contra uma grande variedade de pragas, porém com eficácia limitada (HIRATA, 1995; NUNES & RIBEIRO, 1999; SANCHES et al., 2003).

A primeira substância orgânica com propriedades inseticidas foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT), sintetizada em 1874 por Othomar Zeidler. Porém, essa propriedade só foi descoberta em 1939 por Paul Muller. Pela descoberta e posterior aplicação do DDT no combate a insetos, Muller recebeu o prêmio Nobel de química em 1948. Teve início a geração dos agrotóxicos constituídos de compostos organossintéticos, começando com a utilização de organoclorados no controle das pragas, muitos dos quais tinham propriedades em comum, como estabilidade com relação à decomposição ou à degradação ambiental, solubilidade baixa em água, alta solubilidade em meios semelhantes aos hidrocarbonetos como os tecidos gordurosos de organismos vivos e toxicidade relativamente alta para insetos e seres humanos (NUNES & RIBEIRO, 1999; SANCHES et al., 2003; JARDIM et al., 2009).

O DDT era então o principal meio de controle do inseto propagador da malária, até que se descobriu ser ele carcinogênico, teratogênico e cumulativo nos organismos. Para substituir os organoclorados, em razão das suas características indesejáveis, surgiram os organofosforados e, posteriormente, os piretróides (NUNES & RIBEIRO, 1999; JARDIM et al., 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que os programas de redução da malária, nos quais um dos componentes utilizados foi o DDT, salvaram a vida de mais de cinco milhões de pessoas. Atualmente, o DDT é proibido em pelo menos 86 países. No entanto, ainda continua sendo usado em alguns países em desenvolvimento, no combate à malária e outras doenças tropicais. No Brasil, a introdução de agrotóxicos organossintéticos teve o início em 1943, quando chegaram as primeiras amostras do inseticida DDT. Em 1985, o MAPA publicou a Portaria nº 329 que proibiu, em todo território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados, destinados à agropecuária. Em 2009, o governo federal sancionou a Lei nº 11.936 que proíbe a fabricação, a importação, a exportação, a manutenção em estoque, a comercialização e o uso de DDT no Brasil (BRASIL, 1985; BRASIL, 2009; JARDIM et al., 2009).

Segundo a Lei de Agrotóxicos e Afins nº 7.802, de 11 de julho de 1989, entendem-se por agrotóxicos: “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento das plantas” (BRASIL, 1989). De modo similar, a Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana define o termo agrotóxico como sendo uma substância química ou mistura de substâncias utilizadas para prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga, ou mesmo, para regular, desfolhar e dessecar plantas (EPA, 2007).

Entre as diversas formas de se classificar os agrotóxicos, uma é baseada no tipo de praga a que se destinam, como os herbicidas, fungicidas, acaricidas, algicidas, larvicidas e inseticidas. Nessa classificação podem ser incluídas substâncias desfolhantes, dessecantes ou reguladoras do crescimento de insetos e plantas. Cada grupo de compostos inclui diferentes famílias químicas e mecanismos de ação (KOMATSU & VAZ, 2004).

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2002), a classificação dos agrotóxicos é realizada com base no grau de toxicidade do produto sendo estabelecidas quatro classes: classe I - Extremamente Tóxico (rótulo vermelho); classe II - Altamente Tóxico (rótulo amarelo); classe III - Medianamente Tóxico (rótulo azul) e classe IV - Pouco Tóxico (rótulo verde).

A classificação toxicológica dos agrotóxicos está apresentada na Tabela 1, tendo como parâmetros a Dose Letal (DL₅₀) e a Concentração Letal (CL₅₀). A DL₅₀ é a dose de uma substância química que, quando administrada por via oral ou dérmica em única dose, provoca a morte de, pelo menos, 50 % de um grupo de animais da mesma espécie. A DL₅₀ é representada pela relação mássica, ou seja, a massa em miligrama (mg) do produto tóxico pela massa viva em quilograma (kg). A CL₅₀ é a concentração atmosférica de uma substância química que provoca a morte de 50 % de um grupo de animais expostos, em um tempo definido.

Tabela 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseada na Dose Letal e na Concentração Letal de formulações líquida e sólida, para diferentes vias de administração

Classe	Toxicidade	DL ₅₀ ¹ oral (mg kg ⁻¹)		DL ₅₀ dérmica (mg kg ⁻¹)		CL ₅₀ ² inalatória (mg L ⁻¹) ³
		Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	
I	Extrema	≤ 20	≤ 5	≤ 40	≤ 10	≤ 0,2
II	Alta	20-200	5-50	40-400	10-100	0,2-2
III	Média	200-2000	50-500	400-4000	100-1000	2-20
IV	Pouca	> 2000	> 500	> 4000	> 1000	> 20

¹: Dose Letal; ²: Concentração Letal; ³: expressa em mg L⁻¹ de ar por 1 hora de exposição.
Fonte: BRASIL, 1989.

No Brasil, os agrotóxicos somente podem ser utilizados se forem registrados em órgão federal competente, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura (ANVISA, 2009a).

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

ambiental (ANVISA, 2009a). O principal objetivo é garantir, com certa segurança, que a população possa consumir alimentos cujos níveis de resíduos, dentro destes limites estabelecidos, não causem problemas à saúde.

Entende-se por LMR, a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico legalmente aceita nos alimentos, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes do agrotóxico por um milhão de partes de alimento (mg kg^{-1}) e que pode ser consumido sem prejuízo à saúde, ao longo da vida. Os limites máximos de resíduos referem-se a valores provenientes de experimentos de campo, exigidos para cada cultura alimentar e levam em consideração a ingestão diária aceitável (IDA), ou seja, as quantidades máximas de agrotóxicos que podem ser ingeridas por dia, durante toda a vida, sem que ocorram danos à saúde por esta ingestão, expressa em mg de agrotóxico por kg de peso corpóreo (mg kg^{-1} p.c.) (ANVISA, 2009a).

Os valores de LMR são fixados, para cada ingrediente ativo, no nível mais baixo consistente com as boas práticas agrícolas (BPA), a fim de proteger grupos vulneráveis, como as crianças e os nascituros. Deve-se, ainda, levar em conta a exposição humana a combinações de substâncias ativas e aos seus efeitos cumulativos possivelmente agregados e sinérgicos para a nossa saúde (EUROPEAN COMMISSION, 2005).

Os limites de resíduos estabelecidos pela OMS vêm se tornando cada vez mais rigorosos, o que vem criando um aumento de demanda por métodos mais seletivos e sensíveis (BERRADA et al., 2010). A aceitação do LMR vem causando problemas, pois os limites aceitos em um país não são em outros. Em 1990, a União Européia estabeleceu limites máximos de agrotóxicos para produtos agrícolas a fim de se evitar diversidade de LMR entre os países membros (TORRES et al., 1996). No entanto, o regulamento EC/396/2005, que entrou em vigor em 01 de setembro de 2008, define um novo conjunto de regras para resíduos de agrotóxicos. Este regulamento simplifica a legislação em vigor, estipulando o LMR em território europeu (EUROPEAN COMMISSION, 2005; CIESLIK et al., 2010; GARCÍA-CHAO, et al., 2010).

Outro parâmetro toxicológico de importância é o NOAEL, *no observable effect level*, ou em português nível de efeito não observável. Sendo a concentração ou quantidade de uma substância, que não causa alterações na morfologia, capacidade funcional, crescimento, desenvolvimento, ou tempo de vida do organismo alvo em relação aquelas observadas em indivíduos normais (controle) da mesma espécie sob as mesmas condições de exposição (IUPAC, 1997).

2.1.1 Resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil e no mundo

A preocupação com a presença de agrotóxicos nos alimentos é tão antiga quanto a utilização destes compostos no controle de pragas e doenças que interferem na produção agrícola. Somente em anos mais recentes, o avanço do conhecimento científico, aliado ao desenvolvimento tecnológico na área laboratorial, vem permitindo, no âmbito das diferentes esferas de governo, a estruturação de serviços para a verificação da qualidade do alimento em relação à presença de agrotóxicos (ANVISA, 2008).

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, gerando em 2009 uma receita de US\$ 7 bilhões e um consumo de 700 mil toneladas no país (ANVISA, 2009b). As vendas de defensivos agrícolas no país somaram R\$ 12,878 bilhões em 2009, 1,09 % a mais do que os R\$ 12,739 bilhões de 2008, de acordo com estimativa do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG). Segundo este órgão, em 2009, as vendas de herbicidas somaram R\$ 5,031 bilhões, 8,24 % a menos do que no ano anterior. Já as vendas de fungicidas subiram 16,87 % no mesmo período (SINDAG, 2010).

Em 2001, a ANVISA instituiu o Programa de Análise de Agrotóxico em Alimentos (PARA). O PARA é o programa brasileiro para monitorar resíduos de agrotóxicos em alimentos, visando à criação de ações de vigilância sanitária, com foco na prevenção e controle dos riscos à saúde humana decorrentes do consumo de alimentos contaminados. Os dados obtidos têm possibilitado avaliar a qualidade e a segurança dos alimentos consumidos pela população, caracterizar as fontes de contaminação, proporcionar uma avaliação quanto ao uso inadequado e não autorizado de agrotóxicos, estimular a adoção de BPA, além de fornecer subsídios para a reavaliação dos estudos de resíduos para fins de registro de agrotóxicos (ANVISA, 2010).

O histórico das irregularidades encontradas permite concluir que o maior problema no tocante aos níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos analisados, não está na forma de aplicação do produto na cultura além dos limites permitidos, mas sim no uso indiscriminado de agrotóxicos não autorizados para as culturas. No ano de 2009 foram analisadas 3130 amostras, sendo que 29,0 % foram consideradas insatisfatórias, correspondendo a 907 amostras. Dentre as insatisfatórias 2,8 % (88 amostras) apresentavam níveis acima do LMR, 23,8 % (744 amostras) do total continham ingredientes ativos não autorizados para a cultura e ainda houve 75

amostras representando 2,4 % que apresentaram resíduos não autorizados e acima do LMR (ANVISA, 2010).

No estado de Minas Gerais o IMA tem como missão exercer a defesa sanitária animal e vegetal, a inspeção e fiscalização de produtos contribuindo para a preservação da saúde pública e do meio ambiente. Uma das suas competências é a fiscalização do comércio e o uso de insumos, produtos e subprodutos agropecuários e agroindustriais, estabelecendo normas e procedimentos para proporcionar aos consumidores a oferta de alimentos seguros. Entre 2008 e 2009 foram analisadas 524 amostras. Sendo que 56 % das amostras continham um ou mais resíduos de agrotóxicos. Algumas amostras continham até sete ingredientes ativos. Das 175 amostras analisadas em 2008, 35 (20 %) apresentaram resultados insatisfatórios, sendo 17,7 % devido ao uso de princípio ativo não autorizado para a cultura e 2,3 % por níveis acima do LMR (AMARAL et al., 2009). Dentre as 349 amostras de 2009, 53 (15,2 %) apresentaram resultados insatisfatórios, sendo 12,6 % devido ao uso não autorizado e 2,6 % por apresentar resíduos em níveis acima do LMR (AMARAL et al., 2010).

Diversos países como Estados Unidos, Holanda, Suécia e Inglaterra têm estabelecido programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos com análises contínuas e programadas. Pode-se afirmar que, atualmente, é frequente a identificação de resíduos de agrotóxicos nos alimentos e, em muitos casos, se detectam concentrações acima do LMR permitido, além daqueles não autorizados (ANVISA, 2010).

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos implementou, em 1991, o *Pesticide Data Program* (PDP). No ano de 2008, o PDP analisou 13381 amostras nos 12 estados participantes. Das 13381 amostras coletadas 10382 eram de frutas e vegetais frescos ou processados. Entre todas as amostras testadas, excluindo a água de beber, 30 % não continham nenhum agrotóxico detectável, 24 % continham um agrotóxico e 46 % mais de um. Resíduos que excederam a tolerância foram detectados em 0,5 % das amostras testadas em 2008, sendo que 58 amostras continham um resíduo acima do LMR e duas amostras continham dois resíduos acima do LMR. Por outro lado, resíduos de agrotóxicos não autorizados para as culturas foram encontradas em 3,7 % das amostras o que correspondeu a 442 amostras (USDA, 2009).

O *European Food Safety Authority* (EFSA) é o órgão que normaliza as questões de risco de alimentos e rações no âmbito da União Européia e que publica os relatórios de avaliações de riscos e monitoramentos realizados pelos programas nacionais dos

países membros e programas coordenados pela União. No ano de 2008, mais de 70 mil amostras de cerca de 200 diferentes tipos de alimentos foram analisados pelos programas nacionais. Entre as amostras testadas 96,5 % estavam de acordo com a legislação. Pelo programa coordenado pela União foram realizadas 11610 amostras de nove diferentes produtos para 78 ingredientes ativos, sendo que 2,2 % das amostras excederam o LMR, 62,1 % das amostras não foram detectados resíduos e em 35,7 % das amostras foram detectados um ou mais resíduos com nível mensurável de quantificação, mas menor do que o LMR. Não foram relatadas amostras com uso de produtos não autorizados (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2010).

2.1.2 Morangos

Morangos são frutos muito populares e amplamente consumidos *in natura* ou processados, como conservas, compotas, iogurtes e sorvetes. O morango é um fruto de baixa caloria, rico em pectina e outras fibras solúveis que auxiliam na redução do colesterol. Contém bioflavonóides, substâncias que ajudam a prevenir alguns tipos de câncer, vitamina C e são uma boa fonte de folato, potássio, riboflavina e ferro (SEERAM et al., 2006). Possui como clima ideal o temperado podendo ser cultivada também como planta perene, porém, com drástica redução de produtividade de um ciclo para o outro em função da suscetibilidade a doenças fúngicas, bacterianas, viróticas e infestações por nematoides. Cultivado no sistema convencional, o morangueiro pode receber em média 45 pulverizações de pesticidas, motivo pelo qual se encontra na lista negra dos alimentos campeões de resíduos químicos (RHODEN, 2005).

Na unidade Grande BH da CEASAMINAS, no ano de 2009, foram comercializadas 4.793,3 toneladas de morango (CEASAMINAS, 2010). Minas Gerais é o maior produtor de morango do país, alcançando 40 mil toneladas, 55 % das 72 mil toneladas produzidas no ano (SEBRAE, 2010).

FARIA et al. (2009) analisaram 55 amostras de polpa de morango industrializadas, das quais 95 % continham resíduos de agrotóxicos. Entre as contaminadas 49 % apresentaram produtos não autorizados como a captana, clorfenapir, folpete e o endossulfam, todos organohalogenados. Das 128 amostras de morango analisadas pelo PARA no ano de 2009, 50,8 % foram insatisfatórias. Sendo 38,3 % por apresentarem resíduos não autorizados para a cultura, 8,6 % por

apresentarem resíduos acima do LMR e 3,9 % por apresentarem as duas irregularidades (ANVISA, 2010).

2.1.3 Agrotóxicos organohalogenados

Resíduos de agrotóxicos organohalogenados são frequentemente encontrados em programas de monitoramento nos mais variados tipos de culturas para a produção, conservação e armazenamento de alimentos, alguns com o LMR acima dos padrões estabelecidos e, muitas vezes, até com mais de um tipo de resíduo em um único alimento (IMOTO, 2004; ANVISA 2010).

Além disso, os resultados dos programas de monitoramento conduzidos no âmbito nacional revelaram a presença de resíduos de ativos que já foram completamente banidos para uso devido à sua alta toxicidade, como é o caso do endossulfam, frequentemente encontrado em morangos (ANVISA, 2009a). O endossulfam é considerado uma substância do grupo químico dos organoclorados, subgrupo dos ciclodienoclorados, cujo uso foi proibido ou restrito no mundo (ANVISA, 2009c). Esse pesticida e outros selecionados para este estudo pertencem ao grupo dos organohalogenados e as suas estruturas e nomes químicos são mostrados na Figura 1.

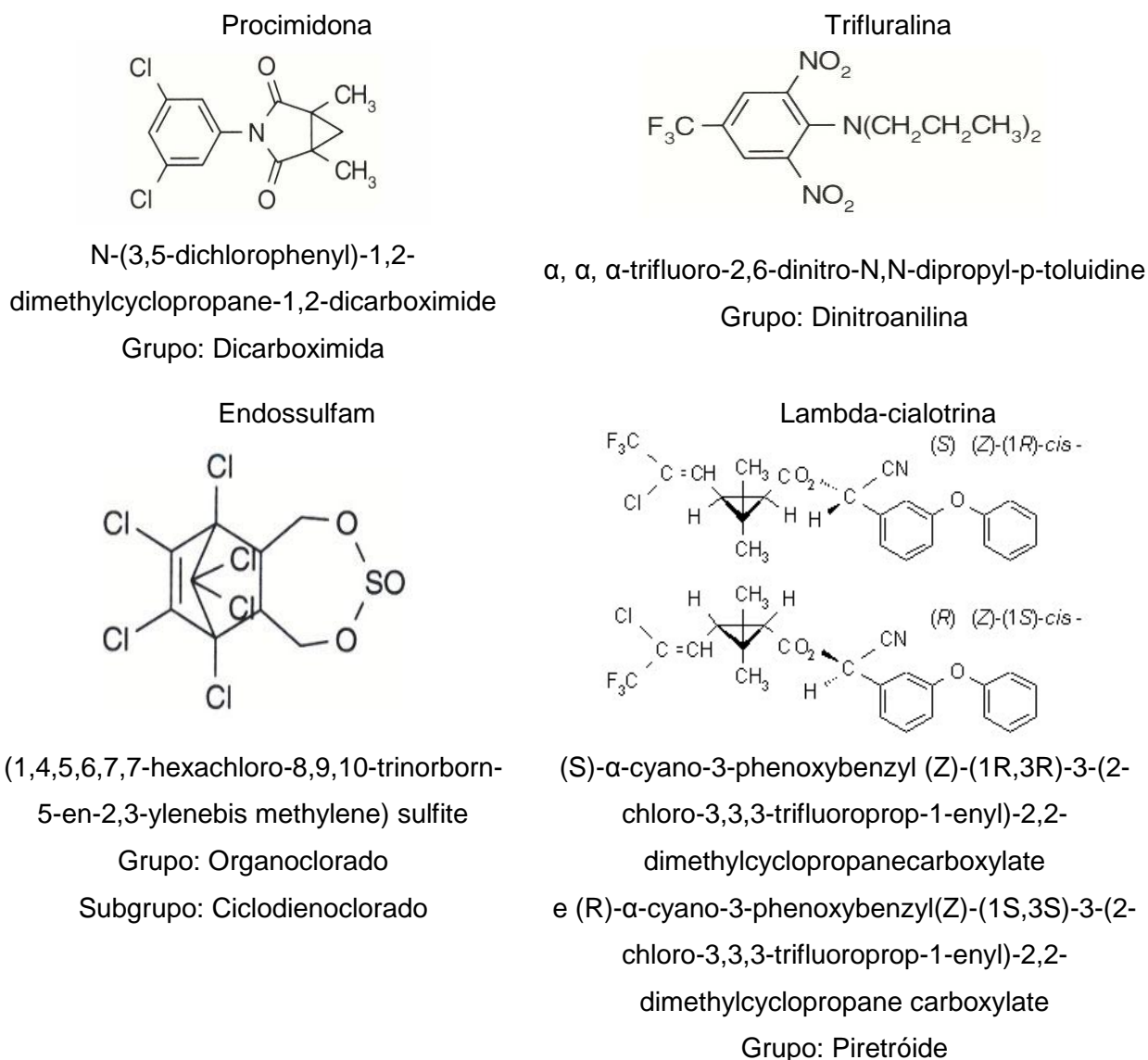


Figura 1 - Estrutura química de agrotóxicos organohalogenados.

Fonte: ANVISA, 2011.

2.1.3.1 Características e toxicidade dos agrotóxicos organohalogenados

Os agrotóxicos organoclorados, piretróides, dinitroanilinas e dicarboximidas possuem um ou mais halogênios em suas moléculas pertencendo ao grupo químico dos organohalogenados.

Os agrotóxicos organoclorados e o seu subgrupo ciclodienoclorados são relativamente inertes e apresentam alta estabilidade, que está relacionada às ligações carbono-cloro. Esses compostos são muito estudados devido à alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e biossolubilidade em tecido lipídico. Algumas dessas substâncias podem persistir por 15 a 20 anos no solo e parte delas pode ser arrastada pelas chuvas, por lixiviação, para o interior dos cursos de água, que também recebem

agrotóxicos oriundos de efluentes industriais, de esgotos, de sedimentos, da atmosfera e por contaminação direta durante a aplicação (QUINETE, 2005; JARDIM et al., 2009).

As propriedades tóxicas dos agrotóxicos organoclorados não são semelhantes. O termo geral “agrotóxicos organoclorados” refere-se a muitas substâncias orgânicas halogenadas que são usadas na atualidade e que eram empregadas no passado, em formulações de agrotóxicos. Tais substâncias podem ter estruturas químicas muito variadas e, conseqüentemente, suas propriedades físicas e toxicológicas, também diferem amplamente. Entre os sintomas tóxicos agudos causados por agrotóxicos clorados estão dor de cabeça, tonteira, perda de coordenação motora, náusea, vômito, tremores e convulsões. Muitos agrotóxicos clorados apresentaram atividades teratogênicas em estudos com animais. Há também evidências limitadas de efeitos causadores de câncer em seres humanos. Por causa da alta toxicidade e potencial carcinogênico, muitos destes compostos são de uso restrito na agricultura (PATNAIK, 2003).

Piretróides são inseticidas lipofílicos, que têm meia-vida curta no ambiente e possuem ação prolongada (HIRATA, 1995). Economicamente, os piretróides se constituíram no inseticida ideal em função do amplo espectro de atividade, eficiência em doses baixas, praticamente não tóxico para mamíferos e baixo poder residual (HIRATA, 1995; VIEIRA et al., 2007). Muitos organismos aquáticos são altamente susceptíveis à intoxicação por piretróides. Estes compostos são, ainda, altamente tóxicos para as abelhas (HENGEL et al., 1997; OUDOU & HANSEN, 2002).

Estudos detalhados do metabolismo e da toxicologia dos piretróides avaliaram o risco da exposição humana a estes compostos. Tais efeitos incluem a síndrome T, causada por piretróides do tipo I, que não contêm o grupo α -ciano, que é caracterizada por tremores, hipersensibilidade, hiperexcitabilidade, câibras musculares e convulsões; e a síndrome CS, causada por piretróides do tipo II, com o grupo α -ciano, cujas características são salivação excessiva, lacrimejamento, distúrbios sensoriais cutâneos (formigamento, entorpecimento e sensação de queimação), hipersecreção nasal, hipersensibilidade, irritação cutânea (eritema papilar), cefaléia intensa, perda do apetite, fadiga, tonturas, perda da consciência, câibras musculares e convulsões (MIYAMOTO et al., 1995; RAY & FORSHAW, 2000; WHO, 2005). Os canais de sódio voltagem-sensíveis dos neurônios do sistema nervoso central parecem ser o sítio primário da ação dos piretróides (NARAHASHI, 1996).

Vários efeitos endócrinos dos piretróides já foram relatados, tais como atividades estrogênica, antiestrogênica, antiandrogênica e antiprogestagênicas (NAKAMURA et

al., 2007). Sintomas reversíveis, como dor de cabeça, vertigem, náuseas, irritação de pele e nariz, e parestesia também foram observados após exposição aos piretróides (HE et al., 1989).

As dinitroanilinas sofrem fotodecomposição, a qual ocorre predominantemente no estado de vapor. Assim, compostos mais voláteis são mais fotodegradáveis. Para evitar a volatilização, esses herbicidas são aplicados por incorporação ao solo. A contaminação da água subterrânea, portanto, pode ser causada por drenagem. A intoxicação por dinitroanilinas ocorre pelo ar e pela ingestão de alimentos contaminados ou simplesmente pelo contato direto com a pele. Levemente tóxico, a inalação de vapores ou de particulados desse grupo de pesticida pode ser moderadamente irritante para as mucosas da boca, do nariz, da garganta e dos pulmões (WANG & ARNOLD, 2003; COUTINHO et al., 2005).

As dicarboximidas são substâncias utilizadas para controlar o desenvolvimento de fungos patogênicos. Com relação à toxicidade, os fungicidas apresentam baixo risco de intoxicações para diferentes tipos de exposição humana. A grande maioria tem apresentado resultados positivos para testes de mutagenicidade *in vitro*. A procimidona é um fungicida dicarboximida que pode alterar a diferenciação sexual de ratos machos imaturos *in vitro*, agindo como um antagonista do receptor de androgênio e induzindo a atividade estrogênica. Uma vez encontrado em tecidos humanos foi despertado o interesse para a investigação da sua capacidade de induzir danos endócrinos (RADICE et al., 2006; QI, 2010).

Alguns parâmetros toxicológicos dos analitos utilizados na realização deste trabalho estão apresentados na Tabela 2:

Tabela 2 – Dados toxicológicos dos agrotóxicos organohalogenados utilizados no estudo de validação para a cultura de morango.

Agrotóxicos	LMR ¹ (mg kg ⁻¹) para morango	IDA ¹ (mg kg ⁻¹ p.c.)	NOAEL ² (mg kg ⁻¹ dia.)
Lambda-cialotrina	0,5	0,05	5
Endossulfam	NA	0,006	0,6
Procimidona	3,0	0,1	10
Trifluralina	NA	0,024	2,4

¹: FONTE: ANVISA (2011); ²: GORENSTEIN, 2009
NA: produto não autorizado.

2.2 TÉCNICAS DE ENSAIO

Há uma diversa literatura sobre extração, partição, purificação, separação e quantificação de resíduos de agrotóxicos organohalogenados em alimentos. Métodos que usam grandes volumes de solventes e outros mais atuais que utilizam apenas alguns mililitros, como os de extração em fase sólida que reduzem trabalhos manuais e melhoram o rendimento, são encontrados. A CG é a principal técnica de determinação, em combinação com detectores específicos e seletivos. Atualmente, ações governamentais e também do setor privado vêm exercendo forte pressão para o aperfeiçoamento do desempenho analítico, exigindo aumento da eficiência e diminuição do custo e do tempo das análises, levando ao desenvolvimento e implantação de métodos QuEChERS (*Quick* - rápido, *Easy* - fácil, *Cheap* - barato, *Effective* - eficiente, *Rugged* - robusto and *Safe* - seguro) (TORRES et al., 1996; COLUMÉ et al., 2001; LENTZA-RIZOS et al., 2001; IMOTO et al., 2004; MENEZES et al., 2010; PINHO et al., 2010).

Os métodos analíticos usados para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos estão divididos em dois grupos: os métodos singulares e os métodos multirresíduos. Os primeiros são aplicados para análise de um único pesticida ou de seu metabólito mais importante em uma ou várias matrizes, e os métodos multirresíduos, como o próprio nome indica, são aplicados para análise de vários agrotóxicos de um mesmo grupo químico ou de diferentes funções químicas em uma ou várias matrizes (IMOTO, 2004).

O uso de métodos multirresíduos em programas de monitoramento de alimentos é muito frequente, pelo fato de possibilitar que vários agrotóxicos de diferentes grupos químicos sejam pesquisados em uma única extração em diversos tipos de matrizes. Os métodos multirresíduos, além de serem eficientes, apresentam um menor custo e redução do tempo de trabalho, quando comparados com os métodos singulares (JANSSON et al, 2004; BERRADA et al., 2010). Trata-se do grupo de métodos mais difundido e reconhecido para monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, sendo adotado em programas de diversos países (ANVISA, 2009a).

2.2.1 Métodos multirresíduos

A maioria dos protocolos relacionados com a determinação de agrotóxicos em alimentos envolve etapas de extração, purificação, concentração do extrato e determinação utilizando a cromatografia (KRISTENSON et al., 2001; NORMA & PANTON, 2001; BERRADA et al., 2010; CIESLIK et al., 2010). Uma dificuldade no desenvolvimento de métodos multirresíduos é o fato de ingredientes ativos de diferentes polaridades, solubilidades, volatilidades e valores de pK_a terem que ser simultaneamente extraídos de uma matriz e analisados (HAIB et al., 2003; STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003).

As diferentes classes químicas dos agrotóxicos, bem como os diferentes tipos de alimentos contaminados, determinam diferentes estratégias de ensaio. Assim, os agrotóxicos são determinados por CG e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando várias combinações de colunas e detectores, com o objetivo de alcançar a necessária seletividade e sensibilidade para as diferentes classes (TORRES et al., 1996; STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003).

Métodos analíticos são necessários para classificar, quantificar e confirmar a identidade de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais para fins de pesquisa e de regulamentação. O método da *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC) tem o reconhecimento internacional como método multirresíduo, permitindo a determinação de dezenas de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais. O método envolve uma extração com um solvente miscível em água, seguida de partição utilizando-se um solvente pouco solúvel em água para remover as interferências presentes no extrato da amostra e ou purificação em fase sólida com sílica ou florisil. Finalmente, o analito é determinado por CG ou por CLAE com detectores seletivos. Seu uso apresenta desvantagens como: por ser muito complexo, não permite geração de resultado em tempo hábil para evitar a entrada de produtos contaminados no mercado; o uso de solventes tóxicos em larga escala; a formação de emulsões na etapa de partição; o número de operações manuais que afetam o rendimento da determinação de resíduos; além de novos agrotóxicos, cada vez mais polares e termosensíveis, que devem ser incorporados no escopo de aplicação do método (TORRES et al., 1996; MUCCIO et al., 1997).

2.2.2 Extração e purificação

A escolha do método de extração depende das propriedades das matrizes, dos analitos, dos equipamentos e dos detectores disponíveis para o analista. É conveniente dividir as matrizes de alimentos em categorias, tendo como base o conteúdo de umidade e gordura (NETHERLANDS, 1996).

MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY (2004) avaliaram a conveniência de seis solventes orgânicos, sendo: acetonitrila, acetato de etila e acetona para extração de agrotóxicos e hexano, tolueno e isooctano para retomada de extrato destinado à análise por CG. Segundo esses pesquisadores, um solvente ideal a ser empregado numa metodologia de determinação multirresíduos de agrotóxicos deve ser compatível com os analitos, com a preparação da amostra e com a determinação cromatográfica. Basicamente, esses três pré-requisitos significam que todos os analitos de interesse devem ser suficientemente solúveis e estáveis nesse solvente. Esse mesmo solvente deve ser usado nas etapas de extração e purificação, evitando-se sua troca. Em relação ao ensaio cromatográfico, as propriedades físico-químicas do solvente não devem interferir na separação e permitir a detecção dos picos. Outras características relevantes dos solventes são: baixa toxicidade e inflamabilidade, baixo custo e pequeno risco ambiental.

Os solventes mais utilizados na extração de multirresíduos são: acetonitrila, acetato de etila e acetona, cada um com suas vantagens e desvantagens. Em comparação com acetato de etila e acetona, a acetonitrila extrai menor quantidade de gorduras e pigmentos e também possui compatibilidade com a CG (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). Acetonitrila e acetona apresentam como vantagem a miscibilidade em água, permitindo a formação de fase única, enquanto o acetato de etila é parcialmente miscível (OBANA et al., 2001).

A acetona foi selecionada como o solvente de extração de noventa agrotóxicos em frutas e vegetais por ser mais efetivo para agrotóxicos polares e apolares em diversas matrizes. E, entre outras vantagens, inclui a baixa toxicidade, miscibilidade com água, facilidade de evaporação e baixo custo (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003).

Após a extração da amostra, uma etapa adicional pode ser realizada para separar os analitos de componentes remanescentes da matriz, denominada purificação dos extratos. Comumente, são empregados procedimentos como cromatografia de permeação em gel (CPG), cartuchos de extração em fase sólida (EFS), microextração

em fase sólida (MEFS) e, mais recentemente, a extração com partição em baixa temperatura (PINHO et al., 2009). A necessidade de purificação depende da matriz que será analisada. Se os valores de LMR e do LD do método não forem próximos e o extrato for relativamente límpido, proporcionando uma detecção suficientemente seletiva, a etapa de purificação pode ser omitida (NETHERLANDS, 1996; COLUMÉ et al., 2001).

A presença de interferentes na matriz dos extratos pode afetar a identificação e quantificação do analito. A purificação é necessária para reduzir o limite de detecção do método e ou evitar as interferências da matriz. Porém, uma extensiva purificação pode resultar na perda parcial de alguns compostos, bem como, aumentar o custo analítico. Uma inadequada purificação pode levar a um efeito adverso relacionado com a qualidade dos dados gerados, mascarando os picos dos resíduos pelos componentes da matriz, ocorrendo um falso positivo e quantificação inexata (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003; PINHO et al., 2009).

Para substituir a clássica extração líquido-líquido (ELL) e para reduzir o custo e a geração de solventes poluentes, foram desenvolvidos métodos de EFS. Nesse processo, o composto de interesse é isolado da amostra líquida por diferença de solubilidade entre a fase móvel e a estacionária. Os adsorventes mais comumente utilizados com boas recuperações para os agrotóxicos halogenados incluem o florisil, a sílica gel e a alumina. Cartuchos de EFS, contendo fase normal e reversa, tornaram-se disponíveis comercialmente e oferecem uma opção mais simples de purificação do extrato e de redução do volume dos solventes utilizados (SZETO & PRICE, 1991; TORRES et al., 1996; QI, 2010). A eficiência da EFS depende do tipo e quantidade de adsorvente, volume da amostra, razão do fluxo e pH, assim como do conteúdo de modificadores orgânicos e do volume do solvente eluído (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003). Embora apresente vantagens, a EFS tem como desvantagens a saturação dos sítios adsorventes resultando na diminuição do fluxo do solvente, baixa reprodutibilidade e, em muitos casos, a não reutilização do cartucho (FARIA et al., 2005).

A MEFS envolve a imersão do polímero que recobre a fibra dentro do extrato aquoso ou em sua fase gasosa (*headspace*) para extrair os analitos. Após o equilíbrio, a agulha da fibra é transferida para a porta do injetor do cromatógrafo a gás, enquanto os analitos são desorvidos termicamente para dentro da coluna. Essa técnica combina amostragem e pré-concentração em uma única etapa (KOMATZU & VAZ, 2004; QI, 2010). A MEFS é de interesse crescente na análise de resíduos de pesticidas e tem

sido utilizada rotineiramente em combinação com CG, utilizando diferentes tipos de detectores (CORTÉS-AGUADO et al., 2008; MENEZES et al., 2010). As vantagens do método de MEFS são que o procedimento analítico é mais simples e mais rápido que ELL e EFS, em geral extratos mais limpos são obtidos, não usa solventes para a eluição. Por outro lado o analito necessita ser volátil e termicamente estável para ser desorvido e determinado por CG (QUEIROZ, et al., 2001).

A extração em fluido supercrítico é uma técnica híbrida entre a cromatografia a gás e a líquida. Um fluido supercrítico é formado por uma substância que é aquecida acima de sua temperatura crítica, ou seja, temperatura acima da qual uma substância não pode ser liquefeita. Uma importante propriedade dos fluidos supercríticos relacionada com sua alta densidade é a sua habilidade de dissolver moléculas grandes não-voláteis, extraíndo a amostra sólida em um curto período de tempo. O fluido supercrítico tem similar densidade do líquido, porém baixa viscosidade e alto coeficiente de difusão. Esta combinação de propriedades resulta em um fluido com maior poder de penetração e solvatação, extraíndo o soluto mais rapidamente que o líquido. A fase móvel mais empregada em cromatografia com fluido supercrítico é o dióxido de carbono (CO_2), que é um excelente solvente para uma variedade de moléculas orgânicas não-polares, sendo ainda não-tóxico e de baixo custo (SKOOG et al., 2006).

Recentemente, a extração em fluido supercrítico está sendo reconhecida no campo de ensaios de resíduos de agrotóxicos, como uma potencial alternativa para a clássica extração com solventes e como método de purificação. Em comparação com a extração com solventes, o fluido supercrítico oferece uma série de vantagens como evitar o uso de solventes, seletividade na extração, rapidez, demanda de menos espaço e vidraria, além de permitir automação (TORRES et al., 1996; LEHOTAY, 1997; QI, 2010).

A cromatografia de coluna é um dos processos utilizados na purificação. É utilizada uma coluna de 10 a 20 cm x 2,5 cm, empacotada com florissil, sílica gel e, com menos frequência, alumina (MARSHALL, 1998). Colunas cromatográficas usando terra diatomácea como adsorvente foram introduzidas como alternativa à ELL na técnica de LUKE et al. (1975) apresentando recuperações reprodutíveis para agrotóxicos polares e não-polares (TORRES et al., 1996).

A cromatografia de permeação em gel (CPG) ou exclusão por tamanho foi, inicialmente, a mais eficiente e versátil técnica de purificação nos ensaios de resíduos de agrotóxicos. É o método de purificação universalmente aplicável para a remoção de

compostos de peso molecular elevados. A maior vantagem da CPG sobre a técnica convencional de cromatografia de coluna é o fato do grande número de agrotóxicos analisados. A mesma coluna pode ser usada para a purificação de várias amostras, com isto é requerido um menor tratamento e torna-se possível a automatização. A desvantagem é o grande volume de eluato que tem que ser processado (NETHERLANDS, 1996).

A extração com partição em baixa temperatura consiste em colocar a amostra líquida ou sólida em contato com um solvente menos denso que a água e com ponto de fusão abaixo de -20 °C. O sistema é agitado e levado ao congelador. Após um determinado período de tempo a fase aquosa congelada e o solvente orgânico, ainda na fase líquida, são separados. Os componentes da matriz ficam retidos na fase aquosa congelada e a fase orgânica é analisada por CG. Essa técnica combina extração e purificação da amostra (VIEIRA et al., 2007).

Além destes, métodos *QuEChERS* vêm sendo aplicados para a extração de multirresíduos de agrotóxicos. Desenvolvido inicialmente por ANASTASSIADES et al (2003), envolvem a extração dos analitos da amostra com acetonitrila contendo 1% de ácido acético, seguida da partição líquido-líquido com a adição de sulfato de magnésio anidro e acetato de sódio. Estes métodos têm sido adotados por diversos pesquisadores e reconhecidos como de fácil utilização, rápidos, de baixo custo e eficientes na extração de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos (MAJORS, 2008; PRESTES et al., 2009; CIESLIK et al., 2010).

Apesar do desenvolvimento das técnicas de extração e microextração em fase sólida, a extração líquido-líquido continua sendo a mais empregada por ser uma técnica simples, pois não exige instrumentação sofisticada, e é de fácil execução. Assim, nos últimos anos vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de otimizar o consumo de solventes utilizados nesta técnica (VIEIRA et al., 2007).

2.2.3 Cromatografia

O método cromatográfico é uma técnica empregada de forma ampla e que permite a separação, identificação e determinação de componentes em matrizes complexas. É um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura com base nas diferenças de velocidade em que os diferentes compostos são transportados através de uma fase fixa estacionária (sólida ou líquida) por uma fase móvel (líquida, gasosa ou fluido supercrítico) (KEALEY & HAINES, 2002).

Um cromatograma é um gráfico de alguma função da concentração do soluto *versus* o tempo de eluição. As posições dos picos no eixo do tempo podem ser empregadas para identificar os componentes da amostra, quando aliado a alguma forma de confirmação, e as áreas sob os picos provêm uma medida quantitativa da quantidade de cada uma das espécies presentes na amostra (SKOOG et al., 2001).

O ensaio quantitativo está baseado na comparação da altura ou área do pico registrado para uma amostra com aquele obtido para um ou mais padrões. Se as condições são controladas adequadamente, ambos os parâmetros variam linearmente com a concentração. O método mais direto envolve a preparação de uma série de soluções padrões dos analitos cuja concentração se aproxima daquela da amostra. Os cromatogramas para os padrões são obtidos e as alturas dos picos ou suas áreas são plotadas em um gráfico em função da concentração para se obter uma equação de regressão (SKOOG et al., 2006). Em um ensaio quantitativo deve-se tomar cuidado em todas as etapas para evitar erros. A amostra a ser analisada deve ser representativa do total; não deve haver perdas e nem contaminações durante seu preparo. A quantidade de amostra injetada deve possuir os componentes em análise em concentração dentro da faixa de resposta linear do detector (KEALEY & HAINES, 2002).

2.2.3.1 Cromatografia em fase gasosa (CG)

A CG é uma técnica com excelente poder de resolução, sensibilidade e quantificação. Porém, apresenta alguns inconvenientes como a necessidade da substância ser volátil e estável termicamente, além da necessidade de etapas de preparação para evitar interferências e contaminação, que na maioria das vezes, são demoradas e dispendiosas (COLLINS et al., 2006).

Na CG, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre a fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Ao realizar-se uma separação por CG, a amostra é vaporizada e injetada na cabeça da coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Em contraste, com muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, sendo sua única função transportar o analito através da coluna (SKOOG et al., 2006).

As características fundamentais de um sistema de CG são: retenção, seletividade, eficiência e resolução. O parâmetro de retenção é o tempo de retenção (t_r), sendo definido como o tempo transcorrido entre a injeção da amostra e o máximo do pico cromatográfico. A seletividade é a capacidade de um sistema diferenciar dois

compostos, que é definida pela razão entre os tempos de retenção de dois picos que são eluídos em sequência em uma corrida cromatográfica. A eficiência, na CG, é expressa pelo número de pratos teóricos (N), que é calculada usando-se o tempo de retenção e a largura do pico cromatográfico. E a resolução entre duas substâncias é a razão entre a diferença dos tempos de retenção e a média das larguras das bandas (KEALEY & HAINES, 2002).

Colunas

A coluna é o componente mais importante do sistema cromatográfico, uma vez que é onde a separação irá ocorrer. Entre os diferentes parâmetros a serem considerados quando da escolha da coluna, dois devem ser destacados: a fase estacionária (o suporte e a natureza da fase líquida) e as características do material onde será acondicionada. As dimensões ideais de uma coluna devem ser determinadas pelo propósito do experimento e pela eficiência desejada na separação (COLLINS et al., 2006).

As colunas utilizadas podem ser classificadas de acordo com o diâmetro em empacotadas, megabore e capilar. As colunas capilares são fabricadas de sílica fundida e são revestidas com uma cobertura de poliimida impermeável. A vantagem dessa coluna é que ela apresenta uma resolução 12 vezes maior que as colunas empacotadas de comprimento similar. As colunas megabore têm diâmetro intermediário entre a empacotada e capilar (0,75 - 1,0 mm), possuem eficiência inferior com relação às capilares, porém, capacidade superior, isto é, maior quantidade de amostra poderá ser injetada. Um ponto a ser observado na escolha da coluna é que quanto menor o diâmetro interno da coluna, maior será sua eficiência. Entretanto, quanto menor o diâmetro interno, menor será a sua capacidade. Com relação ao tempo de análise, quanto menor o diâmetro interno, mais rápida será a análise, pois maior poderá ser a velocidade do gás de arraste (MARSHALL, 1998).

A escolha da fase estacionária é auxiliada pela seguinte regra, semelhante dissolve semelhante (analitos apolares interagem mais fortemente com fases estacionárias apolares e vice versa). Em geral, a natureza do analito determina a escolha da fase estacionária. Por exemplo, para separações de organoclorados e piretróides é recomendada a fase estacionária apolar semelhante a 100 % dimetilpolisiloxano (DB-1 ou OV-1) e ou 5 % fenil-metilpolisiloxano (DB-5 ou BPX-5). Para a separação de alguns compostos mais polares, semelhantes aos compostos organofosforados a 14 % cianopropil-fenil-metilpolisiloxano (OV-17 ou DB-1701) pode

ser aplicada e é bastante recomendada quando se usa o detector fotométrico de chama (NETHERLANDS, 1996).

A polaridade, a volatilidade, a reatividade química e a estabilidade térmica do analito é que determinam a escolha da coluna analítica apropriada, a seleção do instrumento analítico, a eficiência de sua recuperação da matriz do alimento e o seu comportamento na coluna de purificação (MARSHALL, 1998).

Injetores

A obtenção de sinais reprodutíveis em CG é altamente dependente da forma de introduzir a amostra na coluna. A escolha apropriada das condições de injeção, tais como volume da amostra, temperatura do injetor e tipo de injeção, depende do estado físico da amostra (PINHO et al., 2009).

Os injetores que realizam a introdução da amostra na cabeça da coluna (*on-column*) induzem menor efeito de matriz do que os injetores convencionais que introduzem a amostra em um insertor de vidro (*liner*) seguido da divisão ou não da amostra (*split/splitless*) para posterior entrada na coluna. A técnica de injeção *on-column* não discrimina as porções da amostra que serão transferidas para o sistema cromatográfico, por essa razão esse tipo de injeção em análise de traços é mais aplicada para matrizes limpas (PINHO et al., 2009).

ZROSTLÌKOVÁ et al. (2001) provaram que a técnica de injeção com temperatura programada de vaporização é uma forma adequada de aumentar o desempenho do sistema de CG para determinação de agrotóxicos, podendo aumentar o volume de injeção em um fator de 30 vezes em comparação com as técnicas comuns de injeção *splitless* a quente. A técnica consiste em manter o injetor a uma temperatura inicial em que apenas o solvente se vaporiza, com posterior aumento de temperatura até total vaporização e transferência da amostra para a coluna cromatográfica. A injeção de volumes maiores melhora o limite de detecção (LD) do método e diminui a adsorção e a degradação de analitos no *liner* com maior quantidade de amostra sendo transferida para a coluna.

Detectores

A função do detector em um sistema cromatográfico é acusar a presença e medir a quantidade de cada componente no efluente da coluna (HARVEY, 2000). Uma diversidade de detectores é utilizada na CG. Alguns detectores são universais em resposta, enquanto que outros são seletivos, respondendo apenas a uma classe de

compostos. Detectores seletivos são os mais comumente usados na análise de resíduos de agrotóxicos. Dentre estes detectores está o amplamente utilizado DCE, que apresenta alta sensibilidade, da ordem de ppb, principalmente para compostos halogenados (COLUMÉ et al., 2001; QUINETE, 2005).

São características desejáveis em um detector: sensibilidade adequada; boa estabilidade e reprodutibilidade; resposta linear aos solutos; faixa de temperatura desde a ambiente até pelo menos 400 °C; tempo de resposta curto; alta confiabilidade e facilidade de uso (SKOOG et al., 2006).

O DCE tornou-se um dos detectores mais amplamente empregados para amostras ambientais em virtude de responder aos compostos orgânicos contendo halogênios, como os agrotóxicos. Nesse detector, a amostra eluída de uma coluna passa sobre uma fonte radioativa emissora beta, geralmente níquel-63. Um elétron do emissor causa a ionização do gás carregador e a produção de uma rajada de elétrons. Na ausência de espécies orgânicas, produz-se uma corrente constante entre um par de eletrodos em decorrência desse processo de ionização. Contudo, a corrente decresce significativamente na presença de moléculas orgânicas que contêm grupos funcionais eletronegativos que tendem a capturar elétrons. Os compostos halogenados, peróxidos, quinonas e grupos nitro são detectados com alta sensibilidade. O detector é insensível a grupos funcionais como aminas, álcoois e hidrocarbonetos (HARVEY, 2000).

2.2.4 Métodos de confirmação

Métodos de confirmação fornecem indicações completas ou complementares para a identificação inequívoca de uma substância e, caso necessário, a sua quantificação no nível requerido (EUROPEAN COMMISSION, 2002). As análises confirmatórias são necessárias devido à grande possibilidade de resultados falsos positivos obtidos por CG-DCE (GELSOMINO et al., 1997).

Os métodos de confirmação para resíduos e contaminantes orgânicos devem fornecer informações relativas à estrutura química do analito. Conseqüentemente, os métodos que utilizam apenas a análise cromatográfica, sem recurso a um sistema de detecção baseado na espectrometria, não são adequados para utilização isolada enquanto métodos de confirmação. Contudo, se uma determinada técnica não possuir seletividade suficiente, a mesma pode ser obtida através de procedimentos analíticos

constituídos por combinações adequadas de processos de purificação, separação cromatográfica e detecção espectrométrica (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

A identificação pode ser feita comparando-se o tempo de retenção de um padrão com o da amostra. Se um composto conhecido possui o mesmo tempo de retenção que um dado composto na amostra, pode tratar-se da mesma substância. Porém isso não é conclusivo, porque dois compostos podem ter o mesmo tempo de retenção em determinadas condições de ensaio e, nesse caso, a confirmação deve ser feita utilizando-se colunas de diferentes polaridades (COLLINS et al., 2006).

A CG provê um meio excelente de confirmação da presença ou ausência de compostos suspeitos em uma mistura, supondo que uma amostra autêntica do analito esteja disponível. Nenhum outro pico deve aparecer no cromatograma da mistura em adição ao do composto conhecido e o aumento de intensidade de um pico previamente existente deve ser observado. A evidência é particularmente convincente se o efeito puder ser duplicado em colunas diferentes e a diferentes temperaturas (SKOOG et al., 2006).

Técnicas de confirmação são requeridas para demonstrar a seletividade. As seguintes técnicas de confirmação são consideradas aceitas: CG acoplada à espectrometria de massas (EM); CLAE-EM/EM; CLAE/DAD; princípios cromatográficos (CG ↔ CLAE); detectores alternativos; derivação (se este não for o método de escolha); diferentes fases estacionárias e diferentes fases móveis. Além disso, variações nas etapas de partição e purificação da amostra, em casos especiais, também são consideradas métodos de confirmação. Quando o método for realizado por CG-EM ou CLAE-EM/EM não são necessários métodos de confirmação (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

Embora um cromatograma possa não levar a uma identificação positiva das espécies presentes em uma amostra, esse frequentemente provê uma evidência segura da ausência de uma espécie. Assim, se uma amostra falha em produzir um pico com o mesmo tempo de retenção que um padrão obtido sob condições idênticas, isso é uma evidência forte de que o composto em questão está ausente ou presente em concentração abaixo do LD do método (SKOOG et al., 2006).

O uso de um EM acoplado ao cromatógrafo permite a identificação positiva de quase todos os compostos, exceto isômeros, ao nível de microgramas (COLLINS et al., 2006). O EM no modo de seleção de íons é importante na análise qualitativa de resíduos de agrotóxicos, pois permite a obtenção de informações estruturais baseadas na fragmentação do composto em diversos íons (VIEIRA et al., 2007).

A CG-EM/EM e a CLAE-EM/EM não são apenas ferramentas de confirmação efetivas, mas também são os métodos quantitativos de análise mais confiáveis, modernos e avançados em análises de multirresíduos. A detecção por EM pode ser usada para identificação absoluta de compostos desconhecidos, não por seu tempo de retenção, mas com base na massa molecular, fórmula empírica e padrão de fragmentação. Sendo que o padrão de fragmentação secundário, gerado pelo acoplamento EM/EM, permite uma discriminação muito maior dos interferentes da matriz que o uso dos produtos de fragmentação primária (COLUMÉ et al., 2001; JARDIM et al., 2009).

2.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Validação de métodos analíticos é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ABNT, 2005). O laboratório deve validar os métodos não normalizados, criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos, ampliações e modificações dos métodos normalizados (ABNT, 2005; INMETRO, 2010).

Métodos analíticos confiáveis são necessários para a avaliação da conformidade dos produtos com as regulamentações nacionais e internacionais em todas as áreas de análise. A validação de métodos é, por isso, um componente essencial das medidas que um laboratório deve implementar para que ele produza dados analíticos confiáveis (THOMPSON et al., 2002).

O laboratório que utilizar um método validado por estudos interlaboratoriais, que tenha sido avaliado como adequado para o propósito de uso, precisa demonstrar somente que está aplicando o método de forma correta e que alcança determinadas características (EURACHEM, 1998). Em se tratando de método normalizado, o laboratório fica dispensado de realizar a validação completa do método. Entretanto, um estudo de avaliação de desempenho se faz necessário, de forma a comprovar que o método normalizado opera adequadamente nas condições reais do laboratório em questão. Para tanto, os parâmetros críticos devem ser ensaiados com o intuito de demonstrar que o desempenho do método se assemelha ao desempenho originalmente observado. Caso seja realizada alteração no método normalizado, procedimentos ou equipamentos, a validação deverá ser integralmente conduzida (BRASIL, 2009).

Os estudos de validação devem ser representativos, cobrir as faixas de concentração e abranger os diferentes tipos de amostras dentro do escopo do método (THOMPSON et al., 2002). É imprescindível que no processo de validação os estudos para determinação dos parâmetros de desempenho sejam realizados utilizando equipamentos dentro das especificações, em boas condições de trabalho e adequadamente calibrados. Da mesma forma, o analista envolvido nos estudos deve ser competente na área em questão e ter conhecimento suficiente para ser capaz de tomar decisões apropriadas a partir de suas observações (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010).

Os parâmetros de desempenho típicos na validação intralaboratorial a serem estudados em um determinado protocolo são: aplicabilidade, seletividade, linearidade da curva de calibração, faixa de trabalho, efeitos de matriz, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação, sensibilidade e robustez (THOMPSON et al., 2002).

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

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de determinar com acurácia o analito de interesse na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa nas condições do teste (EURACHEM, 1998; RIBANI et al., 2004). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2010). O mesmo significado tem sido frequentemente utilizado para o termo especificidade. Esta situação gera confusão desnecessária e isto pode ser evitado utilizando somente o termo seletividade, como sugerido pela IUPAC (VESSMAN et al., 2001).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004). O ideal é que a relação entre a resposta do instrumento e a concentração seja linear, mas não é obrigatório, o importante é haver repetitividade da curva em dias diferentes (EURACHEM, 1998).

A faixa de aplicação, ou de trabalho, corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão. A faixa de aplicação é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método, e depende do uso em questão (RIBANI et al., 2004). 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 de concentração, 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 (INMETRO, 2010).

Efeito de matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz amostral. Os efeitos de matriz não significativos simplificam enormemente o processo de validação, visto que os padrões dos analitos podem ser preparados diretamente no solvente. Para que esta estratégia seja adotada, o efeito de matriz deve ser avaliado na validação (THOMPSON et al., 2002). O efeito de matriz pode causar alterações na análise cromatográfica, como: (i) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo; (ii) componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse gerando resultado falso positivo. Este problema é fácil de ser contornado, com a utilização de um espectrômetro de massas para monitoramento dos analitos; (iii) aumento no sinal do detector, pela eluição de impurezas voláteis com o mesmo tempo de retenção do analito, levando à superestimação do resultado ou diminuição do sinal do detector gerando uma subestimação do resultado (PINHO et al., 2009). Os diferentes tipos de amostras, extratos e concentrações da matriz podem exibir efeitos de valores diferentes. Uma matriz representativa pode ser usada para calibrar vários tipos de amostras (BRUCE et al., 1998; EUROPEAN COMMISSION, 2010). Vários fatores estão envolvidos com o aparecimento do efeito de matriz em análise de alimentos: número e tipo de sítios ativos no injetor e na coluna cromatográfica; estrutura química dos analitos (ligação de hidrogênio e termolabilidade); concentração dos analitos; temperatura de injeção; o tempo de interação (pressão, volume de injeção, volume de expansão do solvente, diâmetro da coluna e tempo de retenção); e o tipo e concentração da matriz (ANASTASSIADES et al., 2003).

A exatidão 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 (EUROPEAN COMMISSION, 2002). É declarada quantitativamente em termos de tendência (*bias*) ou erro sistemático, com pequenas tendências indicando exatidão (THOMPSON et al, 2002; EUROPEAN COMMISSION 2010). Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações

interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação. Na ausência de materiais de referência, a exatidão pode ser investigada por meio de experimentos de adição de padrões, mas esta técnica pode ser fortemente influenciada por erros de observação. Embora uma boa recuperação não seja uma garantia absoluta de exatidão, certamente uma recuperação pobre é uma indicação de falta de exatidão (THOMPSON et al., 2002). A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (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 (EUROPEAN COMMISSION, 2002). THOMPSON et al., (2002) define precisão como a proximidade de concordância entre resultados independentes obtidos sob condições estipuladas. É usualmente especificado em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativo. As três formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (INMETRO, 2010).

A repetibilidade 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. Tanto a repetitividade quanto a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito (EURACHEM, 1998). A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório (INMETRO, 2010). A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável

de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004).

O LD é a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser significativamente distinguida de zero (THOMPSON et al., 2002). O limite de detecção pode ser definido como a menor concentração detectada em amostras adicionadas, mas não necessariamente quantificada, distinguida de zero, cuja relação sinal/ruído ≥ 3 (SOUZA et al., 2005). Segundo a AOAC (1998), é a média das leituras de amostras brancas ($n \geq 20$) mais 3 vezes o desvio padrão, expresso em concentração do analito. Como define RIBANI et al. (2004), é a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Para sistemas cromatográficos, é a quantidade injetada que resulta em um pico com altura pelo menos 2 ou 3 vezes o sinal da linha de base. De acordo com a EUROPEAN COMMISSION (2005), é a menor concentração de resíduos validada que pode ser quantificada e registrada no âmbito da vigilância de rotina com métodos de controle validados. Pode ainda ser descrito como a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser separada do ruído de fundo do instrumento utilizado para a medição (BRUCE et al., 1998).

Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de uma substância que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis nas condições estipuladas do teste (CODEX, 2003; EUROPEAN COMMISSION, 2010) ou a concentração abaixo da qual o método analítico não pode operar com precisão e exatidão aceitáveis (THOMPSON et al., 2002; SOUZA, 2007). É a menor quantidade de analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão apropriadas para os analitos e matrizes consideradas (AOAC, 1998). Pode também ser descrito como a menor concentração do analito medida com níveis aceitáveis de exatidão e precisão (BRUCE et al., 1998).

O limite de decisão ($CC\alpha$) é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro α , que mede a taxa de resultados falsos não conformes (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Quando os resultados obtidos forem menores que $CC\alpha$, a amostra pode ser declarada como conforme, o que significa ausência do analito ou presença do analito em uma concentração menor que o LMR, com um nível de confiança de $(1 - \alpha)$ (ANTIGNAC et al., 2003).

A capacidade de detecção ($CC\beta$) é o teor mais baixo da substância que pode ser detectado, identificado e ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de

erro β , que mede a taxa de resultados falsos conformes. Em caso de substâncias relativamente às quais não se encontre definido um limite permitido, $CC\beta$ é a concentração mais baixa que o método é capaz de detectar em amostras realmente contaminadas com uma probabilidade igual a $1 - \beta$. No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a capacidade de detecção é a concentração que o método é capaz de detectar na faixa do limite permitido com uma probabilidade igual a $1 - \beta$ (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Quando o resultado obtido é maior ou igual a $CC\beta$, com um limite de confiança de $(1 - \beta)$, a amostra pode ser declarada como não conforme, indicando a presença do analito ou em uma concentração maior que o LMR. Quando o resultado estiver entre $CC\alpha$ e $CC\beta$ há suspeita sobre a conformidade da amostra, mas, sob o ponto de vista estatístico, o resultado não pode ser classificado e a aplicação prática destes parâmetros depende de decisões políticas que envolvem a proteção do consumidor e do produtor de alimentos (ANTIGNAC et al., 2003).

A sensibilidade é o gradiente da curva resposta, ou seja, a alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na concentração do analito (EURACHEM, 1998). A sensibilidade é o gradiente da função de calibração, sendo usualmente arbitrário, dependente de ajustes instrumentais logo não é útil em validações, podendo ser útil em procedimentos de garantia de qualidade (THOMPSON et al., 2002).

A robustez de um procedimento analítico é uma medida da sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas, mas deliberadas variações dos parâmetros do método e fornece uma indicação da sua segurança durante o uso normal (EURACHEM, 1998). Devem ser efetuados estudos prévios para a seleção de fatores do pré-tratamento, da limpeza e da análise da amostra, susceptíveis de influenciarem os resultados da medição. Estes fatores podem incluir o analista, a fonte e a idade dos reagentes, solventes, padrões e extratos de amostra, a taxa de aquecimento, a temperatura, o pH assim como muitos outros fatores que se podem verificar no laboratório. Estes fatores devem ser alterados numa ordem de grandeza coerente com os desvios geralmente encontrados entre laboratórios. Ao se identificarem possíveis fatores que possam influenciar os resultados, devem-se variar levemente cada fator. Quando se verificarem que um fator influencia significativamente os resultados das medições, mais experiências devem ser conduzidas para decidir quanto aos limites de aceitabilidade deste fator. Nesse caso, os resultados devem ser claramente identificados no protocolo do método. As alterações introduzidas devem ser

importantes e geralmente são avaliadas utilizando a abordagem de YOUNG & STEINER (1975), que é de concepção fatorial fracionária (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Testes de robustez examinam o efeito dos parâmetros operacionais nos resultados de análise. Se a influência do parâmetro estiver dentro de uma tolerância previamente especificada, é dito que o parâmetro está dentro da robustez do método. Dados obtidos nestes efeitos permitirão avaliar se um método precisa ser revalidado quando um ou mais destes parâmetros são alterados (HUBER, 1998).

2.4 REVALIDAÇÃO

Revalidação é a reavaliação de um método analítico validado em resposta a uma mudança em algum aspecto do método. É impraticável e provavelmente desnecessário revalidar um método que tenha sofrido “pequenas mudanças”. Propõe-se que estas pequenas variações sejam avaliadas durante a validação, no parâmetro de robustez, e que a revalidação de método seja limitada às situações como mudanças de maiores extensões (RIBANI et al., 2004). Uma revalidação é necessária sempre quando se altera os parâmetros de análise, matriz e tipo ou características do instrumento. Deverá ser realizada também uma nova validação se os resultados da análise da amostra controle estiver fora dos critérios pré-ajustados da aceitação e a fonte de erro não puder ser localizada (HUBER, 1998).

2.5 MATRIZES E ANALITOS REPRESENTATIVOS

A completa validação do método para todas as matrizes e todos os analitos nos alimentos é praticamente impossível. Então, a escolha dos analitos, as concentrações, e matrizes representativas no estudo devem ser feitas criteriosamente para fornecer diversas faixas de combinações para demonstrar a capacidade analítica do método (LEHOTAY, 2000).

Para o procedimento de validação do método, poderá ser selecionado um produto representativo de cada grupo com propriedades comuns. A experiência indica que em matrizes de produtos similares geralmente se obtém um rendimento similar na extração e purificação (CODEX ALIMENTARIUS, 2003). De acordo com a EUROPEAN COMMISSION (2010) as matrizes de frutos, legumes e cereais se dividem em 5 grupos além dos produtos que requerem testes individuais. Produtos com elevado conteúdo de água (maçã, pêssigo, tomate, alface, beterraba, cenoura, batata, etc.); elevado

conteúdo de óleo (castanha, amendoim, soja, abacate, etc.); elevado conteúdo de amido e/ou proteína e baixo conteúdo de água e gordura (feijão, trigo, aveia, arroz, etc.); elevado conteúdo de água e de ácido (limão, tangerina, laranja, morango, uva, abacaxi, etc.); elevado conteúdo de açúcar e baixo de água (passas, ameixas secas, damasco seco, etc.) e produtos que requerem testes individuais (lúpulo, chá, café e especiarias). Segundo o CODEX ALIMENTARIUS (2003) as matrizes se dividem em 6 grupos além dos produtos que requerem testes individuais. Produtos com elevado conteúdo de água e clorofila (alface, espinafre, brócolis, etc.); elevado conteúdo de água e conteúdo escasso ou ausência de clorofila (maçã, pêra, pêssego, morango, uva, tomate, melão, batata, etc.); elevado conteúdo de ácido (laranja, limão, etc.); elevado conteúdo de açúcar (passas, tâmaras); elevado conteúdo de óleo ou gordura (abacate, castanha, amendoim, etc.); produtos secos (arroz, milho, trigo, etc.).

Segundo o CODEX ALIMENTARIUS (2003) para avaliar o rendimento de um método pode-se utilizar analitos representativos, devendo selecionar compostos que possuem propriedades físicas e químicas dos analitos que se pretende determinar no método. A seleção dos analitos representativos deve ser efetuada em função da finalidade e o alcance das análises, levando em conta os seguintes fatores: os analitos representativos devem possuir amplas propriedades físicas e químicas, suficientes para incluir os analitos representados; todos os analitos incluídos no processo de validação inicial devem ser aqueles que serão submetidos ao ensaio regularmente e que podem ser determinados simultaneamente pelo sistema empregado; as concentrações dos analitos utilizados para caracterizar um método devem ser selecionadas de maneira que compreenda os limites aceitáveis de todos os analitos que se planeja avaliar em todos os produtos.

Na validação de um método as separações cromatográficas para análises de uma mistura de padrões e também os analitos críticos no estudo para o qual o método será usado devem ser considerados na escolha dos analitos representativos (AMBRUS, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

Balança analítica (AND); bomba de vácuo (Marconi); capela de segurança química (Veco); homogeneizador tipo *ultra turrax* (Marconi); estufa (Fanem); evaporador rotatório (Büchi); micropipetas automáticas de volume variável (Gilson); triturador de amostras (Skymesen); sistema de cromatografia em fase gasosa modelo CP3800 da marca Varian equipado com: amostrador automático modelo CP8400, detector de captura de elétrons modelo 02-001972-01 com fonte de Ni⁶³ e coluna cromatográfica capilar de sílica fundida CP-Sil 19CB ou similar (14% cianopropilfenila e 86% dimetilpolisiloxano) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme.

Equipamentos como balança analítica, termômetros, micropipetas automáticas de volume variável e vidrarias foram calibrados por laboratórios pertencentes à Rede Brasileira de Calibração (RBC) e acreditados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) no escopo que abrange a grandeza e faixas de uso, com emissão de certificados e etiquetas.

3.2 PADRÕES E REAGENTES

Foram utilizados padrões primários adquiridos de fontes rastreáveis. Os padrões analíticos de agrotóxicos (endossulfam alfa, endossulfam beta, endossulfam sulfato, procimidona, lambda-cialotrina e trifluralina) foram fornecidos por Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha).

Os solventes orgânicos utilizados atenderam aos padrões mínimos requeridos para análise de resíduos de agrotóxicos, isto é, grau resíduo, com certificados de qualidade e pureza. Foram utilizados os seguintes reagentes: acetona grau para análise de resíduos (PAR), diclorometano PAR, hexano PAR e sulfato de sódio anidro PAR da marca Tedia (Ohio, Estados Unidos), acetona grau para análise (PA) da marca Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), isooctano PAR da marca Merck (Darmstadt, Alemanha), hélio ultra puro e nitrogênio ultra puro da IBG (São Paulo, Brasil).

3.3 SOLUÇÕES

3.3.1 Solução padrão estoque (SPE)

As soluções estoque de endossulfam alfa, endossulfam beta, endossulfam sulfato, lambda-cialotrina, procimidona e trifluralina $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas por dissolução de $10 \pm 0,1$ mg do padrão para 50 mL de isooctano. Estas soluções foram armazenadas sob congelamento entre $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $-15 \text{ }^\circ\text{C}$, até o momento do ensaio, e preparadas com frequência anual.

3.3.2 Solução padrão intermediária (SPI) de endossulfam alfa

Foram pipetados 0,2 mL da SPE de endossulfam alfa e transferido para um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com hexano e a solução homogeneizada. A concentração do analito na SPI 1 de endossulfam alfa foi de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$. A SPI 2 de endossulfam alfa foi preparada pela diluição de 1,25 mL da SPI 1 para 50 mL de hexano em balão volumétrico. A concentração do analito na SPI 2 de endossulfam alfa foi de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estas soluções foram armazenadas sob congelamento entre $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $-15 \text{ }^\circ\text{C}$, até o momento do ensaio, e preparadas com frequência trimestral.

3.3.3 SPI de endossulfam beta e trifluralina

Foram pipetados 0,2 mL da SPE de endossulfam beta e trifluralina para um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com hexano e a solução homogeneizada. A concentração dos analitos na SPI1 de endossulfam beta e trifluralina foi de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$. A SPI 2 de endossulfam beta e trifluralina foi preparada pela diluição de 2,5 mL da SPI 1 para 50 mL de hexano em balão volumétrico. A concentração dos analitos na SPI 2 de endossulfam beta e trifluralina foi de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estas soluções foram armazenadas sob congelamento entre $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $-15 \text{ }^\circ\text{C}$, até o momento do ensaio, e preparadas com frequência trimestral.

3.3.4 SPI de endossulfam sulfato, lambda-cialotrina e procimidona

A SPI 1 de endossulfam sulfato, lambda-cialotrina e procimidona foi preparada pela diluição de 0,5 mL da SPE de cada um desses analitos em hexano num balão volumétrico de 10 mL. A concentração dos analitos na SPI 1 de endossulfam sulfato, lambda-cialotrina e procimidona foi de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. A SPI 2 de endossulfam sulfato, lambda-cialotrina e procimidona foi preparada pela diluição de 2,5 mL da SPI 1 para 50 mL de hexano em balão volumétrico. A concentração dos analitos na SPI 2 de endossulfam sulfato, lambda-cialotrina e procimidona foi de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estas soluções foram armazenadas sob congelamento entre $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $-15 \text{ }^\circ\text{C}$, até o momento do ensaio, e preparadas com frequência trimestral.

3.3.5 Soluções da curva de calibração

As soluções da curva de calibração foram preparadas para cada um dos seis níveis em triplicata. Foram tomadas alíquotas de 200, 300, 400, 500, 600 e 700 μL , da SPI 2 de endossulfam alfa à $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$; 100, 250, 400, 550, 700 e 850 μL , da SPI 2 de endossulfam beta e trifluralina à $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$; e 100, 240, 380, 520, 660 e 800 μL da SPI 2 de endossulfam sulfato, lambda-cialotrina e procimidona à $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com hexano e homogeneizados. As faixas de concentração das soluções nos *pools* da curva de calibração foram de: 2; 3; 4; 5; 6 e 7 ng mL^{-1} para endossulfam alfa; 2; 5; 8; 11; 14 e 17 ng mL^{-1} para endossulfam beta e trifluralina; e de 5; 12; 19; 26; 33 e 40 ng mL^{-1} para endossulfam sulfato, lambda-cialotrina e procimidona.

3.3.6 Solução extratora

A solução extratora de diclorometano:hexano (1:1 v/v) foi preparada, medindo-se iguais volumes de hexano PAR e de diclorometano PAR, em quantidades suficientes para as extrações realizadas no dia.

3.4 AMOSTRAS DE MORANGO

A validação foi realizada com a matriz de morango, representando o grupo com alto teor de ácidos segundo classificação da EUROPEAN COMMISSION (2010). Esta matriz, segundo o CODEX ALIMENTARIUS (2003), representa o grupo com elevado conteúdo de água e conteúdo escasso ou ausência de clorofila. A escolha da matriz, também, levou em consideração os dados sobre a utilização de agrotóxicos nessa cultura (AMARAL & ALTOÉ, 2006; FARIA et al., 2009), e o fato de ser uma cultura de produção expressiva no estado de Minas Gerais.

Para os experimentos de validação foram empregadas amostras de morango provenientes de culturas orgânicas. As amostras foram previamente testadas e foi comprovada a ausência de analitos e interferentes com os mesmos tempos de retenção dos padrões utilizados na validação. Essas amostras foram definidas como sendo amostras brancas de morango. Foram acondicionadas, devidamente identificadas e armazenadas sob congelamento entre -25 °C e -15 °C, até o momento dos ensaios.

As amostras destinadas aos estudos de ocorrência no estado de Minas Gerais foram coletadas por fiscais do IMA, nas propriedades rurais dos municípios de Alfredo Vasconcelos, Barbacena, Estiva, Pouso Alegre e Bom Reposo, possibilitando a rastreabilidade das amostras e a adoção de medidas de orientação e controle. Esses municípios figuram entre os principais produtores de morango no estado.

Os técnicos do IMA são treinados para realizar a coleta de acordo com o estabelecido pelo CODEX ALIMENTARIUS (1999), observando a representatividade do lote do produto; sem dar preferência por determinadas características como tamanho, cor ou tipo; evitando contaminação das amostras pelas mãos roupas ou qualquer outro material que entrou em contato com agrotóxicos. Foi coletado no mínimo 1 kg de morangos por amostra, as mesmas foram acondicionadas em embalagens plásticas, lacradas e enviadas ao laboratório, em caixa de isopor. Só foram analisadas as amostras em que o período máximo entre a coleta e sua entrada no laboratório não foi superior a 36 horas.

As amostras recebidas foram adequadamente identificadas, trituradas sem as sépalas, acondicionadas e armazenadas sob congelamento entre -25 °C e -15 °C, até o momento dos ensaios.

3.5 MÉTODO DE ENSAIO

O método validado foi baseado em um procedimento multirresíduos previamente descrito em NETHERLANDS (1996). O método de ensaio fundamentou-se na extração de resíduos de inseticidas organohalogenados em amostras previamente trituradas e homogeneizadas. Alíquotas de aproximadamente $15,00 \pm 0,10$ g foram pesadas em um béquer de 400 mL, utilizando uma balança analítica. Foi adicionado ao béquer 15 ± 1 g de sulfato de sódio anidro, agitando-se, cuidadosamente, o béquer para que toda a amostra entrasse em contato com o sulfato de sódio. A extração foi realizada com 40 mL de acetona PAR por, aproximadamente, 30 segundos em homogeneizador do tipo *ultra turrax*, em seguida, com 60 mL de solução extratora de diclorometano:hexano (1:1 v/v) por mais 30 segundos em *ultra turrax*. A solução foi filtrada a vácuo, com funil de *Buchner* e papel de filtro, para um kitasato, lavando-se a haste do *ultra turrax* e o béquer com a solução extratora de diclorometano:hexano (1:1 v/v). O extrato foi transferido para uma proveta calibrada e completou-se o volume para 100 mL com a solução de diclorometano:hexano (1:1 v/v). Foi tomada uma alíquota de 5 mL desse extrato com micropipeta automática calibrada para um balão de fundo chato. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório, tomando-se o cuidado para não secá-lo totalmente. Tal procedimento foi realizado em corrente de ar comprimido e os resíduos do extrato foram retomados com 2 mL de hexano, utilizando micropipeta automática calibrada. Injetou-se 1 μ L da amostra. Brancos da amostra foram preparados em cada bateria analítica. Foi empregada a CG-DCE para identificação e quantificação dos analitos utilizando-se coluna CP-Sil 19CB (14 % cianopropilfenila e 86 % dimetilpolisiloxano) de 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno com fase estacionária de 0,25 μ m de espessura, marca Varian. As condições cromatográficas otimizadas e estabelecidas para a condução dos ensaios no CG-DCE foram: fluxo de hélio (gás de arraste) de 1,0 mL/min; modo de injeção: *split* com uma razão de divisão de 1/20; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector DCE: 300 °C; rampa de temperatura do forno da coluna: 70 °C por 1 min, 30 °C/min até 180 °C manutenção por 2 min, 15 °C/min até 250 °C manutenção por 8 min, 15 °C/min até 280 °C manutenção por 17 minutos; tempo total de corrida: 35 min. O fluxograma da metodologia analítica está representado na Figura 2.

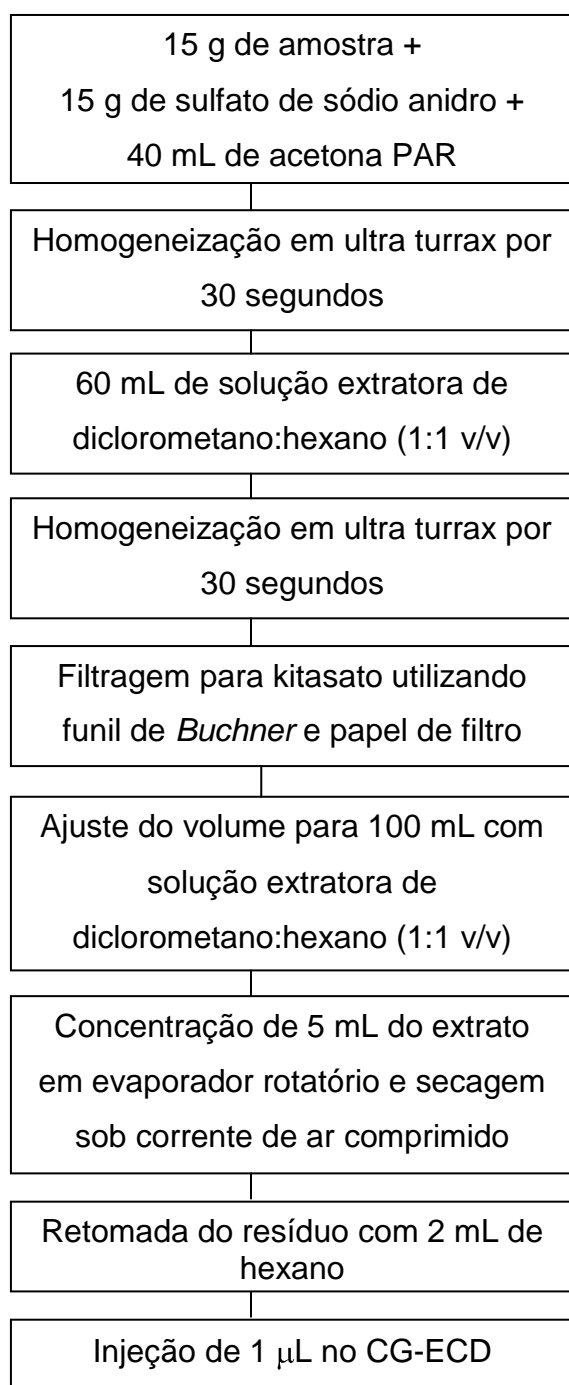


Figura 2: Fluxograma do método de análise

3.5.1 Preparo da curva de calibração no extrato da matriz

Realizou-se a extração da amostra branca conforme procedimento descrito acima. Foi tomada uma alíquota de 5 mL do extrato com micropipeta calibrada para balão de fundo chato e levado ao evaporador rotatório. Em seguida secou-se completamente com ar comprimido. Adicionou-se 40, 60, 80, 100, 120 e 140 µL da SPI 2 de endossulfam alfa; 20, 50, 80, 110, 140 e 170 µL da SPI 2 de endossulfam

beta e trifluralina; e 20, 48, 76, 104, 132 e 160 μL da SPI 2 de endossulfam sulfato, lambda-cialotrina e procimidona. Secou-se em corrente de ar e os resíduos foram retomados com 2 mL de hexano. As faixas de concentração das soluções nos *pools* da curva de calibração em matriz foram de: 2, 3, 4, 5, 6 e 7 ng mL^{-1} para o endossulfam alfa; 2, 5, 8, 11, 14 e 17 ng mL^{-1} para o endossulfam beta e a trifluralina; e 5, 12, 19, 26, 33 e 40 ng mL^{-1} para o endossulfam sulfato, lambda-cialotrina e procimidona.

3.5.2 Adição de padrão em amostras brancas para estudo de recuperação

A adição de padrão em amostras brancas foi realizada para cada um dos três níveis de acordo com a Tabela 3 e procedeu-se a extração conforme descrito em 3.5.

Tabela 3 – Volume adicionado de solução intermediária 2 dos analitos nas amostras no estudo da recuperação.

	Vol. SPI 2 endossulfam alfa (μL)	Vol. SPI 2 procimidona, endossulfam sulfato e lambda-cialotrina (μL)	Vol. SPI 2 endossulfam beta e trifluralina (μL)
Primeiro nível	800	400	400
Segundo nível	1200	960	800
Terceiro nível	2800	3200	2400

3.5.3 Adição de padrão em amostras brancas para estudo do limite de detecção

As amostras foram adicionadas com a metade do volume do menor nível do estudo de recuperação: 400 μL da SPI 2 de endossulfam alfa; 200 μL da SPI 2 de procimidona, endossulfam sulfato e lambda-cilotrina; e 200 μL da SPI 2 de endossulfam beta e trifluralina . Foram realizadas doze replicatas.

3.6 VALIDAÇÃO

Os parâmetros seletividade, linearidade, efeito do dia, efeito de matriz, exatidão, precisão, LD, LQ, $\text{CC}\alpha$ e $\text{CC}\beta$ foram estabelecidos em ensaios com soluções padrão, amostras brancas e amostras brancas adicionadas de padrão. A adequação para uso do método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de

aceitabilidade definidos (THOMPSON et al., 2002; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; SOUZA, 2007; EUROPEAN COMMISSION, 2010; INMETRO, 2010).

3.6.1 Seletividade

Para a verificação da seletividade do método foram analisadas amostras adicionadas de padrão e amostras brancas, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes. Foram observadas as resoluções dos picos das substâncias, a capacidade do método de detectar e quantificar todos os organohalogenados testados e a ausência de interferentes nos tempos de retenção dos analitos estudados (INMETRO, 2010). A resolução dos picos foi determinada utilizando-se a expressão:

$$R = \frac{2 \Delta t_r}{W_1 + W_2}$$

Sendo, Δt_r a variação do tempo de retenção entre dois picos e W a largura dos picos na linha de base.

3.6.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada conforme procedimento descrito por SOUZA & JUNQUEIRA (2005). Após a definição da faixa de interesse, soluções dos analitos foram preparadas em seis níveis de concentração igualmente espaçados, com três replicatas verdadeiras e independentes de cada nível, em 3 diferentes dias. As concentrações das soluções estão apresentadas na Tabela 4. As leituras foram realizadas em ordem aleatória, dentro de cada dia. Brancos de solvente foram preparados para todas as curvas como ferramenta de controle de qualidade interno e ajuste do zero do equipamento, mas não foram incluídos nos cálculos.

Tabela 4 – Níveis de concentração das curvas de calibração.

Princípio ativo	Concentração (ng mL ⁻¹)					
Endossulfam alfa	2	3	4	5	6	7
Endossulfam beta	2	5	8	11	14	17
Endossulfam sulfato	5	12	19	26	33	40
Lambda-cialotrina	5	12	19	26	33	40
Procimidona	5	12	19	26	33	40
Trifluralina	2	5	8	11	14	17

Na Tabela 5 estão representados os níveis de concentração correspondentes em mg kg^{-1} de alimento.

Tabela 5 – Níveis de concentração das curvas de calibração correspondentes em mg kg^{-1} de alimento.

Ingrediente ativo	Concentração (mg kg^{-1})					
Endossulfam alfa	0,005	0,008	0,011	0,013	0,016	0,019
Endossulfam beta	0,005	0,013	0,021	0,029	0,037	0,045
Endossulfam sulfato	0,013	0,032	0,051	0,069	0,088	0,107
Lambda-cialotrina	0,013	0,032	0,051	0,069	0,088	0,107
Procimidona	0,013	0,032	0,051	0,069	0,088	0,107
Trifluralina	0,005	0,013	0,021	0,029	0,037	0,045

Os parâmetros das curvas foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Os valores dispersos (*outliers*) foram identificados pelo teste de resíduos padronizados *Jackknife* e removidos até que novos valores dispersos não fossem mais detectados ou até um limite de exclusão de 2/9 do número original de dados. As premissas de significância da regressão e da adequação do ajuste ao modelo linear foram avaliadas de acordo com o procedimento recomendado por SOUZA & JUNQUEIRA (2005).

3.6.3 Efeito do dia

A avaliação do efeito do dia foi baseada nas curvas de calibração, preparadas em solvente e em matriz, obtidas em três dias. As estimativas das inclinações e das interseções das curvas foram comparadas pelo teste de t (SNEDECOR & COCHRAN, 1989), aplicado a dois contrastes ortogonais. O efeito do dia foi considerado significativo quando a estatística t excedeu ao valor de t crítico para qualquer um dos contrastes ortogonais (AMARAL, 2007).

3.6.4 Efeito de matriz

Para avaliação dos efeitos de matriz foi empregado o método de adição de padrão e delineamento proposto por SOUZA (2007). Duas curvas de calibração foram estudadas em seis níveis de concentração. Ambas com as mesmas concentrações do analito, uma preparada com o solvente e outra em extrato de amostra branca de morango obtida de amostra ensaiada nas mesmas condições do procedimento normal,

sendo que para cada nível foram preparadas três replicatas independentes, analisadas em ordem aleatória no mesmo dia. O ajuste do zero do equipamento foi feito, para todas as curvas, com soluções do solvente e da amostra, sem a presença dos analitos. As curvas foram avaliadas como descrito para o estudo da linearidade, os parâmetros da regressão foram estimados e as premissas relativas ao MMQO foram verificadas para estas curvas. No tratamento dos dados foi aplicado o teste de Pearson & Hartley (SNEDECOR & COCHRAN, 1989) para verificar a homogeneidade de variância dos resíduos da curva e as inclinações e interseções das curvas de solvente e de matriz foram comparadas pelo teste de t ou t'. O efeito de matriz foi considerado significativo quando a estatística t_b ou t_a calculadas excederam o valor de t crítico (SNEDECOR & COCHRAN, 1989; SOUZA, 2007).

3.6.5 Recuperação e precisão

Para os estudos de recuperação (falta de exatidão) e precisão em condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial foram preparadas amostras adicionadas de padrão dos analitos, em três níveis de concentração, na faixa da curva de calibração, exceto para o endossulfam beta e a trifluralina que foram trabalhados na faixa entre 2,0 e 12,0 ng mL⁻¹, correspondendo a 0,005 e 0,032 mg kg⁻¹. Os três níveis de adição estudados estão representados na Tabela 6. Para cada nível de concentração estudado, doze replicatas verdadeiras e independentes foram divididas em quatro lotes de três replicatas, sendo cada lote analisado independentemente, em diferentes dias, por diferentes analistas, em ordem aleatória, simulando condições de reprodutibilidade parcial (SOUZA, 2007). Sendo os ensaios dos dias 1 e 2 realizados pelo analista 1 e dos dias 3 e 4 pelo analista 2. As concentrações dos analitos nas amostras adicionadas foram calculadas pelas equações das curvas de calibração na matriz, mesmo para os analitos que não apresentaram o efeito de matriz.

Tabela 6 – Níveis de concentração de padrões em amostras brancas de morango.

Ingrediente ativo	Concentração (mg kg ⁻¹)		
Endossulfam alfa	0,005	0,008	0,019
Endossulfam beta	0,005	0,011	0,032
Endossulfam sulfato	0,013	0,032	0,107
Lambda-cialotrina	0,013	0,032	0,107
Procimidona	0,013	0,032	0,107
Trifluralina	0,005	0,011	0,032

Os resultados de recuperação obtidos foram analisados quanto à presença de valores dispersos pelo teste de Grubbs (SOUZA, 2007). A falta de exatidão foi avaliada por meio das médias de recuperação das amostras adicionadas de padrão obtidas para doze replicatas independentes. Foram consideradas aceitáveis médias de recuperação entre 70 e 120 % de acordo com a EUROPEAN COMMISSION (2010), norma específica para procedimentos de controle de qualidade e validação de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

A precisão sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial foi expressa em termos de desvios padrão relativos e estimada por análise de variância dos resultados de recuperação obtidos de, no mínimo, doze replicatas de amostras brancas adicionadas em cada nível de concentração. As premissas de normalidade (teste de Ryan & Joiner) e homoscedasticidade (teste de Brown & Forsythe) dos resíduos dos resultados de recuperação, relativas à análise de variância, foram previamente testadas e as estatísticas dos cálculos foram descritas por SOUZA (2007). Os desvios padrão relativos de repetitividade (DPR_r) e os desvios padrão relativos de reprodutibilidade parcial (DPR_R) foram considerados aceitáveis quando menores ou iguais a 20 % (EUROPEAN COMMISSION, 2010).

Os resultados foram avaliados por análise de variância, adotando um delineamento fatorial completamente aninhado, que forneceu as estimativas da variância de repetitividade; da variância entre bateladas que inclui as fontes de variação confundidas do dia e do analista; e da variância da precisão intermediária (MAROTO et al., 1999).

3.6.6 Limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção

O LD do método foi estabelecido como a menor concentração detectada nas amostras adicionadas, mas não necessariamente quantificada, diferente de zero (sinal/ruído ≥ 3) (SOUZA, 2007).

O LQ do método foi estabelecido como a menor concentração na qual o método pôde operar com exatidão e precisão aceitáveis, segundo os critérios adotados nos estudos de recuperação e precisão. Este limite foi determinado com base nos resultados médios de recuperação e de desvios padrão relativos de repetitividade e reprodutibilidade parcial obtidos nas avaliações de exatidão e precisão, para as

replicatas de amostras adicionadas no menor nível de concentração estudado (SOUZA, 2007).

O limite de decisão e a capacidade de detecção foram estimados utilizando-se os resultados de recuperação obtidos nos experimentos de avaliação da reprodutibilidade parcial, de acordo com VAN LOCO & BEERNAERT (2003). A informação se o produto é autorizado e qual é seu LMR foi utilizada para o cálculo desses parâmetros.

3.7 OCORRÊNCIA NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Foram coletadas, pelos fiscais do IMA, 75 amostras de morango nos principais municípios produtores de morango de Minas Gerais, para a análise de resíduos de agrotóxicos pelo LARA no ano de 2010. Realizou-se a análise de 43 analitos organohalogenados nas amostras. O preparo das amostras, a extração, o preparo das soluções padrões, da curva de calibração no extrato da amostra branca e a análise cromatográfica foram baseadas no método validado.

A confirmação dos ingredientes ativos para o estudo de ocorrência foi realizado sob as mesmas condições cromatográficas, porém foi usada uma coluna com fase estacionária 100 % dimetilpolisiloxano.

Os ingredientes ativos analisados foram os piretróides: aletrina, bifentrina, ciflutrina (I, II, III e IV), cipermetrina (cis e trans), deltametrina, esfenvalerato, fenpropatrina, fenvalerato, lambda-cialotrina e permetrina (cis e trans); os organoclorados: aldrim, DDT total (op'DDD, pp'DDD, op'DDT, pp'DDT, op'DDE, pp'DDE), dicofol, dieldrim, dodecacloro, endossulfam alfa, endossulfam beta, endossulfam sulfato, endrim, hexaclorobenzeno, hexaclorociclohexano (HCH) alfa, HCH beta, HCH delta, lindano (HCH gama), heptacloro e metoxicloro; os fungicidas dicarboximidas: captana, folpete, iprodiona, procimidona e vinclozolina; entre outros pertencentes a variadas classes: bromopropilato, clorfenapir, clorotalonil, fipronil, procloraz, tetradifona e trifluralina.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANALITOS E MATRIZES REPRESENTATIVOS

Buscou-se escolher um entre os ativos mais utilizados, dentro de cada grupo, na cultura de morango para realizar o estudo. Trabalhou-se com o herbicida trifluralina, porém o seu uso não é comum na cultura de morango, os demais analitos, selecionados para compor o *pool* para adição nas amostras, são agrotóxicos frequentemente detectados nessa cultura. Levou-se em consideração, ainda, a resolução dos mesmos nos cromatogramas, de modo a permitir a análise de um maior número de agrotóxicos em uma mesma corrida cromatográfica. Suas características gerais estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Características gerais dos agrotóxicos organohalogenados utilizados no estudo.

Ativo	Fórmula	Grupo	Uso	Classe	Solubilidade
Lambda-cialotrina	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	Piretróide	Inseticida	III	0,003mg/L em água à 20°C
Endossulfam (alfa, beta e sulfato)	$C_9H_6Cl_6O_3S$	Ciclodienoclorado	Acaricida, Inseticida e Formicida	I	alfa 0,32mg/L beta 0,33mg/L em água à 22°C
Procimidona	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	Dicarboximida	Fungicida	IV	4,5mg/L em água à 25°C
Trifluralina	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	Dinitroanilina	Herbicida	III	< 1mg/L em água à 27°C

Fonte: PESTICIDE ANALYTICAL MANUAL (1999)

4.2 SELETIVIDADE

A resolução dos picos indicou capacidade do método em determinar todos os organohalogenados testados sem interferências mútuas entre os analitos testados, mesmo para os pares de isômeros da lambda-cialotrina. Segundo KEALEY & HAINES (2002) uma resolução, mínima satisfatória, para a separação de dois picos

cromatográficos de no mínimo 1,5 foi observada para todos os analitos. Os tempos de retenção médios observados e a resolução entre os picos estão descritos na Tabela 8. O método foi capaz de detectar e quantificar todos os analitos testados e não houve interferentes nos tempos de retenção dos analitos estudados.

Tabela 8 - Tempos de retenção e resolução dos picos dos analitos organohalogenados estudados utilizando coluna CP Sil 19 CB.

Análitos	Tempo retenção (min)	Resolução
Trifluralina	9,865 ± 0,009	54,0
Procimidona	13,918 ± 0,014	79,7
Endossulfam alfa	14,490 ± 0,011	10,8
Endossulfam beta	15,481 ± 0,013	17,8
Endossulfam sulfato	16,447 ± 0,013	15,9
Lambda-cialotrina I	20,079 ± 0,027	44,3
Lambda-cialotrina II	20,586 ± 0,030	4,9

A resolução da trifluralina foi calculada em relação ao pico do solvente. Resultados não detectados (sinal/ruído < 3) foram obtidos para as amostras brancas analisadas, demonstrando ausência dos agrotóxicos testados e de interferentes com o mesmo tempo de retenção. Os perfis de resposta dos cromatogramas obtidos para os analitos na matriz foram muito semelhantes àqueles obtidos para as soluções de padrão em solvente de concentrações correspondentes. Os cromatogramas típicos obtidos das soluções: branco de solvente, branco de matriz, padrão de organohalogenados em solvente, padrão de organohalogenados em matriz e padrão de organohalogenados em matriz obtido de um ensaio de recuperação dos analitos pela técnica validada estão apresentados nas Figuras 3 a 7, indicando a seletividade do método.

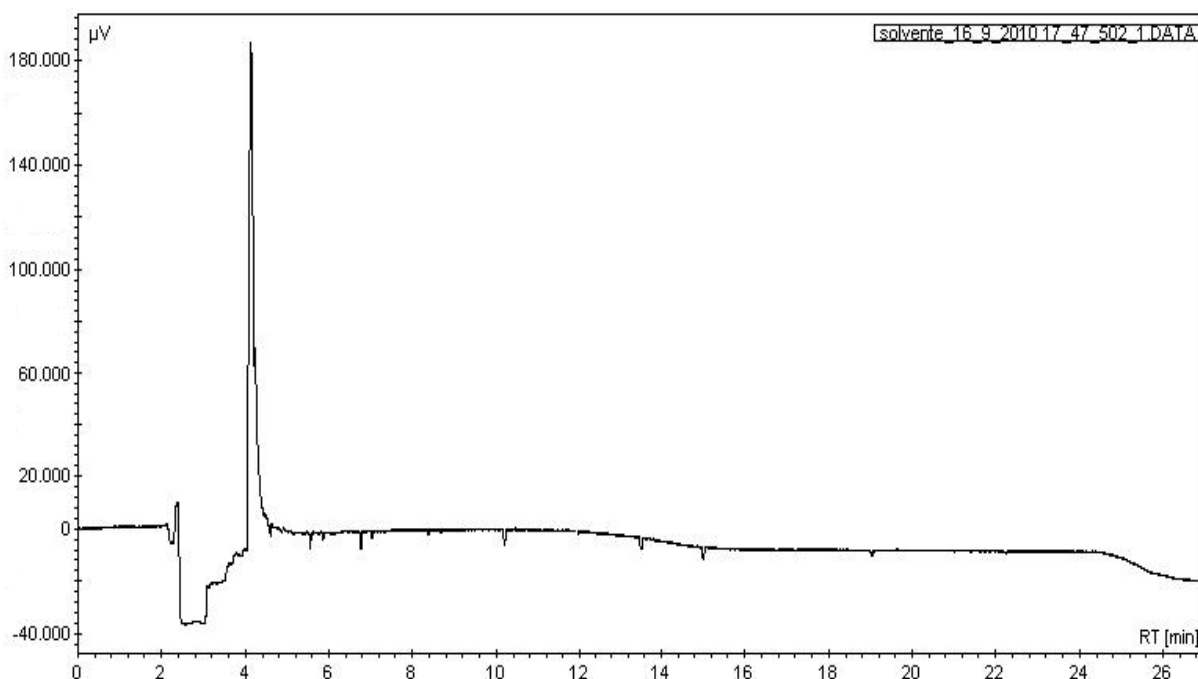


Figura 3 - Cromatograma do solvente hexano utilizado para retomar os extratos.

Condições cromatográficas: fluxo de nitrogênio de 1,0 mL/min; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector ECD: 300 °C; rampa de temperatura do forno da coluna: 70 °C por 1 min, 30 °C/min até 180 °C, manutenção por 2 min, 15 °C/min até 250 °C, manutenção por 8 min, 15 °C/min até 280 °C, manutenção por 17 min; tempo total de corrida: 35 min.

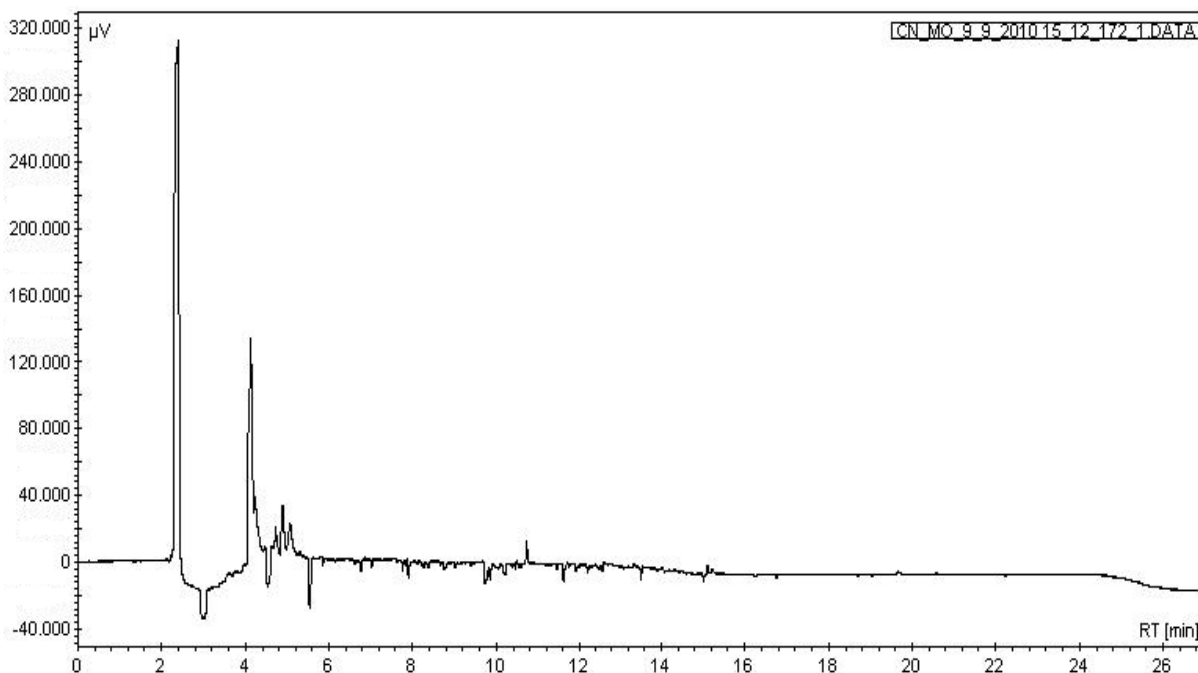


Figura 4 - Cromatograma de amostra branca de morango.

Condições cromatográficas: fluxo de nitrogênio de 1,0 mL/min; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector ECD: 300 °C; rampa de temperatura do forno da coluna: 70 °C por 1 min, 30 °C/min até 180 °C, manutenção por 2 min, 15 °C/min até 250 °C, manutenção por 8 min, 15 °C/min até 280 °C, manutenção por 17 min; tempo total de corrida: 35 min.

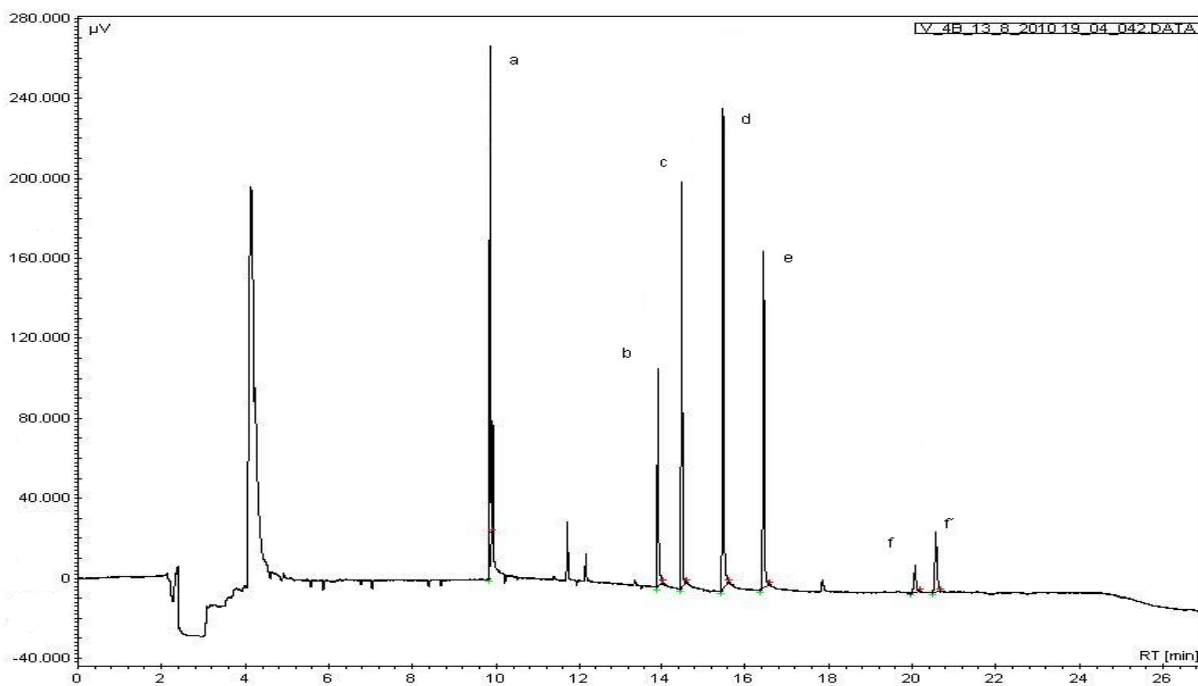


Figura 5 - Cromatograma da solução dos padrões em solvente hexano.

(a) Trifluralina, (b) Procimidona, (c) Endossulfam alfa, (d) Endossulfam beta, (e) endossulfam sulfato, (f) Lambda-cialotrina I e (f') Lambda-cialotrina II. Condições cromatográficas: fluxo de nitrogênio de 1,0 mL/min; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector ECD: 300 °C; rampa de temperatura do forno da coluna: 70 °C por 1 min, 30 °C/min até 180 °C, manutenção por 2 min, 15 °C/min até 250 °C, manutenção por 8 min, 15 °C/min até 280 °C, manutenção por 17 min; tempo total de corrida: 35 min.

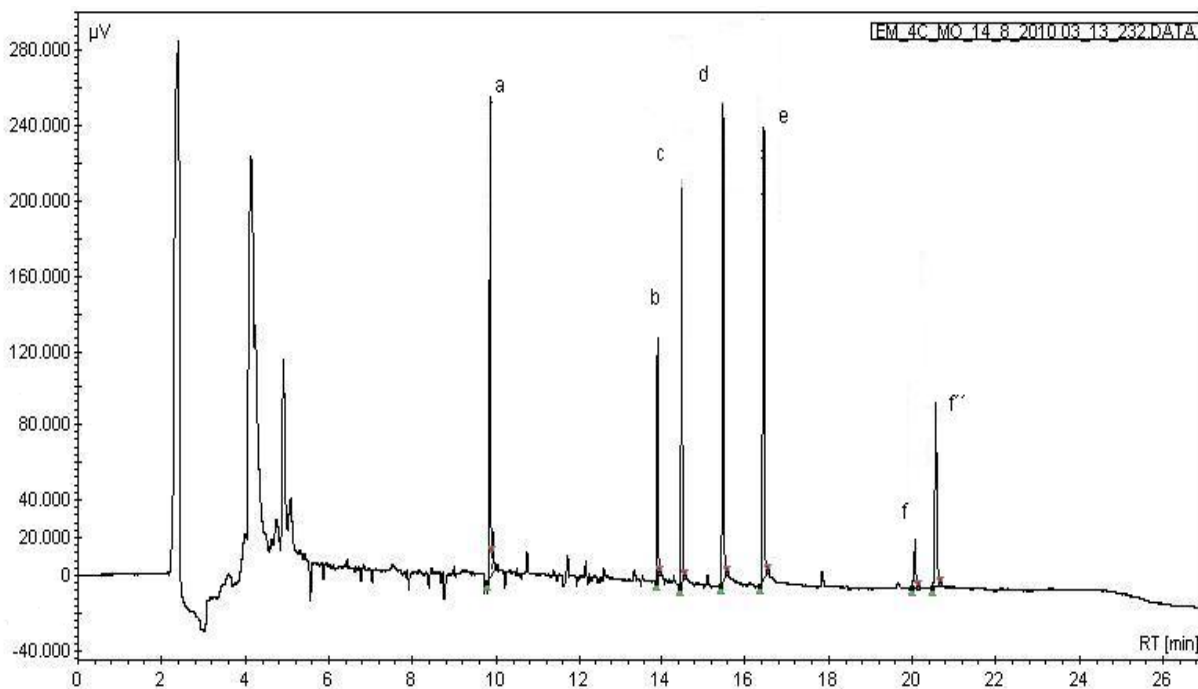


Figura 6 - Cromatograma da solução dos padrões em matriz.

(a) Trifluralina, (b) Procimidona, (c) Endossulfam alfa, (d) Endossulfam beta, (e) endossulfam sulfato, (f) Lambda-cialotrina I e (f') Lambda-cialotrina II. Condições cromatográficas: fluxo de nitrogênio de 1,0 mL/min; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector ECD: 300 °C; rampa de temperatura do forno da coluna: 70 °C por 1 min, 30 °C/min até 180 °C, manutenção por 2 min, 15 °C/min até 250 °C, manutenção por 8 min, 15 °C/min até 280 °C, manutenção por 17 min; tempo total de corrida: 35 min.

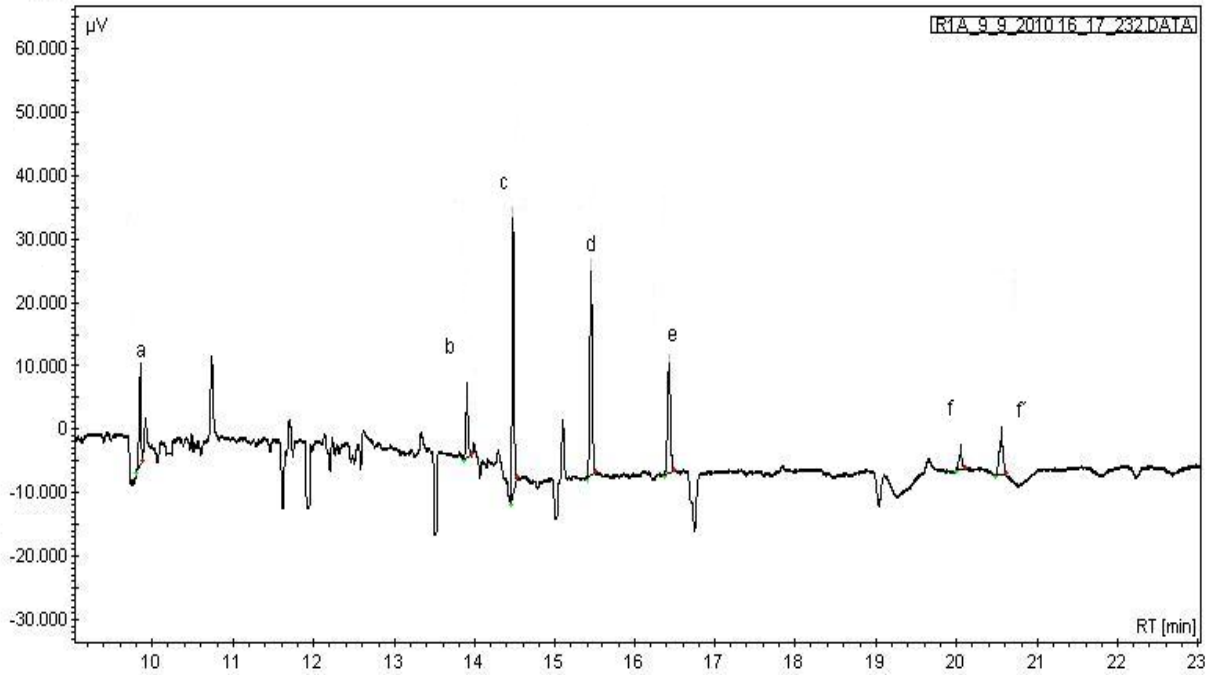


Figura 7 - Cromatograma de recuperação em amostra branca de morango.

(a) Trifluralina, (b) Procimidona, (c) Endossulfam alfa, (d) Endossulfam beta, (e) endossulfam sulfato, (f) Lambda-cialotrina I e (f') Lambda-cialotrina II. Condições cromatográficas: fluxo de nitrogênio de 1,0 mL/min; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector ECD: 300 °C; rampa de temperatura do forno da coluna: 70 °C por 1 min, 30 °C/min até 180 °C, manutenção por 2 min, 15 °C/min até 250 °C, manutenção por 8 min, 15 °C/min até 280 °C, manutenção por 17 min; tempo total de corrida: 35 min.

A comparação dos cromatogramas demonstra a seletividade do método. De maneira semelhante, CARDOSO et al. (2010) também avaliou a seletividade pela análise de amostras brancas adicionadas de padrões de agrotóxicos na análise de γ - HCH, clorotalonil, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona em tomate.

4.3 LINEARIDADE

Os valores dispersos foram detectados e retirados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife para $\alpha = 0,05$. Foram confirmados que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, são independentes e homoscedásticos, permitindo a utilização dos testes de hipóteses de t e F, além do emprego da análise de variância para estimativa da significância da regressão e do desvio da linearidade. Distribuição normal dos resíduos da regressão foi observada pelos coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicando desvios da normalidade não significativos com $p > 0,10$, com exceção do dia 1 para endossulfam sulfato e do dia 2 para endossulfam beta, em que esta probabilidade foi $p > 0,05$. A independência dos resíduos da regressão foi indicada

pelas estatísticas de Durbin-Watson, não se observando autocorrelação significativa para $p > 0,10$. A homoscedasticidade foi observada com estatísticas t de Levene não significativa para $p > 0,05$. Os dados obtidos foram avaliados como bem ajustados ao modelo linear. Significância da regressão ($p < 0,001$) e desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) indicaram que a relação entre as respostas cromatográficas e as concentrações dos agrotóxicos estudados segue modelos lineares nas faixas de concentração estudadas.

Os resultados obtidos nos experimentos para avaliação da linearidade para os organohalogenados estudados estão demonstrados nas Tabelas 9 a 14.

Tabela 9 - Avaliação da linearidade para as três curvas de endossulfam alfa em solvente na faixa de 2,0 a 7,0 ng mL⁻¹.

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
n	16	16	17
<i>Outliers</i> retirados	2	2	1
R	0,9739	0,9646	0,9927
p	> 0,10	> 0,10	> 0,10
d	2,177	1,842	1,633
p	> 0,10	> 0,10	> 0,10
t_L	-0,695	-0,799	-1,630
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
F(1)	576,845	518,205	1688,675
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F(2)	1,642	0,880	1,420
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05

n = número de observações, R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (Normalidades), d = estatística de Durbin-Watson (Independência), t_L = estatística t de Levene (Homoscedasticidade), $F(1)$ = razão entre variâncias (Regressão), $F(2)$ = razão entre variâncias (Desvio da Linearidade), p = significância.

Tabela 10 - Avaliação da linearidade para as três curvas de endossulfam beta em solvente na faixa de 2,0 a 17,0 ng mL⁻¹.

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
n	18	18	16
<i>Outliers</i> retirados	-	-	2
R	0,9744	0,9564	0,9594
p	> 0,10	> 0,05	> 0,10
d	2,367	1,224	2,055
p	> 0,10	> 0,10	> 0,10
t _L	-0,425	-0,454	-0,173
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
F(1)	813,646	367,570	668,207
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F(2)	1,252	2,569	3,380
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (Normalidades), *d* = estatística de Durbin-Watson (Independência), *t_L* = estatística t de Levene (Homoscedasticidade), *F(1)* = razão entre variâncias (Regressão), *F(2)* = razão entre variâncias (Desvio da Linearidade), *p* = significância, - = nenhum *outlier* retirado.

Tabela 11 - Avaliação da linearidade para as três curvas de endossulfam sulfato em solvente na faixa de 5,0 a 40,0 ng mL⁻¹.

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
n	15	14	16
<i>Outliers</i> retirados	3	4	2
R	0,9390	0,9847	0,9750
p	> 0,05	> 0,10	> 0,10
d	2,343	2,334	2,453
p	> 0,10	> 0,10	> 0,10
t _L	-1,549	-1,052	0,022
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
F(1)	356,367	563,68	226,96
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F(2)	1,183	0,819	1,715
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (Normalidades), *d* = estatística de Durbin-Watson (Independência), *t_L* = estatística t de Levene (Homoscedasticidade), *F(1)* = razão entre variâncias (Regressão), *F(2)* = razão entre variâncias (Desvio da Linearidade), *p* = significância.

Tabela 12 - Avaliação da linearidade para as três curvas de lambda-cialotrina em solvente na faixa de 5,0 a 40,0 ng mL⁻¹.

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
n	16	14	15
<i>Outliers</i> retirados	2	4	3
R	0,9633	0,9762	0,9816
p	> 0,10	> 0,10	> 0,10
d	1,900	2,535	1,602
p	> 0,10	> 0,10	> 0,10
t _L *	-1,951	-1,700	-0,415
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
F(1)	265,10	379,98	429,80
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F(2)	1,901	0,321	2,465
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (Normalidades), *d* = estatística de Durbin-Watson (Independência), *t_L* = estatística t de Levene (Homoscedasticidade), *F*(1) = razão entre variâncias (Regressão), *F*(2) = razão entre variâncias (Desvio da Linearidade), *p* = significância.

Tabela 13 - Avaliação da linearidade para as três curvas de procimidona em solvente na faixa de 5,0 a 40,0 ng mL⁻¹.

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
n	16	16	16
<i>Outliers</i> retirados	2	4	3
R	0,9866	0,9602	0,9874
p	> 0,10	> 0,10	> 0,10
d	1,539	1,155	1,654
p	> 0,10	> 0,10	> 0,10
t _L *	-0,350	-0,137	-2,109
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
F(1)	2500,14	1119,30	533,52
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F(2)	3,141	3,468	1,842
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05

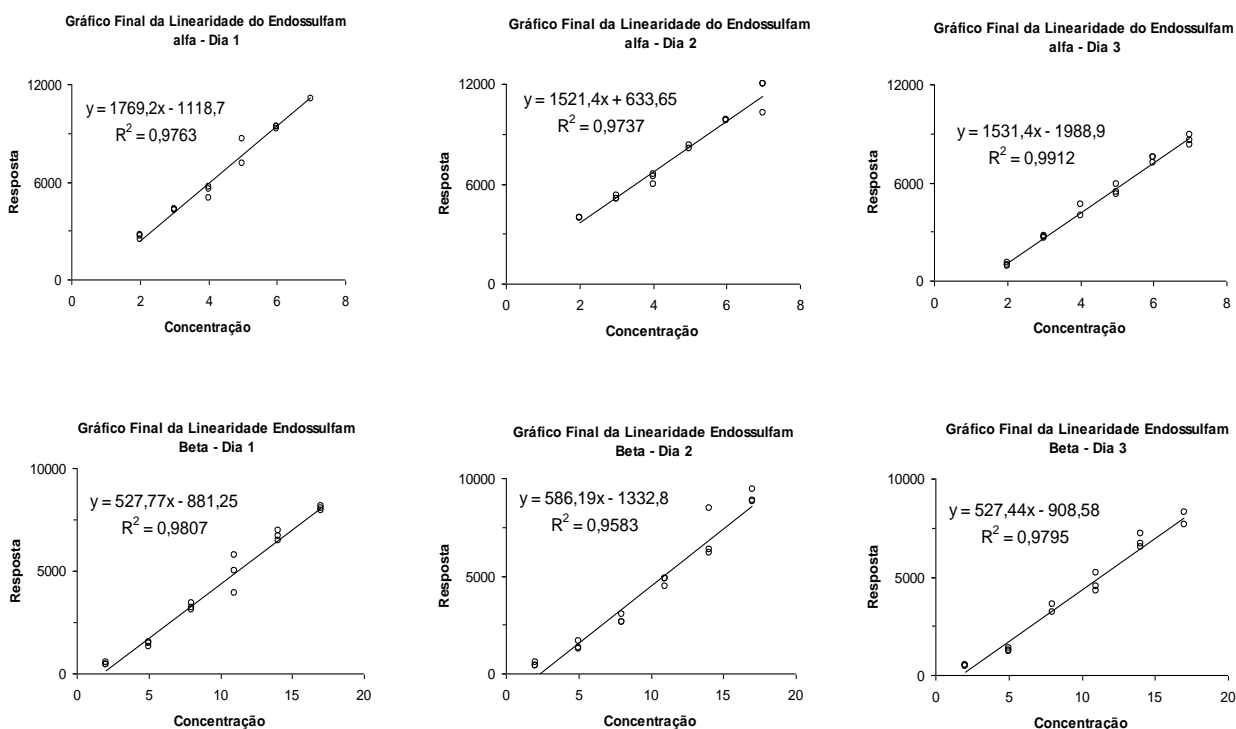
n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (Normalidades), *d* = estatística de Durbin-Watson (Independência), *t_L* = estatística t de Levene (Homoscedasticidade), *F*(1) = razão entre variâncias (Regressão), *F*(2) = razão entre variâncias (Desvio da Linearidade), *p* = significância.

Tabela 14 - Avaliação da linearidade para as três curvas de trifluralina em solvente na faixa de 2,0 a 17,0 ng mL⁻¹.

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
n	18	18	15
<i>Outliers retirados</i>	0	-	3
R	0,9773	0,9581	0,9839
p	> 0,10	> 0,10	> 0,10
d	2,322	1,997	1,507
p	> 0,10	> 0,10	> 0,10
t _L	-0,285	-0,558	-0,181
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05
F(1)	1543,414	1450,432	1336,113
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F(2)	0,411	2,734	3,361
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (Normalidades), *d* = estatística de Durbin-Watson (Independência), *t_L* = estatística t de Levene (Homoscedasticidade), *F*(1) = razão entre variâncias (Regressão), *F*(2) = razão entre variâncias (Desvio da Linearidade), *p* = significância, - = nenhum *outlier* retirado.

As curvas de calibração obtidas nos ensaios de avaliação da linearidade para os analitos estudados estão apresentadas na Figura 8:



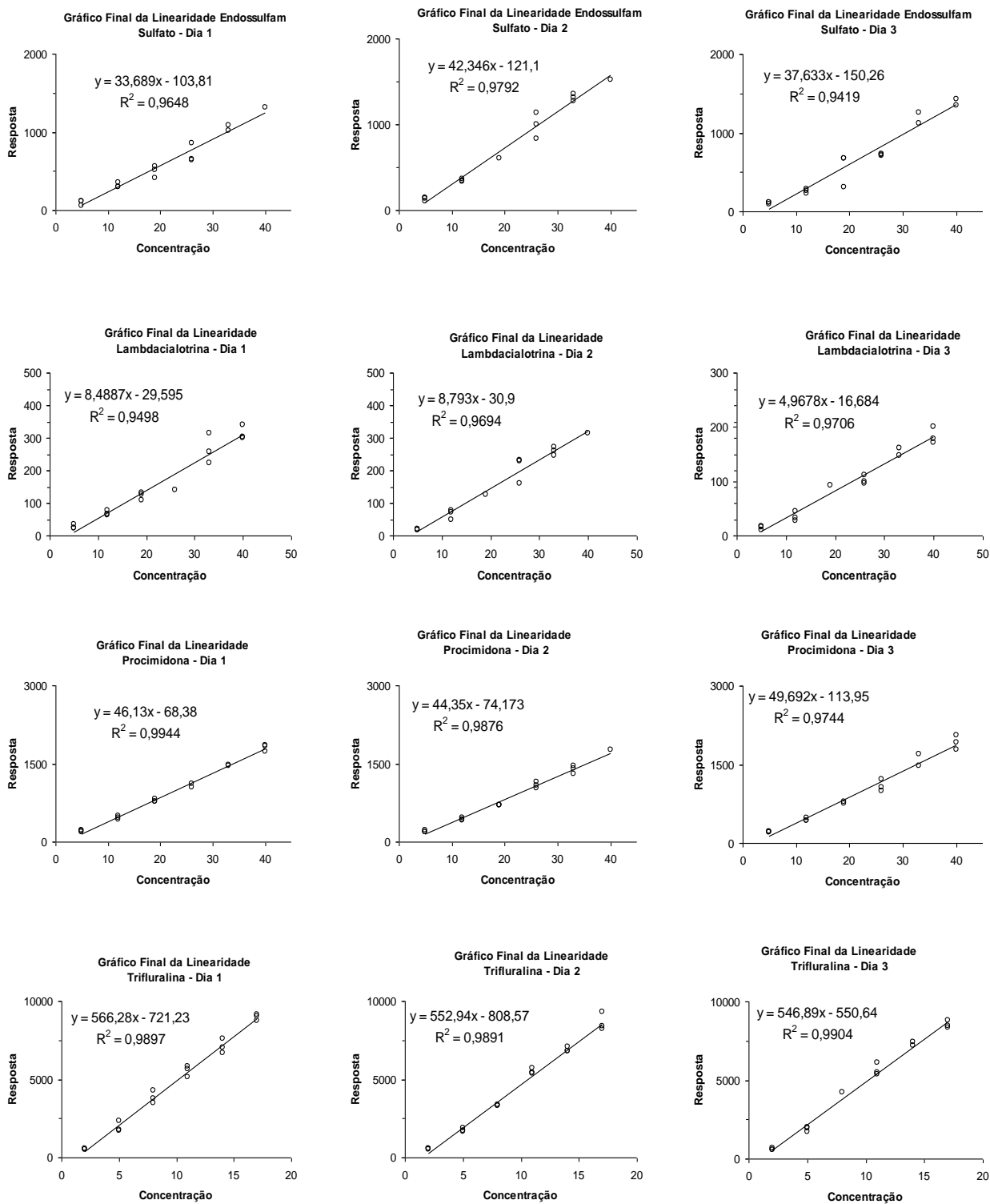


Figura 8 - Curvas de calibração obtidas nos ensaios de avaliação da linearidade, após a retirada dos *outliers*.

Com base apenas no coeficiente de determinação ($r^2 > 0,99$), IMOTO et al., (2004) demonstraram que o método multirresíduos para determinação de compostos

organohalogenados por extração líquido-líquido e determinação por CG-ECD, foi o suficiente para a quantificação dos analitos HCH beta, clorotalonil, endossulfam alfa, endossulfam beta, endossulfam sulfato, tetradifona, trifluralina e vinclozolina em amostras de maçãs, com linearidade na faixa de $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ a $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$. CIESLIK et al. (2010) determinaram a linearidade de 13 agrotóxicos organoclorados, na faixa de 2 ng mL^{-1} a 1000 ng mL^{-1} , utilizando o modelo de regressão de mínimos quadrados com a qualidade do ajuste dado pela correlação de Pearson (r) com todos os valores sendo maiores que 0,9944. Em um método de análise de fungicidas, dentre eles a procimidona, por CG-ECD a linearidade foi determinada na faixa de 10 a 1000 ng mL^{-1} com coeficiente de correlação entre 0.9987 e 0.9999 (Qi, 2010).

Apesar de serem amplamente utilizados os coeficientes de determinação e de correlação não são adequados para demonstrar linearidade (THOMPSON et al., 2002). Tais coeficientes indicam o grau de ajuste dos dados à curva. Se os pontos de uma calibração estiverem bem ajustados à curva, o valor experimental do coeficiente de determinação será próximo de um, mas um valor próximo de um não é necessariamente resultado de uma relação linear (RSC, 2005; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Embora tenha mencionado o coeficiente de Pearson e o coeficiente de determinação em seu trabalho CARDOSO et al. (2010) não os utilizam isoladamente. Além de checar esses coeficientes eles determinaram a existência de valores dispersos pelo teste de Grubbs, a homogeneidade dos resíduos pelo teste de Cochran, a significância da regressão e desvio da linearidade por análise da variância utilizando ANOVA. A linearidade em seu trabalho foi determinado na faixa de 3 ng mL^{-1} à 400 ng mL^{-1} para o clorotalonil, fenitrotiona e clorpirifós e de 4 ng mL^{-1} à 497 ng mL^{-1} para a procimidona.

A ausência de critérios apropriados na avaliação da linearidade pode resultar em determinação de faixas de operação aparentemente amplas, mas não necessariamente lineares (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

4.4 EFEITO DO DIA

Complementando o estudo da linearidade foi realizado a avaliação do efeito do dia para confirmar se as curvas de calibração apresentam as mesmas respostas em diferentes dias. Os valores de t e p demonstraram que houve diferenças significativas ($p < 0,01$) tanto para as interseções, quanto para as inclinações ($p < 0,001$), conforme

as Tabelas 15 e 16. Para alguns valores de t e p houve diferença significativa para a inclinação, porém a significância foi de $p < 0,05$.

Tabela 15 - Avaliação do efeito dia com três curvas de linearidade da solução padrão em solvente.

Estatística	Analito					
	Endossulfam alfa	Endossulfam beta	Endossulfam sulfato	Lambda-cialotrina	Procimidona	Trifluralina
Inclinação						
$t_{(Y1)}$	2,86	1,75	2,83	$4,93 \times 10^{-1}$	$7,77 \times 10^{-1}$	$6,51 \times 10^{-1}$
p	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
$t_{(Y2)}$	1,57	$9,77 \times 10^{-1}$	$1,53 \times 10^{-1}$	7,14	2,35	$7,04 \times 10^{-1}$
p	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p > 0,05$
Interseção						
$t_{(Y1)}$	1,20	1,26	$2,47 \times 10^{-1}$	$8,67 \times 10^{-2}$	$1,06 \times 10^{-1}$	$3,95 \times 10^{-1}$
p	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
$t_{(Y2)}$	3,20	$6,22 \times 10^{-1}$	$6,43 \times 10^{-1}$	1,05	$9,09 \times 10^{-1}$	1,09
p	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

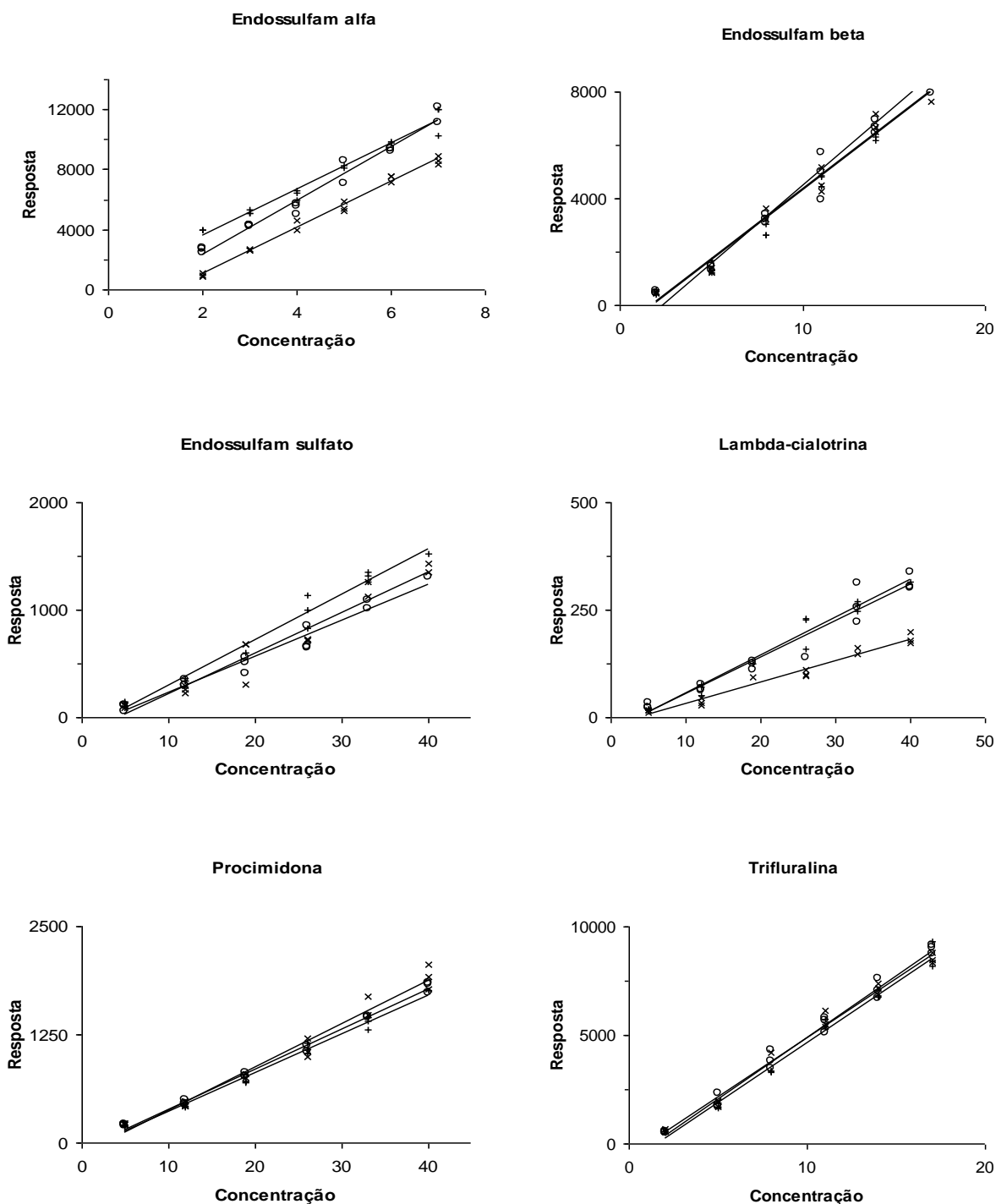
$t_{(Y1)}$ = estatística t para contraste ($Y_1 = dia_1 - dia_2$);
 $t_{(Y2)}$ = estatística t para contraste ($Y_2 = dia_1 + dia_2 - 2 dia_3$); p = significância.

Tabela 16 - Avaliação do efeito dia com três curvas de linearidade da solução padrão em extrato de matriz (morango).

Estatística	Analito					
	Endossulfam alfa	Endossulfam beta	Endossulfam sulfato	Lambda-cialotrina	Procimidona	Trifluralina
Inclinação						
$t_{(Y1)}$	$7,52 \times 10^{-1}$	$8,69 \times 10^{-1}$	1,88	2,02	1,10	2,84
p	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,01$
$t_{(Y2)}$	$1,81 \times 10^{-1}$	$9,35 \times 10^{-1}$	1,08	1,76	$7,35 \times 10^{-1}$	7,02
p	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,001$
Interseção						
$t_{(Y1)}$	$4,79 \times 10^{-1}$	1,76	$6,27 \times 10^{-1}$	$1,88 \times 10^{-1}$	1,57	1,96
p	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
$t_{(Y2)}$	1,19	1,31	$9,74 \times 10^{-1}$	$2,48 \times 10^{-1}$	$1,50 \times 10^{-1}$	$3,23 \times 10^{-1}$
p	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

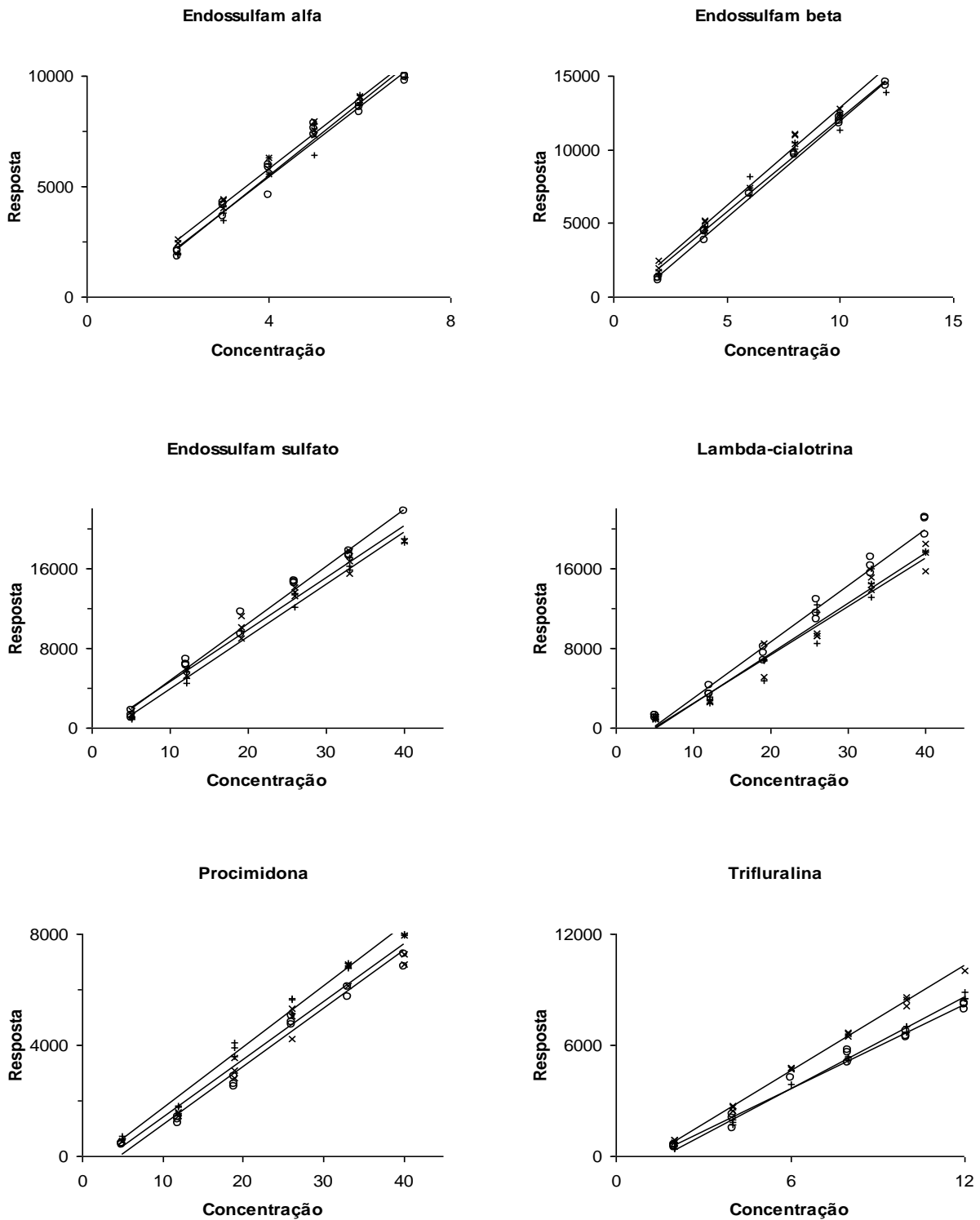
$t_{(Y1)}$ = estatística t para contraste ($Y_1 = dia_1 - dia_2$);
 $t_{(Y2)}$ = estatística t para contraste ($Y_2 = dia_1 + dia_2 - 2 dia_3$); p = significância.

Com os resultados apresentados nas Tabelas 15 e 16 e as curvas de padrões em solvente e em matriz, Figuras 9 e 10, observa-se que as respostas não são as mesmas nos dias avaliados, logo, as curvas de padrões não poderão ser utilizadas em dias diferentes para a quantificação de resíduos de agrotóxicos organohalogenados.



0: Dia 1; +: Dia 2 e x: Dia 3

Figura 9 - Comparação das curvas de calibração das soluções padrões de agrotóxicos organohalogenados preparadas no solvente, obtidas em três dias.



0: Dia 1; +: Dia 2 e x: Dia 3

Figura 10 - Comparação das curvas de calibração das soluções padrão de agrotóxicos organohalogenados preparadas no extrato da matriz, obtidas em três dias.

4.5 EFEITO DE MATRIZ

Como descrito na avaliação da linearidade, foram detectados os resultados dispersos e verificadas as premissas relativas ao MMQO para as curvas dos analitos em solvente e em matriz. Com exceção da lambda-cialotrina, as variâncias dos resíduos das curvas eram homogêneas e as inclinações e interseções foram comparadas pelo teste de t. No primeiro caso, o teste empregado foi o teste de t' , considerando variâncias distintas.

As comparações entre as curvas em solvente e em matriz, apresentadas na Tabela 17, evidenciou que a lambda-cialotrina e o endossulfam sulfato apresentaram diferenças significativas para a inclinação, o endossulfam alfa para a interseção e os demais analitos não apresentaram nenhum tipo de efeito de matriz.

Tabela 17 – Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz morango.

Estatística	Analito					
	Endossulfam alfa	Endossulfam beta	Endossulfam sulfato	Lambda-cialotrina*	Procimidona	Trifluralina
F	2,368	1,516	1,407	5,238	2,021	1,286
F _{crit}	2,637	2,637	2,577	2,604	2,617	2,463
Inclinação						
t _(b)	1,670	0,164	5,161	9,939	1,752	1,195
p	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,001	p < 0,001	p > 0,05	p > 0,05
t _{crit}	2,056	2,045	2,056	2,120	2,052	2,045
Interseção						
t _(a)	2,096	0,573	1,260	0,596	0,210	0,085
p	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
t _{crit}	2,056	2,045	2,056	2,120	2,052	2,045

t_a = estatística t para contrastes entre interseções, t_b = estatística t para contrastes entre inclinações, t_{crit} = t crítico, p = significância, F = estatística F de Snedecor & Cochran, F_{crit} = F crítico.

*para a lambda-cialotrina foi usado o teste de t para variâncias distintas. t'_a = estatística t para contrastes entre interseções, t'_b = estatística t para contrastes entre inclinações.

Verificou-se que as curvas dos analitos em solvente não fornecem as mesmas respostas que as curvas dos analitos em matriz, nas mesmas faixas de concentração, caracterizando o efeito de matriz. Segundo a literatura, este fato sugere que componentes da matriz presentes na amostra podem bloquear os sítios ativos no

injetor e desse modo prevenir possível degradação e adsorção de analitos nessa câmara de vaporização. Conseqüentemente a quantidade de analito que entra na coluna é maior em amostras contendo a matriz do que em solvente puro. O efeito da matriz pode gerar sérios problemas analíticos, devido à possível super ou subestimação da concentração dos analitos (ZROSTLÌKOVÁ et al., 2001; ANASTASSIADES et al., 2003; POOLE, 2007; PINHO et al., 2009).

PRZYBYLSKI & HOMMET (2008) fizeram uma comparação entre o coeficiente angular das curvas analíticas obtidas a partir de soluções padrão de 12 agrotóxicos preparadas em solvente e em extratos de cenoura, alimento infantil, feijão verde, batata e ervilha. Os resultados indicaram que o efeito de matriz quantificado pelos coeficientes angulares das curvas analíticas (razão entre coeficiente angular matriz/solvente) pode ser positivo (razão > 1) ou negativo (razão < 1), dependendo das características dos agrotóxicos e da complexidade da matriz em análise por cromatografia gasosa.

CARDOSO et al. (2008) testaram o efeito de matriz para cinco agrotóxicos e confirmaram que os organofosforados, clorpirifós e fenitrotiona, apresentaram o efeito, enquanto o HCH gama, clorotalonil e a procimidona não apresentaram o efeito de matriz. Confirmando esse estudo a procimidona também não apresentou efeito de matriz no atual experimento.

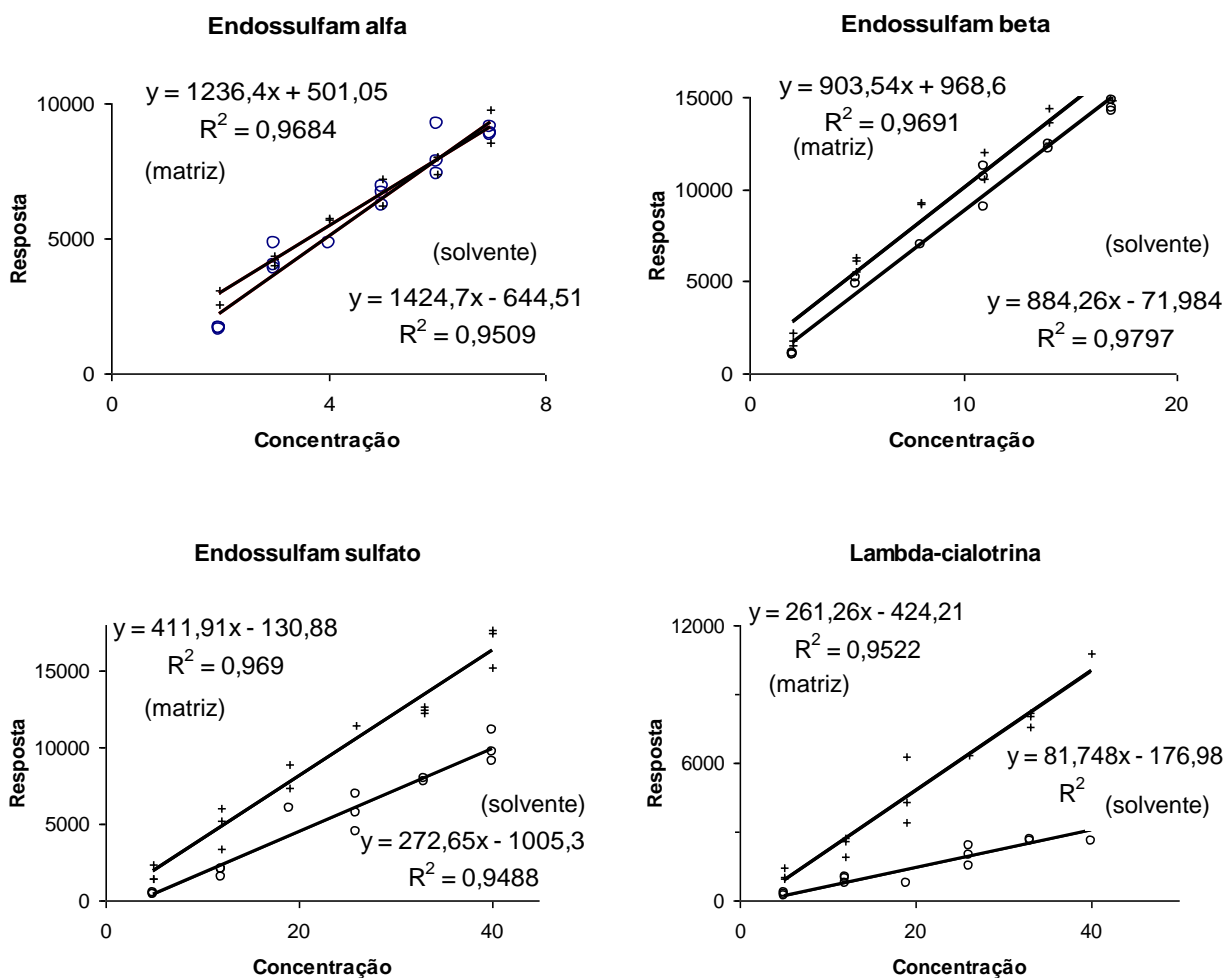
Foi observado por PINHO et al. (2009) que compostos hidrofóbicos, como os agrotóxicos organoclorados, não apresentam efeito de matriz pronunciado por serem menos susceptíveis à adsorção pelos sítios ativos do *liner*. Os piretróides, apesar de serem menos polares, apresentam efeito de matriz significativo, devido, a sua elevada massa molar (acima de 400 g mol^{-1}) que dificulta a volatilização e menor quantidade de analito é introduzida na coluna cromatográfica quando preparado em solvente puro, produzindo menores respostas. No presente trabalho testou-se o efeito de matriz do composto piretróide lambda-cialotrina confirmando o experimento de PINHO et al. (2009), porém dentre os três organoclorados estudos dois apresentaram efeito de matriz contradizendo o referido estudo. Compostos contendo grupamentos -P=O (organofosforados), -O-CO-NH- (carbamatos), -OH (hidroxilados), -N= (imidazoles e benzimidazoles), -NH-CO-NH- (derivados da uréia) são mais susceptíveis ao efeito de matriz.

Para minimizar a influência dos componentes da matriz na quantificação de agrotóxicos são utilizadas estratégias como limpeza dos extratos, injeção no topo da coluna e injeção com temperatura programada de vaporização. Também existem os procedimentos que promovem a compensação da ocorrência do efeito de matriz como

a utilização de analitos protetores, método de adição de padrão e curva analítica preparada pela dissolução dos padrões em extratos da matriz (ANASTASSIADES et al., 2003; PINHO et al., 2010). Sendo a estratégia mais eficaz a utilização de curva analítica preparada pela dissolução dos padrões em extratos da matriz (ZROSTLÌKOVÁ et al., 2001), sendo o procedimento adotado neste trabalho, ou o uso de analitos protetores (POOLE, 2007).

No presente trabalho todas as concentrações dos analitos nas amostras adicionadas foram calculadas pelas equações das curvas de calibração na matriz, mesmo para os analitos que não apresentaram o efeito de matriz, pois não há necessidade de se preparar duas curvas de calibração, em solvente e na matriz, e experiências têm demonstrado que o efeito de matriz varia de um dia para outro durante o uso do método (AMBRUS, 2000).

A Figura 11 apresenta os gráficos relativos às curvas de calibração preparadas em solvente e em matriz.



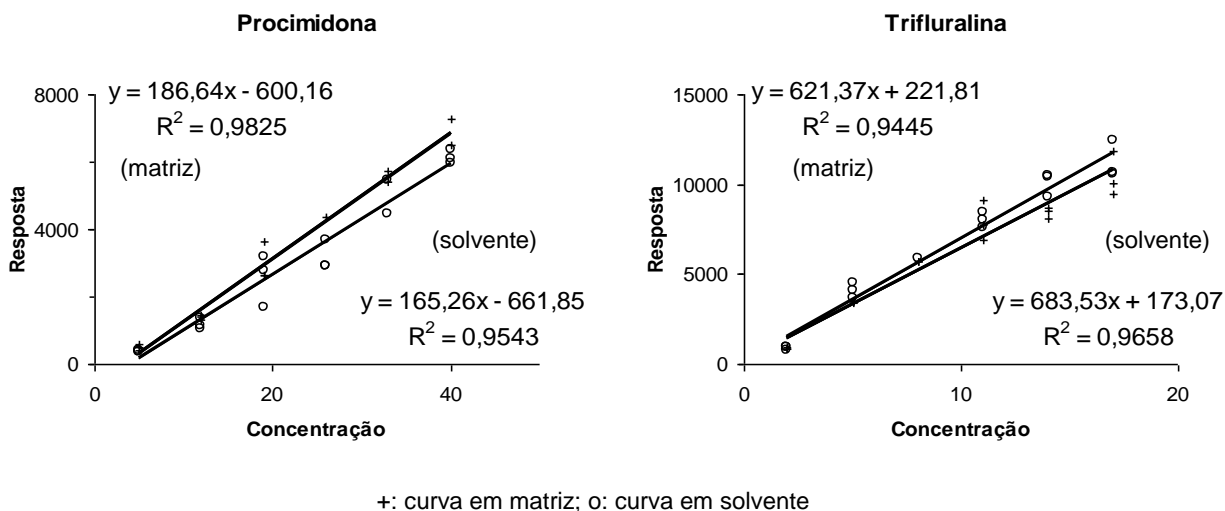


Figura 11 - Gráfico final das curvas de calibração preparadas em solvente e matriz.

4.6 RECUPERAÇÃO E PRECISÃO

Os resultados de recuperação obtidos, Tabela 18, foram analisados quanto à presença de valores dispersos. A distribuição normal dos resíduos foi observada indicando desvios da normalidade não significativos com $p > 0,10$ e homoscedasticidade com $p > 0,05$, permitindo a estimativa de desvios padrão relativos de repetitividade (DPR_r) e desvios padrão de reprodutibilidade parcial (DPR_R) por análise de variância sem ponderação.

Tabela 18 – Médias de recuperação, desvios padrão relativo, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de morango adicionadas de resíduos de organohalogenados em diferentes níveis de concentração.

Analito	Concentração (mg kg ⁻¹)	MR (%)	DPR _r (%)	DPR _R (%)
Endossulfam Alfa	0,005	78,06	20,98	20,98
	0,008	88,04	4,90	13,42
	0,019	82,93	2,65	8,41
Endossulfam Beta	0,005	88,34	9,40	17,07
	0,011	92,20	6,60	12,57
	0,032	81,85	1,63	6,43
Endossulfam Sulfato	0,013	83,94	19,91	19,91
	0,032	89,86	14,18	17,68
	0,107	76,70	4,66	10,10
Lambda-cialotrina	0,013	115,41	4,04	13,09
	0,032	81,79	6,19	13,61
	0,107	74,59	12,78	12,85
Procimidona	0,013	101,52	4,73	13,94
	0,032	82,98	6,42	7,35
	0,107	85,14	3,41	10,22
Trifluralina	0,005	108,93	5,86	5,86
	0,011	99,89	7,33	9,23
	0,032	91,65	4,15	6,08

MR = média de recuperação, DPR_r = desvio padrão relativo de repetitividade, DPR_R = desvio padrão relativo de reprodutibilidade parcial.

Médias de recuperação aceitáveis foram atingidas para todos os analitos avaliados. Entretanto, DPR_r e DPR_R acima de 20 % foram observados para o endossulfam alfa no nível 0,005 mg kg⁻¹. Estes resultados sinalizaram exatidão e precisão do método validado nas faixas de 0,005 mg kg⁻¹ à 0,032 mg kg⁻¹ para endossulfam beta e trifluralina, 0,013 mg kg⁻¹ à 0,107 mg kg⁻¹ para endossulfam sulfato, lambda-cialotrina e procimidona e de 0,008 mg kg⁻¹ à 0,019 mg kg⁻¹ para endossulfam alfa, considerando os critérios de aceitabilidade determinados. Neste trabalho as análises de recuperação foram repetidas 12 vezes sendo três repetições por dia em quatro diferentes dias. As médias de recuperação variaram entre 74,59 % e 115,41 %, com DPR_r variando entre 1,63 % e 20,98 % e DPR_R de 5,86 % a 20,98 %.

Não considerando os valores de 20,98 %, pois excederam os limites determinados pela EUROPEAN COMMISSION (2010), o maior valor de DPR_r e DPR_R foi de 19,91 %.

Segundo COLUMÉ et al. (2001), em morango, a recuperação para a lambda-cialotrina no nível de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ foi de 91 % com um desvio padrão relativo (DPR) de 4 % obtidas da média de 6 replicatas. Para outros piretróides a faixa de recuperação na concentração de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ foi de 66 % (encontrado para a bifentrina) a 91 % com um DPR entre 2 % e 7 %. LENTZA-RIZOS et al. (2001) estudaram a recuperação de endossulfam e seus metabólitos e de mais cinco piretróides, dentre eles a lambda-cialotrina, em amostra de azeite utilizando CG-DCE. Recuperações de 71 % a 91 % com DPR de 6 % a 17 % foram relatados, sendo que cada análise da recuperação foi repetida cinco vezes. IMOTO et al. (2004) encontraram médias de recuperação para o endossulfam alfa, endossulfam beta, endossulfam sulfato e trifluralina em maçã no nível $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ obtidas de cinco replicatas, de 99 %, 94 %, 92 % e 81 %, respectivamente, com coeficiente de variação (CV) de 13,0 %, 12,5 %, 12,5 % e 14,0 %.

HERNÁNDEZ et al. (2006) calcularam a precisão de um método multirresíduo por meio de experimentos de recuperação em dois níveis de concentração, $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em quintuplicata em cada nível, para as matrizes tomate, limão, abacate e passas. A maioria dos resultados obtidos para as recuperações foram entre 70 % e 110 % com CV abaixo de 15 %. Nesta validação a maioria dos resultados de recuperação foram entre 80 % e 100 % e os valores de DPR também foram abaixo de 15 %.

Trabalhando com organoclorados CIÉSLIK et al. (2010), para concentração de $0,008 \text{ mg kg}^{-1}$ em amostras de damasco, nectarina, cereja, ameixa, maçã, pêra e marmelo encontraram médias de recuperação de 71 % a 172 %. O DPR variou de 1,1 % a 38,9 %. MENEZES et al. (2010) determinaram a precisão do método avaliando sua repetitividade realizada em sete extrações no mesmo dia e em mais três extrações por dia durante 5 dias. No primeiro caso o CV foi menor que 17,05 % e no segundo caso variou de 7,04 % a 22,03 %. BERRADA et al. (2010) determinaram a exatidão do método pela avaliação de sua recuperação em dois níveis, $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$, com médias entre 56 % e 97 %. A precisão foi realizada pelo cálculo do DPR de cinco replicatas no mesmo dia e em dias diferentes sendo o resultado entre 5 % e 18 % para as replicatas intra dia e menor que 19 % para as que foram realizadas em dias diferentes.

CARDOSO et al. (2010) trabalhando com ELL, curva de calibração em extrato da matriz e determinação por CG-DCE, encontraram médias de recuperação de 76 % a 110 % com CV de 2 % a 4 % para o analito procimidona em amostras de tomate nos níveis $0,025 \text{ mg kg}^{-1}$, $0,100 \text{ mg kg}^{-1}$ e $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ obtidas de 6 replicatas. Para outros compostos halogenados no referido trabalho, a faixa de recuperação foi de 72 % a 99 % com CV entre 4 % e 15 %. O método de análise e as faixas de recuperação foram semelhantes ao do presente estudo.

4.7 LIMITES DE DETECÇÃO, DE QUANTIFICAÇÃO, DE DECISÃO E CAPACIDADE DE DETECÇÃO

Os valores de LD dos analitos organohalogenados estudados para a matriz morango foram determinados pela detecção dos mesmos em amostras adicionadas com médias de sinal/ruído ≥ 3 em relação à amostra branca. Os resultados estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Limites de detecção dos organohalogenados estudados na matriz morango.

Analito	LD (mg kg^{-1})
Endossulfam alfa	0,003
Endossulfam beta	0,003
Endossulfam sulfato	0,007
Lambda-cialotrina	0,007
Procimidona	0,007
Trifluralina	0,003

Os valores encontrados na validação do presente trabalho estão próximos dos valores da literatura. ZAWIYAH et al. (2007) determinaram o LD de seis organoclorados e de três piretróides na faixa de $0,003 \text{ mg kg}^{-1}$ a $0,015 \text{ mg kg}^{-1}$, em amostras de uva, utilizando a relação sinal/ruído maior que 3. Segundo CARDOSO et al. (2010), os LD em amostras de tomate para o clorotalonil e a procimidona foram de $0,006 \text{ mg kg}^{-1}$, para fenitrotiona e HCH gama de $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ e para o clorpirifós de $0,004 \text{ mg kg}^{-1}$, os limites foram calculados com base no método da relação sinal/ruído e foram realizadas seis injeções para sua determinação. MENEZES et al. (2010) determinaram o LD do

método para determinação de resíduos de agrotóxicos em manga na faixa de 0,001 mg kg⁻¹ a 0,033 mg kg⁻¹, porém não foi mencionado como foram calculados os limites.

O LQ correspondente ao menor nível de concentração nos quais os experimentos indicaram exatidão e precisão aceitáveis. Os valores determinados de LQ estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 – Limites de quantificação dos organohalogenados estudados na matriz morango.

Analito	LQ (mg kg ⁻¹)
Endossulfam alfa	0,008
Endossulfam beta	0,005
Endossulfam sulfato	0,013
Lambda-cialotrina	0,013
Procimidona	0,013
Trifluralina	0,005

Apesar de possuir uma faixa de linearidade mais estreita o LQ determinado no presente estudo é menor do que dos trabalhos aqui apresentados. IMOTO et al. (2004) utilizando ELL e determinação por CG-DCE, obtiveram exatidão e precisão, e uma relação sinal/ruído maior que 10, para compostos organohalogenados na concentração de 0,02 mg kg⁻¹. HERNÁNDEZ et al. (2006) determinaram 0,01 mg kg⁻¹ sendo o LQ de um método multirresíduos pois foi a menor concentração que apresentou recuperação e precisão satisfatórias em seu experimento para todas as matrizes testadas utilizando-se CLAE-EM-EM. O LQ determinado no experimento de Zawiyah et al. (2007) variou na faixa de 0,01 mg kg⁻¹ a 0,05 mg kg⁻¹.

Os resultados dos cálculos de CC α e CC β encontrados para os analitos estudados estão representados na Tabela 21.

Tabela 21 – Limite de decisão e capacidade de detecção para os analitos estudados na matriz morango.

Analito	CC α (mg kg ⁻¹)	CC β (mg kg ⁻¹)
Endossulfam alfa	0,003	0,005
Endossulfam beta	0,004	0,006
Endossulfam sulfato	0,025	0,042
Lambda-cialotrina	0,538	0,581
Procimidona	3,128	3,266
Trifluralina	0,004	0,006

GARCÍA-CHAO et al. (2010) realizaram a validação de inseticidas sistêmicos em mel. No trabalho o cálculo de CC α e CC β foi baseado em curvas de calibração encontrando valores entre 0,41 mg kg⁻¹ e 2,33 mg kg⁻¹ para o CC α e entre 0,83 mg kg⁻¹ e 4,83 mg kg⁻¹ para o CC β . No presente trabalho a forma de cálculo dos parâmetros foi semelhante ao dos pesquisadores, porém os limites determinados no presente estudo foram menores.

4.8 OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOHALOGENADOS EM MORANGO

Foram analisadas 75 amostras de morango no ano de 2010, das quais 57 (76 %) apresentaram no mínimo um resíduo de agrotóxico. Dessas, 47 estavam contaminadas por agrotóxicos organohalogenados. Algumas amostras chegaram a apresentar até cinco resíduos de agrotóxicos. Três amostras estavam em desacordo com a legislação, uma por apresentar resíduo de agrotóxico acima do LMR e duas por conterem resíduos não autorizados para a cultura (Figura12).

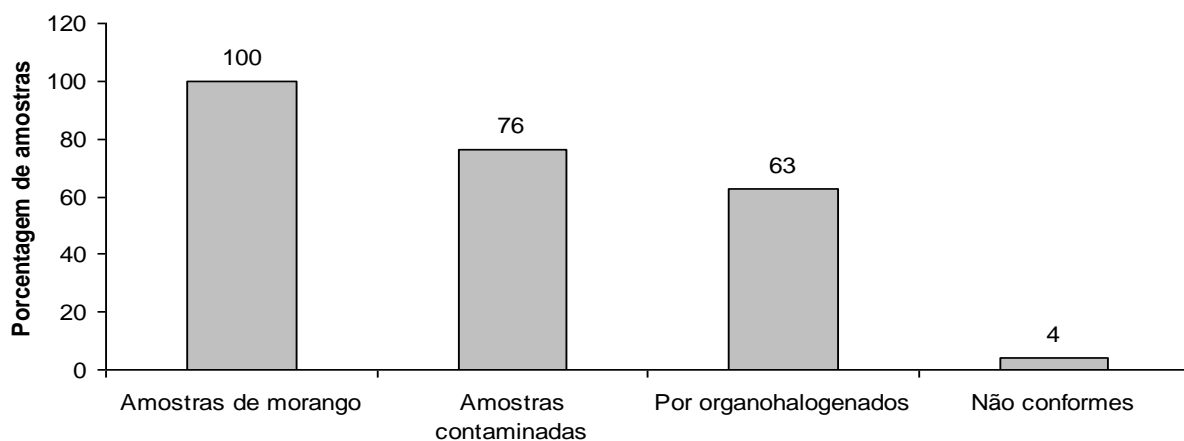


Figura 12 – Porcentagem de amostras de morango com resíduos de agrotóxicos.

Além da pesquisa de agrotóxicos organohalogenados foram analisados também outros grupos como os organofosforados e os ditiocarbamatos. Dentre as amostras não conformes uma apresentou resíduo de clorfenapir na concentração de $0,303 \text{ mg kg}^{-1}$. O clorfenapir é um análogo de pirazol, de classe II, que contém flúor, bromo e cloro em sua molécula e não é autorizado para a cultura de morango. Outro agrotóxico não autorizado para a cultura e detectado no estudo foi o organofosforado parationa metílica na concentração de $0,012 \text{ mg kg}^{-1}$. A parationa metílica é extremamente tóxica, classe I. E o analito que teve a sua concentração acima do limite permitido foi o halogenado difeconazole, do grupo dos triazóis. O difeconazole é extremamente tóxico, classe I e possui cloro em sua molécula. O seu LMR permitido para a cultura de morango é de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ e a concentração encontrada desse analito variou de $0,171 \text{ mg kg}^{-1}$ a $1,243 \text{ mg kg}^{-1}$.

Entre os analitos pesquisados no atual trabalho foram encontrados nas amostras de morango apenas a procimidona e a lambda-cialotrina. A procimidona foi encontrada em 35 amostras numa faixa de concentração entre $0,016 \text{ mg kg}^{-1}$ e $3,000 \text{ mg kg}^{-1}$. A menor concentração encontrada é maior que o LQ e a amostra que apresentou a concentração de $3,000 \text{ mg kg}^{-1}$ não foi considerada não conforme pois a concentração apresentada foi menor que o CC α determinado. A faixa de concentração encontrada das 12 amostras que apresentaram lambda-cialotrina variou entre $0,013 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,150 \text{ mg kg}^{-1}$. Não foram constatadas nenhuma irregularidade para esses analitos. Outros ingredientes ativos encontrados estão descritos na Figura 13, sendo que nenhuma irregularidade foi constatada para esses agrotóxicos.

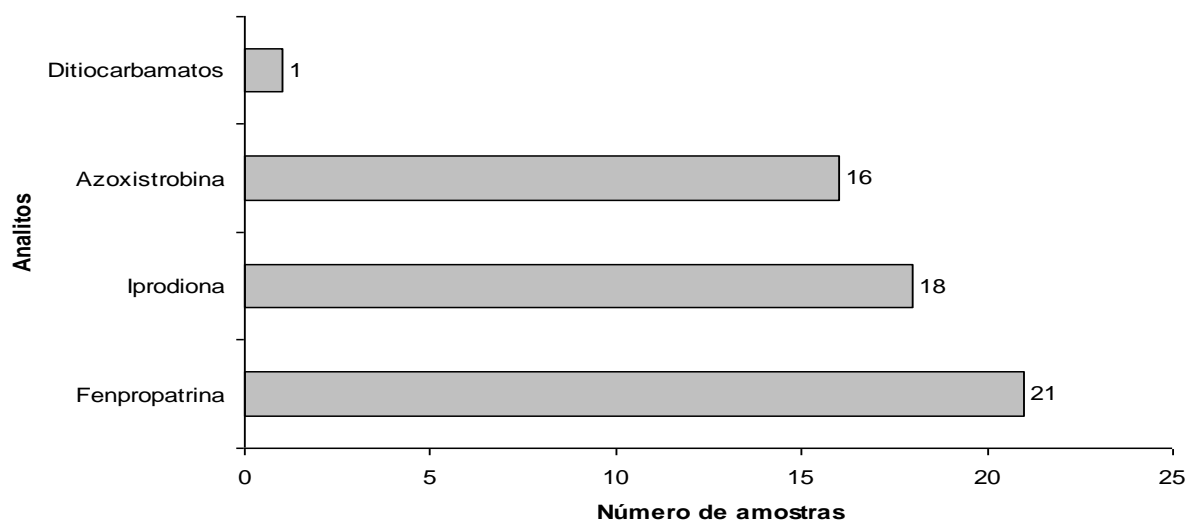


Figura 13 – Número de amostras de morango com resíduos de agrotóxicos.

AMARAL et al. (2009) realizaram a análise de 15 amostras de morango, no ano de 2008, sendo que 13 (86,7 %) estavam contaminadas e sete (46,7 %) estavam em desacordo com a legislação, seis por apresentarem resíduos de agrotóxicos não autorizados e uma por apresentar resíduo acima do LMR. AMARAL et al. (2010) realizaram em 2009 86 amostras de morango sendo que 11 (12,8 %) apresentaram resíduos não autorizados para a cultura. Não foi constatada nenhuma irregularidade por presença de agrotóxicos acima do limite máximo permitido. A grande maioria das irregularidades é referente ao uso de agrotóxicos não autorizados para a cultura. Para as amostras realizadas no estado de Minas Gérias está sendo evidenciado uma diminuição das infrações de acordo com os resultados obtidos.

5 CONCLUSÕES

O procedimento utilizado foi adequado para validação intralaboratorial do método de multirresíduos de organohalogenados em matriz de morango. Os parâmetros de desempenho avaliados indicaram adequação do método para uso na análise de resíduos de agrotóxicos organohalogenados em morango e culturas similares, atendendo aos limites regulamentados pelo ANVISA.

O método foi seletivo para os analitos avaliados. Faixas de operação lineares foram obtidas. Houve comprovação de efeito do dia nos estudos linearidade. Comprovou-se o efeito de matriz para a lambda-cialotrina, o endossulfam sulfato e o endossulfam alfa na cultura estudada, porém não houve evidência de efeito de matriz para o endossulfam beta, a procimidona e a trifluralina.

O método apresentou recuperação e precisão aceitáveis nos níveis estudados, com exceção do endossulfam alfa em que o método não foi repetitivo e nem reprodutivo no nível de adição de $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$. As porcentagens de recuperação variaram de 74,59 % a 115,41 %, com desvios padrão de repetitividade e reprodutibilidade parcial entre 1,63 % e 20,98 % e entre de 5,86 % a 20,98 %, respectivamente.

Foram estabelecidos limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção para os analitos variando entre $0,003 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,007 \text{ mg kg}^{-1}$; $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,013 \text{ mg kg}^{-1}$; $0,003 \text{ mg kg}^{-1}$ e $3,128 \text{ mg kg}^{-1}$; e $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ e $3,266 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

Das 75 amostras de morango analisadas no ano de 2010, três estavam em desacordo com a legislação, uma por apresentar resíduo de agrotóxico acima do LMR e duas por conterem resíduos não autorizados para a cultura.

6 SUGESTÕES

- Aplicar o protocolo de validação trabalhado para outros grupos de matrizes representativas.
- Validar métodos de ensaio para outros grupos de agrotóxicos.
- Manter e ampliar os programas de monitoramento de resíduos.
- Ampliar os grupos de agrotóxicos pesquisados nos estudos de ocorrência de resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas.
- Treinar produtores, como forma de disciplinar as boas práticas agrícolas e garantir melhor saúde dos consumidores e trabalhadores rurais.
- Com auxílio dos resultados orientar consumidores, comerciantes e produtores quanto ao consumo do alimento seguro e do uso correto dos agrotóxicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2ª ed., 31p. 2005.
- ALMEIDA, V.; PIGNATI, W.; GONZAGA, A. Uso de agrotóxicos em hortaliças no estado do Mato Grosso e suas implicações à vigilância ativa em saúde e ambiente. Revista Brasileira de Toxicologia, v. 22, p. 52, 2009.
- AMARAL, E.H.; ALTOÉ, I.M.F.F. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos no morango de Minas Gerais. In: Carvalho, S. P. (Cord.). Boletim do Morango, cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico. Belo Horizonte, p.137-142, 2006.
- AMARAL, E.H. Resíduos de agrotóxicos organofosforados: validação de métodos de cromatografia a gás e quantificação em produtos agrícolas. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 134 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- AMARAL, E. H.; SOARES, A. A.; CARVALHO, I. R.; SOUSA, L. A. F.; CARVALHO, R. D. E.; Análise de resíduos de agrotóxicos em hortícolas no estado de Minas Gerais. XVI Encontro Nacional e II Congresso Latino-Americano de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte, 2009.
- AMARAL, E.H.; SOARES, A. A.; CARVALHO, I. R.; SOUSA, L. A. F. Resíduos de agrotóxicos em hortícolas produzidas em Minas Gerais no ano de 2009. XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Ciência e Tecnologia de Alimentos: Potencialidades, Desafios e Inovações, Salvador, p. 824, 2010.
- AMBRUS, A. Worked example for validation of a multi-residue method. In: FAJGELP, A.; AMBRUS, A. Principles and practices of method validation. Workshop on the principles and practices of method validation, nov. 1999, Budapest, Hungary. Royal Society of Chemistry, n. 256, p. 157-175, 2000.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetone extraction/partitioning and

- “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v. 86, p. 412-431, 2003.
- 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. *Analytica Chimica Acta*, v. 483, p. 325-334, 2003.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos. Relatório de Atividades de 2001 – 2007. 16 junho de 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2010.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos. Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008. 15 de abril de 2009. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2010. (a)
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Ascom/Assessoria de Imprensa da Anvisa. Agrotóxicos: Agência discute o controle de resíduos no Senado. 25 de novembro de 2009. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2010. (b)
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Reavaliação de Produtos Agrotóxicos – 2009. Nota técnica: reavaliação toxicológica do ingrediente ativo endossulfam. 2009. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 18 de fevereiro de 2010. (c)
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2009. 22 junho de 2010. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>>. Acesso em 28 de outubro de 2010.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Monografias de Produtos Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografia/index.htm>>. Atualizado em 17.08.2011. Acesso em 12 setembro 2011.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST). AOAC Peer Verified Methods Program. Manual on Policies and Procedures. AOAC International, Arlington, 35p, 1998.

BERRADA, H.; FERNÁNDEZ, M.; RUIZ, M. J.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J.; FONT, G. Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months (2004/05). Food Control, v. 21, p. 36–44, 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985. Diário Oficial da União, Brasília, 03 de setembro de 1985.

BRASIL, Ministério da Saúde. Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Diário Oficial da União, Brasília, 12 jul. 1989, p. 11459.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 347, de 16 de dezembro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 31 dez. 2002.

BRASIL, Lei nº 11.936, de 14 de maio de 2009. Proíbe a fabricação, a importação, a exportação, a manutenção em estoque, a comercialização e o uso de diclorodifeniltricloreto (DDT) e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 15 mai. 2009, p. 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 24, de 14 de julho de 2009. Diário Oficial da União. Brasília, 22 de julho de 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 8, de 29 de abril de 2010. Diário Oficial da União. Brasília, 3 mai. 2010, p. 24-30. (a)

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 26, de 8 de outubro de 2010. Diário Oficial da União. Brasília, 14 de outubro de 2010. (b)

- BRUCE, P.; MINNKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochimica Acta*, v. 128, p. 93-106, 1998.
- CALDAS, E.; SOUZA, L.C. de. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, p. 529-537, 2000.
- CARDOSO, M.H.W.M.; NÓBREGA, A.W.; ABRANTES, S. Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates. *Revista Analytica*. nº 34, p. 48-55, Abril/Maio 2008.
- CARDOSO, M.H.W.M.; GOUVÊA, A.V.; NÓBREGA, A.W.; ABRANTES, S.M.P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30 (Supl.1), p. 63-72, 2010.
- CEASAMINAS - Centrais de Abastecimento. Informações de Mercado. Disponível em: http://www.ceasaminas.com.br/informacoes_mercado.asp. Acesso em 13 de fev. de 2010
- CHEN, Z.M.; WANG Y.H. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. *Journal of Chromatography A*, v. 754, p. 367-395, 1996.
- CIESLIK, E.; SADOWSKA-ROCIK, A.; RUIZ, J. M. M.; SURMA-ZADORA, M. Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. *Food Chemistry*, 2010.
- CODEX ALIMENTARIUS. Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs. FAO Rome. CAC/GL 33-1999.
- CODEX - Codex Alimentarius Commission. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis. FAO/WHO: Rome. CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456p.
- COLUMÉ, A.; CÁRDENAS, S.; GALLEGU, M.; VALCÁCCI, M. Selective enrichment of 17 pyrethroids from lyophilised agricultural samples. *Journal of Chromatography A*, v. 912, p. 83-90, 2001.

- CORTÉS-AGUADO, S.; SÁNCHEZ-MORITO, N.; ARREBOLA, F. J.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Fast screening of pesticide residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 107, p. 1314–1325, 2008.
- COUTINHO, C.F.B.; TANIMOTO, S.T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G.S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R.B. do; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 15, p. 65-72, 2005.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Pesticides, 2007. Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/>. Acesso em 15 de novembro 2010.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). SCIENTIFIC REPORT OF EFSA. 2008 Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) N° 396/2005. Parma, Italy. *EFSA Journal* 2010; 8(6):1646. p. 442.
- EURACHEM. The Fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998. 61 p.
- EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, L 221/8, 2002.
- EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on residue analytical methods (doc. SANCO/825/00) rev. 67. 17 March 2004. Disponível em: <http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications_en.htm>. Acesso em 28 de janeiro de 2010.
- EUROPEAN COMMISSION. REGULATION (EC) N° 396/2005 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL. 23 February 2005. On maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- EUROPEAN COMMISSION. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed (doc. N° SANCO/10684/2009) 01/01/2010.

- FARIA, V. H. F.; DIAS, B. M.; COSTA, M. C. M.; SILVA, V. R.; DRUMMOND, A. L.; FRANCO, V. P.; CUNHA, M. R. R.; FRANKLIN, H. M. O. H.; PEIXOTO, T. M. A. G. Avaliação de resíduos de agrotóxicos em polpas de morango industrializadas. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 19, p. 49-56, 2009.
- FARIA, A.M.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A. Extração por ponto nuvem: técnica alternativa para a extração de resíduos de agrotóxicos. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 15, p. 29-42, 2005.
- GARCIA-CHAO, M.; AGRUÑA, M. J.; CALVETE, G. F.; SAKKAS, V.; LLOMPART, M.; DAGNAC, T. Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain. *Analytica Chimica Acta*, v. 672, p. 107–113, 2010.
- GELSOMINO, A.; PETROVICOVÁ, B.; TIBURTINI, S.; MAGNANI, E.; FELICI, M. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gel permeation chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal Chromatography A*, v. 782, p. 105-122, 1997.
- GORENSTEIN, O. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos realizado pela CEAGESP no período de dezembro de 2006 a maio de 2007. *Informações Econômicas*, v.38, p. 32-39, 2008. Disponível em:<<http://www.iea.sp.gov.br>. Acesso em 01 de abril de 2010.
- HAIB, J.; HOFER, I.; RENAUD, J.M. Analysis of multiple pesticide residues in tobacco using pressurized liquid extraction, automated solid-phase extraction clean-up and gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC-MS). *Journal of Chromatography A*, v. 1020, p. 173-187, 2003.
- HARVEY, D. *Modern Analytical Chemistry*. 1 ed. United States: The McGraw-Hill Companies, 2000. 816 p.
- HE, F.; WANG, S.; LIU, L.; CHEN, S.; ZHANG, Z.; SUN, J. Clinical manifestation and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Archives of Toxicology*, v. 63, p. 54-58, 1989.

- HENGEL, M. J.; MOWER, C. R.; SHIBAMOTO, T. New method for analysis of pyrethroid insecticides: esfenvalerate, cis-permethrin, and trans-permethrin, in surface waters using solid-phase extraction and gas chromatography. *Environmental Contamination Toxicology*, v. 59, p. 171-178, 1997.
- HERNÁNDEZ, F.; POZO, O. J.; SANCHO, J. V.; BIJLSMA, L.; BARREDA, M.; PITARCH, E. Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. *Journal of Chromatography A*, v. 1109, p. 242–252, 2006.
- HIRATA, R. Piretróides: estrutura química - atividade biológica. *Química Nova*, v. 18, n. 4, p. 368-374, 1995.
- HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC/GC International*, p. 96-105, 1998.
- IMOTO, M.N.; FONTOURA, P. S. G.; FREITAS, R. J. S. Validação de método multiresíduo para análise de pesticidas organohalogenados em maçãs. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 63, n. 2, p. 186-192, 2004.
- IMOTO, M.N. Validação de método multiresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de elétrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS). Curitiba: Departamento de Engenharia Química da UFPR. 2004. 134 p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL). DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 3. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 20 p.
- IUPAC (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY). *Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition*, 1997.
- JANSSON, C.; PIHLSTRÖM, T.; ÖSTERDAHL, B-G.; MARKIDES, K.E. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1023, p. 93-104, 2004.

- JARDIM, I. C. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.
- KEALEY, D.; HAINES, P. J.; *Instant Notes in Analytical Chemistry*. 1 ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2002. 353 p.
- KOMATSU, E.; VAZ, J.M. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 720-724, 2004.
- KRISTENSON, E.M.; HAVERKATE, E.G.J.; SLOTEN, C.J.; RAMOS, L.; VREULS, R.J.J.; BRINKMAN, U.A. Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 917, p. 277-286, 2001.
- LEHOTAY, S.J. AOAC International collaborative study on the determination of pesticide residues in nonfatty foods by supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. In: FAJGELP, A.; AMBRUS, A. Principles and practices of method validation. Workshop on the principles and practices of method validation, nov. 1999, Budapest, Hungary. Royal Society of Chemistry, n. 256, p. 89-99, 2000.
- LEHOTAY, S.J. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. *Journal of Chromatography A*, v. 785, p. 289-312, 1997.
- LENTZA-RIZOS, C.; AVRAMIDES, E. J.; VISI, E. Determination of residues of endossulfan and Five pyrethroid inseticides in virgin oil using gás chromatography with elestron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, v. 921, p. 298-304, 2001.
- LUKE, M.A.; FROBERG, J.E.; MASUMOTO, H.T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, v. 58, p. 1020-1026, 1975.
- MAJORS, R. E. QuEChERS — A new technique for multiresidue analysis of pesticides in foods and agricultural samples. *LCGC Asia Pacific*, v. 11, 1º ed., 2008.

- 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.
- MARSHALL, W.D. Analysis of Pesticides, Mycotoxin, and Drug residues in Foods. In: NIELSEN, S.S. Food analysis. 2 Ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publisher, 1998. p. 305-329.
- MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S.J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticides residues. *Journal of Chromatography A*, v. 1040, p. 259-272, 2004.
- MENEZES, A. F.; SANTOS, F. N. DOS; PEREIRA, P. A. DE P. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. *Talanta*, v. 81, p. 346-354, 2010.
- MIYAMOTO, J.; KANEKO, H.; TSUJI, R.; OKUMO, Y. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks should be assessed to human health. *Toxicology Letters*, v. 82/83, p. 933-940, 1995.
- MUCCIO, A.D.; PELOSI, P.; BARBINI, D.A.; GENERALI, T.; AUSILI, A.; VERGORI, F. Selective extraction of pyrethroid pesticide residues from milk by solid-matrix dispersion. *Journal of Chromatography A*, v. 765, p. 51-60, 1997.
- NAKAMURA, Y.; SUGIHARA, K.; SONE, T.; ISOBE, M.; OHTA, S.; KITAMURA, S. The in vitro metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. *Toxicology*, v. 235, p. 176-184, 2007.
- NARAHASHI, T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology and Toxicology*, v. 78, p. 1-14, 1996.
- NETHERLANDS, MINISTRY OF PUBLIC HEALTH, WELFARE AND SPORT. Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, 6a Ed. Amsterdam: RIVM, 1996.
- NORMA, K.N.T.; PANTON, S.H.W. Supercritical fluid extraction and quantitative determination of organophosphorus pesticide residue in wheat and maize using gas chromatography with flame photometric and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, v. 907, p. 247-255, 2001.

- NUNES, G.S.; RIBEIRO, M.L. Pesticidas: uso, legislação e controle. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 4, p 31-44, 1999.
- OBANA, H.; AKUTSU, K.; OKIHASHI, M.; HORI, S.; Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits using two-layered column with graphitized carbon and water absorbent polymer. *Analyst*, v. 126, p. 1529-1534, 2001.
- OVIEDO, M. T. P.; TOLEDO, M. C. de F.; VICENTE, E. Resíduos de agrotóxicos piretróides em hortaliças. *Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente*, v. 13, p. 9-18, 2003.
- OUDOU, H.C.; HANSEN, H.C. Sorption of lambda-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate to quartz, corundum, kaolinite and montmorillonite. *Chemosphere*, v. 49, p. 1285-1294, 2002.
- PATNAIK, P. Guia Geral - Propriedades Nocivas das Substâncias. Tradução de Ricardo Maurício Soares Baptista. Belo Horizonte: Ergo, 2003. 536 p.
- PESTICIDE ANALYTICAL MANUAL (PAM). U. S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Plant and Dairy Foods and Beverages, 1994, v. 1, 3 Ed.; Updated October, 1999.
- PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. ; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova*, v. 32, nº 4, p. 987-995, 2009.
- PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; STARLING, M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. *Química Nova*, v. 33, nº 4, p. 909-913, 2010.
- POOLE, C. F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1158, p. 241–250, 2007.
- PRESTES, O.D.; FRIGGI C.A.; ADAIME M.B.; ZANELLA R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 32, nº 6, p. 1620-1634, 2009.

- PRZYBYLSKI, C.; HOMMET, F. Evaluation of some parameters affecting troublesome pesticide analysis in gas chromatography–ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1201, p. 78–90, 2008.
- QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v.24, n.1, p. 68-76, 2001.
- QI, X. Development of a matrix solid-phase dispersion-sonication extraction method for the determination of fungicides residues in ginseng extract. *Food Chemistry*, v. 121, p. 758–762, 2010.
- QUINETE, N.S. Extração de poluentes organoclorados persistentes em fragmentos remanescentes da mata atlântica, RJ: comparação de métodos. Niterói: Química da UFF. 2005. 155 p. (Dissertação, Mestrado em Química).
- RADICE, S.; CHIESARA E.; FRIGERIO S.; FUMAGALLI, R.; PAROLARO, D.; RUBINO, T.; MARABINI L. Estrogenic effect of procymidone through activation of MAPK in MCF-7 breast carcinoma cell line. *Life Sciences*, v. 78, p. 2716 – 2723, 2006.
- RAY, D.E.; FORSHAW, P.J. Pyrethroid insecticides: poisoning syndromes, synergies, and therapy. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, v. 38, p. 95-101, 2000.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIZOS, C.L., AVRAMIDES, E.J., VISI, E. Determination of residues of endosulfan and five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, v. 921, p. 297-304, 2001.
- RHODEN, K. K. Desenvolvimento e validação de método multirresíduo, empregando GC-ECD e GC-MS, para a investigação de pesticidas em morango, maçã e uva. Santa Maria. Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria. 2005. 132 p. (Dissertação, Mestrado em Química).
- RSC (Royal Society of Chemistry). Analytical Methods Committee Technical Brief: Is my calibration linear? RSC, 2005. 2 p.

- SANCHES, S.M.; SILVA, C.H.T. de P. da; CAMPOS, S.X. de; VIEIRA, E.M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 53-58, 2003.
- SEBRAE (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS). Agência SEBRAE de Notícias – Agronegócio - Produtores de morango em Minas miram classes A e B. 17 de setembro de 2010. Disponível em: <http://www.agenciasebrae.com.br/noticia>. Acesso em 16 de outubro de 2010.
- SEERAM, N. P.; LEE, R.; SCHEULLER, H. S.; HEBER, D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry*, V. 97, P. 1–11, 2006.
- SINDAG (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA). SINDAG News – Vendas de Defensivos. Disponível em <http://www.sindag.com.br>. Acesso em 30 de janeiro de 2010.
- SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. Fundamentos de química analítica. 8 ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.1083 p.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. Princípios de Análisis Instrumental. 5 ed. Madri: McGraw-Hill Hill, 2001.1024 p.
- SNEDECOR G.W.; COCHRAN W.G. Statistical methods. 8 ed. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.
- 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 Ciências 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.
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G.; GINN, R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) – In-house method validation. *Journal of Chromatography A*, v. 1077, p. 151-158, 2005.

- SSEBUGERE, P.; WASSWA, J.; MBABAZI, J.; NYANZI, S.A.; KIREMIRE, B.T.; MARCO, J.A.M. Organochlorine pesticides in soils from south-western Uganda. *Chemosphere*, V. 78, P. 1250-1255, 2010.
- STAJNBAHER, D.; ZUPANCIC-KRALJ, L. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1015, p. 185-198, 2003.
- SZETO, S.Y.; PRICE, P.M. Persistence of pesticide residues in mineral and organic soils in the fraser valley of British Columbia. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 39, p. 1679-1684, 1991.
- 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.
- TORRES, C. M.; PICÓ, Y.; MAÑES, J. Determination of pesticides residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, v. 754, p. 301-331, 1996.
- USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). Pesticide Data Program (PDP). Annual Summary, Calendar Year 2008. December 2009. Disponível em <[http:// www.ams.usda.gov/pdp](http://www.ams.usda.gov/pdp)>. Acesso em 10 de fevereiro de 2010.
- 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.
- VESSMAN, J.; STEFAN, R.I.; VAN STADEN, J.E.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D.T.; FAJGELJ, A.; MULLER, H. Selectivity in analytical chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, v. 73, p. 1381-1386, 2001.
- VIEIRA, H.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R. de. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2007.
- WANG, S.; ARNOLD, W.A. Abiotic reduction of dinitroaniline herbicides. *Water Research*, v. 37, p. 4191-4201, 2003.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) 2005. Safety of pyrethroids for public health use.

YODEN; W.J.; STEINER, E.H.; Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Washington, p. 88, 1975.

ZAWIYAH, S.; CHE MAN, Y.B.; NAZIMAH, S.A.H.; CHIN, C.K.; TSUKAMOTO, I.; HAMANYZA, A.H.; NORHAIZAN, I. Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using SAX/PSA clean-up column. Food Chemistry, v. 102, p. 98–103, 2007.

ZROSTLÍKOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J.; GODULA, M.; MASTOVSKÁ, K. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. Journal of Chromatography A, v. 937, p. 73–86, 2001.