

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

HERLAINE DE SOUSA

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TOMATE: VALIDAÇÃO DE
MÉTODO POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E MONITORAMENTO**

Belo Horizonte, MG
2017

HERLAINE DE SOUSA

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TOMATE: VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS E MONITORAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial à obtenção de título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves
Junqueira

Coorientadora: Profa. Dra. Scheilla Vitorino
Carvalho de Souza Ferreira

Belo Horizonte, MG
2017

Sousa, Herlaine de.

S725r Resíduos de agrotóxicos em tomate: validação de métodos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e monitoramento / Herlaine de Sousa. – 2017. 95 f. : il.

Orientador: Roberto Gonçalves Junqueira.
Coorientadora: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira.

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

1. Tomate – Teses. 2. Validação de método - Teses. 3. Agrotóxicos – Teses. 4. Resíduos – Teses. 5. Análise cromatográfica – Teses. I. Junqueira, Roberto Gonçalves. II. Ferreira, Scheilla Vitorino Carvalho de Souza. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 664.07



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPGCA

FOLHA DE APROVAÇÃO

RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TOMATE: VALIDAÇÃO DE MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E MONITORAMENTO

HERLAINE DE SOUSA

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

Aprovada em 17 de agosto de 2017, pela banca constituída pelos membros:

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

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

Dra. Márcia Cassimira Marcos Ribeiro
Fundação Ezequiel Dias - FUNED

Belo Horizonte, 17 de agosto de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Ao orientador Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira.

À coorientadora Profa. Dra. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira.

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

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA).

Ao Laboratório de Análise de Resíduos e Agrotóxicos (LARA).

À Biblioteca da FAFAR e à Secretaria do PPGCA.

Aos colegas do LARA: Ana Paula, Dilma, Isis, Lucimére e Marcos.

Aos colegas do LQA: principalmente Bruna, Giovana e Kátia.

Aos meus pais, família, marido e amigos.

Aos colegas do mestrado.

Aos integrantes da banca da defesa da dissertação.

Ao Gustavo Cosenza do Laboratório Multiusuário da FAFAR.

À chefe Heulla Pereira e à gerente Eliane Hooper do LQA.

Ao Juliano da EMBRAMEC.

A todos que colaboram com este trabalho.

“Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante
do que ter aquela velha opinião formada sobre tudo”

Raul Seixas

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Agrotóxicos	19
3.1.1 Conceitos	19
3.1.2 Classificação	20
3.1.3 Toxicidade	21
3.1.4 Legislação	23
3.1.5 Mercado mundial e nacional	26
3.1.6 Monitoramento de resíduos em alimentos	29
3.2 Tomate	31
3.2.1 Histórico e características	31
3.2.2 Mercado	32
3.2.3 Agrotóxicos	33
3.3 Análise de resíduos de agrotóxicos	34
3.3.1 Fundamentos	34
3.3.2 Preparo da amostra.....	34
3.3.2.1 Solventes de extração	35
3.3.2.1 Adição de sais secantes e separação de fases	36
3.3.2.2 Purificação	36
3.3.2.3 Evaporação	37
3.3.3 Evolução dos métodos de extração	38
3.3.3.1 Mills	38
3.3.3.2 Luke	38
3.3.3.3 Mini-Luke.....	39
3.3.3.4 QuEChERS	39

3.3.3.5	Novo método mini-luke (NL-método modificado)	40
3.3.4	Determinação cromatográfica e espectrometria de massas	41
3.4	Validação	43
3.4.1	Definições	43
3.4.2	Parâmetros de desempenho	44
3.4.2.1	Linearidade, sensibilidade e faixa	45
3.4.2.2	Seletividade e efeitos de matriz	46
3.4.2.3	Veracidade e precisão	47
3.4.2.4	Limite de detecção e quantificação	48
3.4.2.5	Incerteza de medição	49
4.	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1	Material	50
4.2	Equipamentos	51
4.3	Padrões, reagente e solventes	51
4.4	Soluções	53
4.4.1	Padrão - Solução estoque e solução <i>pool</i> dos analitos	53
4.4.2	Padrão - Solução de possíveis interferentes	53
4.4.3	Solução de padrão interno (SPI)	54
4.4.4	Solução extratora	54
4.5	Amostras	54
4.6	Método de ensaio	55
4.6.1	Preparo da amostra pelo método QuEChERS modificado	55
4.6.1.1	Extração	55
4.6.1.2	Adição de sais	55
4.6.1.3	Purificação	56
4.6.1.4	Evaporação	56
4.6.2	Preparo da amostra pelo NL-método modificado	57
4.6.2.1	Adição de sal	58
4.6.2.2	Extração	58
4.6.2.3	Evaporação	58
4.6.3	Determinação cromatográfica	59
4.6.3.1	Identificação dos tempos de retenção e fragmentos	59
4.7	Validação	60
4.7.1	Linearidade e faixa linear	61
4.7.2	Efeitos de matriz e seletividade	62
4.7.3	Veracidade e precisão	63
4.7.4	Limite de detecção e quantificação	64
4.7.5	Incerteza de medição	65

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1 Matriz representativa	66
5.2 Comparação entre os métodos QuEChERS modificado e NL-método modificado	66
5.3 Confirmação	67
5.4 Linearidade	68
5.5 Efeitos de matriz e seletividade	75
5.6 Veracidade e precisão	78
5.7 Limites de detecção e quantificação	79
5.8 Incerteza de medição	80
5.9 Monitoramento	84
6. CONCLUSÃO	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Agrotóxicos e organismos-alvos.....	20
TABELA 2: Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseada na Dose Letal ₅₀ e na Concentração Letal ₅₀ de formulações líquidas e sólidas para diferentes vias de administração.....	22
TABELA 3: Agrotóxicos reavaliados pela ANVISA no período de 2006 a 2016.....	25
TABELA 4: Ingredientes ativos mais vendidos no Brasil em 2014.....	28
TABELA 5: Principais classes de produtos agrotóxicos comercializados no Brasil em 2014.....	29
TABELA 6: Os 10 maiores produtores mundiais de tomate em 2014.....	32
TABELA 7: Participação relativa dos estados na produção de tomate no Brasil em 2015.....	33
TABELA 8: Agrotóxicos investigados com suas respectivas fórmulas moleculares, grupos químicos, classes, classificações toxicológicas e LMRs.....	52
TABELA 9: Pureza dos padrões e concentração dos analitos nas soluções estoques e solução <i>pool</i>	53
TABELA 10: Analitos estudados com seus respectivos tempos de retenção e íons monitorados.....	60
TABELA 11: Níveis de concentração das curvas de calibração em mg mL ⁻¹	61
TABELA 12: Níveis de concentração das curvas de calibração em mg kg ⁻¹	62
TABELA 13: Níveis de concentração dos analitos no estudo de veracidade e precisão.....	64
TABELA 14: Recuperações médias e desvios padrão relativos obtidos na comparação entre NL-método modificado e QuEChERS modificado.....	67

TABELA 15: Variabilidade da intensidade relativa dos íons estudados em um dia de análise.....	68
TABELA 16: Estatísticas da análise de variância da regressão e do desvio de linearidade obtidas em um dia de análise.	74
TABELA 17: Equações, coeficientes de determinação e número de observações obtidos em um dia de análise.....	74
TABELA 18: Comparações entre as interseções e inclinações das curvas em solvente e em matriz de tomate.....	76
TABELA 19: Recuperação médias e desvios padrão relativos obtidos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária nos três níveis de concentração estudados.	78
TABELA 20: Limites de detecção e quantificação obtidos em mg kg ⁻¹	79
TABELA 21: Incerteza padrão, incerteza expandida, graus de liberdade efetivo e fator de abrangência obtidos nos três níveis de concentração estudados.	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Principais países exportadores de agrotóxicos no período de 2011 a 2015 em valor monetário (milhões de US\$).	27
FIGURA 2: Principais países exportadores de agrotóxicos no período de 2011 a 2015 em peso (mil t).....	27
FIGURA 3: Principais países importadores de agrotóxicos no período de 2011 a 2015 em valor monetário (milhões de US\$).	27
FIGURA 4: Principais países importadores de agrotóxicos no período de 2011 a 2015 em peso (mil t).....	28
FIGURA 5: Consumo de agrotóxicos e afins no período de 2000 a 2014 no Brasil. .	29
FIGURA 6: Fluxograma do preparo da amostra pelo método QuEChERS modificado.	57
FIGURA 7: Fluxograma do preparo da amostra pelo método NL-método modificado.	59
FIGURA 8: Diagrama representando as principais fontes de incerteza do método. .	65
FIGURA 9: Gráficos dos resíduos da regressão das curvas de cada analito em matriz de tomate com indicação dos respectivos valores dispersos em um dia de análise. .	71
FIGURA 10: Gráficos de Durbin-Watson das curvas de cada analito em um dia de análise.....	72
FIGURA 11: Representação gráfica do teste de Levene para curvas de cada analito em um dia de análise.	73
FIGURA 12: Cromatogramas do solvente, branco da matriz e padrões.	77
FIGURA 13: Contribuição da curva de calibração e da precisão intermediária para incerteza final.	82
FIGURA 14: Contribuição da resposta instrumental, da curva de calibração e da precisão intermediária para incerteza final.	83

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ANOVA	- Análise de Variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	- <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BPA	- Boas Práticas Agrícolas
CAC	- <i>Codex Alimentarius Commission</i>
CG	- Cromatografia Gasosa
CG-EM	- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CL	- Cromatografia Líquida
CL-EM	- Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
CL ₅₀	- Concentrao Letal
DL ₅₀	- Dose Letal
DPR _r	- Desvio Padrão Relativo de repetibilidade
DPR _R	- Desvio Padrão Relativo de precisão intermediária
DSPE	- <i>Dispersive Solid Phase Extration</i>
EM	- Espectrometria de Massas
FAFAR	- Faculdade de Farmácia
FAO	- <i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
IA	- Ingrediente Ativo
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	- Ingestão Diária Aceitável
IDMT	- Ingestão Diária Máxima Teórica
IMA	- Instituto Mineiro de Agropecuária
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LARA	- Laboratório de Resíduos e Agrotóxicos
LD	- Limite de Deteco
LMR	- Limite Máximo de Resíduos
LQ	- Limite de Quantificao
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA	- Ministério do Meio Ambiente
MMQO	- Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MMR	- Método Multirresíduos
MS	- Ministério da Saúde
<i>m/z</i>	- Relao massa/carga
NA	- Não Autorizados
NOAEL	- <i>No Observed Adverse Effect Level</i>
PA	- Para Análise
PAR	- Para Análise de Resíduos

PARA	- Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PPGCA	- Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos
PNCRC	- Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	- <i>Primary Secondary Amine</i>
SE	- Solução Estoque
SIM	- <i>Selected Ion Monitoring</i>
SP	- Solução <i>Pool</i>
SPE	- <i>Solid Phase Extration</i>
SPI	- Solução de Padrão Interno
SEM	- <i>Selected Reaction Monitoring</i>
T _r	- Tempo de retenção
VWA	- <i>Food and Consumer Product Safety Authority</i>
WHO	- <i>World Health Organization</i>

RESUMO

Este trabalho envolveu a validação intralaboratorial de um método analítico para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de tomate por CG-EM. Comparou-se o preparo de amostras pelos métodos QuEChERS modificado e NL-método modificado. Realizou-se a validação do método QuEChERS modificado que apresentou melhores resultados de recuperação. Foram avaliados os parâmetros analíticos de linearidade, seletividade, efeitos de matriz, veracidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e incerteza de medição. A linearidade foi demonstrada por meio da comprovação das premissas da regressão linear simples. O desvio da normalidade pelo teste de Ryan-Joiner não foi significativo ($p > 0,10$). Os resíduos da regressão apresentaram independência pelo teste de Durbin-Watson ($p > 0,10$). A homoscedasticidade pelo teste de Levene demonstrou homogeneidade da variância ao longo da curva ($p > 0,05$). As regressões foram significativas ($p < 0,001$), com desvios da linearidade não significativos ($p > 0,05$) pelo método dos mínimos quadrados ordinários, nas faixas de 0,01 a 0,06 mg kg⁻¹ para clorpirifós metil, endrin, etrinfós e metolaclo, 0,05 a 0,30 mg kg⁻¹ para atrazina, clorfenapir, etoprofós, fenitrotiona e procimidona e 0,10 a 0,60 mg kg⁻¹ para dieldrin. O método foi seletivo e as curvas foram preparadas em matrizes de tomate para todos os analitos. Foram demonstradas veracidade e precisão na quantificação dos analitos. As médias de recuperação variaram entre 71,69 e 110,15 %. Desvios padrão relativos máximos de 13,03 % foram obtidos em condições de repetibilidade e 19,61 % em condições de precisão intermediária. A incerteza de medição foi estimada levando em consideração a incerteza da curva de calibração e da reprodutibilidade parcial. O método validado foi aplicado no monitoramento de amostras de tomate coletadas no estado de Minas Gerais. Não foram encontrados resultados insatisfatórios para os analitos estudados nas 20 amostras de tomate monitoradas, considerando os limites de detecção de 0,04 mg kg⁻¹ para atrazina, clorfenapir, dieldrin e fenitrotiona, 0,01 mg kg⁻¹ para clorpirifós metil, endrin, etrinfós e metolaclo e 0,03 mg kg⁻¹ para etoprofós e 0,02 mg kg⁻¹ para procimidona.

Palavras-chave: Tomate. QuEChERS. CG-EM. Agrotóxicos. Multirresíduos. Validação de métodos.

ABSTRACT

In-lab validation of an analytical method, GC-MS, was performed to determine pesticide residues in tomato samples. Sample preparation was compared using the modified QuEChERS method and modified NL-method. The modified QuEChERS method was validated and presented better recovery results. The analytical parameters of linearity, selectivity, matrix effects, accuracy, precision, detection limit, quantification limit and measurement uncertainty were evaluated. Linearity was demonstrated by proving the premises of simple linear regression. The deviation from normality calculated by the Ryan-Joiner test was not significant ($p > 0.10$). Regression residuals were independent as calculated by the Durbin-Watson test ($p > 0.10$). Homoscedasticity, as demonstrated by the Levene test, had variance homogeneity along the curve ($p > 0.05$). The regressions were significant ($p < 0.001$) with non-significant linear deviations ($p > 0.05$), as calculated by the ordinary least squares method, in the ranges from 0.01 to 0.06 mg kg⁻¹ for chlorpyrifos methyl, endrin, etrimfos and metolachlor, 0.05 to 0.30 mg kg⁻¹ for atrazine, chlorfenapyr, ethoprophos, fenitrothion and procymidone and 0.10 to 0.60 mg kg⁻¹ for dieldrin. The method was selective and the curves were prepared in tomato matrices for all analytes. Veracity and precision were demonstrated in the analytes quantification. The mean values of the recovery rate varied between 71.69 and 110.15 %. Relative standard deviations of 13.03 % were obtained under repeatability conditions and 19.61 % under conditions of intermediate precision. The measurement uncertainty was estimated considering the uncertainty of the calibration curve and the data of intra-laboratory reproducibility. The validated method was applied to the monitoring of tomato samples collected in the state of Minas Gerais. 20 tomato samples were monitored and no unsatisfactory results were obtained for the studied analytes, considering the detection limits of 0.04 mg kg⁻¹ for atrazine, chlorfenapyr, dieldrin and fenitrothion, 0.01 mg kg⁻¹ for chlorpyrifos methyl, endrin, etrimfos and metolachlor, 0.03 mg kg⁻¹ for ethoprophos and 0.02 mg kg⁻¹ for procymidone.

Key words: Tomato. QuEChERS. GC-MS. Pesticides. Multiresidues. Validation methods.

1. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos é a principal estratégia no campo para o controle de pragas agrícolas. A crescente demanda desses insumos transformou o Brasil no maior importador mundial de agrotóxicos nos últimos anos (UN COMTRADE, 2017). A utilização desses insumos químicos foi intensificada no país a partir da década de 60, com a denominada “Revolução Verde”. Nesse período foram implantadas políticas públicas favoráveis ao setor agrícola, para promover, entre outros, a utilização de agrotóxicos no campo (BRASIL, 1965; BRASIL, 1966).

Entretanto, os agrotóxicos estão relacionados a diversos casos de intoxicação (SINITOX, 2012). A toxicidade desses compostos e de seus produtos de degradação demanda o desenvolvimento de sistemas para detectar e monitorar os resíduos presentes em alimentos e no ambiente (ARAGAY, 2012).

No Brasil, há programas nacionais e estaduais de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal. Esses programas são estabelecidos para assegurar a qualidade, a inocuidade e a segurança higiênico-sanitária dos alimentos de origem vegetal (ANVISA, 2016a). O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC/Vegetal), são coordenados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), respectivamente (BRASIL, 2003a; BRASIL, 2009). No estado de Minas Gerais, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) é responsável pelo monitoramento de resíduos de agrotóxicos, e realiza o monitoramento em hortifrutícolas produzidas em propriedades rurais do estado (MINAS GERAIS, 1991; MINAS GERAIS, 2000).

A premissa desejável para qualquer metodologia de determinação de resíduos de agrotóxicos é a garantia de resultados precisos, com veracidade e baixos limites de detecção e quantificação para um amplo espectro de analitos. Além disso, a metodologia deve assegurar rapidez da análise, ser facilmente executada, permitir a determinação seletiva de analitos, garantir um alto nível de automatização, ser

aplicável com pequenas quantidades de solventes e reagentes, assim como produzir baixas quantidades de resíduos (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

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 aos propósitos de uso (ABNT, 2005).

O Brasil figura entre os dez maiores produtores mundiais de tomate, sendo o estado de Minas Gerais o 3º maior produtor do país. O cultivo dessa cultura é muito dependente do uso intensivo de agrotóxicos e frequentemente seus resíduos são encontrados em monitoramentos realizados nesses frutos (ENGINDENIZ, 2006; ANVISA, 2016a; BRASIL, 2016; FAO, 2017; IBGE, 2016).

As frutas e os vegetais são classificados em grupos de acordo com as características de cada matriz e cada grupo possui suas respectivas culturas representativas. O tomate é uma cultura representativa do grupo de vegetais frutíferos e cucurbitáceos com alto teor de água (SANTE, 2015).

Dessa forma, com o objetivo de gerar dados confiáveis no monitoramento de resíduos de agrotóxicos realizado pelo IMA, foi validado um método com baixo consumo de solventes para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate por cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrometria de massas (EM). A validação deste trabalho será utilizada como modelo para ampliação do escopo do método para outras culturas do grupo do tomate que também são monitoradas pelo IMA como o melão, pepino, abobrinha, chuchu, entre outros.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Validar um método analítico para determinação de resíduos de atrazina, clorfenapir, clorpirifós metil, dieldrin, endrin, etoprofós, etrinfós, fenitrotiona, metolacloro e procimidona em tomate, por CG-EM, com aplicação no monitoramento realizado pelo IMA em amostras produzidas em Minas Gerais.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar dois métodos de preparo de amostra, QuEChERS modificado e NL-método modificado, para análise de resíduos de atrazina, clorfenapir, clorpirifós metil, dieldrin, endrin, etoprofós, etrinfós, fenitrotiona, metolacloro e procimidona em tomate empregando CG-EM.
- Validar o método escolhido por processo intralaboratorial, incluindo o estudo dos parâmetros de linearidade, seletividade, efeitos de matriz, veracidade, precisão, limites de detecção, limite de quantificação e cálculo da incerteza de medição.
- Monitorar a ocorrência de resíduos de atrazina, clorfenapir, clorpirifós metil, dieldrin, endrin, etoprofós, etrinfós, fenitrotiona, metolacloro e procimidona em amostras de tomate produzidas no estado de Minas Gerais, coletadas diretamente nas propriedades rurais por fiscais do IMA, empregando o método validado.
- Avaliar a adequação das amostras analisadas considerando o uso autorizado e o Limite Máximo de Resíduos (LMR) permitido para a cultura de tomate pela legislação nacional.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agrotóxicos

3.1.1 Conceitos

No Brasil, os termos defensivos agrícolas, agroquímicos, fitossanitários, pesticidas, biocidas e agrotóxicos são frequentemente adotados como sinônimos. A legislação brasileira utiliza o termo “agrotóxico” (BRASIL, 1989), porém atualmente tramita na Câmara dos Deputados o Projeto de Lei nº 3.200/2015 (BRASIL, 2015) que propõe, entre outros, a troca do termo “agrotóxico” por “defensivos fitossanitários e produtos de controle ambiental”, retirando a denominação que transparece a ideia dos efeitos negativos desse produto.

A Lei nº 7.802 (BRASIL, 1989) e o Decreto Federal nº 4.074 (BRASIL, 2002) que a regulamenta definem que os agrotóxicos e afins são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados para alterar a composição da flora ou da fauna, com o objetivo de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Também podem se apresentar como substâncias e produtos empregados como efeito desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Segundo a *Codex Alimentarius Commission* (CAC), um corpo subsidiário da *Food and Agriculture Organization* (FAO) e da *World Health Organization* (WHO), agrotóxico é qualquer substância destinada a prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer praga, incluindo espécies indesejáveis de plantas ou animais. O termo também inclui substâncias utilizadas como reguladoras de crescimento de plantas, desfolhantes, dessecantes ou inibidores de germinação e substâncias aplicadas às culturas antes ou após a colheita (CAC, 2016).

Para BAIRD (2002), os agrotóxicos são substâncias que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira, interferindo

em seu processo reprodutivo ou bloqueando um processo metabólico vital dos organismos para os quais são tóxicos.

3.1.2 Classificação

Os agrotóxicos englobam um grande número de substâncias químicas e podem ser classificados por vários critérios. Uma das formas de classificação pode ser baseada no tipo de organismo ao qual o agrotóxico se destina, como apresentado na **Tabela 1**.

TABELA 1: Agrotóxicos e organismos-alvos.

Classificação	Organismos-alvo
Acaricida	Ácaros
Algicida	Algas
Avicida	Pássaros
Bactericida	Bactérias
Desinfetante	Microrganismos
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas
Inseticida	Insetos
Larvicida	Larvas de insetos
Moluscicida	Caracóis, lesmas
Nematicida	Nematoide
Piscicida	Peixes
Raticida	Roedores

Fonte: BAIRD, 2002.

A composição química dos agrotóxicos é outro critério que pode ser utilizado para classificá-los, como por exemplo os grupos químicos: glicina substituída, ácido ariloxialcanoico, organofosforados, triazina, metilcarbamato de oxima, ditiocarbamatos, ureia, entre outros (ANVISA, 2017b).

Os agrotóxicos também podem ser divididos, quanto ao modo de ação, entre sistêmicos e de contato. Após a aplicação, os sistêmicos circulam através da

seiva por todos os tecidos vegetais, e os de contato agem principalmente nas partes externas do vegetal (ANVISA, 2016a).

3.1.3 Toxicidade

Os agrotóxicos estão relacionados a diversos casos de intoxicação. Segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, no período de 2011 a 2012, foram registrados 9731 casos de intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola no Brasil (SINITOX, 2012).

A intoxicação pode surgir após a exposição do indivíduo ao agrotóxico por meio de vias digestiva, respiratória, dérmica ou por contato ocular (THUNDIYIL *et al.*, 2008) e os quadros de intoxicação podem ocorrer de forma aguda ou crônica.

No modo de intoxicação aguda os sintomas surgem rapidamente, afetando as pessoas expostas diretamente ao produto. Entre os principais sintomas dessas intoxicações incluem: irritação da pele e olhos, coceira, cólicas, vômitos, diarreias, espasmos, dificuldades respiratórias e convulsões. A intoxicação do tipo crônica pode afetar a população de modo geral, pois é decorrente da exposição múltipla e em pequenas doses. Os efeitos adversos associados à exposição crônica podem aparecer muito tempo após a exposição, dificultando a correlação com o agente, entre eles podemos destacar: infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, efeitos sobre o sistema imunológico e câncer (INCA, 2017).

Nos próximos anos, a ANVISA pretende avançar nos estudos de risco cumulativo dos agrotóxicos, que leva em consideração os riscos à saúde resultantes da ingestão de alimentos contendo resíduos de agrotóxicos que possuem um mesmo modo de ação toxicológica (ANVISA, 2017a).

A ANVISA é o órgão responsável pela avaliação da toxicidade dos agrotóxicos, que preza a minimização dos impactos à saúde humana, tanto para os

trabalhadores expostos a essas substâncias, quanto para os consumidores de culturas tratadas e para população em geral (BRASIL, 2002).

O estudo de todas as informações técnicas e científicas do ingrediente ativo (IA), fornecidas à ANVISA pela empresa registrante, permite a sua avaliação toxicológica, que é uma das etapas obrigatórias no processo de registro de agrotóxicos (BRASIL, 1992).

Os agrotóxicos podem ser classificados em quatro classes toxicológicas, definidas principalmente pelos resultados obtidos nos testes da Dose Letal (DL₅₀) oral, DL₅₀ dérmica e Concentração Letal (CL₅₀), conforme a **Tabela 2**. A DL₅₀ é a quantidade de agrotóxico em mg por peso corpóreo capaz de matar 50 % da população teste e a CL₅₀ é a quantidade em mg de agrotóxico por litro de ar, durante uma hora de exposição, capaz de provocar a morte de 50 % da população experimental. A classificação em uma das quatro classes previstas não depende de todos os dados estarem na mesma classe toxicológica, uma vez que o dado mais agravante será utilizado para classificar o produto (BRASIL, 1992).

TABELA 2: Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseada na Dose Letal₅₀ e na Concentração Letal₅₀ de formulações líquidas e sólidas para diferentes vias de administração.

Classe	Toxicidade	DL ₅₀ oral (mg kg ⁻¹)		DL ₅₀ dérmica (mg kg ⁻¹)		CL ₅₀ inalatória (mg L ⁻¹)
		Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	
I	Extremamente tóxico	≤ 20	≤ 5	≤ 40	≤ 10	≤ 0,2
II	Altamente tóxico	20 - 200	5 - 50	40 - 400	10 - 100	0,2 – 2,0
III	Mediamente tóxico	200 - 2000	50 - 500	400 - 4000	100 - 1000	2,0 – 20,0
IV	Pouco tóxico	> 2000	> 500	> 4000	> 1000	> 20,0

DL: dose letal; CL: concentração letal; Fonte: BRASIL, 1992.

Além dos testes da DL₅₀ oral, DL₅₀ dérmica e CL₅₀ inalatória, os dados obtidos nos testes de irritação ocular e dérmica, sensibilização cutânea, efeitos sobre a reprodução e prole, metabolismo e vias de excreção, e possíveis efeitos teratogênicos, mutagênicos, neurotóxicos retardados e carcinogênicos, também são utilizados para avaliar toxicologicamente os agrotóxicos (BRASIL, 1992).

3.1.4 Legislação

No BRASIL (1989) é estabelecido que os agrotóxicos devem ser registrados em órgão federal competente para que possam ser produzidos, exportados, importados, comercializados e utilizados, seguindo as diretrizes e exigências dos órgãos responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura.

No Decreto nº 4.074 (BRASIL, 2002) são discriminados os três órgãos que estão envolvidos no registro de agrotóxicos, a saber: o MAPA; a ANVISA, que é vinculada ao Ministério da Saúde (MS); e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), que é vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA); bem como são estabelecidas as respectivas competências.

Compete a esses órgãos, no âmbito de suas respectivas áreas de atuação, entre outras: ao MAPA, avaliar a eficiência agrônômica dos agrotóxicos, e juntamente com a ANVISA, monitorar os resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem vegetal; à ANVISA, avaliar, classificar toxicologicamente, estabelecer a Ingestão Diária Aceitável (IDA), o LMR e o intervalo de segurança (período de carência), e analisar os impactos potenciais à saúde pública; ao IBAMA realizar avaliação ambiental preliminar de agrotóxicos, estabelecendo suas classificações quanto ao potencial de periculosidade ambiental (BRASIL, 2002).

As empresas, que pleiteiam o registro de um agrotóxico, fornecem para a ANVISA dados de estudos toxicológicos realizados com esse IA. Esses dados, além de serem utilizados para avaliar e classificar toxicologicamente os agrotóxicos, são também utilizados para definir o nível de efeito não observável (do inglês, *No Observed Adverse Effect Level* - NOAEL). A NOAEL corresponde à maior dose de agrotóxico, em mg kg^{-1} , determinada experimentalmente em animais de laboratório, que não causa reações no organismo exposto. Outro índice de referência é o cálculo da IDA de cada agrotóxico, que é a quantidade máxima de agrotóxico, em mg kg^{-1} , que ingerida diariamente durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos atuais. A IDA é calculada aplicando um fator de

segurança, geralmente o fator 100, à NOAEL estabelecida para cada agrotóxico (BRASIL, 1992).

Para garantir níveis seguros de agrotóxicos nos alimentos, as empresas requerentes devem realizar também o Estudo de Resíduos para cada IA. Em ensaios de campo, conduzidos segundo as Boas Práticas Agrícolas (BPA), o agrotóxico é aplicado, na dose pleiteada no registro, na cultura em estudo. Após os períodos de carência a serem testados, as amostras são coletadas e analisadas em laboratórios credenciados e a partir dos resultados obtidos, o LMR para o agrotóxico é proposto (BRASIL, 2006; BRASIL, 2008). O LMR corresponde a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico, presente nos alimentos em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, que pode ser consumida sem prejuízo à saúde, ao longo de sua vida (BRASIL, 2002).

A ANVISA realiza um comparativo entre a IDA e a Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) para avaliar se um LMR proposto no Estudo de Resíduos tem risco aceitável. A IDMT estima a quantidade máxima de um determinado agrotóxico que teoricamente é consumido por dia pela população, de acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Caso o valor da IDMT seja inferior ao da IDA, é possível realizar a inclusão de uma cultura ou a alteração de um LMR com garantia da saúde do consumidor (ANVISA, 2016a).

Outra exigência para o registro de um novo produto é a comprovação que sua ação tóxica sobre o ser humano e o meio ambiente seja, comprovadamente, igual ou menor do que a daqueles já registrados para o mesmo fim (BRASIL, 1992).

Atualmente, o registro de agrotóxicos no Brasil não possui previsão legal para renovação ou revalidação, portanto, não há exigências para serem periodicamente reavaliados para renovação do registro. O Decreto nº 4.074 (BRASIL, 2002) estabelece que a reavaliação de registro deve ser realizada quando surgirem indícios da ocorrência de riscos que desaconselhem o uso de produtos registrados ou quando o país for alertado nesse sentido por organizações internacionais responsáveis pela saúde, alimentação ou meio ambiente das quais o Brasil seja membro integrante ou signatário de acordos.

O conhecimento técnico-científico sobre os agrotóxicos está em permanente evolução e, mesmo após o registro, novos aspectos e riscos podem ser identificados. Assim, a ANVISA reavalia os registros de agrotóxicos adotando as medidas pertinentes em função do produto e de seus efeitos adversos decorrentes da exposição dietética e ocupacional. Na **Tabela 3** são apresentadas as reavaliações de IA de agrotóxicos realizadas pela ANVISA no período de 2006 a 2016. Atualmente, há seis ingredientes ativos com reavaliações toxicológicas em andamento: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, abamectina, carbofurano, glifosato, tiram e paraquate. A partir da reavaliação, pode-se concluir pela manutenção do registro do ingrediente ativo sem alterações; pela alteração da formulação, da dose ou do método de aplicação; pela restrição da produção, da importação, da comercialização ou do uso; pela proibição ou suspensão da produção, importação ou uso; ou pelo cancelamento do registro (ANVISA, 2016b).

TABELA 3: Agrotóxicos reavaliados pela ANVISA no período de 2006 a 2016.

Ingrediente Ativo	Resolução da Diretoria Colegiada		Decisão
	Início	Término	
	Cihexatina	RDC 10/2008	
Endossulfam	RDC 10/2008	RDC 28/2010	Proibido.
Forato	RDC 10/2008	RDC 12/2015	Proibido.
Fosmete	RDC 10/2008	RDC 36/2010	Mantido com restrições.
Lactofem	RDC 10/2008	RDC 92/2016	Mantido sem alterações.
Lindano	RDC 124A/2006	RDC 165/2006	Proibido.
Metamidofós	RDC 10/2008	RDC 01/2011	Proibido.
Monocrotofós	RDC 135/2002	RDC 215/2006	Proibido.
Parationa-metílica	RDC 10/2008	RDC 56/2015	Proibido.
Pentaclorofenol	RDC 124A/2006	RDC 164/2006	Proibido.
Procloraz	RDC 44/2013	RDC 60/2016	Proibido.
Triclorfom	RDC 10/2008	RDC 37/2010	Proibido.

Fonte: ANVISA, 2016b.

3.1.5 Mercado mundial e nacional

O comércio internacional de agrotóxicos cresceu bastante nas últimas décadas. As exportações/importações mundiais de agrotóxicos passaram de US\$ 31 bilhões em 2015. Nos últimos anos destacaram-se a China e o Brasil. O primeiro se tornou o maior exportador mundial, em peso, de agrotóxicos; e o último apresentou grande crescimento das importações, tornando-se, a partir de 2013, o maior importador mundial de agrotóxicos, em peso e em valor monetário (UN COMTRADE, 2017).

O mercado mundial de agrotóxicos foi estimado, em 2014, em torno de US\$ 67 bilhões, e é controlado por 13 empresas multinacionais, que concentram cerca de 90 % das vendas. As restrições regulatórias de alguns países fazem com que essas multinacionais, instalem suas unidades em países que permitem o uso dos seus produtos (PELAEZ *et al.*, 2016).

Os principais países exportadores mundiais de agrotóxicos - Alemanha, França, Estados Unidos, China e Bélgica - foram responsáveis por cerca de 53 % do valor total das exportações globais no ano de 2015. A **Figura 1** mostra que a Alemanha, França e Estados Unidos foram os três maiores exportadores mundiais em valor monetário (milhões de US\$), no período de 2011 a 2015. Porém, no mesmo período estudado, quando é considerada a quantidade exportada em peso (mil toneladas), a China lidera as exportações mundiais, como mostra a **Figura 2**.

Os principais importadores - Brasil, França, Alemanha, Canadá e Estados Unidos - foram responsáveis por cerca de 30 % das importações mundiais em 2015. O Brasil passou a ser o maior importador mundial de agrotóxicos, tanto em valor monetário (milhões de US\$) quanto em peso (mil t), a partir de 2013, como apresentado nas **Figura 3** e **Figura 4**, respectivamente.

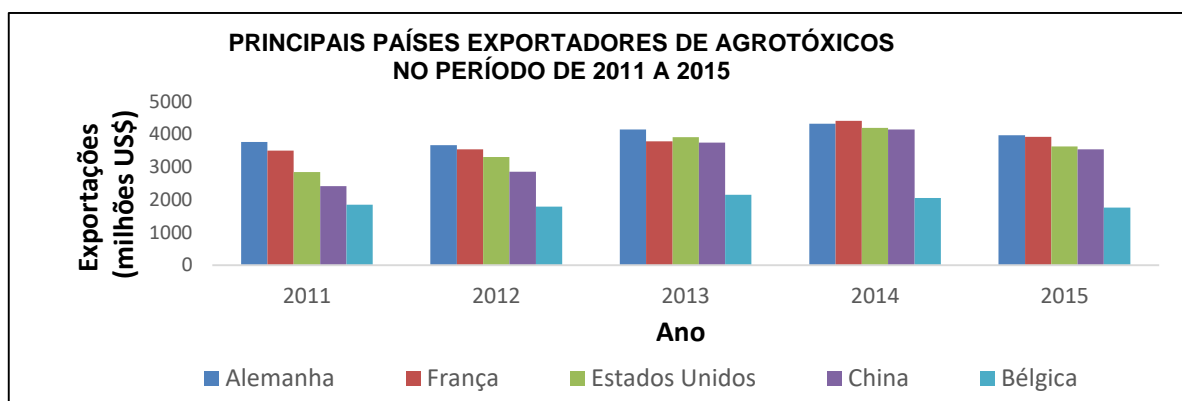


FIGURA 1: Principais países exportadores de agrotóxicos no período de 2011 a 2015 em valor monetário (milhões de US\$).

Fonte: UN COMTRADE, 2017.

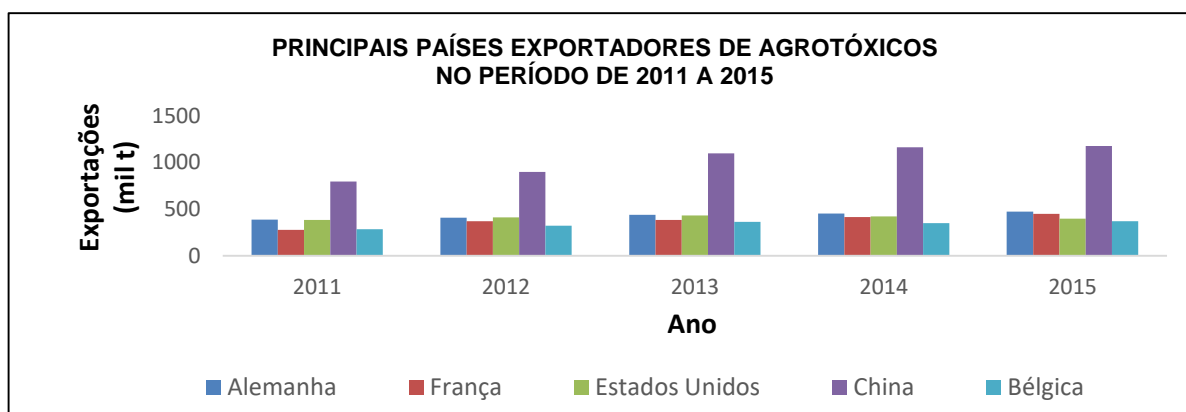


FIGURA 2: Principais países exportadores de agrotóxicos no período de 2011 a 2015 em peso (mil t).

Fonte: UN COMTRADE, 2017.

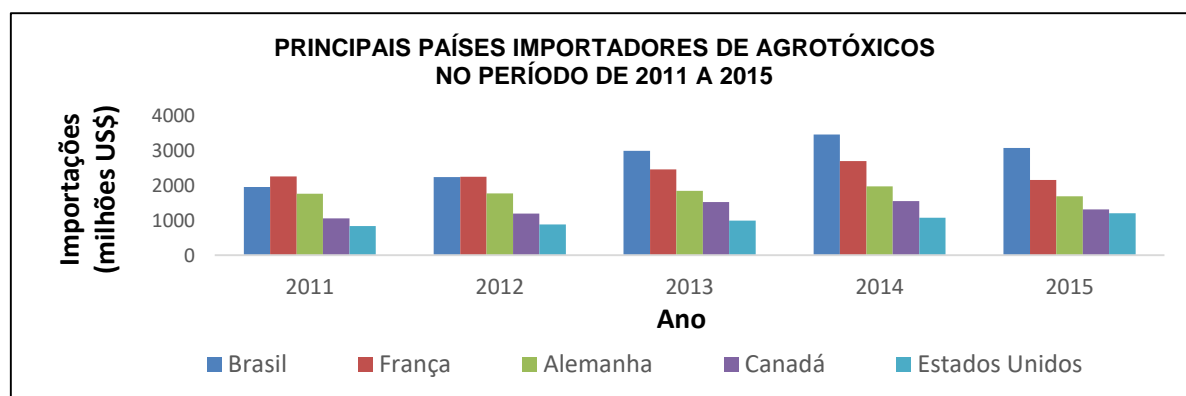


FIGURA 3: Principais países importadores de agrotóxicos no período de 2011 a 2015 em valor monetário (milhões de US\$).

Fonte: UN COMTRADE, 2017.

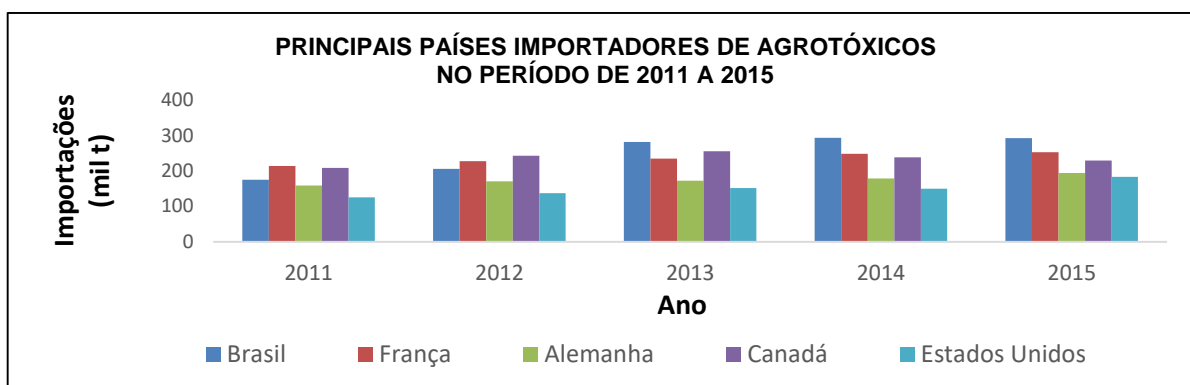


FIGURA 4: Principais países importadores de agrotóxicos no período de 2011 a 2015 em peso (mil t).

Fonte: UN COMTRADE, 2017.

De acordo com estimativa do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal, as vendas de agrotóxicos, no Brasil, somaram US\$ 9,6 bilhões em 2015 (SINDIVEG, 2016).

Segundo o IBAMA (2014), em 2014, 122 empresas detentoras de registros de produtos agrotóxicos apresentaram ao Instituto os relatórios obrigatórios com as quantidades de agrotóxicos comercializados no país. Na **Tabela 4** estão representados os 10 IA mais vendidos, sendo o glifosato e seus sais, os mais comercializados no Brasil.

TABELA 4: Ingredientes ativos mais vendidos no Brasil em 2014.

Ingrediente ativo	Quantidade (mil t)	Ranking
Glifosato e seus sais	194,88	1º
2,4 – D	36,51	2º
Acefato	26,19	3º
Óleo mineral	25,63	4º
Clorpirifós	16,45	5º
Óleo vegetal	16,13	6º
Atrazin	13,91	7º
Mancozebe	12,27	8º
Metomil	9,80	9º
Diurrom	8,57	10º

Fonte: IBAMA, 2014.

Na **Tabela 5** estão relacionadas as principais classes de produtos agrotóxicos comercializados no país, sendo os herbicidas, inseticidas e fungicidas as principais classes consumidas.

TABELA 5: Principais classes de produtos agrotóxicos comercializados no Brasil em 2014.

Classes de uso	Quantidade (mil t)	Percentual (%)
Herbicida	294,92	57,99
Inseticida	62,57	12,30
Fungicida	53,99	10,62
Inseticida, acaricida	38,22	7,52
Adjuvante	20,28	3,99
Outros	38,57	7,58

Fonte: IBAMA, 2014.

Na **Figura 5** está apresentada a evolução de consumo de agrotóxicos e afins no período de 2000 a 2014 no Brasil. O consumo desses insumos aumentou cerca de três vezes durante esse período.

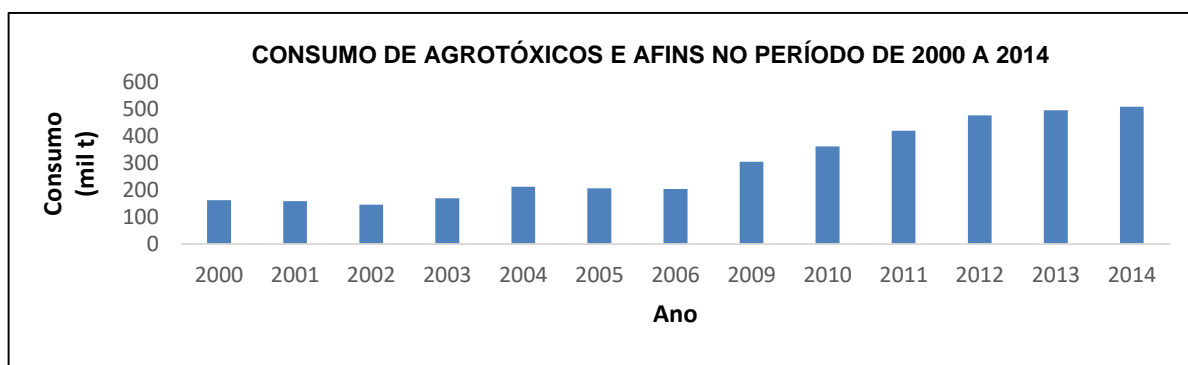


FIGURA 5: Consumo de agrotóxicos e afins no período de 2000 a 2014 no Brasil.

Fonte: IBAMA, 2014.

3.1.6 Monitoramento de resíduos em alimentos

O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos, portanto há uma grande demanda por monitoramento desses resíduos em alimentos. Os programas de monitoramento são estabelecidos para assegurar a qualidade, a

inocuidade e a segurança higiênico-sanitária dos alimentos de origem vegetal (ANVISA, 2016a).

No Brasil, há dois programas nacionais de monitoramento de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: o PARA, criado como Projeto em 2001 e posteriormente transformado em Programa pela ANVISA e o PNCRC/Vegetal, instituído em 2008 e coordenado pelo MAPA (BRASIL, 2003a; BRASIL, 2009). No estado de Minas Gerais, o Laboratório de Análise de Resíduos e Agrotóxicos (LARA) do IMA é responsável pelo monitoramento de hortifrutícolas coletadas em todo o estado (MINAS GERAIS, 1991; MINAS GERAIS, 2000).

O PARA contribui para a segurança alimentar, orientando as cadeias produtivas sobre as inconformidades existentes em seu processo produtivo e incentivando a adoção das BPA. Os resultados anuais do programa permitem: verificar se os alimentos comercializados no varejo apresentam níveis de resíduos de agrotóxicos dentro dos LMR estabelecidos pela ANVISA; conferir se os agrotóxicos utilizados estão devidamente registrados no país e se foram aplicados somente nos alimentos para os quais estão autorizados; estimar a exposição da população a resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal e, conseqüentemente, avaliar o risco à saúde decorrente dessa exposição (BRASIL, 2003a; ANVISA, 2016a).

O PNCRC/Vegetal tem como função inspecionar e fiscalizar a qualidade dos produtos de origem vegetal produzidos no país. São monitorados produtos de origem vegetal destinados ao mercado interno e à exportação. Atualmente, aproximadamente 80 % das análises são voltadas para o mercado interno. As amostras são coletadas em propriedades rurais, estabelecimentos beneficiadores e em centrais de abastecimento. O programa é composto por subprogramas: Subprograma de Monitoramento, que gera informações sobre frequência, níveis e distribuição de resíduos e contaminantes para nortear ações de investigação e controle; Subprograma de Investigação, que é composto por todos os processos de investigação ocorridos durante um ano-safra; Subprograma de Produtos Importados, que consiste na coleta de amostra na zona primária (portos, postos de fronteira e aeroportos) ou no local de destino da mercadoria; Subprograma Exploratório, que verifica a ocorrência de resíduos e contaminantes que ainda não possuem limites e níveis máximos estabelecidos (BRASIL, 2009).

O relatório do PARA divulgado em 2016, apresentou resultados de 12051 amostras, coletadas no mercado varejista no período de 2013 a 2015 em todo país. 232 agrotóxicos foram pesquisados e foi avaliado o risco dietético agudo - agravo à saúde 24 horas após o consumo. Das amostras analisadas, 19,70 % demonstraram resultados insatisfatórios, apresentando como irregularidades resíduos de agrotóxicos não autorizados (NA) para a cultura (16,70 %), níveis de agrotóxicos acima do LMR estabelecidos pela legislação (1,33 %) e resíduos acima do LMR e NA simultaneamente (1,68 %). Em 1,11 % das amostras monitoradas, identificou-se um potencial de risco agudo relativo a 13 alimentos. Das 730 amostras de tomate analisadas, 32,05 % apresentaram resultados insatisfatórios (ANVISA, 2016a).

O relatório do PNCRC/Vegetal, publicado em 2016, apresentou os resultados das amostras coletadas no ano safra 2014/2015. No Subprograma de Monitoramento 1007 amostras foram analisadas e 93 % apresentaram resultados satisfatórios; no Subprograma Exploratório foram analisadas 459 amostras, sendo 83 % conformes e no Subprograma de Produtos Importados 159 amostras foram analisadas e 95 % apresentaram resultados satisfatórios. Das 51 amostras de tomate analisadas, 35,29 % não apresentaram resultados satisfatórios (BRASIL, 2016).

No monitoramento realizado pelo IMA no período de fevereiro a maio de 2017, analisaram-se 68 amostras, coletadas por fiscais do próprio Instituto, em propriedades rurais do estado. Constatou-se que 18 % das amostras apresentaram resultados insatisfatórios devido a presença de agrotóxicos NA para a cultura.

3.2 Tomate

3.2.1 Histórico e características

O tomate é originário da zona andina da América do Sul, mas foi domesticado no México e introduzido na Europa em 1544. Posteriormente, foi disseminado para Ásia Meridional e Oriental, África e Oriente Médio. Mais

recentemente, o tomate silvestre distribuiu-se para outras partes da América do Sul e do México (NAIKA *et al.*, 2006).

O consumo de tomate contribui para uma dieta saudável e bem equilibrada. Ele é rico em minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares, fibras dietéticas, vitaminas B e C, ferro e fósforo (NAIKA *et al.*, 2006).

O licopeno, um pigmento carotenoide vermelho que ocorre naturalmente em tomates tem sido amplamente estudado por mais de 70 anos. Estudos epidemiológicos associaram o consumo de tomate com um menor risco de câncer de próstata e doenças cardiovasculares. Outros benefícios do licopeno estão associados ao seu uso no tratamento de queimaduras solares (por ação ultravioleta), da gengivite, da osteoporose, de transtornos mentais, e da asma (STORY *et al.*, 2010).

3.2.2 Mercado

A China é o maior produtor mundial de tomate. Em 2014, sua produção foi de 52,6 milhões de toneladas, seguida pela Índia com 18,7 milhões de toneladas. O Brasil ocupou a 9ª posição entre os maiores produtores do mundo com produção de 4,3 milhões de toneladas em 2014, como mostra a **Tabela 6** (FAO, 2017).

TABELA 6: Os 10 maiores produtores mundiais de tomate em 2014.

País	Produção (mil t)
China	52586,9
Índia	18735,9
Estados Unidos	14516,1
Turquia	11850,0
Egito	8288,0
Irã	5973,3
Itália	5624,2
Espanha	4888,9
Brasil	4302,8
México	3536,3

Fonte: FAO, 2017.

A **Tabela 7** mostra que a produção de tomate em Minas Gerais se destaca entre os estados do Brasil ocupando o 3º lugar (17,1 %) no país (IBGE, 2016).

TABELA 7: Participação relativa dos estados na produção de tomate no Brasil em 2015.

Estados	Produção (mil t)	Participação (%)
São Paulo	1097,937	26,2
Goiás	912,976	21,8
Minas Gerais	715,890	17,1
Bahia	323,660	7,7
Paraná	230,319	5,6
Rio de Janeiro	185,889	4,4
Santa Catarina	180,486	4,3
Espírito Santo	144,834	3,5
Ceará	95,128	2,3
Demais unidades	297,819	7,1

Fonte: IBGE, 2016.

3.2.3 Agrotóxicos

Um grande número de agrotóxicos é permitido para cultura de tomate. Atualmente, há 143 IA registrados no Brasil, pertencentes à diferentes classes químicas, para essa cultura (AGROFIT, 2017). Justifica-se esse grande número de IA permitidos pelo fato dessa cultura ter se tornado menos resistente a doenças, pragas e condições ambientais adversas, consequências estas, resultantes do processo de seleção de longo prazo imposto para melhorar a sua produtividade e qualidade. Portanto, a cultura de tomate tornou-se muito dependente do uso intensivo de agrotóxicos quando cultivada em campos abertos (ENGINDENIZ, 2006).

3.3 Análise de resíduos de agrotóxicos

3.3.1 Fundamentos

Atualmente, há um grande número de agrotóxicos no mercado, por isso a utilização de métodos multirresíduos (MMR) é a alternativa mais comum e a mais eficiente a ser adotada. Estes métodos são capazes de analisar um grande número de agrotóxicos em apenas um procedimento (GRIMALT & DEHOUCK, 2016).

Um requisito desejável para uma metodologia de determinação de resíduos de agrotóxicos é a garantia de resultados seletivos, precisos, com veracidade, com baixos limites de detecção e quantificação para um amplo espectro de analitos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

A análise de resíduos de agrotóxicos, geralmente, é realizada numa série de etapas. Envolve uma parte inicial com as etapas de preparo da amostra e uma parte final com a etapa de determinação por CG ou cromatografia líquida (CL) (LI *et al.*, 2013; OELLING, 2016).

3.3.2 Preparo da amostra

A complexidade do preparo de amostra é ligada às propriedades dos agrotóxicos, aos interferentes potenciais presentes na matriz e à técnica de separação utilizada. Geralmente, o preparo da amostra possui a etapa de extração dos analitos com solventes orgânicos; a etapa de adição de sais inorgânicos secantes; a etapa de purificação (*clean-up*) do extrato; e quando necessária, a etapa de evaporação (GRIMALT & DEHOUCK, 2016).

3.3.2.1 Solventes de extração

A escolha do solvente de extração é uma das decisões mais cruciais a ser feita quando se desenvolve um novo MMR. Cada solvente tem suas vantagens e desvantagens em termos de seletividade e questões práticas. Muitos aspectos têm que ser considerados, como a capacidade para cobrir o espectro de analitos; a seletividade que pode ser conseguida durante a extração, partição e limpeza; a separação da água; a compatibilidade com técnicas de separação cromatográfica; os custos; a segurança; as questões ambientais; e aspectos de manuseios (por exemplo, a facilidade de evaporação e as transferências de volume) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Durante as últimas cinco décadas, muitos métodos de extração foram relatados para a análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais e os três principais solventes utilizados foram a acetonitrila, o acetato de etila e a acetona (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011; LOZANO *et al.*, 2016).

A acetonitrila e a acetona são miscíveis em água, assim a extração de uma amostra com um desses solventes leva a formação de uma fase única. Portanto, para realizar uma extração líquido-líquido, utilizando acetonitrila ou acetona como solventes, é necessário adicionar um solvente apolar (geralmente diclorometano ou éter de petróleo) para induzir uma separação de fases bem definidas com água. No entanto, a acetonitrila consegue uma boa separação de fases com a água quando se utiliza sais secantes, o que evita a necessidade de solventes apolares, além de não diluir o extrato da amostra (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

O acetato de etila tem a vantagem de ter miscibilidade parcial com água, tornando desnecessária a adição de outros solventes apolares, para a separação de fases. No entanto, alguns agrotóxicos mais polares ficam particionados na fase aquosa, podendo prejudicar a recuperação dos analitos. Além disso, o acetato de etila extrai uma grande quantidade de co-extrativos não polares, levando interferentes para análise (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

3.3.2.1 Adição de sais secantes e separação de fases

A presença de um sal inorgânico secante na extração da amostra pode influenciar o comportamento de equilíbrio do extrato. A solubilidade do agrotóxico fica diminuída na fase aquosa saturada, e ele é transferido para a fase orgânica. Esse fenômeno é conhecido como efeito "salting-out" e auxilia na obtenção de recuperações aceitáveis para agrotóxicos mais polares (HASSEINE *et al.*, 2009; LOZANO *et al.*, 2016).

ANASTASSIADES e colaboradores (2003) utilizaram sulfato de magnésio anidro para induzir a separação de fases devido sua maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além disso, sua hidratação é exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C do extrato, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares. LOZANO e colaboradores (2016) consideraram o sulfato de sódio anidro mais apropriado por apresentar reação menos exotérmica que o sulfato de magnésio, o que evitaria a degradação de agrotóxicos termolábeis.

3.3.2.2 Purificação

A etapa de purificação permite a redução da quantidade de co-extraídos após a extração dos analitos com solventes orgânicos. Essa etapa reduz a quantidade de interferentes e suas influências negativas na seletividade do sinal analítico e na manutenção dos equipamentos (VIDAL *et al.*, 2002).

A purificação é essencial em MMR de agrotóxicos em alimentos, para minimizar efeitos de matriz em CL e CG acoplada à EM (OELLING & SCHWACK, 2014).

Um método de purificação com extração em fase sólida dispersiva (do inglês, *Dispersive Solid Phase Extration* - DSPE) foi proposto por ANASTASSIADES e colaboradores (2003) para análise de resíduos de agrotóxicos. A DSPE baseia-se

na metodologia de extração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Extration* - SPE), mas com o adsorvente sendo adicionado diretamente à amostra, sem a utilização de cartuchos ou colunas. Em comparação com o método de SPE convencional, as principais vantagens da DSPE é que ela pode aumentar eficazmente a área de superfície ativa entre os analitos e o adsorvente. Além disso, é uma operação mais simples, apresenta menor tempo de extração e maior eficiência (LIN *et al.*, 2016).

Vários adsorventes podem ser utilizados na DSPE, e esses são selecionados de acordo com os interferentes presentes na matriz que precisam ser retirados. A etilenodiamina-N-propil, uma amina primária secundária (do inglês, *Primary Secondary Amine* - PSA), é utilizada para remover vários ácidos orgânicos, pigmentos polares, alguns açúcares e ácidos graxos; o grafite remove esteróis e pigmentos de clorofila e a C18 remove substâncias não-polares interferentes, como os lipídios (ANASTASSIADES *et al.* 2003; CUNHA *et al.* 2007; GARCIA-REYES *et al.*, 2007; WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

3.3.2.3 Evaporação

A amostra, após o tratamento, pode ser injetada diretamente no cromatógrafo ou pode ser necessária uma etapa de evaporação. O extrato pode ser evaporado para concentrá-lo, quando um grande volume de solvente é empregado na etapa de extração e um baixo limite de detecção é requerido pela legislação. Ou então, para trocar o solvente, quando esse não é compatível com a técnica (SLOWIK-BAROWIEC *et al.*, 2015).

3.3.3 Evolução dos métodos de extração

3.3.3.1 Mills

O primeiro MMR para extração de agrotóxicos foi publicado na década de 1960 pelo químico Mills na *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos e foi denominado método de Mills. O método era aplicado para extração de agrotóxicos organoclorados e agrotóxicos apolares em amostras de alimentos não-gordurosos. Baseado em uma extração inicial com acetonitrila, seguida de uma etapa de partição após a adição de água e de um solvente apolar (éter de petróleo, diclorometano ou hexano) (MILLS *et al.*, 1963; ANASTASSIADES *et al.*, 2003; WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

3.3.3.2 Luke

Na década de 1970, com a utilização de agrotóxicos com características mais polares, houve o desenvolvimento de novos métodos de extração que englobassem esses compostos que não eram extraídos pelo método de Mills. Um deles foi o método de Luke, que substituiu o método de Mills na FDA. O novo método consistia de uma extração inicial com acetona, seguida de uma partição com solventes apolares (diclorometano ou diclorometano e éter de petróleo) e cloreto de sódio. Esse sal era utilizado para saturar a fase aquosa e promover recuperações mais elevadas do analitos polares (LUKE *et al.*, 1975; FDA, 1994; ANASTASSIADES *et al.*, 2003; WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

3.3.3.3 Mini-Luke

Na década de 1980, o *Food and Consumer Product Safety Authority (VWA)* da Holanda adaptou o método de Luke, omitindo-se a etapa de particionamento com cloreto de sódio e diminuindo a quantidade de solventes. Essa miniaturização do método possibilitou a redução da quantidade de amostra, bem como de solventes utilizados, por isso o nome de mini-Luke. Entretanto, valores baixos de recuperação (< 70 %) foram obtidos para pesticidas polares, como metamidofós, ometoato, monocrotofós entre outros. Nos anos 90, o VWA desenvolveu uma modificação do método de extração mini-Luke, ao qual foi adicionado sulfato de sódio anidro na etapa de extração levando, assim, a uma melhor extração dos agrotóxicos polares (NETHERLANDS, 1996; HIEMSTRA & de KOK, 2007).

3.3.3.4 QuEChERS

ANASTASSIADES e colaboradores (2003) introduziram um MMR com simplificação de etapas descrito como rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*), denominado pelo seu acrônimo, QuEChERS. O método original consistia em uma extração inicial com acetonitrila, seguida por uma etapa de partição com sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. Por último, uma etapa de purificação do extrato realizada com sulfato de magnésio anidro e PSA.

O método QuEChERS realiza a purificação pela técnica DSPE, que reduz os efeitos dos interferentes da matriz e aumenta o tempo de vida do sistema cromatográfico. Além disso, esse método não utiliza solventes orgânicos apolares, pois a combinação apropriada dos sais gera uma separação de fases bem definida (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; MASTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004; LEHOTAY & MASTOVSKÁ, 2005).

Algumas modificações no método QuEChERS original foram desenvolvidas com o intuito de melhorar a recuperação de alguns analitos, conforme a matriz a ser analisada. No método “Quechers-acetato” foi adicionada uma etapa tamponante com acetato de sódio e ácido acético para manter o pH do extrato em torno de pH 4,8. Esse método foi adotado em 2007 como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (LEHOTAY *et al.*, 2005; AOAC, 2007). No método “Quechers-citrato” foi adicionada uma etapa tamponante com citrato de sódio dihidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado para manter o pH entre 5,0 e 5,5. Em 2008, esse método foi nomeado como oficial pelo Comitê Europeu de Normalização (ANASTASSIADES *et al.*, 2007; CEN, 2008).

3.3.3.5 Novo método mini-luke (NL-método)

Lozano e colaboradores (2016) consideraram que um método rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro não eram exclusividades do método QuEChERS e propuseram um método alternativo para preparo da amostra. Os pesquisadores realizaram uma otimização e miniaturização do método mini-Luke, denominado novo método mini-Luke (NL-método), com o objetivo de reduzir o volume de solventes orgânicos utilizados na extração, principalmente do diclorometano que deve ter seu consumo minimizado devido aos danos causados ao meio ambiente. Os pesquisadores conseguiram bons resultados utilizando a mesma quantidade de amostra do método original, metade do volume total de solventes orgânicos, e um terço do volume de diclorometano. Foi utilizado o sulfato de sódio anidro como sal secante para promover o efeito de “*salting-out*” por ser um reagente já utilizado na análise de rotina de laboratórios que utilizam o método mini-Luke e também por apresentar reação menos exotérmica do que o sulfato de magnésio anidro, evitando a degradação de agrotóxicos termolábeis.

3.3.4 Determinação cromatográfica e espectrometria de massas

Após o preparo apropriado da amostra, a etapa de determinação de resíduos, geralmente, é realizada por CL OU CG (VIDAL *et al.*, 2009).

A cromatografia é uma técnica na qual os componentes de uma mistura são separados com base nas diferenças de velocidade de transporte deles através de uma fase estacionária (coluna cromatográfica) por uma fase móvel líquida (CL) ou gasosa (CG). Um detector apropriado, posicionado ao final da coluna cromatográfica, registra o sinal do analito eluído e assim, permite a determinação de compostos de interesse em misturas complexas (SKOOG *et al.*, 2006).

A CG é aplicada para compostos voláteis, semi-voláteis e compostos termicamente estáveis. Enquanto a CL é indicada para compostos não voláteis e termicamente instáveis (KUJAWSKI *et al.*, 2014)

Desde o início da década de 1970, a CG tem sido a técnica mais empregada na determinação de resíduos de agrotóxicos em combinação com detector de captura de elétrons, de nitrogênio/fósforo e de ionização por chama. Esses detectores clássicos, geralmente, identificam o analito através do seu tempo de retenção. Como vários compostos podem apresentar o mesmo tempo de retenção, os resultados obtidos necessitam de confirmação em outro cromatógrafo equipado com um tipo diferente de coluna ou detector. Atualmente, a utilização de CG-EM permite a determinação e a confirmação simultânea de resíduos de agrotóxicos utilizando apenas um equipamento em um teste analítico, pois a espectrometria de massas fornece informações estruturais que permitem a confirmação inequívoca do analito (ALDER *et al.*, 2006; VIDAL *et al.*, 2009).

No passado, a CL foi pouco empregada para análise de resíduos, pois os detectores ultravioletas tradicionais, arranjo de diodos e fluorescência utilizados naquela época eram muitas vezes menos seletivos e sensíveis do que os detectores que eram utilizados na CG. Mas, nos últimos anos, com a disponibilidade de fontes de ionização que operam à pressão atmosférica, acopladas à espectrometria de massas, os detectores da CL se tornaram mais seletivos e sensíveis. Além disso,

houve um aumento no consumo de agrotóxicos polares, que são melhores analisados por CL (ALDER *et al.* 2006; VIDAL, *et al.*, 2009).

Na busca por métodos de análise de agrotóxicos em matrizes complexas, cada vez mais rápidos, seletivos e sensíveis, vários avanços têm sido obtidos no desenvolvimento das técnicas analíticas de separação e detecção. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) tornou-se uma ferramenta analítica amplamente utilizada, sendo compatível com agrotóxicos de várias classes químicas, polaridades e pesos moleculares, com vários trabalhos publicados nos últimos anos (SAGRATINI *et al.*, 2007; CUNHA & FERNANDES, 2011; ANDRASCIKOVÁ & HROUZKOVÁ, 2013; RESTREPO *et al.*, 2014).

Os principais componentes do espectrômetro de massas são: fonte de ionização, analisador de massas e detector. Na fonte de ionização, os componentes da amostra são convertidos em íons pela ação de um agente ionizante, que opera em baixa pressão e pressão atmosférica, respectivamente, na CG-EM e na CL-EM (ALDER *et al.*, 2006; KUSTER *et al.*, 2006; LANÇAS, 2009). Os analisadores de massas separam os íons, formados na fonte de ionização, de acordo com sua relação m/z . Todos os analisadores de massas usam campos elétricos e magnéticos que podem estar sozinhos ou combinados (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; LANÇAS, 2013). O detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados e geram o espectro de massas (LANÇAS, 2009).

O espectrômetro de massas pode ser programado para operar de acordo com o objetivo de cada análise. No modo de aquisição varredura completa (do inglês, *full scan*), o espectrômetro de massas é programado para analisar uma faixa ampla de m/z dentro do seu espectro de operação, gerando um espectro completo de íons. Quando a análise visa à detecção de compostos específicos, pode-se utilizar o modo de aquisição de Monitoramento do Íon Selecionado (do inglês, *Selected Ion Monitoring* – SIM). Nesse modo somente os fragmentos característicos do analito de interesse são monitorados e o cromatograma obtido é altamente seletivo, com um ganho significativo na razão sinal/ruído e na sensibilidade em relação ao *full scan*. O modo de aquisição de Monitoramento Seletivo de Reações (do inglês, *Selected Reaction Monitoring* – SRM) requer o uso de espectrometria de massas em *tandem*. Os

fragmentos selecionados pelo primeiro analisador sofrem uma reação de fragmentação selecionada que permite obter um ganho de sensibilidade e seletividade quando comparado ao modo SIM (VÉKEY, 2001; WANG & FINGAS, 2003; HOFFMANN & STROOBANT, 2007; ZEIGLER *et al.*, 2008; TERZIC *et. al.*, 2013).

3.4 Validação

3.4.1 Definições

Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia, na validação de metodologia é fornecida evidência objetiva de que um dado item satisfaz requisitos especificados para o uso pretendido (VIM, 2012).

É indispensável que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para comprovar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Dados analíticos confiáveis são necessários para uma interpretação correta de resultados obtidos e para o cumprimento das normas nacionais e internacionais (RAMBLA-ALEGRE *et al.*, 2012; INMETRO, 2016).

Para assegurar a credibilidade do método, o laboratório deve validar métodos não normalizados; métodos normalizados modificados ou utilizados fora dos escopos para os quais foram contemplados e métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório (ABNT, 2005; EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016).

Diversos protocolos, normas, guias e orientações, nacionais e internacionais, definem diretrizes a serem adotadas no processo de validação. No Brasil, pode-se destacar os documentos: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (BRASIL, 2003b) e Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos (INMETRO, 2016). No âmbito internacional, pode-se citar os documentos: *Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis* (THOMPSON *et al.*, 2002), *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, a*

Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (EURACHEM, 2014) e *Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results* (EC, 2002). Além desses, há documentos específicos para análise de resíduos de agrotóxicos, como: *Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis* (CODEX, 2003) e *Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed* (SANTE, 2015).

A validação de metodologias analíticas pode ser desenvolvida em um único laboratório (intralaboratorial) e por comparação interlaboratorial (estudo colaborativo). Na validação intralaboratorial todos os parâmetros de desempenho são avaliados, exceto a reprodutibilidade. Se um método desenvolvido terá uma ampla utilização ou até mesmo se tornar um método normalizado, o estudo colaborativo, envolvendo um grupo de laboratórios, é recomendado (THOMPSON *et al.*, 2002; EURACHEM, 2014). Uma alternativa para validar métodos por procedimentos interlaboratoriais é a participação, ao longo do tempo, em ensaios de proficiência ou outros tipos de comparações interlaboratoriais, que são aceitos como um importante meio de monitoramento do grau de equivalência dos resultados analíticos a nível nacional e internacional. Os organismos de acreditação consideram a participação em ensaios de proficiência e em ferramentas de controle de qualidade externa como parte integrante da gestão da qualidade dos laboratórios participantes (SOUZA, 2007; EURACHEM, 2014).

3.4.2 Parâmetros de desempenho

O parâmetro de desempenho é definido pela EC (2002) como uma qualidade funcional que pode ser atribuída a um método de ensaio. Os parâmetros de desempenho típicos na validação intralaboratorial de métodos de ensaio quantitativos são: linearidade da curva de calibração, sensibilidade, faixa de trabalho, seletividade, efeitos de matriz, veracidade, precisão, limites de detecção e quantificação e robustez (THOMPSON *et al.*, 2002).

3.4.2.1 Linearidade, sensibilidade e faixa

A linearidade é a habilidade de um método analítico obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Uma adequada avaliação da linearidade é fundamental para a qualidade dos demais parâmetros de desempenho estabelecidos para métodos quantitativos (como sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, veracidade, precisão e limites) (SOUZA, 2007; EURACHEM, 2014).

A sensibilidade é a alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na concentração do analito, ou seja, é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, expresso pela inclinação da curva obtida por regressão linear (THOMPSON *et al.*, 2002; EURACHEM, 2014).

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2016).

Segundo THOMPSON e colaboradores (2002), para construir a curva analítica são necessários vários níveis de concentração uniformemente distribuídos na faixa de trabalho pretendida (no mínimo cinco). O número de replicatas analisadas de cada concentração deve ser de no mínimo três, e preferencialmente, com os níveis de concentração analisados em ordem aleatória.

A linearidade de um método não pode ser observada apenas por meio do gráfico dos resultados de resposta em função da concentração do analito. Antes de fazer a regressão linear, deve ser verificada a ausência de valores dispersos (em inglês, *outliers*) para cada nível de concentração e a homoscedasticidade (homogeneidade da variância dos resíduos) dos dados. A verificação da ausência de *outliers* pode ser avaliada por diferentes abordagens, por exemplo com base nos resíduos padronizados Jackknife e a homoscedasticidade pelos testes de Levene ou

de Brown-Forsythe. Se o sistema for homoscedástico, a equação da regressão linear simples deve ser calculada usando o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Caso seja heterocedástico, a equação da regressão linear simples deve ser calculada utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários ponderados. Além disso, deve-se também avaliar a adequação do ajuste de modelo utilizado por meio do teste de análise da variância (ANOVA) da regressão (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; INMETRO, 2016).

3.4.2.2 Seletividade e efeitos de matriz

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003b). Esse parâmetro possui grande importância em MMR, principalmente quando se considera a análise de alimentos, na qual as matrizes são misturas de constituições químicas complexas (SOUZA, 2007).

A avaliação da seletividade pode ser realizada comparando a matriz branca e a matriz adicionada com o analito em estudo, sendo que, na matriz branca, nenhum interferente deve coeluir com substância a ser analisada. Pode-se também, averiguar se a adição de interferentes específicos na matriz (aqueles com potencial de estarem presentes nas amostras) afetam a identificação ou a quantificação dos analitos de interesse (EC, 2002; CODEX, 2010; EURACHEM, 2014).

Estudos dos efeitos de matriz correspondem a um tipo específico de estudo de seletividade. Possuem como objetivo verificar possíveis interferências na resposta analítica causadas por elementos diversos que compõem a matriz. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal proveniente do analito (THOMPSON *et al.*, 2002; EURACHEM, 2014). A medição pode ser alterada porque a matriz, os reagentes ou outros componentes da amostra afetam a sensibilidade do detector que mede o analito ou porque estes compostos afetam diretamente a resposta. Assim, efeitos de erros constantes, devidos a ação de interferentes e erros proporcionais à calibração

devidos a efeitos de matriz podem estar presentes ao mesmo tempo (BRUCE *et al.*, 1998).

O estudo de efeitos de matriz é realizado comparando a curva de calibração em solvente e em amostra branca (curva de adição de padrão). A observação de efeitos de matriz não significativos simplifica o processo de validação e a rotina analítica, visto que os padrões dos analitos podem ser preparados diretamente no solvente, dispensando uma curva de adição de padrão em amostra branca (THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA, 2007).

3.4.2.3 Veracidade e precisão

A veracidade de um método analítico corresponde ao grau de concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência tido como verdadeiro. É declarada quantitativamente em termos de tendência (*bias*) ou erro sistemático, com pequenas tendências indicando veracidade (EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a veracidade de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados, participação em comparações interlaboratoriais, comparação com método de referência (ou método validado) e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2016).

Quando a veracidade do método é determinada pelo ensaio de recuperação, amostras brancas são fortificadas com quantidades conhecidas do analito, em pelo menos três diferentes concentrações (baixa, média e alta) da faixa de uso do método. A veracidade será reportada pela porcentagem de recuperação, que representa a relação percentual entre a concentração obtida, e a concentração fortificada, juntamente com o desvio padrão e o coeficiente de variação (EC, 2002; INMETRO, 2016).

A precisão é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições específicas pré-estabelecidas. O valor da

precisão, geralmente, é expresso pelo cálculo do desvio padrão e coeficiente de variação do resultado do ensaio e pode ser avaliado por meio da repetibilidade, precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial ou parcial) e da reprodutibilidade (EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; INMETRO, 2016).

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 precisão intermediária refere-se à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando condições como: analistas diferentes; equipamentos diferentes e dias diferentes. A reprodutibilidade representa a variabilidade encontrada quando resultados são obtidos utilizando o mesmo método, em laboratórios diferentes, com diferentes analistas e usando equipamentos diferentes (EURACHEM, 2004; INMETRO, 2016; THOMPSON *et al.*, 2002).

Para avaliar a repetibilidade do método, deve-se preparar amostras da mesma matriz em, no mínimo, três níveis de concentração (baixa, média e alta) da faixa de uso do método. Essas amostras devem ser analisadas em, no mínimo, seis repetições independentes para cada nível de concentração. Para a precisão intermediária basta repetir a análise da repetibilidade, variando o analista e/ou o equipamento e o dia de análise (SOUZA, 2007).

3.4.2.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser significativamente distinguida de zero. Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2016).

Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de uma substância que pode ser quantificada com veracidade e precisão aceitáveis nas condições

estipuladas do teste ou a concentração abaixo da qual o método analítico não pode operar com precisão e veracidade aceitáveis (EC, 2002).

Os LD e LQ, podem ser estimados por diversos procedimentos, entre esses, por avaliação visual; pela relação sinal/ruído; por estimativa a partir da curva analítica; por estimativa do desvio padrão do branco ou por estimativa da curva de desvios padrão (INMETRO, 2016).

A relação sinal/ruído ≥ 3 ou ≥ 2 é geralmente considerada aceitável para estimativa do limite de detecção. A relação sinal/ruído típica para estimativa do limite de quantificação é de ≥ 10 . Mas, também podem ser adotadas relações sinal/ruído de ≥ 6 e ≥ 5 (INMETRO, 2016).

3.4.2.5 Incerteza de medição

Segundo o VIM (2012), a incerteza de uma medida é um parâmetro, associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando. Os laboratórios devem possuir um procedimento bem definido, de fácil compreensão e ampla aceitação para caracterizar a qualidade do resultado de uma medição, ou seja, para avaliar e expressar a incerteza (ABNT 2005; CARVALHO *et al.*; 2012).

A incerteza pode ser originada de diferentes fontes, tais como: amostragem, efeitos de matriz, condições ambientais, incertezas de massas, equipamentos volumétricos, aproximações e suposições incorporadas ao método, variação aleatória, entre outras. Todas as fontes consideradas importantes devem ser consideradas na estimativa da incerteza de medição (EURACHEM/CITAC, 2012).

A combinação de todas as componentes de incerteza identificadas, é denominada incerteza combinada, que é um desvio padrão estimado igual a raiz quadrada positiva da variância total, obtida pela combinação de todos os componentes da incerteza, usando a lei de propagação da incerteza (EURACHEM/CITAC, 2012).

A maioria das aplicações em química analítica deve utilizar a incerteza expandida, que fornece um intervalo dentro do qual se acredita, com alto nível de confiança, que esteja o valor do mensurando. A incerteza expandida é, é obtida a partir da incerteza combinada multiplicada pelo fator de abrangência, que está relacionado com o nível de confiança desejado e no grau de liberdade efetivo (ABNT/INMETRO, 2003; EURACHEM/CITAC, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas experimentais descritas no presente trabalho foram conduzidas no LARA do Laboratório de Química Agropecuária da Gerência da Rede Laboratorial do IMA, localizado em Contagem – MG, Brasil.

Inicialmente, comparou-se dois métodos de preparo de amostra, QuEChERS modificado (LEHOTAY *et al.*, 2005) e NL-método modificado (LOZANO *et al.*, 2016), para a determinação de 10 analitos, utilizando CG-EM. Esses métodos foram comparados por apresentarem baixo consumo de solventes em relação aos outros métodos já utilizados no laboratório (NETHERLANDS, 1996). Foram realizadas cinco recuperações no nível intermediário para cada analito e as recuperações médias foram comparadas pelo teste t emparelhado. Posteriormente, realizou-se a validação do método que apresentou os melhores resultados de recuperação e a aplicação do mesmo no monitoramento de amostras de tomate coletadas no estado de Minas Gerais.

4.1 Material

Tubo de centrífuga de polipropileno, com tampa de rosca, de 15 mL e 50 mL; espátula de aço inox; faca; proveta de 100 mL; papel de filtro quantitativo; luvas descartáveis; béquer de 20 mL, 50 mL, 100 mL e 400 mL; filme flexível; balão

volumétrico de 10 mL, 25 mL, 50 mL e 1000 mL; tubo de ensaio; kitasato de 250 mL; funil de Buchner e vial de 2 mL.

4.2 Equipamentos

Agitador tipo vórtex Biomatic (Porto Alegre, Brasil); balança analítica Gehaka HR-200 (São Paulo, Brasil); balança semi-analítica analítica Mettler P1210 (Zürich, Switzerland); bomba de vácuo Marconi MA057 (São Paulo, Brasil); capela de segurança química Veco VLFS-09 (São Paulo, Brasil); centrífuga Jouan C312 (Saint-Herblain, France); congelador Consul (Joinville, Brasil); estufa de secagem Fanem 315SE (São Paulo, Brasil); homogeneizador tipo ultra turrax Marconi MA102E (São Paulo, Brasil); macro e micropipetas automáticas de volume variável Gilson (Villiers-le-Bel, France); termômetros com cabo sensor Incoterm (São Paulo, Brasil); triturador de amostras Skymesen CR-4L (Santa Catarina, Brasil); concentrador Tecvap Tecnal TE-0194 (Piracicaba, Brasil); cromatógrafo a gás Focus, com sistema de aquisição de dados controlado pelo software *X-calibur*, equipado com amostrador automático AS 3000 e acoplado a espectrômetro de massas Polaris Q modelo Íon Trape, Thermo Scientific (EUA); coluna cromatográfica capilar HP-5MS (5 % fenil, 95 % metilpolisiloxano), de sílica fundida, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme Agilent (EUA).

Os equipamentos: balanças, termômetros, micropipetas automáticas de volume variável e vidrarias volumétricas foram calibrados por laboratórios acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), de acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025.

4.3 Padrões, reagente e solventes

Foram utilizados os padrões: atrazina, clorfenapir, clorpirifós metil, dieldrin, eldrin, etoprofós, etrinfós, fenitrotiona, metolacloro e procimidona, todos fornecidos por

Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). Além destes, os padrões heptacloro, mevinfós e quintozene, disponíveis no laboratório, do mesmo fornecedor, foram utilizados para averiguar se a presença de outros possíveis agrotóxicos na amostra, interferiam na quantificação dos analitos de interesse. O composto trifenilmetano, fornecido por Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), foi utilizado como padrão interno.

Na **Tabela 8** estão listados os 10 agrotóxicos investigados nesse trabalho e suas respectivas fórmulas moleculares, grupos químicos, classes de uso, classificações toxicológicas e LMRs na cultura de tomate.

TABELA 8: Agrotóxicos investigados com suas respectivas fórmulas moleculares, grupos químicos, classes, classificações toxicológicas e LMRs.

Analito	Fórmula	Grupo químico	Classe de uso	CT	LMR
Atrazina	$C_8H_{14}ClN_5$	triazina	herbicida	III	NA
Clorfenapir	$C_{15}H_{11}BrClF_3N_2O$	análogo pirazol	inseticida/acaricida	II	0,2
Clorpirifós metil	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	organofosforado	inseticida/acaricida	*	NA
Dieldrin	$C_{12}H_8Cl_6O$	organoclorado	inseticida	*	NA
Endrin	$C_{12}H_8Cl_6O$	organoclorado	inseticida	*	NA
Etoprofós	$C_8H_{19}O_2PS_2$	organofosforado	nematicida/inseticida	I	NA
Etrinfós	$C_{10}H_{17}N_2O_4PS$	organofosforado	inseticida/acaricida	*	NA
Fenitrotiona	$C_9H_{12}NO_5PS$	organofosforado	inseticida/formicida	II	NA
Metolacloro	$C_{15}H_{22}ClNO_2$	cloroacetanilida	herbicida	III	NA
Procimidona	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	dicarboximida	fungicida	IV	2

*: não possui autorização de uso no Brasil, CT: Classificação toxicológica, NA: não autorizado, LMR: Limite máximo de resíduos; Fonte: ANVISA, 2017b.

Os reagentes e solventes utilizados foram testados previamente para atenderem aos padrões mínimos requeridos para a análise de resíduos de agrotóxicos. Os cromatogramas obtidos após a extração dos reagentes e solventes foram avaliados quanto a presença de picos no tempo de retenção dos IA analisados. Foram utilizados: acetona grau para análise de resíduos (PAR), diclorometano PAR, acetona grau para análise (PA) e ácido acético glacial PA, da marca Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); sulfato de sódio anidro PA, da marca Êxodo Científica (Hortolândia, Brasil); sulfato de magnésio anidro PA, acetonitrila grau HPLC e n-hexano PAR, da marca J. T. Baker (Japão); PSA bondesil, da marca Agilent (EUA); acetato de sódio da marca Dinâmica (Diadema, Brasil); e hélio ultra puro da marca da IBG (São Paulo, Brasil).

4.4 Soluções

4.4.1 Padrão - Solução estoque e solução *pool* dos analitos

As soluções estoque (SE) foram preparadas em acetona PAR, para os 10 analitos de interesse neste estudo, individualmente, considerando a pureza de cada composto. A partir das SE, preparou-se a solução *pool* (SP) em acetonitrila PAR.

A SP foi utilizada para realizar os ensaios com adição de padrão e também as curvas de calibração. As purezas, as concentrações na SE e SP, de cada analito, estão listadas na **Tabela 9**. As soluções foram armazenadas em freezer com temperatura inferior a - 15 °C.

TABELA 9: Pureza dos padrões e concentração dos analitos nas soluções estoques e solução *pool*.

Composto	Pureza (%)	SE ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Atrazina	99,0	1001,80	7,50
Clorfenapir	99,0	997,92	7,50
Clorpirifós metil	98,5	1000,76	1,50
Dieldrin	97,5	887,30	15,00
Endrin	99,0	2487,50	1,50
Etoprofós	98,0	1007,44	7,50
Etrinfós	50,0	988,00	1,50
Fenitrotiona	98,0	985,90	7,50
Metolacoloro	99,0	978,12	1,50
Procimidona	98,0	999,60	7,50

SE: Solução estoque, SP: solução *pool*

4.4.2 Padrão - Solução de possíveis interferentes

Os padrões heptacloro, mevinfós e quintozene foram preparados na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila. A solução foi armazenada em freezer com temperatura inferior a - 15 °C.

4.4.3 Solução de padrão interno (SPI)

O trifenilmetano foi utilizado como padrão interno e sua solução foi preparada na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila. A solução foi armazenada em freezer com temperatura inferior a $-15 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.4 Solução extratora

A solução extratora do método QuEChERS modificado foi preparada com 1 % de ácido acético PA (v/v) em acetonitrila PAR e a do NL-método modificado foi preparada medindo-se volumes de n-hexano PAR e diclorometano PAR na proporção de 2:1 (v/v).

4.5 Amostras

Para a otimização e a validação do método foram utilizadas amostras de tomate, consideradas brancas para os agrotóxicos em estudo. Os tomates foram coletados em produções sabidamente isentas de aplicação de agrotóxicos na zona rural de Paraopeba – MG, Brasil. 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. As amostras brancas foram devidamente acondicionadas e identificadas e armazenadas sob congelamento em temperatura inferior a $-15 \text{ }^\circ\text{C}$, até o momento dos ensaios.

Para o estudo de monitoramento, foram coletadas 20 amostras de tomate por fiscais agropecuários do IMA, diretamente nas propriedades rurais. Os frutos foram acondicionados em saco plástico lacrado e enviados ao laboratório em caixa de isopor, respeitando o prazo máximo permitido, entre a coleta e sua entrada no laboratório, de 36 horas. As amostras foram coletadas, entre fevereiro e maio de 2017, nos municípios de São Gonçalo do Sapucaí, Cajuri, Uberaba, Alfredo Vasconcelos, Divinópolis, Araxá, Pimenta, Piumhi, Arapuá, Patrocínio, São José da Varginha, Pequi,

Onça do Pitangui, Araguari e Barbacena, possibilitando a rastreabilidade das amostras e a adoção de medidas de orientação e controle.

As amostras de tomate recebidas no laboratório foram adequadamente identificadas, trituradas (com casca), homogeneizadas, acondicionadas em sacos plásticos também identificados e armazenadas em freezer com temperatura inferior a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento dos ensaios.

4.6 Método de ensaio

4.6.1 Preparo da amostra pelo método QuEChERS modificado

As amostras de tomate, previamente trituradas e homogeneizadas, foram descongeladas até atingirem a temperatura ambiente. Alíquotas de $15,00\text{ g} \pm 0,10\text{ g}$ foram pesadas diretamente em tubos de centrifuga, com auxílio de espátula.

4.6.1.1 Extração

A extração foi realizada com a adição de 15 mL da solução de acetonitrila acidificada, em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos.

4.6.1.2 Adição de sais

Adicionou-se, simultaneamente, 6 g de sulfato de magnésio anidro PA e 1,5 g de acetato de sódio PA. Logo após, os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos e posteriormente centrifugados a 3500 g por 10 minutos.

4.6.1.3 Purificação

A técnica de DSPE foi utilizada para a purificação da amostra. Uma alíquota de 3 mL do sobrenadante (fase orgânica) foi transferida para tubo de centrifuga de 15 mL, contendo 150 mg de PSA e 450 mg de sulfato de magnésio anidro PA. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos e posteriormente centrifugados a 3500 g por 10 minutos.

4.6.1.4 Evaporação

O extrato foi concentrado para melhorar a resposta no equipamento. Uma alíquota de 1,75 mL do sobrenadante foi transferida com micropipeta para tubo de ensaio e realizou-se a evaporação do solvente em concentrador, composto por banho-maria a 40 °C (± 5 °C) com sistema de evaporação sob fluxo de ar comprimido. Por fim, 70 μ L da solução de padrão interno foi adicionada ao tubo e o extrato foi reconstituído com acetonitrila PAR totalizando 0,70 mL de volume final, que foi transferido para vial para determinação cromatográfica.

O preparo do extrato branco, utilizado na curva de calibração em matriz, foi submetido ao mesmo tratamento da amostra até etapa de purificação. Na etapa de evaporação, uma alíquota de 2,25 mL do sobrenadante foi levada à secura no concentrador. Posteriormente, foram adicionadas alíquotas da SP e SPI de acordo com o respectivo nível da curva de calibração e o extrato foi reconstituído com acetonitrila PAR totalizando 0,90 mL de volume final, que foi transferido para vial para determinação cromatográfica.

Na **Figura 6** encontra-se representado o fluxograma do preparo da amostra pelo método QuEChERS modificado com as etapas de extração, adição de sais, purificação e evaporação.

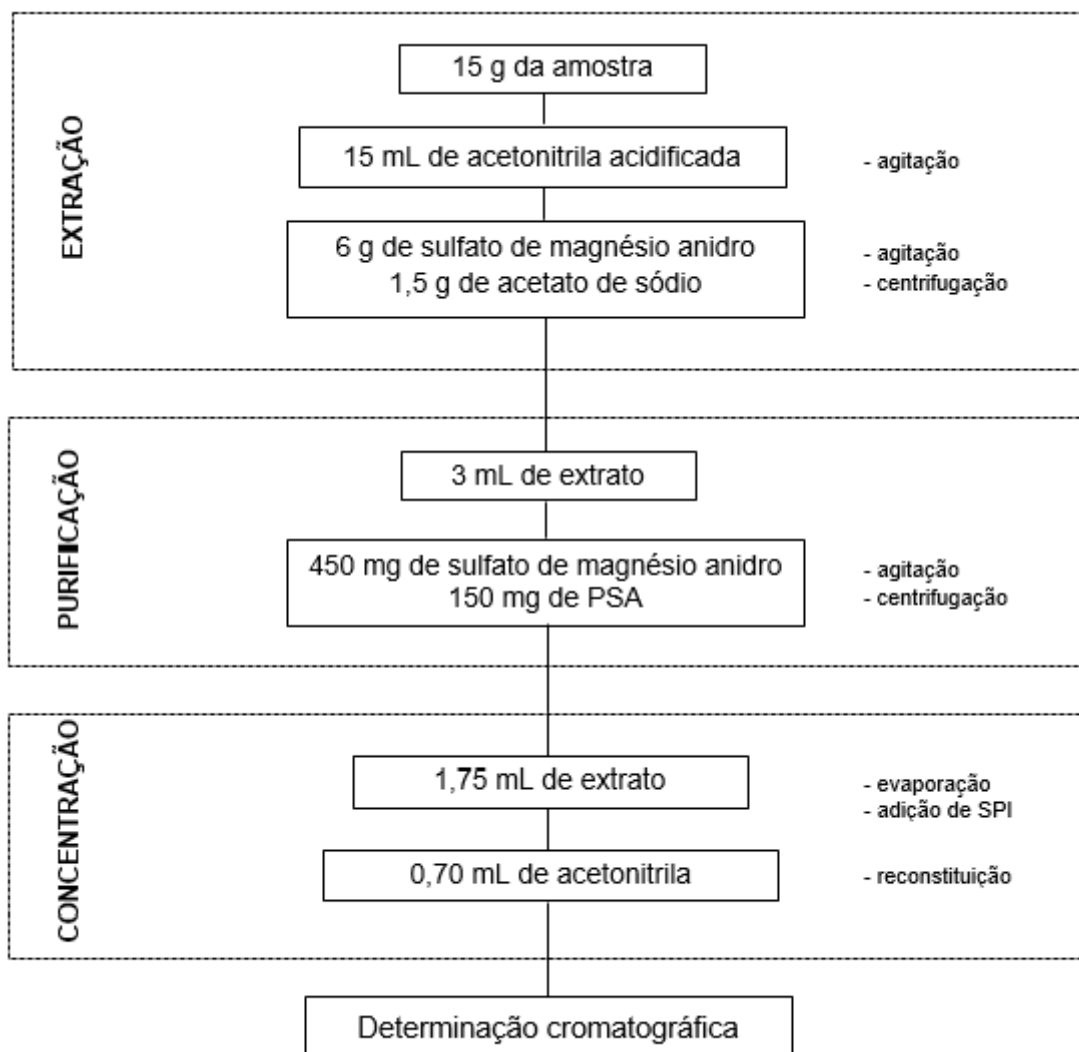


FIGURA 6: Fluxograma do preparo da amostra pelo método QuEChERS modificado.

4.6.2 Preparo da amostra pelo NL-método modificado

As amostras de tomate, previamente trituradas e homogeneizadas, foram descongeladas até atingirem a temperatura ambiente. Alíquotas de $15,00 \text{ g} \pm 0,10 \text{ g}$ foram pesadas diretamente em béquer de 400 mL, com auxílio de espátula.

4.6.2.1 Adição de sal

Adicionou-se, 15 g de sulfato de sódio anidro à amostra, que foi agitada cuidadosamente para que toda a amostra entrasse em contato com o sal.

4.6.2.2 Extração

A extração foi realizada, primeiramente, adicionando 20 mL de acetona PAR ao béquer. Em seguida utilizou-se homogeneizador tipo *ultra turrax* por 30 segundos. Posteriormente, acrescentou-se 30 mL da solução extratora n-hexano:diclorometano (2:1) à amostra, que foi homogeneizada novamente por 30 segundos em *ultra turrax*. A amostra foi filtrada para um kitasato utilizando funil de Buchner, papel de filtro e bomba a vácuo. O filtrado foi transferido para proveta de 50 mL e seu volume foi completado com a solução extratora.

4.6.2.3 Evaporação

O extrato foi concentrado para melhorar a resposta no equipamento. Uma alíquota de 6 mL do sobrenadante foi transferida com micropipeta para tubo de ensaio e realizou-se a evaporação do solvente em concentrador, composto por banho-maria a 40 ° C (± 5 °C) com sistema de evaporação sob fluxo de ar comprimido. Em seguida, 72 μ L da SPI foi adicionada ao tubo e o extrato foi reconstituído com acetonitrila PAR totalizando 0,72 mL de volume final, que foi transferido para vial para determinação cromatográfica.

O fluxograma do preparo da amostra pelo método NL-método modificado com as etapas de extração, adição de sal e evaporação está representado na **Figura 7**.

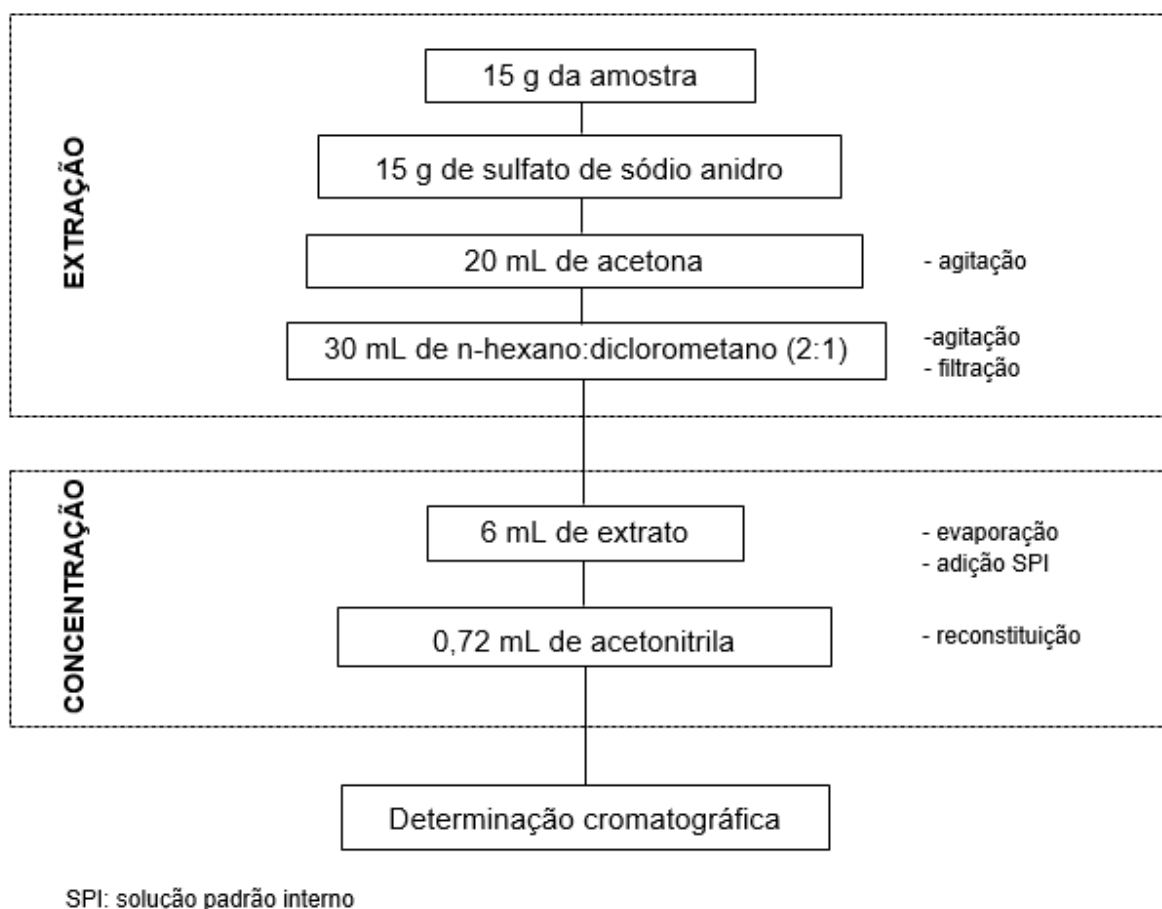


FIGURA 7: Fluxograma do preparo da amostra pelo método NL-método modificado.

4.6.3 Determinação cromatográfica

4.6.3.1 Identificação dos tempos de retenção e fragmentos

As condições de operação do sistema GC foram: fluxo de hélio (gás de arraste): $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; modo de injeção: *splitless*; volume de injeção: $1 \mu\text{L}$; temperatura do injetor: $250 \text{ }^\circ\text{C}$; rampa de temperatura do forno da coluna: $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min, $15 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $130 \text{ }^\circ\text{C}$, $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $240 \text{ }^\circ\text{C}$, $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $300 \text{ }^\circ\text{C}$; tempo total da corrida: 45 min. O espectrômetro de massas foi ajustado com os seguintes parâmetros: temperatura da *transfer line*: $280 \text{ }^\circ\text{C}$; temperatura da fonte: $230 \text{ }^\circ\text{C}$; ionização por impacto eletrônico: 70 eV; full scan: m/z 50 a 400.

Para selecionar os íons monitorados no modo SIM, realizou-se a injeção de cada composto individualmente no modo *full scan*, obtendo-se o seu respectivo espectro de massas. No modo SIM foram utilizadas as mesmas condições de operação utilizadas no modo *full scan*.

Os agrotóxicos analisados e os respectivos tempos de retenção e íons selecionados estão relatados na **Tabela 10**:

TABELA 10: Analitos estudados com seus respectivos tempos de retenção e íons monitorados.

Composto	t_r (min)	Íons monitorados (m/z)
Etoprofós	15,36	158, 97, 200
Atrazina	18,74	200, 215, 202
Etrinfós	21,34	181, 153, 292
Clorpirifós metil	23,05	286, 288, 125
Fenitrotiona	24,70	260, 277, 125
Metolaclo	25,67	162, 238, 240
Procimidona	28,91	96, 283, 285
Dieldrin	31,05	263, 79, 277
Endrin	32,28	245, 281, 243
Clorfenapir	33,35	247, 249, 137

t_r = tempo de retenção

4.7 Validação

Os parâmetros linearidade, seletividade, efeitos de matriz, veracidade, precisão, limites de detecção e de quantificação, e incerteza foram estabelecidos em ensaios intralaboratoriais 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 (EC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; SOUZA, 2007; INMETRO, 2016; SANTE, 2015). O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$.

4.7.1 Linearidade e faixa linear

A linearidade do método foi avaliada conforme procedimento descrito por SOUZA & JUNQUEIRA (2005). Após a definição da faixa de estudo, as curvas de calibração foram preparadas, nas mesmas concentrações, com os analitos no solvente (curva usual) (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005) e no extrato branco da matriz (curva matrizada) (BELLO *et al.*, 2017).

As curvas de calibração foram preparadas em seis níveis de concentração, igualmente espaçados, como mostra as **Tabelas 11 e 12**, em mg mL⁻¹ e mg kg⁻¹, respectivamente. Alíquotas de 15 µL, 30 µL, 45 µL, 60 µL, 75 µL e 90 µL da SP e 90 µL da SPI foram transferidas para seus respectivos tubos de ensaio, sendo que na curva matrizada as alíquotas da SP foram transferidas para tubos contendo o extrato branco previamente preparado (item 4.6.1.4). Os solventes foram evaporados em concentrador composto por banho-maria a 40 °C (± 5 °C) com sistema de evaporação sob fluxo de ar comprimido. Após a evaporação dos solventes, os padrões foram reconstituídos em 900 µL de acetonitrila, homogeneizados e transferidos para vials.

TABELA 11: Níveis de concentração das curvas de calibração em mg mL⁻¹.

Princípio ativo	Concentração (mg mL ⁻¹)					
Atrazina	0,125	0,250	0,375	0,500	0,625	0,750
Clorfenapir	0,125	0,250	0,375	0,500	0,625	0,750
Clorpirifós metil	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125	0,150
Dieldrin	0,250	0,500	0,750	1,000	1,250	1,500
Endrin	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125	0,150
Etoprofós	0,125	0,250	0,375	0,500	0,625	0,750
Etrinofós	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125	0,150
Fenitrotiona	0,125	0,250	0,375	0,500	0,625	0,750
Metolacloro	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125	0,150
Procimidona	0,125	0,250	0,375	0,500	0,625	0,750

TABELA 12: Níveis de concentração das curvas de calibração em mg kg⁻¹.

Princípio ativo	Concentração (mg kg ⁻¹)					
Atrazina	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
Clorfenapir	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
Clorpirifós metil	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
Dieldrin	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60
Endrin	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
Etoprofós	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
Etrinfós	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
Fenitrotona	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
Metolaclo	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
Procimidona	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30

As curvas de calibração foram preparadas nos quatro dias de validação, sendo as leituras realizadas em ordem aleatória. Os brancos de solvente foram preparados para todas as curvas como ferramenta de controle de qualidade interno. As leituras foram realizadas em ordem aleatória, dentro de cada dia (SOUZA, 2007).

Os valores dispersos foram investigados pelo teste de resíduos padronizados de Jacknife 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. Os parâmetros da regressão foram estimados pelo MMQO, sendo verificadas as premissas de normalidade (teste de Ryan & Joiner), homoscedasticidade (teste de Brown & Forsythe ou Levene), independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin & Watson), significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (ANOVA) (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

4.7.2 Efeitos de matriz e seletividade

O estudo da influência da matriz na determinação dos analitos estudados foi verificado por comparação das curvas de calibração em solvente e em matriz branca de tomate. As curvas foram avaliadas como descrito para o estudo da linearidade (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). Posteriormente, fez-se o teste F para avaliação da diferença entre as variâncias das curvas. A interferência da matriz foi

investigada pela comparação das inclinações e interseções das curvas pelo teste t de Student. Os efeitos de matriz foram considerados significativos quando o valor de t calculado excedeu o valor de t crítico (THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA, 2007; BELLO *et al.*, 2017).

Na avaliação da seletividade do método foram analisadas amostras brancas sem o analito, que foram preparadas e injetadas todos os dias da validação para verificar a ocorrência de possíveis interferências tais como sinais ou picos na região em que se prevê a eluição do analito pesquisado. Também foram analisadas amostras brancas adicionadas de possíveis interferentes (heptacloro, mevinfós e quintozene) (EC, 2002).

4.7.3 Veracidade e precisão

O estudo da veracidade (recuperação) e precisão, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, foram realizados com amostras brancas adicionadas de SP.

A adição de SP foi realizada em três níveis de concentração (baixa, média e alta) da faixa linear da curva de calibração. Foram adicionados 100 µL; 400 µL e 600 µL da SP para cada tubo contendo 15 g de amostra branca. Os tubos foram deixados em repouso por 30 minutos a fim de permitir uma interação dos agrotóxicos com a amostra, antes da extração. Os três níveis de adição estudados estão representados na **Tabela 13**.

TABELA 13: Níveis de concentração dos analitos no estudo de veracidade e precisão.

Princípio ativo	Concentração (mg kg ⁻¹)		
Atrazina	0,05	0,20	0,30
Clorfenapir	0,05	0,20	0,30
Clorpirifós metil	0,01	0,04	0,06
Dieldrin	0,10	0,40	0,60
Endrin	0,01	0,04	0,06
Etoprofós	0,05	0,20	0,30
Etrinfós	0,01	0,04	0,06
Fenitrotiona	0,05	0,20	0,30
Metolaclo-ro	0,01	0,04	0,06
Procimidona	0,05	0,20	0,30

Para cada nível de concentração estudado, doze replicatas verdadeiras e independentes foram preparadas e analisadas. As análises foram divididas em quatro bateladas de três replicatas, sendo os ensaios dos dias 1 e 2 realizados pelo analista 1 e dos dias 3 e 4 pelo analista 2 (SOUZA, 2007).

Os resultados foram avaliados por ANOVA para estimativa dos desvios padrão relativos obtidos sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, para cada nível de concentração, com verificação prévia de valores dispersos pelo teste de Grubbs e das premissas de normalidade (teste de Ryan & Joiner) e homoscedasticidade (teste de Brown & Forsythe) dos resíduos (SOUZA, 2007). Baseando nos valores estabelecidos pela SANTE (2015), norma específica para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, foram considerados aceitáveis médias de recuperação entre 70 % e 120 %; e desvios padrão relativos de repetibilidade (DPR_r) e de precisão intermediária (DPR_R) menores ou iguais a 20%.

4.7.4 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção foram verificados a partir da curva analítica, que correspondem a três vezes os desvios padrão dos interceptos obtidos para as curvas de calibração em matriz, divididos pelas inclinações (BRASIL, 2003b). A relação

sinal/ruído ≥ 2 foi considerada aceitável para estimativa do limite de detecção (INMETRO, 2016).

Os limites de quantificação do método corresponderam às concentrações abaixo das quais o método não operou com precisão e recuperação aceitáveis. Desta forma, os referidos limites foram definidos como os menores níveis de concentração avaliados no processo de validação, para os quais os valores de recuperação, precisão e incerteza foram aceitáveis (SOUZA, 2007).

4.7.5 Incerteza de medição

Para a estimativa da incerteza de medição foi utilizada a abordagem *Top Down*, considerando apenas as fontes principais de incerteza dos dados obtidos no ensaio de recuperação nos quatro dias de validação (BRASIL, 2011).

As incertezas associadas à precisão intermediária e à curva de calibração foram consideradas como fontes principais para a incerteza final. A contribuição da curva de calibração foi calculada combinando a incerteza: da resposta instrumental; do intercepto e inclinação da curva de calibração; e da covariância entre o intercepto e inclinação (BRASIL, 2011), como representado na **Figura 8**.

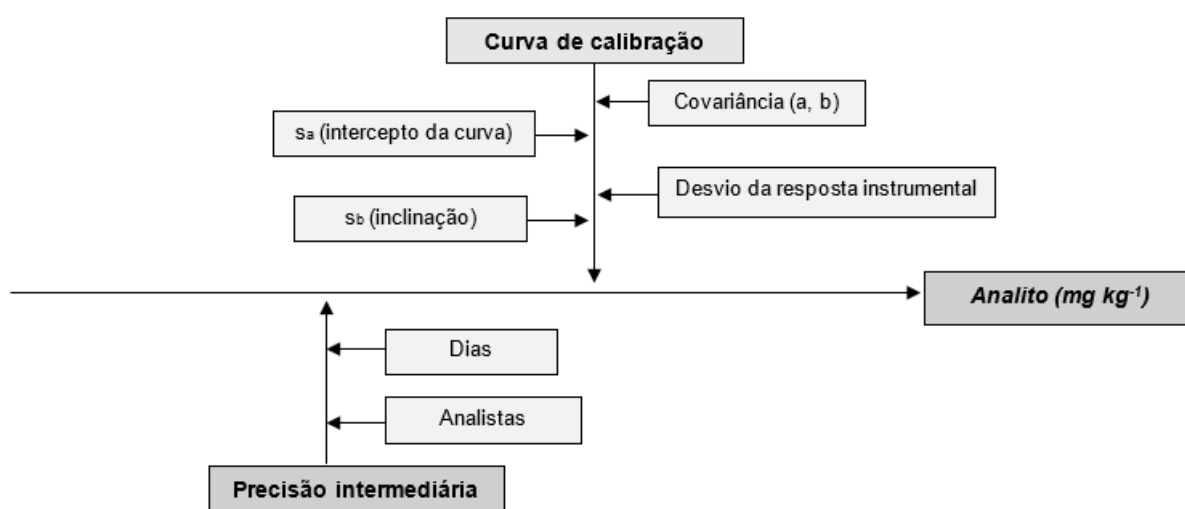


FIGURA 8: Diagrama representando as principais fontes de incerteza do método.

A incerteza de cada fonte declarada foi convertida em uma medida equivalente a um desvio padrão: a incerteza padronizada ou padrão. Para converter todas as unidades para a unidade do mensurando (mg kg^{-1}), multiplicou-se cada incerteza padrão por um coeficiente de sensibilidade, resultando no que chamamos de contribuição da incerteza. Depois de estimar a contribuição da incerteza de cada componente, foi estimada a incerteza combinada pela lei de propagação da incerteza, que foi multiplicada pelo fator de abrangência para obtenção da incerteza expandida (EURACEM/CITAC, 2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Matriz representativa

Como o tomate é uma cultura representativa do grupo de vegetais frutíferos e cucurbitáceos com alto teor de água (SANTE, 2015), posteriormente o método será ampliado para outras culturas desse grupo que são monitoradas pelo IMA como o melão, pepino, abobrinha, chuchu, entre outros.

5.2 Comparação entre os métodos QuEChERS modificado e NL-método modificado

O método modificado de preparo da amostra proposto por LOZANO e colaboradores (2016) apresentou valores de recuperação entre 47,2 e 71,4 % e DPR entre 7,1 e 23,7 %, enquanto o método QuEChERS modificado (LEHOTAY *et al.*, 2005) evidenciou valores de recuperação entre 65,5 e 83,4 % e DPR entre 5,3 e 9,9 %, conforme demonstrado na **Tabela 14**. O NL-método modificado foi realizado com algumas adaptações disponíveis no laboratório, o que pode ter ocasionado resultados de recuperações e DPR diferentes dos obtidos pelos autores.

O método QuEChERS modificado de preparo da amostra apresentou baixo consumo de solventes e recuperações significativamente maiores que as obtidas pelo método proposto por LOZANO (2016) ($t_{8g.l.} = 5,03$, $p < 0,001$) e, conseqüentemente, foi adotado na validação intralaboratorial.

Na comparação entre os métodos observou-se uma grande variação nas respostas obtidas pelo CG-EM, então a técnica de calibração interna foi utilizada na validação do método sendo a solução de padrão interno adicionada no extrato final antes da etapa de determinação cromatográfica. A adição de padrão interno nos extratos finais permite a verificação e possível correção na variação do volume de injeção (SANTE, 2015).

TABELA 14: Recuperações médias e desvios padrão relativos obtidos na comparação entre NL-método modificado e QuEChERS modificado.

Analitos	NL-Método modificado		QuEChERS modificado	
	R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)
Atrazina	71,4	13,5	74,5	6,5
Clorpirifós metil	47,2	12,8	75,7	9,2
Dieldrin	53,3	10,2	81,6	9,9
Endrin	47,7	15,1	76,5	7,3
Etoprofós	62,4	18,8	65,5	7,3
Etrinofós	53,2	18,8	68,5	7,6
Fenitrotiona	51,9	23,7	69,9	9,3
Metolacloro	71,0	7,1	83,4	5,3
Procimidona	63,8	8,8	78,7	6,3

$t_{8g.l.}$: 5,03; $p < 0,001$, R: média de recuperação, DPR: desvio padrão relativo

5.3 Confirmação

A razão entre os íons, nas curvas de calibração e nas amostras, foi avaliada para cada IA em todos os experimentos da validação. Na **Tabela 15** estão reportadas as variabilidades das intensidades relativas que foram obtidas pela média das razões das intensidades dos íons de confirmação pelos íons de quantificação de cada IA. O documento SANTE (2015) estabelece que a tolerância máxima permitida é de $\pm 30\%$,

portanto todos os analitos estudados apresentaram a razão entre íons dentro da faixa de tolerância aceitável.

TABELA 15: Variabilidade da intensidade relativa dos íons estudados em um dia de análise.

Analitos	Intensidade relativa¹	DPR¹ (%)	Intensidade relativa²	DPR² (%)
Atrazina	0,36	9,31	0,21	12,65
Clorfenapir	0,65	9,75	0,35	14,17
Clorpirifós metil	0,72	5,07	0,42	8,34
Dieldrin	0,71	12,79	0,39	16,58
Endrin	0,75	6,06	0,54	9,25
Etoprofós	0,86	4,83	0,47	11,74
Etrinós	0,65	7,74	0,29	14,65
Fenitrotona	0,43	18,23	0,22	19,89
Metolacoloro	0,38	6,10	0,16	9,65
Procimidona	0,74	6,22	0,49	10,68

DPR: Desvio padrão relativo, ¹: íon de confirmação 1 e íon de quantificação, ²: íon de confirmação 2 e íon de quantificação

5.4 Linearidade

A linearidade foi demonstrada por meio da comprovação das premissas da regressão linear simples, nas faixas de 0,01 a 0,06 mg kg⁻¹ para clorpirifós metil, endrin, etrinós e metolacoloro, 0,05 a 0,30 mg kg⁻¹ para atrazina, clorfenapir, etoprofós, fenitrotona e procimidona e 0,10 a 0,60 mg kg⁻¹ para dieldrin.

Os valores dispersos detectados foram removidos individualmente até que novos valores dispersos não fossem mais detectados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. O número máximo removido por curva foi de quatro valores dispersos, atendendo ao limite de exclusão de 2/9 dos dezoito dados originais. Os gráficos dos resíduos da regressão, com indicação dos valores dispersos detectados, estão apresentados na **Figura 9**.

Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner obtidos foram superiores aos valores críticos, variando entre 0,957 e 0,991, demonstrando que os desvios da normalidade não foram significativos ($p > 0,10$) para todos os IA estudados.

O perfil homogêneo de distribuição dos pontos nos quatro quadrantes dos gráficos de Durbin-Watson sugeriu que não houve tendências positivas ou negativas ($p > 0,10$) dos resíduos. As estatísticas calculadas variaram entre 1,640 e 2,510, intervalos que não apresentaram autocorrelação entre os resíduos, conforme mostrado na **Figura 10**.

A homoscedasticidade foi demonstrada pela homogeneidade da variância dos resíduos ao longo dos níveis de concentração estudados. Na **Figura 11** estão mostradas que as estatísticas t de Levene não foram significativas ($p > 0,05$), com valores estimados entre 0,189 e 1,160.

Os resultados dos testes de normalidade, independência dos resíduos e homoscedasticidade tornaram adequado o uso do método linear simples para estimativa dos parâmetros das curvas das regressões. As regressões foram significativas ($p < 0,001$), com desvios da linearidade não significativos ($p > 0,05$) para as curvas de todos os analitos. Na **Tabela 16**, estão demonstradas as estatísticas da análise de variância da regressão das curvas de todos os analitos no dia 1 de análise.

As equações, coeficientes de determinação e o número de observações obtidos após o tratamento dos valores dispersos pelo teste do resíduo padronizado Jackknife ($p < 0,05$) obtidos em um dia de análise, encontram-se compilados na **Tabela 17**.

As faixas validadas como lineares foram consideradas adequadas para análise de resíduos de atrazina, clorfenapir, clorpirifós metil, dieldrin, endrin, etoprofós, etrinfós, fenitrotona, metolacoloro e procimidona em tomate. Outra faixa linear, semelhante às obtidas no presente trabalho, foi reportada por RESTREPO e colaboradores (2014), que determinaram a linearidade das curvas de 24 IA em tomate, utilizando QuEChERS e CG-EM. Entre eles, os analitos clorpirifós metil, etoprofós e procimidona que demonstraram linearidade na faixa de 0,02 a 0,20 mg kg⁻¹ por regressão linear ponderada. A linearidade das curvas de calibração foi analisada de

acordo com os resíduos dos pontos experimentais e o valor do coeficiente de determinação não foi considerado como um parâmetro para determinar a linearidade.

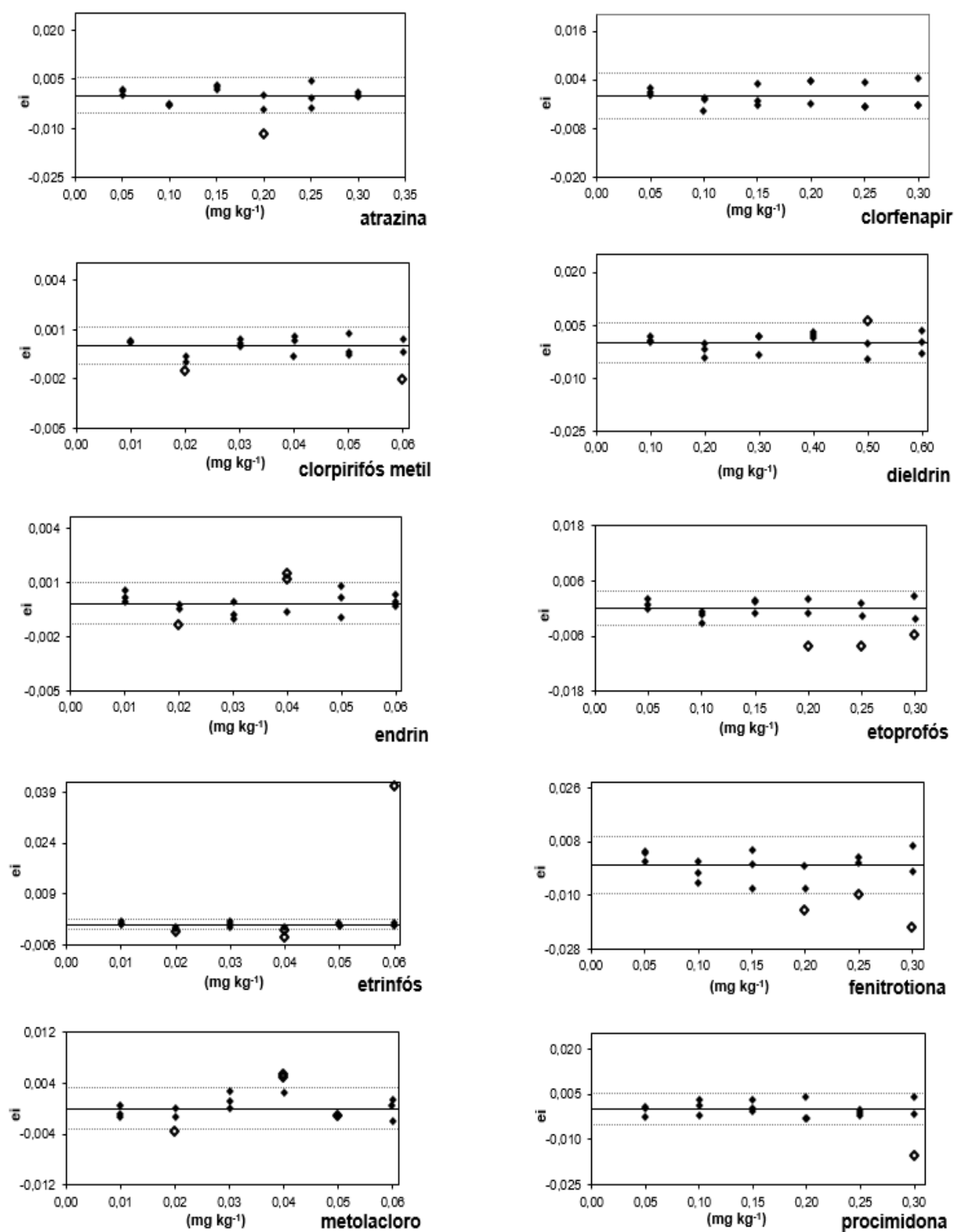


FIGURA 9: Gráficos dos resíduos da regressão das curvas de cada analito em matriz de tomate com indicação dos respectivos valores dispersos em um dia de análise. e_i : resíduo da regressão, \diamond : valor disperso, e - - - : $(\pm t_{(0,975;n-2)} S_{res})$

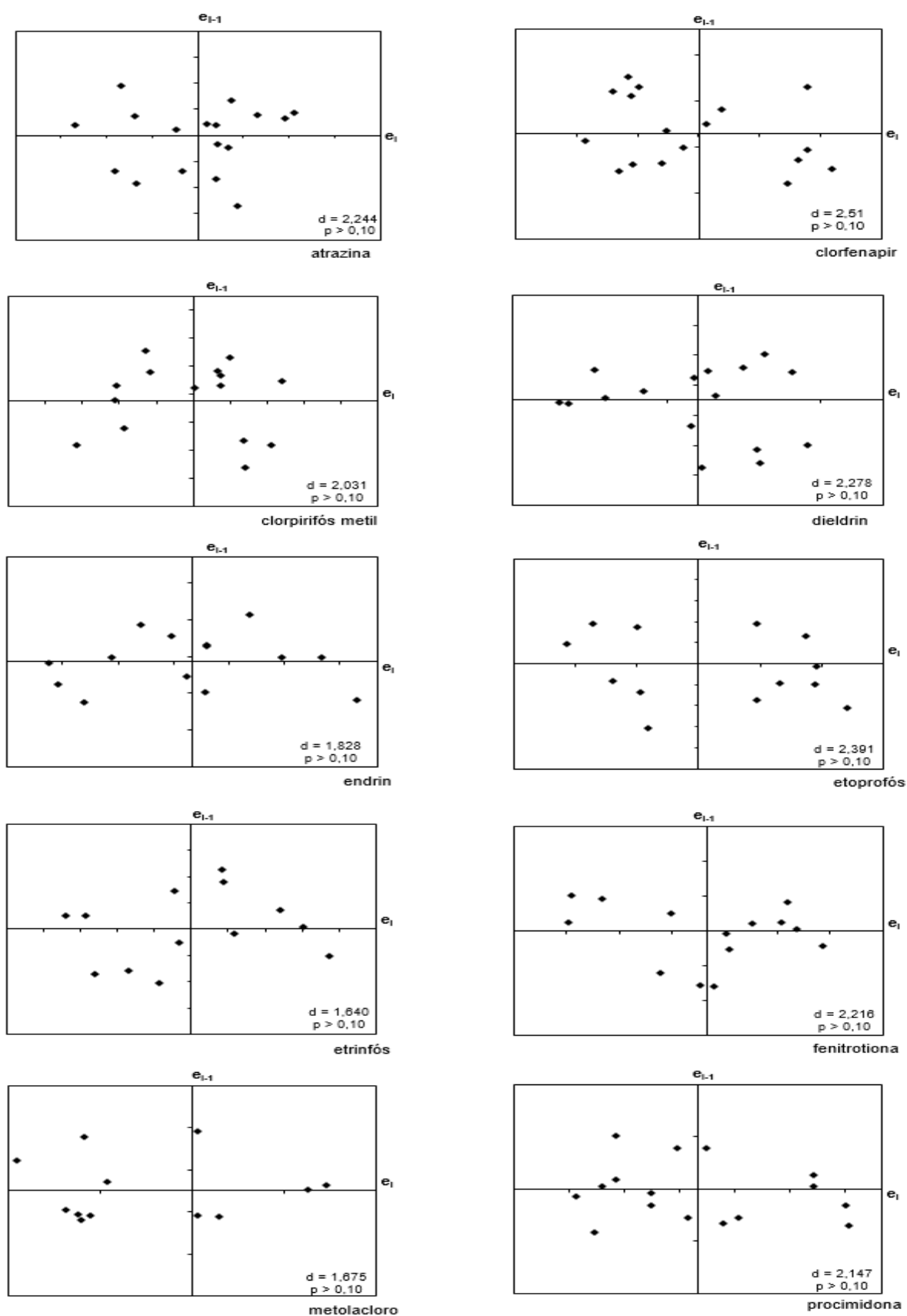
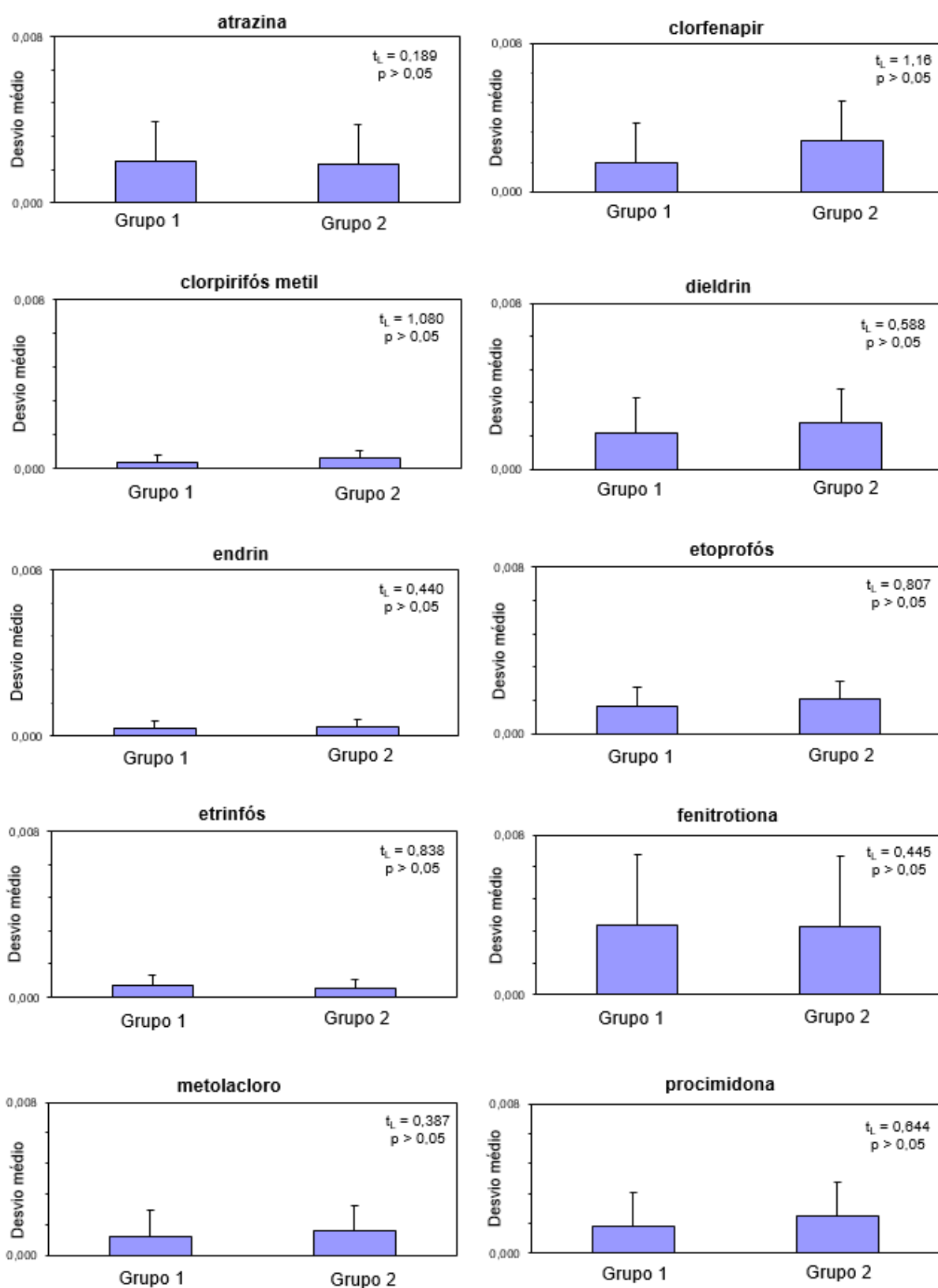


FIGURA 10: Gráficos de Durbin-Watson das curvas de cada analito em um dia de análise.

e_i : resíduo da regressão, d : estatística de Durbin-Watson, p : significância



t_L : estatística t de Levene , p : significância

FIGURA 11: Representação gráfica do teste de Levene para curvas de cada analito em um dia de análise.

TABELA 16: Estatísticas da análise de variância da regressão e do desvio de linearidade obtidas em um dia de análise.

Analito	Regressão		Desvio da linearidade	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Atrazina	6160,64	$4,99 \times 10^{-21}$	3,15	0,06
Clorfenapir	15454,14	$4,92 \times 10^{-20}$	3,74	0,05
Clorpirifós metil	4422,63	$6,54 \times 10^{-19}$	1,79	0,21
Dieldrin	2830,85	$1,67 \times 10^{-18}$	1,89	0,18
Endrin	2992,48	$9,37 \times 10^{-17}$	1,38	0,31
Etoprofós	1924,05	$1,63 \times 10^{-15}$	1,17	0,39
Etrinfós	16277,11	$3,61 \times 10^{-20}$	2,87	0,10
Fenitrotiona	715,19	$9,46 \times 10^{-13}$	1,27	0,35
Metolacloro	5719,46	$1,41 \times 10^{-18}$	3,40	0,06
Procimidona	1894,52	$3,33 \times 10^{-17}$	0,52	0,72

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

TABELA 17: Equações, coeficientes de determinação e número de observações obtidos em um dia de análise.

Analito	Equação	<i>r</i> ²	n
Atrazina	$y = (0,5657 \pm 0,0072)x - (0,0081 \pm 0,0014)$	0,998	17
Clorfenapir	$y = (0,1306 \pm 0,0075)x + (0,0027 \pm 0,0015)$	0,980	18
Clorpirifós metil	$y = (0,5285 \pm 0,0079)x - (0,0008 \pm 0,0003)$	0,997	16
Dieldrin	$y = (0,1960 \pm 0,0037)x - (0,0038 \pm 0,0014)$	0,995	17
Endrin	$y = (0,3998 \pm 0,0073)x - (0,0008 \pm 0,0003)$	0,996	15
Etoprofós	$y = (0,2392 \pm 0,0055)x - (0,0023 \pm 0,0010)$	0,993	15
Etrinfós	$y = (1,3288 \pm 0,0104)x + (0,0014 \pm 0,0004)$	0,999	14
Fenitrotiona	$y = (0,3864 \pm 0,0144)x - (0,0109 \pm 0,0026)$	0,982	15
Metolacloro	$y = (1,6469 \pm 0,0218)x + (0,0033 \pm 0,0009)$	0,998	15
Procimidona	$y = (0,3208 \pm 0,0074)x + (0,0076 \pm 0,0014)$	0,992	17

*r*²: coeficiente de determinação, n: número de observações

5.5 Efeitos de matriz e seletividade

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.

As comparações entre as interseções e inclinações das curvas de cada analito no solvente e na matriz de tomate, bem como a avaliação da homogeneidade das variâncias dessas curvas estão apresentados na **Tabela 18**. O resultado do teste F para avaliação da diferença entre as variâncias da curva usual e em matriz demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as variâncias dos resíduos para os compostos atrazina, etoprofós e metolacloro, portanto, o teste t com variâncias distintas foi conduzido para comparação das interseções e inclinações dessas curvas. Para os compostos clorpirifós metil, dieldrin, endrin, etrinfós, fenitrotiona e procimidona o teste F não apresentou diferenças significativas entre as variâncias das curvas ($p > 0,05$). Com base nesses resultados, foi conduzido teste t com variâncias combinadas para comparação das interseções e inclinações das referidas curvas.

Os analitos endrin, etrinfós e fenitrotiona não apresentaram efeitos de matriz significativos ($p > 0,05$). Para os compostos atrazina e dieldrin os efeitos matriz foram considerados significativos para os parâmetros de interseção e inclinação ($p < 0,05$). Para o composto etoprofós, os efeitos de matriz foram considerados significativos para o parâmetro de interseção ($p < 0,05$), enquanto para os compostos clorpirifós metil, metolacloro e procimidona os efeitos de matriz foram considerados significativos para o parâmetro de inclinação ($p < 0,05$) (**Tabela 18**). Desta forma, foi possível concluir que as curvas usuais analisadas para atrazina, clorpirifós metil, dieldrin, etoprofós, metolacloro e procimidona forneceram respostas que diferiram significativamente daquelas obtidas para as curvas feitas com a matriz de tomate, nas mesmas concentrações.

Os efeitos de matriz interferem na quantificação de alguns analitos, portanto, as amostras foram analisadas utilizando curvas de calibração em matriz. O documento SANTE (2015) recomenda que em MMR as curvas de calibração sejam feitas em matriz.

TABELA 18: Comparações entre as interseções e inclinações das curvas em solvente e em matriz de tomate.

Analito	F	Interseção		Inclinação	
		t_a	p	t_b	p
Atrazina	7,64	3,37	$3,9 \times 10^{-3}$	12,37	$1,3 \times 10^{-9}$
Clorpirifós metil	1,36	1,25	$2,2 \times 10^{-1}$	3,36	$2,2 \times 10^{-3}$
Dieldrin	1,12	2,19	$4,0 \times 10^{-2}$	3,01	$5,1 \times 10^{-3}$
Endrin	1,91	1,35	$2,0 \times 10^{-1}$	0,70	$4,9 \times 10^{-1}$
Etoprofós	2,79	3,85	$8,7 \times 10^{-4}$	1,97	$6,0 \times 10^{-1}$
Etrinfós	1,06	0,90	$3,7 \times 10^{-1}$	0,62	$5,4 \times 10^{-1}$
Fenitrotiona	1,33	0,03	$9,7 \times 10^{-1}$	1,93	$6,0 \times 10^{-1}$
Metolacloro	3,32	0,09	$9,3 \times 10^{-1}$	3,77	$1,0 \times 10^{-3}$
Procimidona	2,45	0,08	$9,4 \times 10^{-1}$	5,59	$8,0 \times 10^{-6}$

F = razão entre variâncias, t_a = estatística t para contrastes entre interseções, t_b = estatística t para contrastes entre inclinações, p = significância.

Na avaliação da seletividade do método as amostras brancas, não apresentaram picos nos tempos de retenção dos analitos estudados. Além disso, amostras brancas com adição dos possíveis interferentes, heptacloro, mevinfós e quintozene, não apresentaram sinais ou picos na região em que se previu a eluição dos analitos pesquisados.

Os cromatogramas típicos obtidos para: branco de solvente, branco de matriz e padrões estão apresentados na **Figura 12**, indicando a seletividade do método.

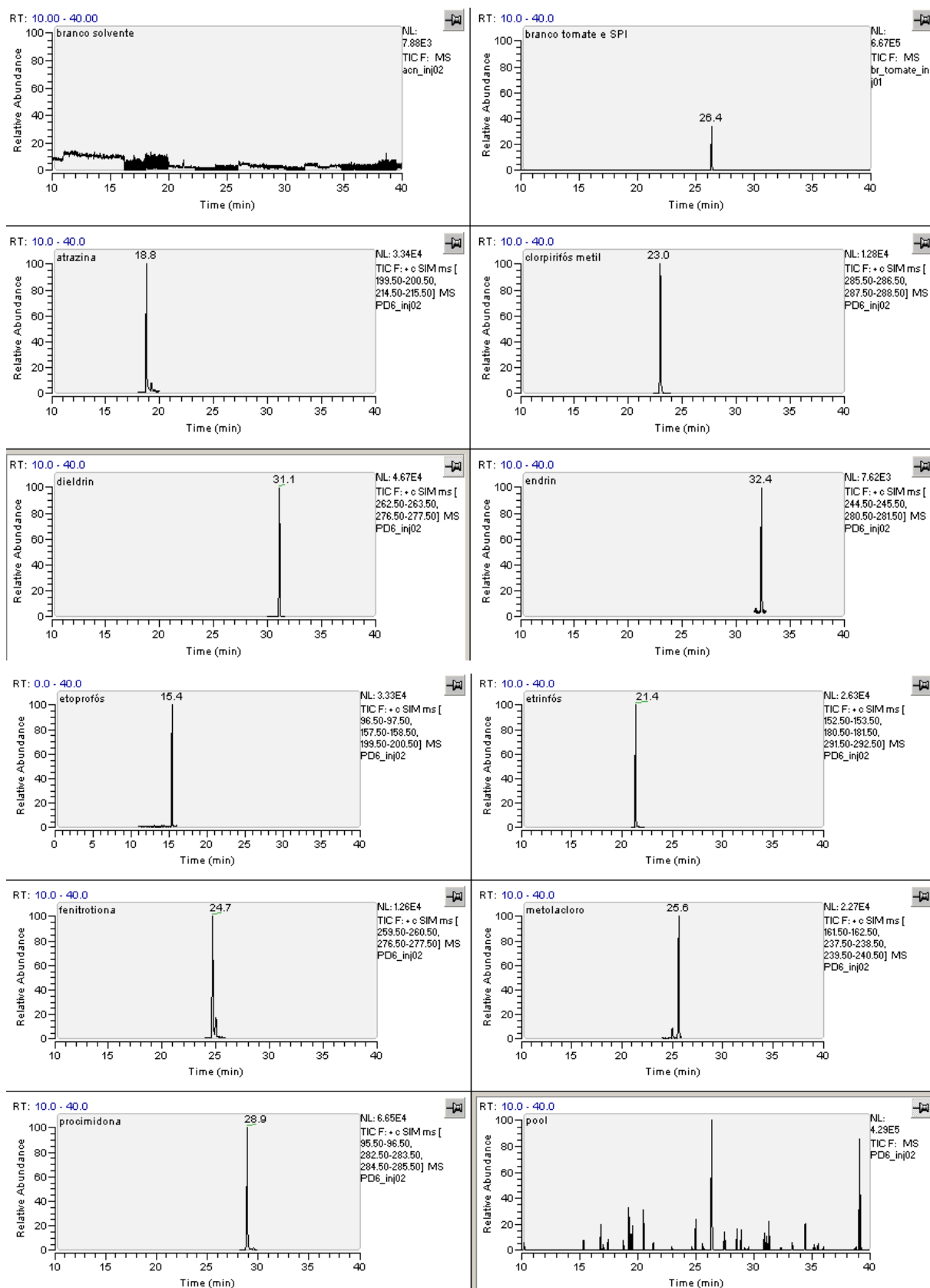


FIGURA 12: Cromatogramas do solvente, branco da matriz e padrões.

5.6 Veracidade e precisão

Os valores médios de recuperação utilizados na estimativa da veracidade, bem como o DPR_r e DPR_R utilizados na estimativa da precisão, nas condições de repetibilidade e precisão intermediária estão mostrados na **Tabela 19**.

TABELA 19: Recuperação médias e desvios padrão relativos obtidos, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária nos três níveis de concentração estudados.

Composto	Nível (mg/kg)	R (%)	DPR_r (%)	DPR_R (%)
Atrazina	0,05	102,32	8,78	19,61
	0,20	91,02	4,81	5,36
	0,30	94,36	5,42	7,07
Clorfenapir	0,05	90,07	9,07	15,39
	0,20	71,69	12,93	12,93
	0,30	80,40	5,84	6,64
Clorpirifós metil	0,01	98,97	3,47	7,25
	0,04	91,23	4,60	8,51
	0,06	93,96	7,47	9,01
Dieldrin	0,10	101,48	6,82	6,99
	0,40	90,00	3,01	8,47
	0,60	90,35	2,50	2,54
Endrin	0,01	102,15	5,67	12,18
	0,04	90,12	13,03	17,14
	0,06	92,22	8,96	13,03
Etoprofós	0,05	93,73	6,12	6,19
	0,20	96,21	9,46	15,09
	0,30	89,44	11,00	17,56
Etrinfós	0,01	110,15	6,28	10,55
	0,04	94,50	5,28	6,15
	0,06	93,69	10,14	10,14
Fenitrotiona	0,05	105,94	8,15	14,57
	0,20	96,47	11,65	13,11
	0,30	101,87	5,34	9,90
Metolaclo-ro	0,01	94,18	9,90	16,35
	0,04	96,00	7,77	9,58
	0,06	92,79	4,78	8,03
Procimidona	0,05	109,50	4,31	6,63
	0,20	95,81	10,83	15,52
	0,30	101,44	8,17	9,62

R: média de recuperação, DPR_r : desvio padrão relativo de repetibilidade, DPR_R : desvio padrão relativo de precisão intermediária.

Considerando os critérios de aceitabilidade estabelecidos pela SANTE (2015), de 70 a 120 % para recuperação e de 20 % para DPR_r e DPR_R , os resultados obtidos demonstraram veracidade e precisão nas faixas de 0,01 a 0,06 $mg\ kg^{-1}$ para clorpirifós metil, endrin, etrinfós e metolacloro, 0,05 a 0,30 $mg\ kg^{-1}$ para atrazina, clorfenapir, etoprofós, fenitrotiona e procimidona e 0,10 a 0,60 $mg\ kg^{-1}$ para dieldrin. As recuperações médias variaram entre 71,69 e 110,15 %, e os DPR_r e DPR_R variaram entre 2,50 e 13,03 % e 2,54 e 19,61 %, respectivamente.

5.7 Limites de detecção e quantificação

Os padrões de clorpirifós metil, endrin, etrinfós e metolacloro, preparados em matriz na concentração dos limites de detecção obtidos da curva de calibração, não apresentaram relação sinal/ruído ≥ 2 . Portanto, para esses IA foram considerados os LD iguais ao LQ. Os LD obtidos para cada analito avaliado estão mostrados na **Tabela 20**.

TABELA 20: Limites de detecção e quantificação obtidos em $mg\ kg^{-1}$.

Analito	LD ($mg\ kg^{-1}$)	LQ ($mg\ kg^{-1}$)
Atrazina	0,04	0,05
Clorfenapir	0,04	0,05
Clorpirifós metil	0,01	0,01
Dieldrin	0,04	0,10
Endrin	0,01	0,01
Etoprofós	0,03	0,05
Etrinfós	0,01	0,01
Fenitrotiona	0,04	0,05
Metolacloro	0,01	0,01
Procimidona	0,02	0,05

LD: Limite de detecção, LQ: Limite de quantificação.

Os analitos atrazina, clorfenapir, clorpirifós metil, dieldrin, endrin, etoprofós, etrinfós, fenitrotiona, metolacloro e procimidona apresentaram LD entre 0,01 e 0,04 $mg\ kg^{-1}$ e LQ entre 0,01 e 0,10 $mg\ kg^{-1}$. Esses valores são apropriados para monitoramento desses analitos e são semelhantes aos obtidos por RESTREPO e

colaboradores (2014), que determinaram LQ de 0,02 mg kg⁻¹, para os analitos clorpirifós metil, etoprofós e procimidona em tomate, utilizando QuEChERS e CG-EM.

5.8 Incerteza de medição

Os valores da incerteza expandida e do fator de abrangência (nível de confiança 95%) obtidos para cada analito nos três níveis estudados, estão demonstrados na **Tabela 21**. Os valores da incerteza expandida, variaram de 7,48 a 35,62 %, inferiores ao limite de 50 % estabelecido pelo SANTE (2015). Como esperado, os maiores valores de incerteza foram obtidos nos níveis de concentração mais baixos para a maioria dos analitos.

Na **Figura 13** estão demonstradas as contribuições da curva de calibração e da precisão intermediária na incerteza final nos três níveis estudados para cada analito. A incerteza oriunda da curva de calibração foi obtida pelos desvios padrão do intercepto e inclinação da curva de calibração; da covariância entre o intercepto e inclinação; e da resposta instrumental.

A contribuição da resposta instrumental foi desmembrada da incerteza obtida da curva de calibração para demonstrar como sua contribuição foi significativa na incerteza final. Na **Figura 14** estão representadas as contribuições da resposta instrumental, da curva de calibração (sem a incerteza da resposta instrumental) e da precisão intermediária na incerteza final nos três níveis estudados.

TABELA 21: Incerteza padrão, incerteza expandida, graus de liberdade efetivo e fator de abrangência obtidos nos três níveis de concentração estudados.

Analito	Nível (mg kg⁻¹)	GL_{ef}	k	Incerteza padrão (mg kg⁻¹)	Incerteza expandida (%)
Atrazina	0,05	56,23	2,00	0,007	26,06
	0,20	8,49	2,31	0,011	14,26
	0,30	5,68	2,57	0,020	18,52
Clorfenapir	0,05	32,77	2,04	0,007	30,20
	0,20	4,70	2,78	0,018	35,38
	0,30	8,16	2,31	0,033	29,21
Clorpirifós metil	0,01	24,73	2,06	0,001	13,75
	0,04	21,24	2,08	0,002	13,52
	0,06	22,34	2,07	0,003	11,92
Dieldrin	0,10	20,49	2,09	0,007	15,09
	0,40	17,57	2,11	0,020	11,72
	0,60	17,37	2,10	0,019	7,48
Endrin	0,01	32,75	2,04	0,001	28,92
	0,04	22,77	2,07	0,004	22,76
	0,06	8,07	2,31	0,006	26,41
Etoprofós	0,05	16,64	2,12	0,005	22,74
	0,20	25,75	2,06	0,020	20,96
	0,30	27,38	2,05	0,028	21,24
Etrinfós	0,01	58,10	2,00	0,001	25,85
	0,04	11,56	2,20	0,004	23,41
	0,06	45,49	2,01	0,005	16,91
Fenitrotiona	0,05	44,10	2,02	0,009	34,69
	0,20	6,69	2,45	0,028	35,62
	0,30	5,77	2,57	0,036	30,52
Metolacloro	0,01	52,44	2,01	0,002	34,77
	0,04	36,45	2,03	0,003	15,57
	0,06	42,27	2,02	0,004	13,83
Procimidona	0,05	31,02	2,04	0,007	24,75
	0,20	17,76	2,11	0,022	24,02
	0,30	21,85	2,08	0,023	15,51

GL_{ef}: grau de liberdade efetivo; k: fator de abrangência

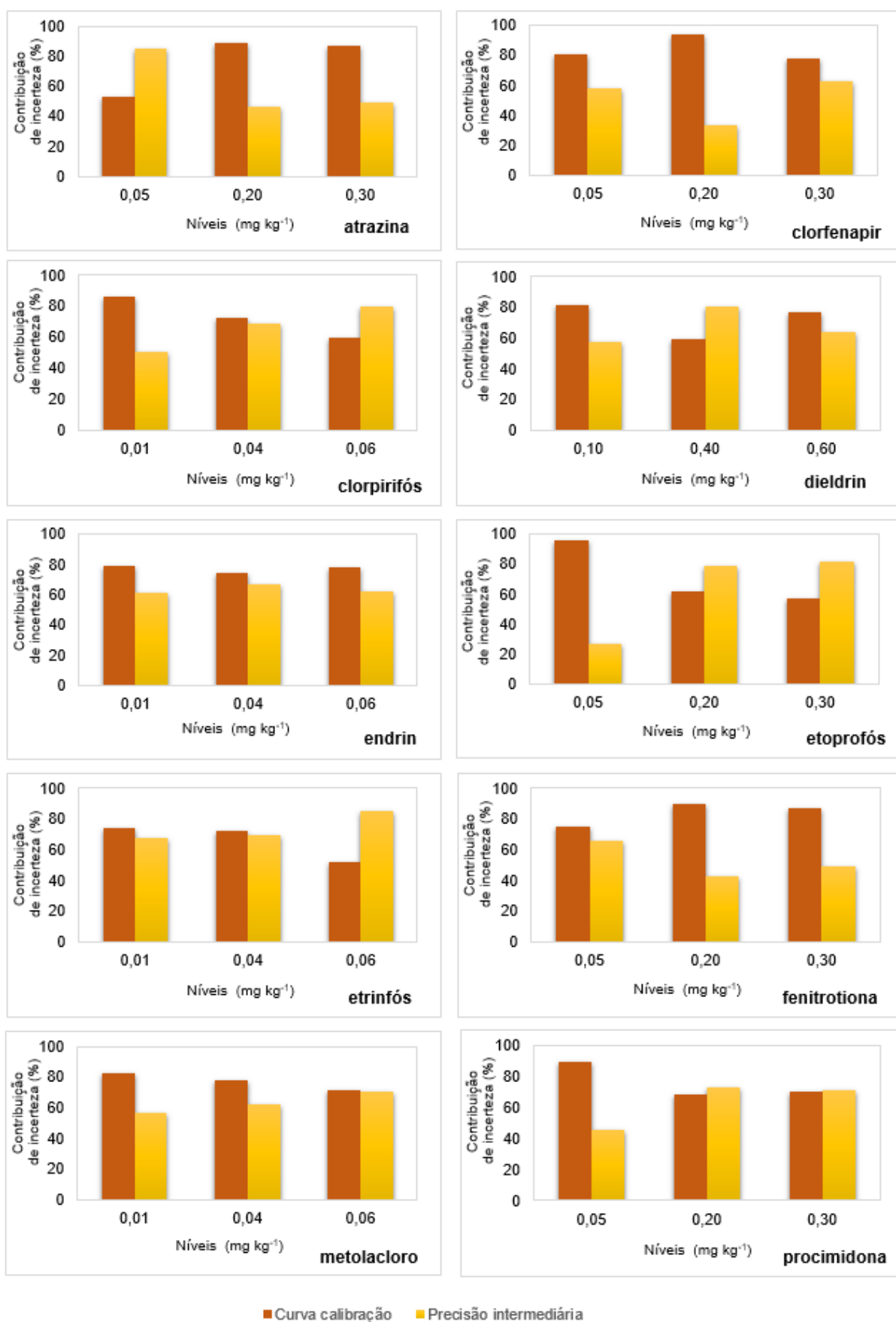


FIGURA 13: Contribuição da curva de calibração e da precisão intermediária para incerteza final.

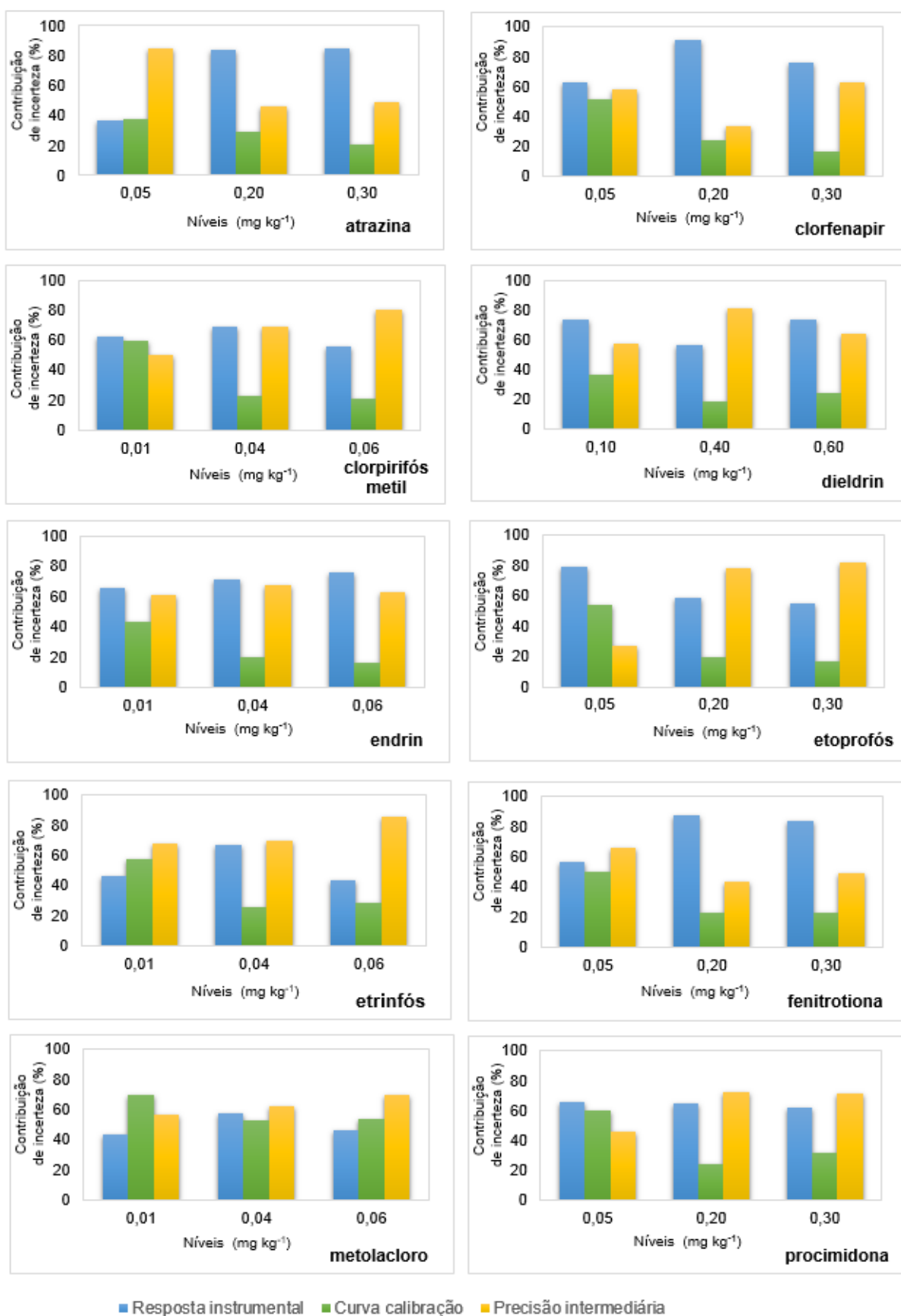


FIGURA 14: Contribuição da resposta instrumental, da curva de calibração e da precisão intermediária para incerteza final.

5.9 Monitoramento

Tendo como base os limites de detecção dos analitos estudados na matriz de tomate, não foram encontradas amostras insatisfatórias entre as 20 amostras analisadas. Quatro dessas amostras apontaram a presença de procimidona e sete de clorfenapir, ou seja, apresentaram resultados entre o LD e LQ. Esses agrotóxicos são permitidos para a cultura de tomate e os valores detectados foram menores que os LMRs estabelecidos, portanto, as amostras apresentaram resultados satisfatórios.

As 20 amostras também foram analisadas pelo método oficial do LARA, que utiliza o método de extração mini-Luke e resultados semelhantes foram obtidos (NETHERLANDS, 1996).

No relatório do PARA divulgado em 2011, 141 amostras de tomate foram analisadas e 6 dessas amostras apresentaram a presença de clorfenapir e 24 a presença de procimidona. No relatório de 2016, 22 amostras de tomate apresentaram a presença de procimidona. Por isso, a grande importância de monitorar esses IA, principalmente na cultura de tomate que é muito dependente do uso intensivo de agrotóxicos (ANVISA, 2011; ANVISA, 2016a).

6. CONCLUSÃO

O método QuEChERS utilizado para a extração de resíduos de agrotóxicos, demonstrou veracidade e precisão. Os resultados de recuperação e desvios padrão relativos em condições de repetibilidade e de precisão intermediária apresentaram conformidade com critérios do SANTE (2015).

As amostras analisadas foram quantificadas utilizando curva de calibração em matriz. A regressão linear simples foi adequada para a estimativa dos parâmetros das curvas de regressão para todos os analitos.

Os LD e LQ estabelecidos foram satisfatórios, pois foram significativamente menores que o LMR, quando estabelecidos. Os valores de incerteza expandida estimados foram aceitáveis de acordo com critérios do SANTE (2015).

As amostras de tomate monitoras apresentaram resultados satisfatórios, indicando que o tomate de Minas Gerais não oferece riscos à saúde dos consumidores quanto à presença desses agrotóxicos, considerando os LD do método.

O método validado é simples, utiliza solventes em menor quantidade e com menor toxicidade ao ambiente, que os utilizados nos métodos tradicionais de extração, minimizando a produção de resíduos e colaborando com o uso de metodologias analíticas mais limpas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABNT/INMETRO. Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM). Terceira edição brasileira em língua portuguesa. Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, 2003.

AGROFIT. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários. Consulta de ingrediente ativo. Cultura - tomate. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 jan. 2017.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? **Mass Spectrometry**, rev. 25, p. 838 -865, 2006.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J.; Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM E.; TASDELEN B.; STAJNBAHER D. Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. Pesticide Chemistry - Crop protection, public health, environmental safety. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2007.

ANDRASCIKOVÁ, M.; HROUZKOVÁ, S. A comparative study of three modifications of the QuEChERS method for determination of endocrinedisrupting pesticide residues in lemon matrices by fast GC-MS. **Anal. Methods**, v. 5, p. 1374-1384, 2013.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Nota Técnica 02/2017. Assunto: Posicionamento da Anvisa referente à Recomendação 028/2016 aprovada em Reunião Plenária do Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – CONSEA. Brasília, 23 de janeiro de 2017. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/NOTA+T%C3%89CNICA+02-2017/1c9e2a0722fa-417b-a51c-0e9d982031f3>>. Acesso em: 20 de ago. 2017 (a).

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Relatório das Análises de Amostras Monitoradas no Período de 2013 a 2015. Brasília, 25 de novembro de 2016 Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/2782895/Relat%C3%B3rio+PARA+Vers%C3%A3o+Final/1230de7d-306d-4249-a62c-a68708fab153>>. Acesso em: 18 de dez. 2016 (a).

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Relatório de atividades 2010. Brasília, 05 de dezembro de 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Relat%25C3%25B3rio%2BPARA%2B2010%2B%2BVers%25C3%25A3o%2BFinal.pdf/f568427b-c518-4a68-85b9-dd7680e55e07>>. Acesso em: 20 de dez. 2015.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Regularização de Produtos Agrotóxicos. **Monografias Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 17 de mar. 2017 (b).

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Regularização de Produtos. **Reavaliação de Agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/reavaliacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 23 de nov. 2016 (b).

AOAC, Official Method 2007.01: Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate, **AOAC International**, 2007.

ARAGAY, G.; PINO, F.; MERKOÇI, A. Nanomaterials for Sensing and Destroying Pesticides. **Chemical Reviews**, 112, p. 5317-5338, 2012.

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

BELLO, R. F. C.; PISSINATTI, R.; SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. Evaluating Matrix Effects in the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Food: Can These Interferences Be Neglected for Isotope Dilution? **Food Anal. Methods**, 10, p. 1488-1499 2017.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 de janeiro de 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm> Acesso em: 15 de nov. 2016.

BRASIL. Decreto nº 58.380, de 10 de maio de 1966. Aprova o Regulamento da lei que Institucionaliza o Crédito Rural. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de maio de 1966. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/antigos/d58380.htm>. Acesso em: 05 de mai. 2017.

BRASIL. Lei nº 4.829, de 5 de novembro de 1965. Institucionaliza o crédito rural. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 novembro de 1965. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L4829.htm. Acesso em: 05 de mai. 2017

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 de jul. de 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42 de 31 de dezembro de 2008. Institui o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes de Origem Vegetal- PNCRC/Vegetal. **Diário Oficial da União**, 05 de jan. de 2009.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília MAPA/ACS, 2011. 227 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 52, de 16 de junho de 2016. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de junho 2016. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=17/06/2016&jornal=1&pagina=2&totalArquivos=232>> Acesso: 17 de jan. 2017.

BRASIL. Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins – nº 1, de 9 de dezembro de 1991. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 de fevereiro de 1992, p.1356.

BRASIL. Projeto de Lei nº 3.200/2015. Dispõe sobre a Política Nacional de Defensivos Fitossanitários e de Produtos de Controle Ambiental, seus Componentes e Afins, bem como 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 defensivos fitossanitários e de produtos de controle ambiental, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra?codteor=1412079&filename=PL+3200/2015>. Acesso em: 08 de jan. 2017.

BRASIL. Resolução nº 9, de 22 de fevereiro de 2008. Aprova e promulga o Regimento Interno da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA e da outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 fevereiro de 2008.

BRASIL. Resolução nº 216, de 15 de dezembro de 2006. Dispõe sobre estudos de resíduos de agrotóxicos e afins, em produtos de origem vegetal e cogumelos in natura, apresentados pelos requerentes e titulares do registro. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de dezembro de 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº 119 de 19 de maio de 2003. Cria o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, e dá providências correlatas. **Diário Oficial da União**, 22 de maio de 2003 (a).

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003 (b).

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

CAC (*Codex Alimentarius Commission*). Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/glossary/en/>>. Acesso em: 09 dez. 2016

CARVALHO, K. L.; *et. al.*, Modelling uncertainty estimation for the determination of aflatoxin M1 in milk by visual and densitometric thin-layer chromatography with immunoaffinity column clean-up. **Food Additives and Contaminants**, v. 29, nº 4, p. 679-693, 2012.

CEN (COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION). CEN/TC 275 – EN 15662: 2008: Foods of plant origin – Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS-method. Brussels: CEN, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS. Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis, CAC/GL 40-1993. **Codex Alimentarius Commission**. Revision 2003. Amendment 2010.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1218 p. 7748-7757, 2011.

CUNHA, S. C.; LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; BEATRIZ, M.; OLIVEIRA, P. P. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. **J. Sep. Sci.**, v. 30, p. 620-632. 2007.

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002, L 221/8.

ENGINDENIZ, S. Economic analysis of pesticide use on processing tomato growing: A case study of Turkey. **Crop Protection**, v. 25, p. 534 – 541, 2006.

EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Second– 2014.

EURACHEM/CITAC. Quantifyinf uncertainty in analytical measurement. 3^a Edition. 2012. 133p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Crops Production. Food and agriculture data. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

FDA (Food and Drug Administration). **Pesticide Analytical Manual**, v. I, Multiresidue Methods, 3^o Ed., Washington, DC, 1994.

GARCIA-REYES, J. F.; FERRER, C.; GÓMEZ-RAMOS, M.J.; MOLINA-DÍAZ, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 239- 251. 2007.

GRIMALT, S., DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. **J. Chromatogr. A**, v. 1433, p. 1–23, 2016.

HASSEINE, A.; MENIAI, A. H.; KORICHI, M. Salting-out effect of single salts NaCl and KCl on the LLE of the systems (water + toluene + acetone), (water + cyclohexane + 2-propanol) and (water + xylene + methanol). **Desalination**, v. 242, p. 264–276, 2009.

HIEMSTRA, M., & de KOK, A. J. *Chromatogr. A*, v. 1154, p. 3–25, 2007.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. Third edition, ed. 2007, John Wiley & Sons Ltd. 502 p.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente). Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002. 2014. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: 28 ago. 2016

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). LSPA - **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Setembro, 2016. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201602.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2016.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos. Disponível em:

http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf. Acesso em: 10 jan. 2017.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. DOQ-CGCRE-08, rev. 05, 2016.

KUJAWSKI, M. W.; BARGANSKA, Z.; MARCINIAK, K.; MIEDZIANOWSKA, E.; KUJAWSKI, J. K.; SLEBIODA, M.; NAMIESNIK, J. Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS e Comparison of pesticide recoveries of two liquid-liquid extraction based approaches. **LWT-Food Science and Technology**, v. 56, p. 517-523, 2014.

KUSTER, M.; ALDA, M. L.; BARCELÓ, D. Analysis of Pesticides in Water by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Techniques. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 900-916, 2006.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: Finalmente “compatíveis? **Scientia Chromatographica**, v.1, p. 35-61, 2009.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: Finalmente “compatíveis? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v.5, p. 27-46, 2013.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **J. AOAC Int.**, v. 88(2), 615-629, 2005.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K. Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 630-638, 2005.

LI, M.; JIN, Y.; LI, H.; MA, Y.; LIN, J. Rapid determination of residual pesticides in tobacco by the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample pretreatment method coupled with LC-MS. **J. Sep. Sci.**, v. 36, p. 2522-2529, 2013.

LIN, S.; GAN, N.; CAO, Y.; CHEN, Y.; JIANG, Q. Selective dispersive solid phase extraction-chromatography tandem mass spectrometry based on aptamer-functionalized UiO-66-NH₂ for determination of polychlorinated biphenyls. **J. Chromatogr. A**, v. 1446, p. 34-40, 2016.

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

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. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** v. 58, p. 1020-1026, 1975.

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

MILLS, P.A., ONLEY, J.H., GUITHER, R.A. Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** v. 46, p. 186-191, 1963.

MINAS GERAIS. Decreto estadual nº 41203 de 2000. Aprova o regulamento da lei nº 10545, de 13 de dezembro de 1991, que dispõe sobre produção, comercialização e uso de agrotóxico e afins e dá outras providências. **Diário do Executivo**. Minas Gerais, Belo Horizonte, 08 ago. 2000.

MINAS GERAIS. Lei Estadual Ordinária nº 10545 de 1991: Dispõe sobre a produção, comercialização e uso de agrotóxicos e afins e dá outras providências. **Diário do Executivo**. Minas Gerais, Belo Horizonte, 14 dez. 1991.

NAIKA, S.; JEUDE, J. V. L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B. V. A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, 2006.

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

OELING, C. Acetonitrile extraction and dual-layer solid phase extraction clean-up for pesticide residue analysis in própolis. **J. Chromatogr. A**, 1445, 19-26, 2016.

OELLING, C.; SCHWACK, W. Planar solid phase extraction clean-up and microliter-flow injectionanalysis-time-of-flight mass spectrometry for multi-residuescreening of pesticides in food. **J. Chromatogr. A**, 1351, p.1-11, 2014.

PELAEZ, V.; Teodorovicz, T.; Guimarães, T. A.; Silva, L. R.; Moreau, D.; Mizukawa, G. A dinâmica do comércio internacional de agrotóxicos. **Revista de Política Agrícola**, ano XXV, nº 2, Abr./Maio/Jun. 2016, p. 39-52.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **J. Chromatogr. A**, v. 1232, p. 101-109, 2012.

RESTREPO, A. R.; ORTIZ, A. F. G.; OSSA, D. E. H. QuEChERS GC–MS validation and monitoring of pesticide residues in different foods in the tomato classification group. **Food Chemistry**, v. 158, p. 153-161, 2014.

RUZICKA, J.H. Methods and Problems in Analysing for Pesticides Residues in the Environment. EDWARDS, C.A., (Ed.). Environmental Pollution by Pesticides, Plenum Press, London and New York, v.3, p. 11-56, 1973.

SAGRATINI, G.; MAÑES, J.; GIARDINÁ, D.; DAMIANI, P.; PICÓ, Y. Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1147(2), p. 135-143, 2007.

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

SINDIVEG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal). Sindiveg News. Balanço 2015, ed. 12 – abril de 2016. Disponível em: www.sindiveg.org.br. Acesso em: 15 nov. 2016.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas). Casos de Intoxicação por Agrotóxicos de Uso Agrícola; 2011 e 2012. Disponível em: <http://sinitox.icict.fiocruz.br>. Acesso em: 10 jan. 2017

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de Química Analítica**, Ed. Thomson, tradução da 8ª ed., 2006.

SLOWIK-BAROWIEC, M.; SZPYRKA, E.; WALORCZYK, S. Gas chromatographic determination of pesticide residues in White Mustard. **Food Chemistry**, v. 173, p. 997-1005, 2015.

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

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

STORY, E, N.; KOPEC, R. E.; SCHWARTZ, S. J.; HARRIS, G. K. An Update on the Health Effects of Tomato Lycopene. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.**, v. 1, p.189-210, 2010.

TERZIC, O.; BARTENBACH, S.; VOOGT, P. Determination of Lewisites and their hydrolysis products in aqueous and multiphase samples by in-sorbent tube butyl

thiolation followed by thermal desorption–gas chromatography–full scan mass spectrometry. **J. Ch.**, v. 1304, p. 34-41, 2013.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 835-855, 2002.

THUNDIYIL, J.G.; Stober, J.; Besbelli, Nida; Pronczuk, J. Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool. *Bulletin of The World Health Organization*. 2008, 86(3); 205-209.

UN COMTRADE (United Nations Commodity Trade Statistics). Metadata & Reference: commodity list. Disponível em: <<https://comtrade.un.org/db/mr/rfCommoditiesList.aspx?px=H3&cc=3808>>. Acesso em: 15 fev. 2017.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **J. Chromatogr. A**. V. 921, p. 227-236, 2001.

VIDAL, J. L. M.; ARREBOLA, F. J.; MATEU-SÁNCHEZ, M. Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of pesticides in fruits and vegetables. **J. Chromatogr. A**, v. 959, p. 203-213, 2002.

VIDAL, J. L. M.; PLAZA-BOLÁNOS, P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6767-6788, 2009.

VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia). Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. Ed. Luso-Brasileira. Duque de Caxias: INMETRO, 2012.

WANG, Z.; FINGAS, M. V. Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. **Marine Pollution Bulletin**, v.47, p. 423-452,2003.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803–812, 2011.

ZEIGLER, C.; MACNAMARA, K.; WANG, Z.; JR, A. R. Total alkylated polycyclic aromatic hydrocarbon characterization and quantitative comparison of selected ion monitoring versus full scan gas chromatography/mass spectrometry based on spectral deconvolution. **J. Chromatogr. A**, v. 1205, p. 109-116, 2008.