

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

**REVISÃO SISTEMÁTICA APLICADA À DETERMINAÇÃO DE  
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS: TÉCNICAS DE  
ANÁLISE E PRÁTICAS DE VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL**

Belo Horizonte, MG  
2018

**ROBERTO CESAR SANTOS DE SOUSA**

**REVISÃO SISTEMÁTICA APLICADA À DETERMINAÇÃO DE  
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS: TÉCNICAS DE  
ANÁLISE E PRÁTICAS DE VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Área de concentração: Qualidade de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Scheilla Vitorino C. de Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Vânia Eloisa de Araújo

Belo Horizonte, MG  
2018

Sousa, Roberto Cesar Santos de Sousa

REVISÃO SISTEMÁTICA APLICADA À  
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM  
ALIMENTOS: TÉCNICAS DE ANÁLISE E PRÁTICAS DE  
VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL [manuscrito] / Roberto  
Cesar Santos de Sousa Sousa. - 2018.

184 p. : il.

Orientadora: Scheilla Vitorino C. de Souza SOUZA.

Coorientadora: Vânia Eloisa de Araújo Araújo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais, Faculdade de Farmacia.

1.revisão sistemática. 2.resíduos de agrotóxicos. 3.alimentos.  
4.validação. I.SOUZA, Scheilla Vitorino C. de Souza. II.Araújo,  
Vânia Eloisa de Araújo. III.Universidade Federal de Minas Gerais.  
Faculdade de Farmacia. IV.Título.



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

PPCCA

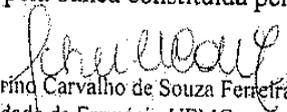
## FOLHA DE APROVAÇÃO

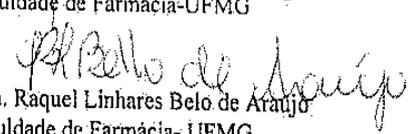
REVISÃO SISTEMÁTICA APLICADA À DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE  
AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS: TÉCNICAS DE ANÁLISE E PRÁTICAS  
DE VALIDAÇÃO

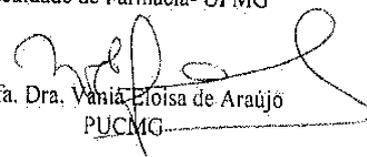
**ROBERTO CÉSAR SANTOS DE SOUSA**

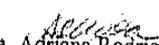
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

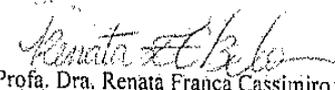
Aprovada em 28 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

  
Profa. Dra. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferrelra - Orientador  
Faculdade de Farmácia-UFMG

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

  
Profa. Dra. Vania Eloisa de Araújo  
PUCMG

  
Profa. Dra. Adriana Rodrigues da Mata  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

  
Profa. Dra. Renata França Cassimiro Belo  
Faculdade Ciências da Vida - FCV

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao apoio total e irrestrito da minha amada Isabela e de todos os meus familiares que deram o suporte necessário para que minha jornada chegasse a mais esse desfecho.

As minhas orientadoras, Prof. Dr. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza e Prof. Dr. Vânia de Eloisa de Araújo, que se tornaram o alicerce deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

Aos membros da banca pela disponibilidade e interesse em contribuir com a excelência do projeto.

A todos os integrantes do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia – UFMG, em especial aos membros do laboratório de bromatologia, agradeço pela cooperação.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Evolução da comercialização de agrotóxicos no Brasil, total e por grupo, no período de 2011 a 2016. ....	30
<b>Figura 2.</b> Esquema estrutural de fibra absorviva de acordo com a posição no suporte. ....	47
<b>Figura 3.</b> Esquema de extração assistida por membrana. ....	51
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do Primary Secondary Amine (PSA) .....	53
<b>Figura 5.</b> Fluxograma das principais variações do método Quechers para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos. ....	54
<b>Figura 6.</b> Etapas de reação dos três principais tipos de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). ....	59
<b>Figura 7.</b> Fluxograma para seleção dos estudos para a revisão sistemática .....	95
<b>Figura 8.</b> Fluxograma de inclusão e exclusão de estudos por etapa de seleção.....	97
<b>Figura 9.</b> Frequência das técnicas de extração aplicadas para resíduos de agrotóxicos em alimentos.....	100
<b>Figura 10.</b> Frequência do número de matrizes alimentares validadas por técnica de extração.....	101
<b>Figura 11.</b> Número de resíduos de agrotóxicos validados de acordo com as técnicas de extração utilizadas.....	101
<b>Figura 12.</b> Origem dos estudos revisados por local de vínculos dos primeiros autores .....	103
<b>Figura 13.</b> Comparação das frequências de estudo de repetibilidade e precisão intermediária ao longo dos anos. ....	122
<b>Figura 14.</b> Frequência de estudo de linearidade sob diferentes abordagens .....	124

<b>Figura 15.</b> Comparação dos parâmetros de validação relativos à sensibilidade ....	126
<b>Figura 16.</b> Comparação dos parâmetros de validação relativos à seletividade.....	128
<b>Figura 17.</b> Agrupamento dos estudos revisados de acordo com a avaliação dos limites de detecção e de quantificação.....	138
<b>Figura 18.</b> Comparação entre os resultados observados na presente dissertação e aqueles reportados por RUIZ-ANGEL <i>et al.</i> (2014).....	139
<b>Figura 19.</b> Comparação das frequências de acordância e concordância pelas abordagens dos guias e de Langton <i>et al.</i> (2002).....	145

## LISTAS DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais sintomas relacionados à intoxicação aguda e crônica de diferentes grupos de agrotóxicos. ....	34
<b>Tabela 2.</b> Cronologia e características dos principais métodos de análises de resíduos agrotóxicos em alimentos. ....	40
<b>Tabela 3.</b> Roteiro de condução de uma revisão sistemática.....	84
<b>Tabela 4.</b> Estratégias de busca para cada uma das bases de dados abordadas. ....	87
<b>Tabela 5.</b> Análise de concordância entre os revisores participantes .....	90
<b>Tabela 6.</b> Número de trabalhos selecionados por base de dados antes e após a remoção das duplicidades.....	93
<b>Tabela 7.</b> Frequência de uso do termo “ <i>validation</i> ” em qualquer língua nos elementos iniciais do texto para métodos quantitativos, considerando diferentes técnicas de determinação.....	104
<b>Tabela 8.</b> Frequência de uso do termo “ <i>validation</i> ” em qualquer língua nos elementos iniciais do texto para métodos qualitativos, considerando diferentes técnicas de detecção.....	104
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros descritos em documentos publicados por órgãos nacionais e internacionais para validação intralaboratorial de métodos analíticos quantitativos. ....	108
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros de validação dispostos por guias de validação de métodos qualitativos de análise química.....	116
<b>Tabela 11.</b> Frequência dos parâmetros de validação propostos no guia harmonizado pela IUPAC/ISO/AOAC nos estudos revisados por ano.....	121

**Tabela 12.** Frequência dos parâmetros de validação propostos no guia harmonizado pela IUPAC/ISO/AOAC nos estudos revisados por técnica de determinação..... 134

**Tabela 13.** Frequência dos parâmetros de validação propostos no guia do FDA nos estudos revisados por técnica de detecção..... 144

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABNT</b>	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AGRIS</b>	<i>System for Agricultural Science and Technology</i>
<b>AOAC</b>	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
<b>BDTD</b>	Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações
<b>CEN</b>	<i>European Committee for Standardization</i>
<b>DDT</b>	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose Letal para 50 % da População
<b>EABA</b>	Extração Assistida Por Barra Absortiva
<b>EAM</b>	Extração Assistida por Membrana
<b>EAU</b>	Extração Assistida por Ultrassom
<b>ECO/OPS</b>	Centro Pan Americano de Ecologia Humana e Saúde
<b>EFSC</b>	Extração por Fluido Supercrítico
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>
<b>EIA</b>	<i>Enzyme Imune Assay</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>ELP</b>	Extração por Líquido Pressurizado
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>EPA</b>	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América
<b>EU</b>	União Europeia
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
<b>FDA</b>	<i>United States Food and Drug Administration</i>
<b>FSTA</b>	<i>Food Science and Technology Abstracts</i>
<b>GC-MS/MS</b>	Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas Sequencial
<b>IARC/OMS</b>	Agência Internacional de Pesquisas Sobre o Câncer
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonisation</i>
<b>IDA</b>	Ingestão Diária Aceitável
<b>IDMT</b>	Ingestão Diária Máxima Teórica
<b>IEC</b>	<i>International Electrotechnical Commission</i>
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
<b>IPCS/OMS</b>	Programa Internacional de Segurança de Substâncias Químicas
<b>IRPTC/UNEP</b>	Registro Internacional de Substâncias Potencialmente Tóxicas do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
<b>OIN/ SO</b>	Organização Internacional de Normalização
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>CL-EM</b>	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
<b>LANAGRO</b>	Laboratório Nacional Agropecuário
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografia Líquida acoplada com Espectrometria de

	Massas Sequencial
<b>LOD</b>	Limite de Detecção
<b>LILACS</b>	<i>Latin American and Caribbean Health Sciences</i>
<b>LMR</b>	Limite Máximo de Resíduos
<b>LOQ</b>	Limite de Quantificação
<b>LR</b>	Limite de Resposta
<b>MAE</b>	Extração Assistida por Micro-ondas
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MEDLINE/Pubmed</b>	<i>Medical Literature Analysis and Retrieval System Online</i>
<b>MEFS</b>	Microextração em Fase Sólida
<b>MMA</b>	Ministério do Meio Ambiente
<b>MMR</b>	Métodos Multirresíduos
<b>MRU</b>	Métodos de Resíduos Únicos
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NATA</b>	<i>National Association of Testing Authorities, Austrália</i>
<b>NBR</b>	Norma Brasileira
<b>NOAEL</b>	Nível de Efeito Adverso Não Observado
<b>OECD/CEE</b>	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Comunidade Econômica Européia
<b>OMS/WHO</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana da Saúde
<b>PARA</b>	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
<b>PNCRC</b>	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
<b>POP</b>	Poluentes Orgânicos Persistentes
<b>PSA</b>	<i>Primary Secondary Amine</i>
<b>QuEChERS</b>	<i>Quick; Easy; Cheap; Effective; Rugged; Safe</i>
<b>RNLVISA</b>	Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária
<b>SciELO</b>	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
<b>SINDIVEG</b>	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal
<b>USDA</b>	<i>United States Department of Agriculture</i>

## RESUMO

Uma revisão sistemática foi proposta para responder à questão: Os métodos de análises validados relativos ao estudo de resíduos de agrotóxicos em alimentos seguem as recomendações dos guias de validação intralaboratorial de métodos analíticos? Para isso, dois analistas selecionaram estudos referentes à validação de métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos com publicação posterior a 2002, ano de publicação do guia harmonizado para validação intralaboratorial de métodos analíticos da IUPAC/ISO/AOAC. As buscas foram realizadas nas principais bases de dados *online* (AGRIS, *Cochrane Library*, FSTA, LILACS, MEDLINE/PubMED, SciELO e *Web of Science*), e nas bases BDTD e *OpenGrey* para preencher a literatura cinzenta, além de buscas manuais nas referências dos estudos selecionados. Foram encontrados 1809 estudos que, após as etapas de seleção, resultaram na recuperação de 835 estudos entre buscas e seleção manual. Ao todo, foram analisados 868 métodos quantitativos e 24 métodos qualitativos divulgados entre os estudos recuperados. Os resultados obtidos para os métodos quantitativos demonstraram que o estudo dos parâmetros de desempenho foi influenciado, principalmente, por fatores próprios dos laboratórios, sendo atribuído aos guias de validação o comportamento evidenciado para as figuras de mérito efeitos de matriz e robustez. Parâmetros clássicos como veracidade, precisão em condições de repetibilidade e seletividade alcançaram frequências de 97,58%; 97,06% e 94,66%, respectivamente. Por outro lado, os parâmetros incerteza de medição e robustez apresentaram frequências de 8,91% e 4,92%, respectivamente. Para métodos qualitativos, observou-se que os guias de validação eram incongruentes no que diz respeito aos parâmetros avaliados, o que provavelmente influenciou no perfil evidenciado de estudo dos parâmetros. Parâmetros clássicos como sensibilidade, seletividade e limite de detecção foram analisados com frequências de 91,67%, 70,83% e 91,67%, respectivamente. Mais uma vez a incerteza (associada à região de perda de confiabilidade) e robustez foram os parâmetros menos frequentes, juntamente com a precisão intermediária (concordância). Entendeu-se que há aspectos relativos à validação de metodologias na área de resíduos de agrotóxicos em alimentos que precisam ser resolvidos para

que os trabalhos sejam mais coesos e harmonizados. Isso permitirá à comunidade científica um melhor entendimento sobre o desempenho das tecnologias atuais no campo das análises de alimentos, identificando as técnicas mais promissoras e eficientes para a análise de agrotóxicos por meio de procedimentos sistematizados.

**Palavras-chave:** revisão sistemática, agrotóxicos, alimentos, resíduos, validação de métodos.

## ABSTRACT

A systematic review was proposed to answer the question: The methods validated for the study of pesticides residues in food follow the recommendations of guidelines for single-laboratory validation of analytical methods? Two analysts selected articles about method validation for the analysis of pesticide residues in foods published after 2002, year of publication of the harmonized guideline for the single-laboratory validation by IUPAC/ISO/AOAC. The searches were conducted at the main databases online (AGRIS, Cochrane Library, FSTA, LILACS, MEDLINE/PubMED, SciELO and Web of Science), at the BDTD for thesis and dissertation, at the OpenGrey database to fill the gray literature, in addition to manual searches in the references of the selected studies. 1809 articles were found, resulting in 835 articles after the selection stages. Altogether, 868 quantitative methods and 24 qualitative methods were disclosed among the recovered articles. The results obtained for the quantitative methods showed that the study of the performance parameters was influenced, mainly, by own factors of the laboratories, being attributed to the validation guidelines the evidenced behavior for the matrix effects and robustness. Classical parameters such as trueness, precision under repeatability conditions and selectivity reached frequencies of 97,58%; 97,06% and 94,66%, respectively. On the other hand, the parameters uncertainty of measurement and robustness presented frequencies of 8,91% and 4,92%, respectively. For qualitative methods, it was observed that the validation guides were incongruent about the parameters that should be studied, which probably influenced the evidenced profile of the studied parameters. The classical parameters of sensitivity, selectivity and limit of detection were analyzed with frequencies of 91,67%, 70,83% and 91,67%, respectively. Again, the uncertainty (associated with the unreliability region) and robustness were the less frequent parameters along with the intermediate precision (concordance). It was understood that there are aspects regarding the method validation within the area of residues of pesticides in food that need to be solved so that the works will be more cohesive and harmonized. This will allow the scientific community a better understanding about the performance of current technologies in the field of food

analysis, identifying the most promising and efficient techniques for the analysis of pesticides through systematized procedures.

**Keywords:** systematic review, pesticides, food, residues, validation methods.

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	19
2	OBJETIVOS .....	21
2.1	Objetivo Geral .....	21
2.2	Objetivos Específicos .....	21
3	REVISÃO DE LITERATURA .....	23
3.1	Agricultura .....	23
3.1.1	História .....	23
3.1.2	Técnicas atuais .....	24
3.2	Agrotóxicos .....	25
3.2.1	Histórico .....	25
3.2.2	Definição e classificações .....	27
3.2.3	Mercado de Agrotóxicos.....	28
3.2.4	Toxicologia, regulamentação e controle em alimentos.....	31
3.3	Técnicas de análise.....	37
3.3.1	Extração e Purificação .....	41
3.3.1.1	Extração Assistida por Micro-ondas.....	42
3.3.1.2	Extração Acelerada por Solventes.....	44
3.3.1.3	Microextração em Fase Sólida.....	46
3.3.1.4	Fluido Supercrítico .....	48
3.3.1.5	Extração Assistida por Membrana .....	51

3.3.1.6	QuEChERS.....	52
3.3.2	Detecção e Determinação.....	56
3.3.2.1	Técnicas Bioquímicas .....	57
3.3.2.2	Técnicas Cromatográficas .....	62
3.4	Validação de métodos.....	70
3.4.1	Definições .....	72
3.4.2	Processo de validação .....	73
3.4.3	Parâmetros de desempenho .....	75
3.4.3.1	<i>Guia AOAC/ISO/IUPAC</i> .....	76
3.4.3.2	<i>SANTE</i> .....	78
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	81
4.1	Bases de dados de produções científicas publicados .....	85
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	92
5.1	Processo de revisão e caracterização dos trabalhos analisados .....	92
5.2	Comparação entre Guias de Validação.....	105
5.2.1	Métodos quantitativos .....	106
5.2.2	Métodos qualitativos.....	113
5.3	Análise dos estudos de métodos quantitativos .....	119
5.4	Análise dos estudos de métodos qualitativos.....	142
5.4.1	<i>Sub-grupo – Técnicas de detecção</i> .....	142
6	CONCLUSÕES.....	147

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	149
APÊNDICE .....	171

# 1 INTRODUÇÃO

Os dados das Nações Unidas relativos a 2017 mostram que cerca de 815 milhões de pessoas no mundo sofrem com a fome e a desnutrição crônica. Além disso, continentes como Ásia e África ainda mostram muitas disparidades no combate a fome. Para as Nações Unidas, a erradicação da fome é uma das principais metas a se alcançar nesse milênio (FAO, 2017).

A demanda global por alimentos é cada vez maior devido ao crescimento da população mundial, que deve atingir nove bilhões de pessoas em 2050 (SEKHON, 2014). Enquanto alguns acreditam que a chave para o suprimento de alimentos está na modificação dos hábitos alimentares humanos, na diminuição do desperdício e na expansão da aquacultura, outros acreditam que a metodologia atual de agricultura deve se intensificar, seja por utilização de mais terras ou por maior produtividade nas terras já utilizadas (GABRIEL *et al.*, 2013).

No contexto da atual produção agrícola, a utilização de agrotóxicos ainda é a principal abordagem técnica para o combate e a prevenção de pragas agrícolas, garantindo que a produção atenda as metas de quantidade e qualidade (PINGALI, 2012; FAO, 2016). No entanto, muitos desses compostos são conhecidos ou suspeitos de serem tóxicos para humanos e outros seres devido a sua alta atividade e toxicidade biológica. É uma das maiores preocupações de fiscalizadores e consumidores é sobre quanto agrotóxico é consumido por meio da ingestão de alimentos (TUCKER, 2008; USDA, 2009; DZUMAN *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2017; AGROFIT, 2018).

A crescente preocupação sobre os possíveis riscos à saúde devidos aos resíduos de agrotóxicos na dieta aumentou a abordagem de cuidado, com ênfase na qualidade e segurança dos alimentos, levando à regulamentação de limites máximos de resíduos (LMRs) de agrotóxicos nos produtos alimentares, bem como de métodos analíticos de resíduos de agrotóxicos essenciais para o monitoramento nos alimentos (HERCEGOVA *et al.*, 2007; ZACHARIA, 2011).

Governos e laboratórios privados espalhados pelo planeta têm realizado análises de agrotóxicos em alimentos e amostras ambientais desde os anos 60. Desde então, vários métodos multirresíduos têm sido desenvolvidos. Esses, que são tidos como os mais eficientes métodos para análises de resíduos de agrotóxicos,

buscam corresponder às expectativas de respostas relacionadas às novas tecnologias na agricultura e às legislações vigentes (ANASTASSIADES *et al.*, 2003) Desta forma, reconhece-se internacionalmente que um laboratório deve tomar medidas apropriadas para assegurar que é capaz de fornecer ou não dados com a qualidade exigida (THOMPSON *et al.*, 2002). Para isso, a validação de uma metodologia analítica confirma, por caracterização e fornecimento de evidência objetiva, que os requisitos específicos são atendidos para o objetivo proposto (ABNT, 2005b). No entanto, embora exista algum consenso sobre quais os parâmetros do método devem ser avaliados nos processos de validação, há grande variação sobre como os experimentos de validação devem ser delineados e conduzidos e sobre as respectivas estatísticas que devem ser aplicadas sobre os dados gerados (SOUZA, 2007).

É possível entender essas questões relativas à validação por meio de revisões sistemáticas. No entanto, a utilização de revisões sistemáticas como ferramenta para abordar o conhecimento já adquirido pela ciência de alimentos no âmbito da segurança alimentar ainda é escassa (EFSA, 2010).

Assim, considera-se necessário identificar, reunir e analisar criticamente, por meio de uma revisão sistemática, as pesquisas relacionadas às metodologias de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos que foram validadas, por processos intralaboratoriais, para que se possa discutir sobre os avanços das estratégias de validação, bem como seu impacto na confiabilidade dos resultados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Realizar uma revisão sistemática sobre os métodos analíticos presentes na literatura para determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares, com foco nas práticas de validação intralaboratorial.

A revisão deverá ser capaz de responder à questão: Os métodos de análises validados relativos ao estudo de resíduos de agrotóxicos em alimentos seguem as recomendações dos guias de validação intralaboratorial de métodos analíticos?

### 2.2 Objetivos Específicos

- Delinear um protocolo de revisão sistemática empregando o acrônimo PIRO (*Problem; Intervention; Reference; Outcome*).
- Aplicar o protocolo à revisão sistemática de métodos para análise de resíduos de agrotóxicos validados em processos intralaboratoriais independentemente das estratégias de validação.
- Comparar os principais guias nacionais e internacionais para validação de métodos em processos intralaboratoriais.
- Caracterizar os trabalhos recuperados e selecionados em função do número de analitos, matrizes alimentares, técnicas de extração/purificação, técnicas de detecção/determinação, tipos de métodos (quantitativos ou qualitativos) e país de origem do estudo de acordo com o local de vínculo do autor principal.

- Analisar criticamente as práticas de validação dos métodos analíticos em função das frequências dos diferentes parâmetros, comparando os estudos por ano de publicação e técnica de detecção/determinação.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Agricultura

#### 3.1.1 História

Anteriormente ao surgimento da agricultura na história humana, a população já se encontrava em expansão devido à evolução nos modos de predação aplicados. Ao contrário do que se acredita, a progressão do número de humanos no planeta não foi uma consequência do surgimento e desenvolvimento da agricultura e pecuária, mas sim a causa para o desenvolvimento da agropecuária de forma global (MAZOYER, 2010).

O primeiro sistema agrícola praticado foi o de derrubada-queimada, posto em prática sob regiões arborizadas. Esse sistema foi capaz de sustentar uma densidade populacional bem maior que sistemas de predação, por volta de 10 a 30 pessoas por hectare. Com isso, entre 3.000 e 1.000 a.C., a população mundial dobrou, passando de 50 a 100 milhões de indivíduos, não só pelo sistema primário de derrubada-queimada, mas também pelo surgimento de sociedades estruturadas em torno da agricultura de irrigação nas regiões Indus, da Mesopotâmia e do Nilo. Nesse curso, entre o ano 1.000 a.C. e o ano 1.000 d.C, a população mundial cresceu para 250 milhões de indivíduos aproximadamente sustentada pela utilização de sistemas hidráulicos de riziculturas de várzea partindo dos vales e deltas da China até o sudeste asiático, somados aos sistemas de agricultura hidráulica que existiram na América Pré-Colombiana nesse período. Na Idade Média, durante os séculos XI ao XIII, o desenvolvimento dos sistemas de cultivos inovadores como o uso de tração pesada elevou tanto a produção que permitiu triplicar ou mesmo quadruplicar a população europeia (MAZOYER, 2010).

A partir de 1944, no México, iniciou-se na história da agricultura a Revolução Verde. Seu objetivo primário era aumentar a produção de grãos, pois o mundo já se

preocupava com a falta de alimentos para a demanda global. Com o sucesso da iniciativa no México, a técnica se espalhou rapidamente pelo mundo. No entanto, a Revolução Verde também promoveu o aumento de consumo de agrotóxicos já que as variedades cultivadas em maior escala, em um sistema de monocultura, não tinham sido selecionadas quanto a uma maior resistência às pragas e doenças. Estimou-se, naquela época, que de 30% a 48% dos alimentos produzidos anualmente se tornariam impróprios para consumo devido às pragas em geral. Com isso, constatou-se que o uso de agrotóxicos era um importante fator para o aumento significativo da produção agrícola (ZACHARIA, 2011).

### 3.1.2 Técnicas atuais

A agricultura atual teve início na segunda metade do século XX, quando a revolução agrícola contemporânea apresentou inovações em diversas áreas como mecânica (motorização e automatização), biotecnologia (seleção das melhores variedades de plantas com forte potencial de rendimento) e química (utilização dos fertilizantes e agrotóxicos). A expansão demográfica da população humana se valeu da união da rizicultura aquática moderna, capaz de duas ou três colheitas por ano, principalmente na Ásia, e pelo desenvolvimento da agricultura mecanizada de estilo europeu que é mantida nos países desenvolvidos e em alguns setores limitados dos países em desenvolvimento (MAZOYER, 2010).

A projeção para 2050 é de que a população mundial alcançará aproximadamente 9,15 bilhões de pessoas (ALEXANDRATOS & BRUINSMA, 2012). Para sustentação de todas essas pessoas sem a ocorrência de subnutrição nem de carência de alimentos, a produção mundial deverá dobrar. Setorialmente, ela deverá quase triplicar nos países em desenvolvimento e mais que quintuplicar na África. É esperado que a taxa de crescimento da população global diminua nos próximos quarenta anos, projetando assim a diminuição no crescimento da produção agropecuária global. No entanto, é preciso salientar que tais projeções são uma média global. Com isso, países podem apresentar crescimento baixo ou até declínio da população, enquanto outros países ainda crescem em números de habitantes de

maneira rápida. E justamente nos países onde a população deverá crescer de forma acelerada é que a distribuição de alimentos é desordenada (MAZOYER, 2010). Os países de baixa renda e as regiões em atraso das economias emergentes continuam a depender da produtividade agrícola como motor do crescimento e da redução da fome (PINGALI, 2012). Nas sociedades subdesenvolvidas e dependentes da produção agrícola, a relação entre produção de alimentos e segurança alimentar pode ser um problema a ser observado. Geralmente, essa condicionante prevalece em regiões semiáridas e localidades mais pobres cujo acesso a infraestrutura e tecnologia são difíceis (ALEXANDRATOS & BRUINSMA, 2012).

De modo simplificado, há duas maneiras de se aumentar a produção de alimentos no planeta. O primeiro diz respeito à intensificação, que consiste em promover que as terras atuais já utilizadas para agricultura sejam capazes de elevar a produção. O segundo modo corresponde a extensificação, ou seja, a expansão de terrenos antes íntegros ou nativos pela superfície planetária para a atividade agrícola. Independente da estratégia a ser utilizada, é correto afirmar que o impacto ambiental por tal modificação do ecossistema será considerável (GABRIEL *et al.*, 2013).

Seja qual for a forma de produção, certo é que o uso de agrotóxicos constituiu uma das ferramentas que proporcionaram maior produção reduzindo as perdas por ervas daninhas, doenças e pragas de insetos, além de assegurarem evolução da vida de prateleira de diversas culturas (AKTAR *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2011).

## **3.2 Agrotóxicos**

### **3.2.1 Histórico**

O surgimento e desenvolvimento da agropecuária impulsionou a espécie humana ao domínio e expansão no planeta. No entanto, não só os seres humanos se beneficiaram de tal modificação do ambiente. Os métodos de agricultura

praticados desde seu início geraram um grande acúmulo de alimentos devido à alta produtividade e estocagem. Essas práticas agrícolas atraíram várias espécies para próximo do ser humano, principalmente insetos e roedores. Doenças relativas às plantas, causadas por bactérias e fungos também sempre foram alvo de preocupação. A proliferação das espécies competidoras e/ou causadoras de doenças se transformou em um enorme desafio para o ser humano. Com isso, o homem sempre buscou maneiras de combater tais espécies, nomeadas pragas devido ao cenário que promoviam. Principalmente no período correspondente à Idade Média, as pragas foram associadas muitas vezes à ira divina. No entanto, o homem também observou o ambiente a sua volta para obter componentes favoráveis à “luta” pelo alimento (BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

Muitos registros históricos atestam o combate às pragas mediante aplicação de compostos químicos. No ano de 2.500 a.C., os sumérios utilizavam enxofre para combate de insetos, mesmo elemento registrado na história chinesa desde os anos 1.000 a.C. e que ainda é utilizado nos tempos modernos, na forma de pó ou em aerossol, como inseticida e fungicida por sua ação importante contra o *míldio pulverulento* nas plantas. Por volta dos anos 900 d.C., foi registrada a utilização de arsênio pelos chineses como forma de controle de insetos em jardins. Entre os séculos XIV e XVI, os chineses resgataram a prática de utilização de arsênio para combate de pragas em lavouras, além da utilização de outros elementos inorgânicos como o mercúrio e de cinzas e especiarias para conservação de produtos agrícolas pós-colheita. Já em 1669, houve o primeiro registro de utilização de arsênio no ocidente como inseticida para formigas (ECOBICHON, 2001; JARDIM, 2009; BRAIBANTE & ZAPPE, 2012).

A indústria agroquímica surgiu em larga escala durante a Segunda Guerra Mundial. As nações participantes da guerra desenvolveram vários compostos tóxicos com várias finalidades, inclusive o combate de mosquitos transmissores de doenças nos territórios mais quentes da Europa. No período pós-guerra, especialmente entre os anos 40 e 50, as indústrias químicas da América do Norte e da Europa Ocidental produziram grandes quantidades de agrotóxicos, especialmente inseticidas. Formulados com base no mecanismo de ação de organoclorados, principalmente, esses agrotóxicos apresentavam propriedades físico-químicas que conferiam alta estabilidade no meio ambiente e toxicidade relativamente alta para insetos e seres

humanos. Após o estabelecimento da indústria agroquímica, a evolução tecnológica do setor levou à introdução de inseticidas sintéticos como o organofosforados na década de 60, carbamatos e piretróides entre os anos 70 e 80, e de outros herbicidas e fungicidas de origem sintética até o final dos anos 80, os quais contribuíram muito para o aumento do consumo de agrotóxicos na prática agrícola. Essas substâncias atraíram a atenção de sistemas regulatórios e de consumidores devido ao uso em larga escala (muitas vezes em excesso), aos resíduos indetectáveis macroscopicamente pelo consumidor, à toxicidade aguda e crônica em animais e humanos comprovada em laboratório, à persistência em ecossistemas e sistemas vivos e, por fim, à geração de resíduos com características diferentes das substâncias originais. Ao fim dos anos 60, a Revolução Verde promoveu a elevação da produção agrícola nos países em desenvolvimento como o Brasil e a Índia. No entanto, o crescimento desordenado das práticas agrícolas desenvolvidas pela Revolução Verde teve como consequência problemas ambientais e sanitários graves (ECOBICHON, 2001; SEIBER, 2003; AKTAR *et al.*, 2009; JARDIM, 2009; BRAIBANTE & ZAPPE, 2012; PINGALI, 2012).

### 3.2.2 Definição e classificações

Várias são as denominações para agrotóxicos. Podem ser chamados também de defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta ou veneno (PERES *et al.*, 2003). Um agrotóxico (*pesticide*, como é denominado em inglês) é qualquer substância ou misturas de substâncias formuladas para prevenir, destruir ou controlar qualquer ser denominado como peste, incluindo vetores de doenças para humanos e animais ou espécies indesejáveis de vegetais e animais que interferem diretamente em sistemas agrícolas ou urbanos. O termo abrange várias classes de produtos de acordo com a espécie alvo e exclui produtos determinados como agroquímicos que incluem fertilizantes e aditivos alimentares (ZACHARIA, 2011; FAO, 2014). Na língua inglesa, tal distinção é promovida pelos termos *pesticides* e *agrochemicals*, sendo que esse último termo se refere não só a agrotóxicos, mas também a fertilizantes e adubos inorgânicos (PERES *et al.*, 2003).

Até a Constituição de 1988, o Brasil nomeava todo produto destinado ao combate e controle de pragas em sistemas rurais como defensivos agrícolas, denominação ultrapassada que não abrangia produtos aplicados em ambientes urbanos. Durante o processo Constituinte, foi criada a Lei Federal no 7.802, de 11 de julho de 1989, atualmente regulamentada pelo Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que dentre outros pontos define (BRASIL, 1989; BRASIL, 2002):

“Agrotóxicos e afins são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.”

Várias são as classificações possíveis para os agrotóxicos. A classificação por modo de entrada no organismo alvo corresponde a via de absorção das substâncias ativas, ou seja, agrotóxicos sistêmicos, de contato, absorção oral e inalatória. A classificação por função agrupa os agrotóxicos por meio dos organismos alvo das substâncias ativas como inseticidas, fungicidas, herbicidas, bactericidas, rodenticidas, acaricidas, dentre outros. Já a classificação por composição química, a mais comum, agrupa os agrotóxicos pela natureza da substância ativa, correspondendo principalmente aos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (YADAV & DEVI, 2017).

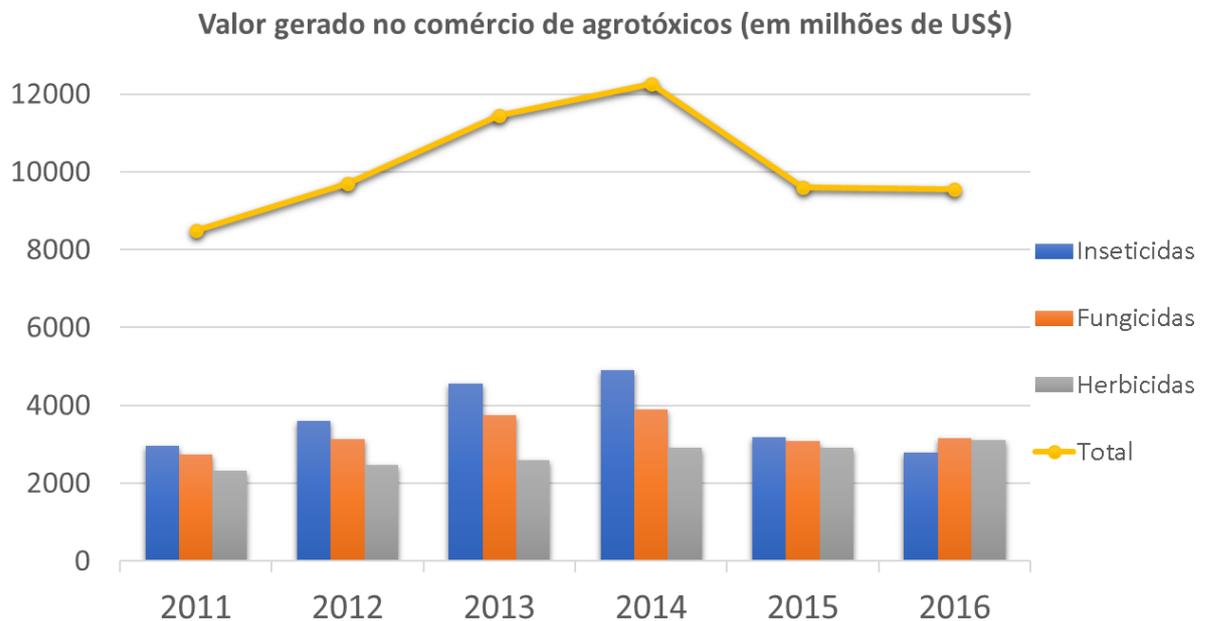
### 3.2.3 Mercado de Agrotóxicos

A extensa utilização de agrotóxicos se deve a diversidade de modos de ação e objetivos. Há uma grande variedade desses produtos com a proposta de combate

a plantas (herbicidas), insetos (inseticidas), fungos (fungicidas), microrganismos de solo (nematicidas), moluscos (moluscicidas), entre outros organismos vivos (PERES *et al.*, 2003). A agricultura é o maior consumidor de agrotóxicos para controlar quimicamente várias pragas (85% da produção mundial). Além disso, agrotóxicos também são usados em atividades de saúde pública para controlar doenças transmitidas por vetores (por exemplo, malária e dengue) e plantas indesejadas (por exemplo, ervas daninhas) em paisagens ornamentais, parques e jardins (KIM *et al.*, 2017).

O Brasil é, na atualidade, o principal consumidor de agrotóxicos no mundo (CARNEIRO, 2015; BRASIL, 2017). No mercado nacional, o balanço oficial do setor de agrotóxicos divulgou que o comércio desses produtos gerou no ano de 2015 U\$ 9,6 bilhões de dólares, com uma diminuição de 21,56% em relação ao ano de 2014. Esse movimento foi condizente com o mercado global de agrotóxicos, que gerou U\$ 54,6 bilhões de dólares em 2015, com queda de 9,8%, devida à queda de consumo no Brasil. Em 2016, o setor de agrotóxicos recuou 1% nas vendas, atingindo US\$ 9,56 bilhões. A retração foi mais significativa quando comparada ao ano de 2014, registrando uma queda acumulada de 22% no período. (SINDIVEG, 2016 e 2017).

**Figura 1.** Evolução da comercialização de agrotóxicos no Brasil, total e por grupo, no período de 2011 a 2016.



Fonte: Adaptado de SINDIVEG (2016 e 2017).

O mercado brasileiro de agrotóxicos trabalha com 80,0% de produtos vindos de importação. O total importado pelo Brasil, em 2015, equivaleu a 392.526 toneladas, com queda de 6,1% em relação a 2014. Segundo o sindicato, a queda de consumo foi resultado de vários fatores em conjunto. A desvalorização do Real, a falta de linhas de crédito rural e o contrabando de produtos ilegais podem ser elencados como fatores causadores de tal impacto negativo no setor. Segundo o SINDIVEG, o Paraguai movimentou U\$ 110 milhões em excedentes do inseticida Benzoato de Emamectina, utilizado apenas para casos emergenciais de infestação por *Helicoverpa Armígera*. Ainda, segundo o sindicato, acredita-se que esse excedente foi introduzido paralelamente no mercado brasileiro, levando ao uso ilegal (SINDIVEG, 2016).

Os benefícios primários da utilização dos agrotóxicos passam pela consequência direta de suas ações, ou seja, a eliminação das pragas possibilitando maior produção, melhores culturas e redução de perdas. Claro que, o aumento de produção agrícola foi um resultado da união dos agrotóxicos com o advento dos

fertilizantes e a mecanização do campo. Demais benefícios da aplicação de agrotóxicos dizem respeito ao controle de vetores de doenças, principalmente insetos, e da preservação de frutas e vegetais em transportes de longas distâncias (AKTAR *et al.*, 2009).

Desde a Revolução Verde, a produção de alimentos mundial, sustentada pela aplicação de agrotóxicos, foi elevada em 850%. No entanto, em relação a 40 anos atrás, utiliza-se atualmente para produzir 1 kg de alimento cerca de 2,5 a 3 vezes mais fertilizante e 1,5 mais agrotóxicos (MCKENZIE & WILLIAMS, 2015).

### 3.2.4 Toxicologia, regulamentação e controle em alimentos

A utilização segura de agrotóxicos dentro das técnicas modernas de produção exige um planejamento sobre produção sustentável, controle de qualidade e custo. O uso irregular de agrotóxicos potencialmente gera riscos à população, tanto em função de intoxicações alimentares quanto de contaminações ambientais (SINDIVEG, 2016). O ideal seria que o agrotóxico fosse letal para a espécie alvo do produto, mas sem afetar qualquer outra espécie não alvo, inclusive o ser humano. No entanto, na realidade, não há esse produto ideal e nenhum segmento da população está totalmente protegido contra a exposição aos agrotóxicos e aos potenciais efeitos tóxicos que tais compostos provocam à saúde (AKTAR *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2017).

A exposição do ser humano a resíduos de agrotóxicos possui várias vias de contato, assim como várias vias de absorção. As principais rotas de exposição humana a agrotóxicos são através da cadeia alimentar, ar, água, solo, flora e fauna. Uma pessoa pode ser exposta aos agrotóxicos por alimentos e água contaminados ou pelo ambiente, seja em ambiente residencial ou ocupacional. Uma vez exposta, essa mesma pessoa pode absorver os resíduos por via oral, respiratória, ocular e dérmica (BOOBIS *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2017). Os grupos de mais altos riscos expostos a agrotóxicos incluem trabalhadores da produção industrial de agrotóxicos,

trabalhadores rurais, lactentes e crianças (AKTAR *et al.*, 2009; WHO, 2010; ANAGNOSTOPOULOS *et al.*, 2012).

Os riscos a saúde são estudados em quatro níveis (EPA, 2018):

- identificação do perigo – análise do potencial de dano que um agrotóxico pode causar ao ser humano e em quais circunstâncias;
- avaliação da dose-resposta – análise da dose capaz de gerar efeitos adversos em animais e a extrapolação dessa dose para humanos;
- avaliação da exposição – análise das fontes, frequência e concentração com as quais o indivíduo entra em contato com o agrotóxico em questão;
- caracterização do risco – combinação das etapas anteriores para descrever o risco geral associado ao agrotóxico associado.

O mais preocupante em relação à exposição aos agrotóxicos diz respeito à toxicidade crônica, que corresponde a ingestão de pequenas quantidades de agrotóxico por um longo período de tempo. A avaliação do potencial de toxicidade crônica exige investimento alto em estudos a longo prazo com animais de laboratório, destinados especialmente à identificação de possíveis efeitos cancerígenos, mutagênicos ou teratogênicos. Esses estudos também são capazes de identificar os efeitos neurotóxicos ou reprodutivos provocados por agrotóxicos em um sistema vivo. Em um procedimento de toxicidade crônica, estabelece-se a concentração de agrotóxico ingerido diariamente durante um longo período, que não tem nenhum efeito toxicológico significativo sobre animais submetidos ao teste, determinado como o nível de efeito adverso não observável (NOAEL). O NOAEL encontrado serve de base para calcular a ingestão diária aceitável (IDA), que é a quantidade de agrotóxico (mg de agrotóxico por kg de peso corporal) que um adulto saudável pode consumir diariamente por todo o tempo de vida sem qualquer efeito adverso para a saúde. A IDA é normalmente calculada pela aplicação de um fator de segurança de 100 vezes sobre o valor encontrado para o NOAEL das espécies mais sensíveis utilizadas no procedimento de análise (FAO, 2014; AUSTRALIA, 2017).

Os potenciais riscos à saúde humana, devidos à ingestão de alimentos contaminados, levam os governos a investirem em legislações mais exigentes e pesquisas mais complexas para determinação dos níveis dos componentes individuais permitidos para cada matriz (FAO, 2016). Cada país, incluindo o Brasil, possui regulamentação específica para que os agrotóxicos sejam registrados e comercializados dentro de suas fronteiras (GODOY, 2004). No país, todo o processo, desde o registro até a utilização, envolve três órgãos, a saber, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Ministério do Meio Ambiente (MMA) e Ministério da Saúde (MS). De maneira genérica, compete ao MAPA avaliar as questões agronômicas, ao MMA os aspectos ambientais e ao MS os impactos sobre a saúde humana. Cada órgão possui sua função descrita pelo Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989, e que foi atualizado pelos Decretos nº 5.981 de 06 de dezembro de 2006 e nº 6.913 de 23 de julho de 2009. Além das competências de cada órgão, o Decreto nº 4.074 também 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 dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins (BRASIL, 2002; BRASIL, 2009b). Os principais sintomas associados à intoxicação por agrotóxicos encontram-se relacionados na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Principais sintomas relacionados à intoxicação aguda e crônica de diferentes grupos de agrotóxicos

Grupo	Sintomas	
	Intoxicação aguda	Intoxicação crônica
Inseticidas	Fraqueza, cólica abdominal, vômito, espasmos musculares, convulsão, náusea, contrações musculares involuntárias, irritação das conjuntivas, espirros, excitação.	Efeitos neurológicos, alterações cromossomais, dermatites de contato, arritmias cardíacas, lesões renais, neuropatias periféricas, alergias, asma brônquica, irritação das mucosas.
Fungicidas	Tonteira, vômito, tremores musculares, dor de cabeça, dificuldade respiratória, hipertemia, convulsão.	Alergias respiratórias, dermatites, doença de Parkinson, câncer, teratogênese, cloroacnes.
Herbicidas	Perda de apetite, enjoo, vômito, fasciculação muscular, fraqueza, desmaios, conjuntivites.	Mutagenicidade, teratogênese, lesões hepáticas, dermatites de contato, fibrose pulmonar.

**Fonte:** Adaptado de PERES *et al.* (2003) e MOSTAFALOU (2013).

As avaliações toxicológicas no Brasil são regulamentadas pela Portaria 03 de 16 de janeiro de 1992 e realizadas pelo MS via Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA). Os dados avaliados para classificação toxicológica dos agrotóxicos com pedido de registro correspondem a dose letal 50 aguda (DL<sub>50</sub>) por via oral e dérmica, para animais de laboratório; concentração letal 50 inalatória (CL<sub>50</sub>) para produtos fumigantes, vaporizáveis, voláteis e pós finos; lesões oculares, lesões cutâneas e sensibilidade cutânea; comprovação da ausência de potenciação dos efeitos tóxicos dos ingredientes ativos que compõem a mistura de agrotóxicos, através da avaliação das DL<sub>50</sub> oral e dérmica da mistura; toxicidade dérmica sub-aguda, por no mínimo 21 dias; toxicidade oral a curto prazo com rações adicionadas de várias doses do agrotóxico ensaiado, por período de tempo nunca inferior a um décimo da vida média (90 dias para ratos e camundongos, 1 ano para cães); toxicidade a longo prazo com rações adicionadas de várias doses do agrotóxico ensaiado, por período de tempo no mínimo equivalente à metade da vida média das espécies de animais empregados (18 meses para camundongos, 24 meses para

ratos), incluindo observações de possíveis efeitos carcinogênicos; efeitos teratogênicos em três gerações sucessivas; metabolismo e vias de excreção bem como a meia vida biológica, do produto técnico, em animais de laboratório; toxicidade dos metabólitos se forem diferentes nas plantas e animais; efeitos mutagênicos; efeitos neurotóxicos retardados, quando aplicável; informações de ordem médica como dados clínicos e laboratoriais referentes a pessoas expostas, voluntária ou ocupacionalmente, confirmação de diagnóstico em casos de intoxicação; primeiros socorros, em casos de intoxicação e medidas terapêuticas e antídotos; sumário dos dados relacionados aos efeitos sobre o ambiente como toxicidade para peixes, organismos aquáticos inferiores, aves, abelhas e fauna silvestre, acumulação na cadeia alimentar, deslocamento no ambiente, persistência e degradação no ambiente e toxicidade do produto degradado. Todos os dados ainda devem estar de acordo com as especificações e diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS), Agência Internacional de Pesquisas Sobre o Câncer (IARC/OMS), Programa Internacional de Segurança de Substâncias Químicas (IPCS/OMS), Centro Pan Americano de Ecologia Humana e Saúde (ECO/OPS), Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), Registro Internacional de Substâncias Potencialmente Tóxicas do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (IRPTC/UNEP), Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Comunidade Econômica Européia (OECD/CEE) e *United States Environmental Protection Agency* (EPA) (BRASIL, 1992).

A partir dos dados obtidos das análises toxicológicas de formulações sólidas e líquidas correspondentes a  $DL_{50}$  oral e dérmica,  $CL_{50}$  (quando aplicável), opacidade da córnea e/ou irritações persistentes da mucosa ocular e lesões cutâneas, o agrotóxico é classificado em classes de periculosidade podendo ser considerado Classe I - Extremamente Tóxicos; Classe II - Altamente Tóxicos; Classe III - Medianamente Tóxicos; e Classe IV - Pouco Tóxicos (BRASIL, 1992).

A ANVISA, antes da autorização de uso de ingrediente ativo calcula o impacto a exposição à substância por meio da Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT), definida como o somatório dos produtos entre os consumos médios per capita diários de cada alimento e seus respectivos LMR, dividido pela massa corporal (**Equação 1**). A IDMT estima o valor teórico de ingestão de cada resíduo de agrotóxico em uma dieta normal de um indivíduo com base nas LMR definidas. Caso

o valor de IDMT seja menor que a IDA para determinado resíduo, as culturas para as quais o agrotóxico estudado é permitido são consideradas seguras (ANVISA, 2016a).

$$\text{IDMT} = \frac{\sum (\text{LMR} \times \text{Consumo do alimento})}{\text{Massa corporal}} \quad \text{Equação 1}$$

Diferente da IDA, o LMR é um parâmetro agrônômico definido como a “quantidade máxima de resíduo de agrotóxico oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes do agrotóxico, afim ou seus resíduos por milhão de partes de alimento (ppm ou mg.kg<sup>-1</sup>)”. O LMR é estabelecido pela ANVISA por meio da avaliação de estudos conduzidos em campo. Neles são analisadas as concentrações de resíduos que permanecem nas culturas após a aplicação dos agrotóxicos, respeitadas as Boas Práticas Agrícolas (ANVISA, 2016a). Os valores de LMR são definidos por meio dos estudos que partem da utilização de quantidades mínimas de agrotóxicos nas culturas propostas, a fim de atender a eficiência agrícola necessária. O objetivo é garantir que a quantidade de resíduo no alimento seja a menor possível (ANVISA, 2017).

A fiscalização das matrizes alimentares é realizada no Brasil de acordo com as diretrizes propostas no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) obedecendo às competências regulamentadas pelo Decreto nº 4.074/2002 (BRASIL, 2002; ANVISA, 2016a; MAPA, 2018).

O PNCRC é um plano de competência do MAPA dividido nas análises de matrizes alimentares de origem animal e vegetal. O programa relativo aos alimentos de origem animal, PNCRC/Animal, é regulamentado pela Instrução Normativa SDA N.º 42, de 20 de dezembro de 1999 e amostra e testa ovos, leite e mel encaminhados para processamento e animais encaminhados para abate em estabelecimentos sob Inspeção Federal. Já o plano para alimentos de origem vegetal, PNCRC/Vegetal, é regulamentado pela Instrução Normativa SDA/MAPA nº 42, de 31 de dezembro de 2008 e objetiva monitorar a qualidade dos produtos de

origem vegetal produzidos em território nacional, seja para consumo interno ou exportação, além dos importados, em relação à ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos. Os dois programas são executados pelos Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGROs), que são os laboratórios oficiais do MAPA, ou por laboratórios públicos e privados credenciados a Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, desde que sejam acreditados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) pela Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 (MAPA, 2018a e b).

O PARA faz parte das ações do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), coordenado pela ANVISA em conjunto com órgãos estaduais e municipais de vigilância sanitária, além de quatro Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen GO, MG, RS e PR) e por laboratório privado contratado por processo licitatório. Criado em 2001 e transformado em programa em 2003 pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 119 de 19 de maio de 2003. O programa verifica se os alimentos comercializados no varejo apresentam níveis de resíduos de agrotóxicos dentro dos LMR estabelecidos pela ANVISA; se os agrotóxicos utilizados estão devidamente registrados no país e se foram aplicados somente nos alimentos para os quais estão autorizados; estima a exposição da população a resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal e, conseqüentemente, avaliar o risco à saúde decorrente dessa exposição (ANVISA, 2016a). Assim, o risco associado com o uso de agrotóxicos é controlado diretamente em produtos alimentícios prontos para consumo por meio da análise de resíduos de agrotóxicos (DA SILVA *et al.*, 2012).

### **3.3 Métodos de análise**

Para acompanhar e fiscalizar o emprego dos agrotóxicos, sistemas regulatórios surgiram após a Revolução Verde, entre os anos 50 e 60, com a intenção de estabelecer os limites toleráveis para resíduos de tais compostos em alimentos e rações em um primeiro momento e, posteriormente, no ar e na água. A rápida evolução técnica do setor com a introdução de vários produtos agrotóxicos no

mercado elevou a demanda por métodos de monitoramento, os quais começaram a ser mais sensíveis e sofisticados para atender a demanda dos cidadãos, preocupados com a toxicidade descoberta dos agrotóxicos. Com isso, esses métodos passaram a identificar cada vez mais resíduos em alimentos, muitos desses proibidos de serem aplicados, o que levou à criação do conceito de “tolerância zero” para alguns compostos. Na mesma época de estabelecimento dos sistemas regulatórios, vários casos de apreensão de alimentos de origem vegetal e animal foram registrados para substâncias que eram, até então, indetectáveis. Isso elevou a pesquisa e informação na área de alimentos, gerando várias publicações de novos métodos e guias práticos de análise de alimentos. Assim, muitos especialistas surgiram em universidades europeias, norte-americanas e japonesas, agências reguladoras, empresas de alimentos e empresas de produtos químicos agrícolas. A partir desse corpo científico, vários métodos foram propostos empregando técnicas como polarimetria, colorimetria, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrometria de massas, além de imunoenaios (SEIBER, 2003).

A determinação de resíduos de agrotóxicos gera dados importantes para mensurar a exposição humana e do meio ambiente a esses compostos, traçando um paralelo de conformidade da produção agrícola com as Boas Práticas Agrícolas e possibilitando decisões regulatórias comerciais acerca da segurança alimentar populacional (PERES, 2009). A análise de alimentos envolve várias etapas: amostragem, preparação de amostras, extração dos analitos, detecção/quantificação e análise de dados, cujo objetivo é obter informações sobre a qualidade e quantidade de resíduos de agrotóxicos presentes no alimentos (ABDULRA'UF *et al.*, 2012). Há 40 anos que instituições públicas e privadas estudam e aplicam metodologias de análise de agrotóxicos em matrizes alimentares. Muitas metodologias antigas foram moldadas de acordo com as especificações de sua época, e com isso, foram estruturadas a partir de análises manuais com um alto consumo de tempo e de reagentes. Tais limitações foram minimizadas após o desenvolvimento dos métodos multirresíduos (MMR) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2011).

O primeiro MMR de destaque na história surgiu nos anos 60, desenvolvido por P. A. Mills, químico da *United States Food and Drug Administration* (FDA). Essa

metodologia atendeu bem as análises de agrotóxicos apolares como os organoclorados, mas deixava a desejar em análises de moléculas polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; HERCEGOVA *et al.*, 2007; PERES, 2009).

Nos anos 70, vários métodos foram desenvolvidos para preencher a lacuna do monitoramento de agrotóxicos polares como compostos fosforados e nitrogenados que eram introduzidos no mercado. O destaque dentre estes foi o método de Luke, no qual foram adicionados sais à fase aquosa nas etapas de partição líquido-líquido dessa metodologia para aumentar a recuperação dos analitos polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Nessa mesma época, houve uma grande queda nos valores dos LMRs e IDAs. Isso fez com que os limites de detecção (LODs) evoluíssem para acompanhar as necessidades de análise de concentrações tão baixas (SIEBERS & HANEL, 2003).

Os anos 80 foram caracterizados pela conscientização do meio científico quanto ao impacto das análises sobre o meio ambiente. Vários autores apresentaram métodos de análise de agrotóxicos que se valiam de solventes menos agressivos e em menor volume. Os estudos apresentaram misturas de solventes para a extração e alguns sais para melhorar a partição dos analitos polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Nos anos 90, a pressão por maior redução de consumo de solventes e pela minimização do contato manual dos analistas durante a execução das técnicas motivou o surgimento de vários métodos de extração, como por exemplo as extrações por flúido supercrítico, dispersão por matriz sólida, extração assistida por micro-ondas, microextração em fase sólida e a extração por líquido pressurizado (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; HERCEGOVA *et al.*, 2007; LEDOUX *et al.*, 2011) (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Cronologia e características dos principais métodos de análises de resíduos agrotóxicos em alimentos

Período	Método	Descrição do Processo	Características
1960	Método de Mills	Extração com acetonitrila. Partição em éter de petróleo. Purificação em coluna contendo florissil.	Baixa recuperação para organofosforados.
	Método de Storherr	Extração com acetonitrila. Partição em diclorometano. Purificação com carvão ativado.	Desenvolvido para extração de organoclorados e organofosforados.
1970	Método de Luke	Extração realizada com acetona. Saturação da fase aquosa com cloreto de sódio. A etapa de purificação utiliza coluna de florissil.	Resultou em maiores valores de recuperação de compostos polares.
1980	Método de Specht	Extração com mistura de acetato de etila e ciclohexano (1:1, v/v).	A mistura promoveu a partição do extrato de maneira forçada.
1990 em diante	-	Introdução de automação aos processos, como as extrações por micro-ondas, acelerada por solventes ou por flúido supercrítico.	Redução da quantidade de solventes utilizados, assim como menor manuseio por parte dos analistas.

**Fonte:** Adaptado de ANASTASSIADES *et al.* (2003); PRESTES *et al.* (2011).

Especialmente para frutas e vegetais, é possível encontrar múltiplas combinações de analitos, matrizes e níveis de concentração. Como consequência, a validação dos métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos envolvendo processos intralaboratoriais e interlaboratoriais, para cada combinação de analito/matriz/concentração, torna-se inviável. Assim, matrizes e analitos representativos são selecionados para avaliar o desempenho do método selecionado (AYSAL *et al.*, 2007; PRESTES *et al.*, 2009).

Em 2016, a ANVISA publicou o Perfil Analítico dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública, documento que compila a capacidade e escopo analíticos dos laboratórios estaduais e municipais pertencentes a Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária (RNLVISA). A análise de alimentos é coberta em todos os estados do Brasil, no entanto a análise de resíduos de agrotóxicos ainda não faz

parte do escopo analítico de uma parcela dos laboratórios (ANVISA, 2016b). Assim, introdução de métodos analíticos aos laboratórios que ainda não realizam análise de resíduos de agrotóxicos exigirá, dentre outras necessidades, a validação dos mesmos.

A literatura atual apresenta vários MMR que descrevem análises capazes de determinar, simultaneamente, um número extenso de agrotóxicos em diferentes matrizes alimentares, seja de origem animal ou vegetal, cobrindo níveis muito baixos de resíduos agrotóxicos (JARDIM, 2009). A evolução das metodologias de análise de agrotóxicos em alimentos sempre buscou a simplificação, a miniaturização, e melhoria nos processos de extração e limpeza, com técnicas universais de determinação como técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (EM) (TORRES, 1996; ANVISA, 2013).

### 3.3.1 Técnicas de Extração

Conceitualmente, a preparação da amostra consiste na conversão de uma matriz real em uma amostra adequada para análise. Esse processo trabalha com a modificação do ambiente químico da matriz. O ponto de partida da preparação da amostra é a extração do analito (RODRIGUEZ *et al.*, 2013). Em geral, deseja-se que a preparação das amostras consiga extrair o máximo de agrotóxicos em uma única etapa, proporcione índices de recuperação o mais próximo de 100%, remova possíveis interferentes da matriz, concentre os analitos de interesse, seja de baixo custo, rápida, fácil, segura, robusta e precisa (DE CASTRO & JIMENEZ-CARMONA, 2000; HERCEGOVA *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2011).

Todos os aspectos relativos à extração e purificação variam de acordo com a matriz e o analito de interesse. A preparação e o processamento das amostras devem ser realizados no prazo mais curto possível para minimizar a deterioração da amostra e as perdas dos resíduos de agrotóxicos presentes. Vários parâmetros próprios da extração de compostos devem ser cuidadosamente analisados como pH,

temperatura e tempo pois, cada um desses aspectos modifica o desempenho da extração (FERNANDES *et al.*, 2011; LEDOUX *et al.*, 2011; SANTE, 2015).

Os novos objetivos de preparação das amostras envolvem, ainda, a utilização de solventes extratores que gerem menos resíduos e que sejam menos trabalhosos, principalmente quanto à manipulação pelos analistas. Tais métodos possuem como base a instrumentação, sendo a extração muitas vezes automatizada, demandando analistas treinados e etapas de limpeza e purificação no intervalo entre extrações, o que implica em um maior tempo de análise. Outra desvantagem é o escopo limitado de resíduos de agrotóxicos que podem ser extraídos, sob determinadas condições. Sendo assim, esses procedimentos, podem ser empregados em algumas aplicações, mas geralmente estão distantes de serem considerados ideais para um MMR de análise de agrotóxicos em alimentos (HERCEGOVA *et al.*, 2007; PRESTES *et al.*, 2011).

#### 3.3.1.1 *Extração Assistida por Micro-ondas*

A primeira proposta dessa técnica ocorreu em 1975, por Abu-Samra *et al.* (ESKILSSON & BJÖRKLUND, 2000; ARMENTA *et al.*, 2008). O objetivo inicial da utilização de micro-ondas em uma extração era o desenvolvimento de uma queima úmida para a análise de cinzas (ABU-SAMRA *et al.*, 1975).

A teoria da extração por micro-ondas se baseia na influência da radiação sobre a matéria. As micro-ondas são radiações não ionizantes eletromagnéticas de frequência entre 300 MHz e 300 GHz (BARBA *et al.*, 2016; SADEGHI *et al.*, 2017). As ondas funcionam como um vetor de energia, que esquentam a matéria com mais eficiência que o método convencional baseado em movimentos de convecção e condução. O calor gerado na matriz pelas micro-ondas ocorre por meio dos fenômenos de condução iônica e rotação de dipolo. A condução iônica é a movimentação eletroforética de espécies iônicas presentes na matriz em direção ao campo elétrico da onda. A resistência promovida pelos componentes da matriz que não se movem causa fricção, gerando calor. Já moléculas polares que apresentam

momentos dipolares diferentes de zero tendem a girar de acordo com o alinhamento do campo elétrico onde se encontram. Com o bombardeamento de várias micro-ondas na amostra, as moléculas polares não conseguem permanecer alinhadas e a constante rotação causa extensas fricções da matéria que geram calor (ESKILSSON & BJÖRKLUND, 2000; MANDAL & HEMELATHA, 2006; CHEMAT *et al.*, 2017; SADEGHI *et al.*, 2017).

Baseado no mecanismo, os solventes utilizados devem ser polares para sofrer ação das micro-ondas. O comportamento térmico do solvente sob ação das micro-ondas obedece a **Equação 2** (ESKILSSON & BJÖRKLUND, 2000; MANDAL & HEMELATHA, 2006; CHEMAT *et al.*, 2017):

$$\tan \delta = \varepsilon'' / \varepsilon' \quad \text{Equação 2}$$

Sendo:

$\tan \delta$  = fator de dissipação;

$\varepsilon''$  = perda dielétrica;

$\varepsilon'$  = constante dielétrica.

A separação dos solutos dos locais ativos da matriz da amostra por meio da aplicação de micro-ondas ocorre por meio do aumento da temperatura e pressão, além da difusão do solvente através da matriz da amostra e a liberação dos solutos da matriz da amostra para o solvente (BARBA *et al.*, 2016).

O efeito das micro-ondas é fortemente dependente da susceptibilidade dielétrica do solvente e da matriz. Assim, pode ser usada uma mistura de solventes que gere bastante calor por meio das micro-ondas. Ainda pode ser realizada uma extração sem solvente (chamada de solvente transparente), onde o conteúdo de água presente na matriz é facilmente aquecido pelas micro-ondas, se comportando como o solvente da extração (ESKILSSON & BJÖRKLUND, 2000; MANDAL & HEMELATHA, 2006; SADEGHI *et al.*, 2017).

Essa modalidade de extração tem sido aplicada em uma extensa variedade de matrizes para extração de analitos orgânicos. Pelo mecanismo, utiliza-se na

extração menor volume de solvente, obtendo ganhos consideráveis no tempo de processo em relação aos métodos tradicionais. Registra-se na literatura uso 10 vezes menor de volume de solvente com ganho de até 20 vezes no tempo com a extração assistida por micro-ondas em relação ao método de Soxhlet (MANDAL & HEMELATHA, 2006; ARMENTA *et al.*, 2008). A extração assistida por micro-ondas ainda apresenta como vantagens a extração simultânea de várias amostras e a facilidade de operação com maior segurança do analista já que a metodologia pode ser conduzida em reatores fechados (ESKILSSON & BJÖRKLUND, 2000; ARMENTA *et al.*, 2008; PRESTES *et al.*, 2011). No entanto, essa técnica de extração não apresenta grande seletividade, acarretando na coextração de uma quantidade considerável de interferentes, não realiza a limpeza do extrato e nem é aplicável a analitos termolábeis (FERNANDES *et al.*, 2011; PRESTES *et al.*, 2011).

#### 3.3.1.2 *Extração por Líquido Pressurizado*

A técnica de extração por líquido pressurizado caracteriza-se pela aplicação de solvente a alta temperatura e pressão sobre a amostra. A técnica foi desenvolvida e validada para um sistema automatizado por Richter *et al.*, em 1996. No início, o foco da extração era amostras ambientais, mas com a versatilidade da técnica, a extração também passou a ser utilizada em alimentos (RICHTER *et al.*, 1996; LUTHRIA *et al.*, 2004; ARMENTA *et al.*, 2008).

O procedimento inicia-se com a introdução da matriz sólida em um cartucho. Posteriormente, o cartucho é preenchido com o solvente escolhido sobre temperaturas a 50°C e 200°C e pressões que variam de 34 atm a 204 atm. Por fim, gás inerte comprimido é jateado no sistema para encaminhar o solvente com o analito do cartucho para o coletor (RICHTER *et al.*, 1996; LUTHRIA *et al.*, 2004).

A extração por líquido pressurizado é bastante semelhante ao que se realiza na técnica de extração por Soxhlet quanto ao processo em geral, tendo como principais diferenças a temperatura e pressão do solvente aplicado sobre a amostra (RICHTER *et al.*, 1996; LUTHRIA *et al.*, 2004; ARMENTA *et al.*, 2008, FERNANDES

*et al.*, 2011). Uma vez que a extração é realizada sob altas pressões, o solvente pode permanecer no estado líquido, mesmo quando levado a temperaturas muito superiores ao seu ponto de ebulição. Assim, o líquido pressurizado pode operar a altas temperaturas, onde a solubilidade dos compostos alvo e a cinética de dessorção da matriz são melhoradas (MATAMOROS *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2014).

O rompimento da tensão superficial durante a extração pressurizada é provocado tanto pela temperatura quanto pela pressão. A temperatura quebra interações estabelecidas entre analito de interesse e a matriz, como interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Assim, a energia térmica do sistema desestabiliza interações coesivas e adesivas que o soluto apresenta entre si e com a matriz, respectivamente. A temperatura mais alta também diminui a viscosidade do solvente, o que facilita o escoamento do líquido na matriz, acrescentando eficiência ao processo de solubilização (RICHTER *et al.*, 1996; LUTHRIA *et al.*, 2004; ARMENTA *et al.*, 2008, FERNANDES *et al.*, 2011).

Quanto à relação entre a pressão aplicada e a tensão superficial, dois aspectos devem ser observados. O aumento de pressão permite a permanência do solvente em estado líquido a altas temperaturas, responsável por romper as interações na superfície da matriz. O segundo aspecto a ser considerado é a maior penetração do solvente sob alta pressão em poros da matriz, que extrai analitos de locais da matriz onde o solvente não acessaria normalmente. No entanto, apesar de ser importante para favorecer a técnica, a pressão não é considerada um ponto crítico de controle da metodologia, assim como é a temperatura (RICHTER *et al.*, 1996; LUTHRIA *et al.*, 2004; ARMENTA *et al.*, 2008, FERNANDES *et al.*, 2011).

Como principais vantagens, a extração por líquido pressurizado apresenta o curto tempo de extração, a possibilidade de purificação do extrato, a automação do processo, a simplicidade de preparo e o consumo moderado de solvente. Porém, a automação exige um equipamento caro para aquisição e manutenção, fornece baixa seletividade, o equipamento necessita de limpeza entre os processos, há inadequação para extração de compostos termolábeis e há uma grande interferência do conteúdo de água sobre o método (RICHTER *et al.*, 1996; ESKILSSON &

BJÖRKLUND, 2000; LUTHRIA *et al.*, 2004; ARMENTA *et al.*, 2008; PRESTES *et al.*, 2011; MATAMOROS *et al.*, 2012).

### 3.3.1.3 *Microextração em Fase Sólida*

A técnica de microextração em fase sólida teve papel muito importante na história e desenvolvimento da química analítica verde. Os autores responsáveis pelo desenvolvimento dessa técnica são Belardi e Pawliszyn, que a publicaram primeiramente em 1989 e depois Pawliszyn e colaboradores publicaram em 1990, 1992 e 1993 (ARMENTA *et al.*, 2008; ABDULRA'UF *et al.*, 2012).

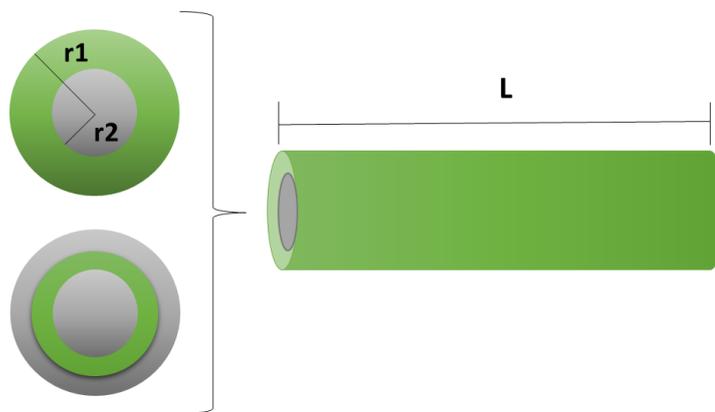
O fundamento da extração passa pelo estabelecimento do equilíbrio entre o meio de extração, ou seja, a matriz e uma fibra adsorvente. A microextração é estruturada em duas etapas. A primeira corresponde ao contato entre a fibra adsorvente e o meio onde se encontra o analito, seja esse meio líquido ou gasoso. A segunda etapa já é caracterizada pela transferência do analito da fibra para a coluna cromatográfica. A fibra com o soluto absorvido é inserida em um sistema de entrada onde a fase móvel do sistema cromatográfico recolhe o soluto da fibra para introdução no aparelho de detecção. O sucesso da extração depende da construção de um meio que favoreça a absorção do analito pela fibra e a posterior liberação do analito absorvido por parte da fibra, ou seja, é preciso ter atenção quanto ao material da fibra e as condições do meio, como temperatura (HINSHAW, 2003; SOUZA-SILVA *et al.*, 2015).

O aparelho é estruturado como se fosse uma seringa. A ponta da seringa é aonde se encontra a fibra de extração. Ao final do processo, a ponta é recolhida em um compartimento próprio do aparato, que será encaminhado para a cromatografia (KATAOKA *et al.*, 2000; ABDULRA'UF *et al.*, 2012.) (**Figura 2**).

A microextração pode ser realizada por imersão direta da fibra no líquido amostral ou inserido na *headspace* (FERNANDES *et al.*, 2011; ABDULRA'UF *et al.*, 2012). Amostras que se apresentam em recipientes de fácil acesso, como bebidas lácteas em recipiente plástico lacrado, podem ser extraídas com o aparato de

absorção externo, que é simplesmente exposto ao meio líquido ou gasoso (*headspace*) do recipiente onde o analito se encontra. Já a estrutura composta pela fibra de absorção interna a uma camada protetora pode ser usada para amostras que podem ser bombeadas facilmente por dentro da agulha, onde a fibra se encontra (HINSHAW, 2003).

**Figura 2.** Esquema estrutural de fibra absorptiva de acordo com a posição no suporte.



**Fonte:** Adaptado de HINSHAW (2003). Acima: fibra absorptiva externa ao suporte, representada na cor verde; Abaixo: fibra absorptiva interna, representada pela cor verde; L: comprimento da fibra; r1 raio do suporte somado à fibra; r2: raio do suporte da fibra absorptiva.

Devido a estrutura e composição da fibra, a microextração é facilmente associada às técnicas de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida (CL) para a detecção ou determinação dos analitos extraídos (FERNANDES *et al.*, 2011).

A concentração de analito entre a fibra absorptiva e o meio da amostra alcança o equilíbrio gradativamente, até que a fibra absorva sua capacidade máxima de soluto. A concentração máxima que a fibra suporta obedece aproximadamente a **Equação 3** (HINSHAW, 2003):

$$M \approx K * V * C \quad \text{Equação 3}$$

Sendo:

M = capacidade máxima da coluna de absorção;

K = constante de distribuição do soluto agregado entre as fases;

V = volume da coluna =  $\pi L * (R_2^2 - R_1^2)$ , sendo L é o comprimento da fibra e R são os raios da fibra absorviva isolada ( $R_2$ ) e do suporte somado à fibra ( $R_1$ );

C = concentração de soluto na amostra.

Como vantagens, a microextração em fase sólida apresenta a redução e até a eliminação de utilização de solventes, possibilidade de miniaturização, a reutilização da fibra, reanálise do extrato e o acoplamento direto do sistema em um aparelho cromatográfico. As desvantagens da técnica são os problemas de precisão, pouca variedade de fibras comerciais disponíveis, percentual de recuperação baixo, lenta otimização da extração, a temperatura de operação relativamente baixa devido à baixa instabilidade térmica do revestimento da fibra absorvente; instabilidade do revestimento em solventes orgânicos e a curta duração do revestimento da fibra absorvente (PRESTES *et al.*, 2011; ABDULRA'UF *et al.*, 2012; SOUZA-SILVA *et al.*, 2015).

#### 3.3.1.4 *Extração por Fluido Supercrítico*

A descoberta do fluido supercrítico foi realizada em 1822 pelo Barão Charles Cagniard de Tour enquanto realizava experiências envolvendo vários fluidos aquecidos e uma bola de canhão em um cano de canhão selado (KNEZ *et al.*, 2014). Os primeiros pesquisadores a perceberem a alta capacidade de dissolução de fluidos supercríticos foram Hannay e Hogarth, há mais de 120 anos. No estudo dos autores, notou-se que sais a base de halogênios solubilizavam ou precipitavam em etanol submetido à temperatura crítica (234,0 °C) de acordo com a pressão que era aplicada no sistema (HEDRICK *et al.*, 1992).

A extração utilizando fluido supercrítico surgiu na década de 80 como uma alternativa a extração por micro-ondas e outras extrações em fase sólida. A técnica substituiu a utilização de solventes orgânicos pela utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico (DE CASTRO & JIMENEZ-CARMONA, 2000; ARMENTA *et al.*, 2008).

Um fluido supercrítico é definido como qualquer substância que se encontra acima de sua temperatura e pressão críticas (SAPKALE *et al.*, 2010; SHARIF *et al.*, 2014). A temperatura crítica caracteriza-se como a temperatura mais elevada em que um gás pode ser convertido em líquido através do aumento da pressão. Já a pressão crítica é a pressão mais alta na qual um líquido submetido pode ser convertido em um gás tradicional quando a temperatura do líquido for aumentada. Quando a pressão aplicada é superior a pressão crítica de determinada substância, as propriedades da substância como líquido ou um gás condensado se tornam idênticas. É esse gás altamente denso que é referido como o fluido supercrítico (HEDRICK *et al.*, 1992; KHAW *et al.*, 2017). Em relação à pressão, sua variação aumenta a densidade do fluido supercrítico, aumentando assim a sua potência de diluição. Em relação à temperatura, essa influencia as propriedades dos solventes, a saber, a densidade, e as propriedades do soluto, principalmente a pressão de vapor. O aumento da temperatura, diminui a densidade e eleva a pressão de vapor. Observando esses fatos, a seleção correta de temperatura requer um balanceamento desses dois efeitos adversos (DE MELO *et al.*, 2014).

As substâncias mais adequadas para a extração devem apresentar parâmetros críticos medianos, algo não comum para substâncias polares. Os compostos mais utilizados para a extração por fluido supercrítico são a água e o CO<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> ganhou destaque por ser um composto inerte, de baixo custo, de alta pureza e atóxico. Por essas características, o CO<sub>2</sub> é escolhido para a extração da maioria dos métodos criados. Mesmo assim, a solvatação do CO<sub>2</sub> de alta densidade não é suficiente para extração por falta de solubilidade do analito ou devido as fortes interações entre os analitos e os componentes da matriz. Nessa situação, aconselha-se a adição de modificadores que aumentam a polaridade do CO<sub>2</sub> na mistura do fluido supercrítico. O CO<sub>2</sub> apresenta diferença entre a pressão de vapor e a pressão atmosférica consideravelmente maior do que demais líquidos. Isso explica como é mais fácil separar o soluto do CO<sub>2</sub> supercrítico em relação a outros líquidos de baixa volatilidade após descompressão do sistema. Isso possibilita a extração de

analitos em uma temperatura mais branda, preservando compostos termolábeis (HEDRICK *et al.*, 1992; DE MELO *et al.*, 2014; KHAW *et al.*, 2017).

A água também deve ser controlada ou retirada da matriz antes da extração. A presença de água pode possibilitar a penetração do fluido em poros da matriz e, especificamente para o CO<sub>2</sub>, aumenta a polaridade do fluido supercrítico melhorando a recuperação do método para analitos mais polares. No entanto, o excesso de água no sistema permanecerá no recipiente de extração e, durante a partição, os analitos polares vão ter maior afinidade pela fase aquosa. Além disso, o excesso de água pode promover uma barreira para substâncias apolares que fiquem encrustadas na superfície da matriz, impedindo a solubilização por parte de fluido supercrítico. Como opção para corrigir essa situação, é possível adicionar agentes secantes que sejam de preferência inertes, não aqueçam com a hidratação e não interfiram na extração (LEHOTAY, 1997; KHAW *et al.*, 2017).

Tanto a utilização de CO<sub>2</sub> quanto da água como solventes supercríticos credenciam a técnica de extração por fluido supercrítico como sendo uma técnica verde, ou seja, uma técnica que se vale de materiais não tóxicos para analistas e ambiente (FERNANDES *et al.*, 2011; DE MELO *et al.*, 2014; SHARIF *et al.*, 2014).

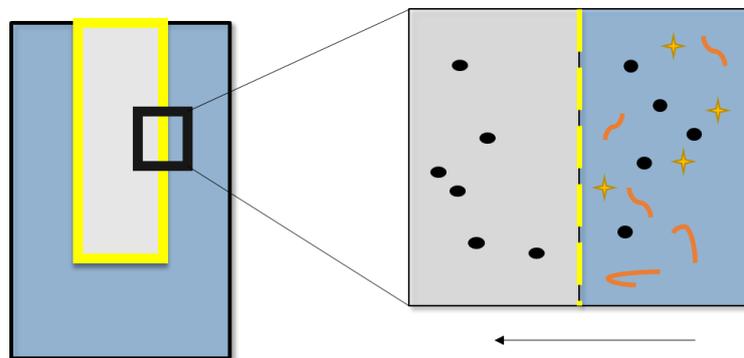
O conjunto de propriedades dessa modalidade de extração faz com que o tempo total do processo seja bem reduzido, assim como há um aumento da taxa de extração e uma diminuição da degradação térmica. A extração com fluido supercrítico é aplicada em analitos de baixa polaridade apresenta simplicidade, rapidez, seletividade com alta concentração do extrato gerado, possibilidade de extração de compostos termolábeis. Como desvantagens, essa técnica exige um equipamento de alto custo de aquisição e manutenção que precisa de limpeza após a extração, além de ser um processo mais complexo que os demais, o que dificulta sua otimização (ARMENTA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2011; LEDOUX *et al.*, 2011; PRESTES *et al.*, 2011; PUCAREVIC *et al.*, 2013; DE MELO *et al.*, 2014; KHAW *et al.*, 2017).

### 3.3.1.5 Extração Assistida por Membrana

Uma membrana consiste em uma barreira seletiva através da qual diferentes gases, vapores e líquidos se movem a taxas variáveis. A membrana permite que duas fases entrem em contato sem mistura direta. As moléculas movem-se através das membranas caracterizando o processo de difusão, sendo conduzidas pela concentração do analito em cada fase, pressão aplicada ao sistema ou gradiente de potencial elétrico (CASAREK *et al.*, 2015).

A utilização de membranas para extração e purificação de compostos iniciou-se no começo da década de 80 (RODIL *et al.*, 2009). A técnica de extração assistida por membrana consiste na criação de um sistema bifásico entre a fase doadora, correspondente a amostra, e a fase aceptora, representada pelo solvente mais adequado ao analito de interesse. Esse sistema é criado pela adição de uma membrana na interface dos dois meios evitando a mistura das fases. Os analitos presentes na amostra que são mais estáveis no solvente de extração passam por difusão da fase doadora para a aceptora (PRIETO *et al.*, 2008; RODIL *et al.*, 2009; IPARRAGUIRRE *et al.*, 2014) (**Figura 3**).

**Figura 3.** Esquema de extração assistida por membrana.



**Fonte:** Adaptado de RODRIGUEZ *et al.* (2013). A membrana, representada na cor amarela, é porosa e seletiva. Isso permite a difusão entre fases de moléculas de peso e tamanho molecular específicos.

Dois tipos de membranas podem ser utilizados na extração. As membranas hidrofóbicas porosas servem mais como um filtro, sendo a extração do analito de interesse diretamente dependente do calibre dos poros da membrana, da composição química do meio e da contenção dos poros. Já as membranas não porosas agregam seletividade devido à permeabilidade e transporte de analitos entre as fases, além de servirem como uma barreira para macromoléculas, partículas macroscópicas e moléculas polares (ARMENTA *et al.*, 2008; PRIETO *et al.*, 2008; RODIL *et al.*, 2009; IPARRAGUIRRE *et al.*, 2014).

As principais vantagens em relação a essa técnica são o pouco uso de solvente, introdução das amostras sem tratamento prévio, potencial de automatização, elevado grau de pré-concentração do analito, o baixo custo das membranas e a purificação conjunta à extração. Porém, essa extração possui eficiência questionável e é demorada, podendo ser ainda mais lenta caso a matriz carregue para o sistema partículas sólidas que podem obstruir os poros da membrana e dificultam o fluxo de partículas entre os meios (RODIL *et al.*, 2009; PRESTES *et al.*, 2011).

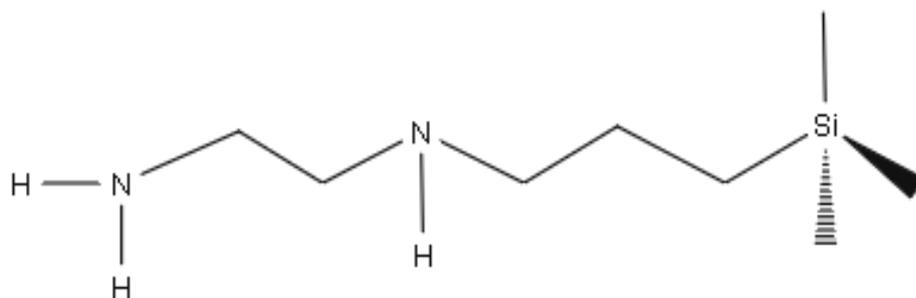
#### 3.3.1.6 QuEChERS

Entre os diferentes métodos, a abordagem QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap Effective, Rugged e Safe*) é uma referência para a determinação de resíduos nos alimentos (MASIÁ *et al.*, 2016). O método QuEChERS foi desenvolvido por Anastassiades *et al.* em 2003 buscando atender as demandas por métodos mais eficientes e fáceis, capazes de responder aos LMR cada vez mais rigorosos que surgiam nos órgãos regulatórios. Após o desenvolvimento, Lehotay *et al.*, participantes do processo, validaram a metodologia para a análise de 229 resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais em CG e CL, ambas acopladas à espectrometria de massas. O método não só gerou um extrato adequado para os detectores modernos, como também purificou o extrato (CHUNG *et al.*, 2010; PRESTES *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

O QuEChERS é uma modalidade de extração que se inicia com a adição da amostra em acetonitrila, seguida de uma etapa de partição processada pela aplicação de uma mistura de sais de magnésio como o sulfato de magnésio. A purificação é realizada por dispersão da matriz em fase sólida, que consiste na adição de sais para particionar os analitos em duas fases. A adição de sulfato de magnésio e *Primary Secondary Amine* (PSA) (**Figura 4**) tanto precipita interferentes quanto remove água residual do extrato. Com isso o extrato final pode ser adicionado diretamente a um sistema de cromatografia, tanto líquida quanto gasosa (FERNANDES *et al.*, 2011; PRESTES *et al.*, 2011; RUIZ *et al.*, 2011; MOEDER *et al.*, 2012; REJCZAK & TUZIMSKI, 2015).

O QuEChERS se caracteriza como uma técnica flexível que possibilita modificar certos aspectos de sua natureza para adequação as matrizes e analitos pesquisados. Como exemplo, é possível encontrar métodos com diferentes quantidades de amostras e solventes de extração além da acetonitrila, como acetato de etila e acetona (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015). Devido a flexibilidade frente ao solvente, sais e agentes quelantes, alguns autores consideram que QuEChERS corresponde mais a um conceito do que a uma técnica específica (RAHMAN *et al.*, 2017).

**Figura 4.** Estrutura química do Primary Secondary Amine (PSA).



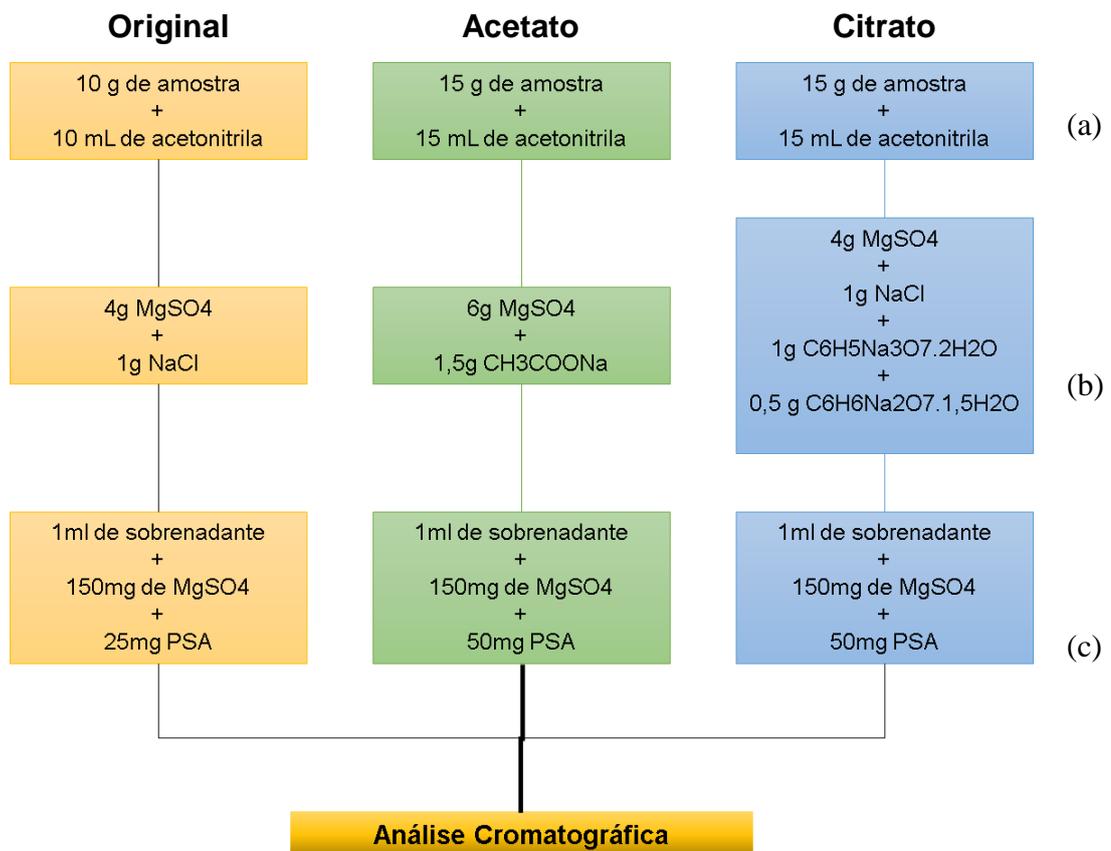
**Fonte:** Adaptado de ROCHA (2014)

Inicialmente, a extração por *QuEChERS* foi estudada em associação com a técnica de CG-EM para a análise de resíduos passíveis de suportar o processo da

técnica de detecção. No entanto, vários outros estudos começaram a surgir, demonstrando a adequação da extração por QuEChERS em associação com várias técnicas de detecção e determinação, com destaque para a CL-EM/EM (AYSAL *et al.*, 2007).

A técnica QuEChERS original teve como foco as análises em matrizes alimentares de alto teor de umidade e baixo conteúdo de lipídeos (KEJCZAK *et al.*, 2015). A técnica continuou evoluindo nas mãos dos próprios autores originais do processo, que promoveram modificações em seu sistema para melhorar problemas relacionados a estabilidade e recuperação do processo final (**Figura 5**).

**Figura 5.** Fluxograma das principais variações do método Quechers para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos.



**Fonte:** Adaptado de Prestes *et al.* (2011). a: etapa de extração dos resíduos de agrotóxicos da matriz alimentar; b: etapa de partição dos analitos extraídos da matriz; c: etapa de purificação do extrato recolhido da partição da solução inicial; MgSO<sub>4</sub>: sulfato de magnésio; PSA: *Primary Secondary Amine*; CH<sub>3</sub>COONa: acetato de sódio; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: citrato de sódio; C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: citrato dissódico.

Os autores adicionaram uma etapa de tamponamento ao processo para elevar a recuperação de agrotóxicos dependentes de pH, independente da matriz a ser analisada. Lehotay e seus colaboradores propuseram o tamponamento com acetato de sódio, estabilizando o extrato em pH 4,8. Já Anastassiades e seus colaboradores propuseram a adição de um tampão a base de citrato, com a introdução de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquidratado para estabilizar o pH entre 5,0 e 5,5. Ambas modificações demonstraram bons resultados, tanto que a modificação proposta por Lehotay foi oficializada pela AOAC, em 2007, e a proposta de Anastassiades foi oficializada pelo *European Committee for Standardization* (CEN), em 2008 (PRESTES *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015).

O seguimento das técnicas de QuEChERS e cromatografias acopladas a espectrometrias gera um método analítico completo com um amplo escopo e excelentes parâmetros de seletividade e sensibilidade (LEHOTAY *et al.*, 2010). Na literatura atual, encontra-se uma grande variedade de métodos de análise de agrotóxicos em alimentos por extração QuEChERS acoplada a CG-EM/EM ou a CL-EM/EM, podendo analisar simultaneamente mais de 100 agrotóxicos em diferentes matrizes (CHEN, 2013).

Muitas das vantagens e desvantagens da extração por QuEChERS dizem respeito as características dos solventes escolhidos, e não da técnica em si. Em relação a técnica de fato, umas das boas vantagens do método de QuEChERS é sua flexibilidade e simplicidade, o que permite que o QuEChERS sirva como ponto de partida para a construção de um método mais adequado. Outra grande vantagem é a realização da extração e purificação do extrato obtido na mesma técnica, fato que deixa a análise bem mais rápida. A possibilidade da simples agitação manual durante a partição permite a aplicação da técnica em campo (PRESTES *et al.* 2009; LEHOTAY *et al.*, 2010; PRESTES *et al.*, 2011; KEJCZAK *et al.*, 2015).

Como desvantagens, destaca-se a menor quantidade de extrato obtido na aplicação de QuEChERS em relação a outras técnicas de extração, podendo prejudicar o limite de quantificação da técnica utilizada (PRESTES *et al.*, 2011). Além disso, a técnica, principalmente em sua versão original, não atende a todas as classes de agrotóxicos como os da família "quat", o glifosato e o seu metabolito

AMPA ou clorotalonil, que devem ser analisados por MRU ou os agrotóxicos dependentes de pH como pimetrozina, tiabendazol e imazalil. Outra desvantagem da técnica é a geração de extratos sujos e, conseqüentemente, a promoção de efeitos de matriz e danos aos equipamentos quando o extrato é aplicado principalmente a um sistema de cromatografia gasosa acoplada a detectores tradicionais como detectores de captura de elétrons. Em adição, os adsorventes e quelantes na etapa de limpeza ainda apresentam limitações como a retenção de parte do analitos, o que pode levar a baixas taxas de recuperação do método de análise, mesmo com a aplicação de EM como detector (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015; SENYUVA *et al.*, 2015; RAHMAN *et al.*, 2017).

### 3.3.2 Detecção e Determinação

Métodos são desenvolvidos e avaliados para diferentes fins. O objetivo pode ser o de criar uma ferramenta de pesquisa ou alternativa para o estudo de um problema científico particular (EMONS, 2013). Os métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em produtos alimentares para fins humanos e animais são desenvolvidos com os fins de monitoramento e fiscalização, para certificação de importação/exportação de produtos, avaliação de risco e verificação de alimentos orgânicos (AYSAL *et al.*, 2007). A determinação de resíduos de agrotóxicos, especialmente em matrizes alimentares, é de extrema importância. São para esses resíduos de agrotóxicos o maior número de regulamentos desenvolvidos para cobrir os tipos e as quantidades dessas substâncias a que a população está exposta. É por isso que muitos países incluíram esses analitos como poluentes, perigosos para a saúde humana. Nesse sentido, diversas organizações estabeleceram LMRs em frutas, vegetais, cereais, alimentos de origem animal e água (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2015). Mas certo é que devido ao custo crescente de profissionais especializados nas novas tecnologias, reagentes a serem utilizados, equipamentos e espaço de laboratório, uma demanda enorme é observada para desenvolvimento e utilização de procedimentos com maior custo-benefício (AYSAL *et al.*, 2007).

### 3.3.2.1 *Técnicas Bioquímicas*

#### 3.3.2.1.1 Imunoensaio

A técnica de imunoensaio foi desenvolvida com o objetivo primordial de auxiliar o estudo médico sobre as relações entre antígeno e anticorpo presentes no campo da imunologia. A base de qualquer imunoensaio é a mensuração da interação entre antígeno e anticorpo. Um antígeno é qualquer molécula capaz de induzir a produção de um anticorpo de resposta em um sistema vivo. Já o anticorpo é uma imunoglobulina, uma molécula de natureza proteica produzida por um organismo vivo para responder à presença de um antígeno. Para o processo analítico, uma dessas espécies se torna o alvo da reação, enquanto a outra é a molécula de captura (HSIEH, 2010).

Todo imunoensaio precisa apresentar tanto a capacidade de distinguir no meio reativo quais são as moléculas de antígeno livres e quais são as ligadas ao anticorpo, quanto de quantificar as macroestruturas de antígenos e anticorpos ligados com o máximo de veracidade e precisão possíveis, mesmo em pequenas concentrações de analito (HSIEH, 2010). Atualmente, a utilização dos imunoensaios se expandiu para outras áreas de pesquisa, inclusive com a aplicação na ciência de alimentos, no que diz respeito ao estudo de proteínas, resíduos de compostos como agrotóxicos ou de microorganismos. Essa técnica se difundiu, principalmente pelos parâmetros de desempenho apresentados em relação à sensibilidade, seletividade e limites de detecção, além da simplicidade (SHAN *et al.*, 2002; HSIEH, 2010; GAN & PATEL, 2013). Para alcançar os resultados buscados, os imunoensaios podem se valer de algumas ferramentas como radioatividade, fluorescência ou enzimas (SHAN *et al.*, 2002).

O precursor dos métodos imunoenzimáticos foi imunoensaio radiológico, desenvolvido por Solomon Berson e Rosalyn Yalow, em 1960. A publicação do primeiro método de EIA (*Enzyme Imune Assay*) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) foi registrada, simultaneamente, por Eva Engvall e Peter Perlmann,

em 1971, que correspondia à quantificação de IgG (imunoglobulina G) de soro de coelho por meio da fosfatase alcalina (LEQUIN, 2005; HSIEH, 2010). Já a aplicação de ELISA para agrotóxicos teve início em 1980, quando Hammock e Mumma descreveram as possibilidades da técnica para análise de agroquímicos e poluentes (SHAN *et al.*, 2002).

São três tipos de ELISA praticados atualmente, os quais podem ser estruturados nos modelos sanduíche, não competitivo (indireto) e competitivo (direto) (**Figura 6**).

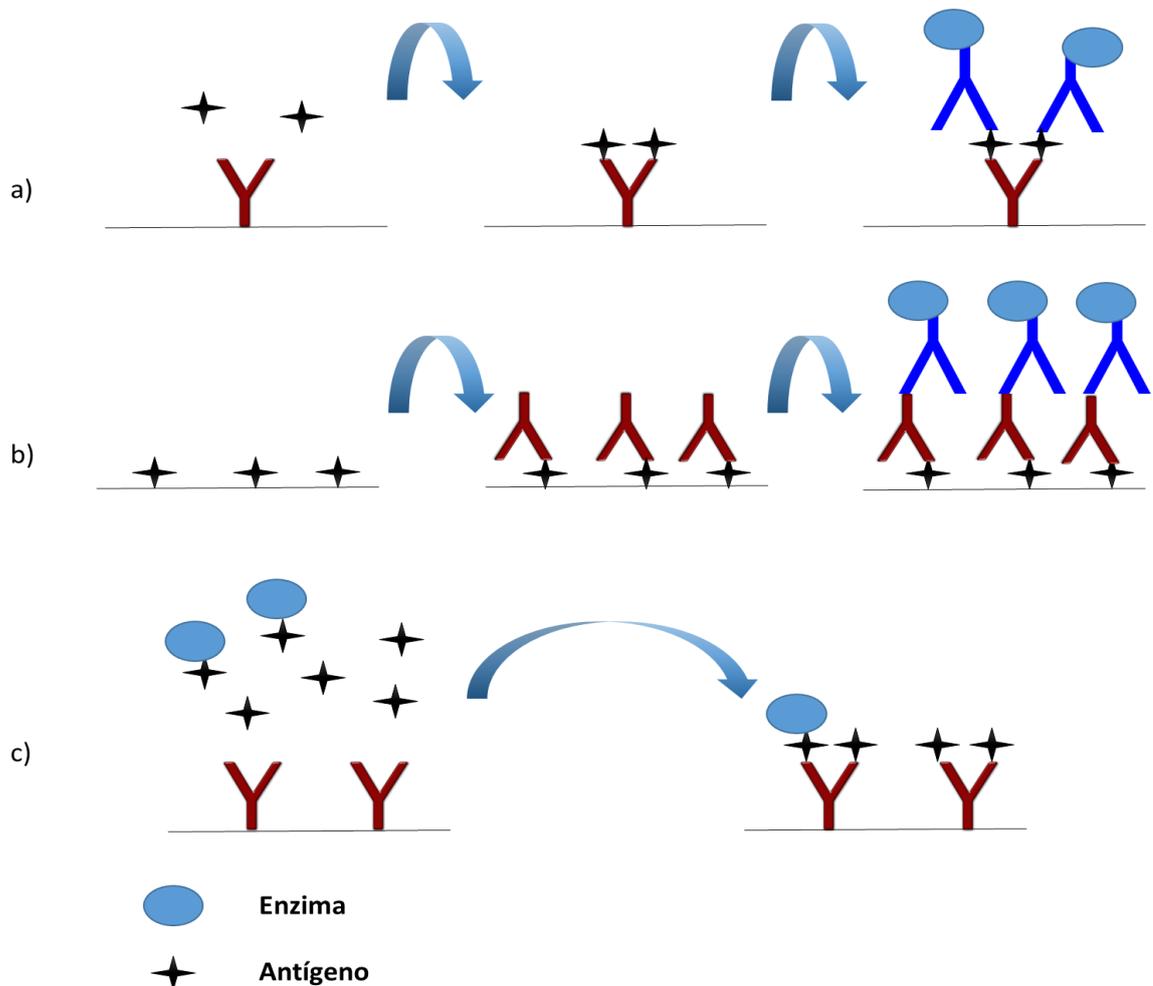
A técnica de ELISA baseada na modalidade não-competitiva corresponde a simples detecção do complexo antígeno-anticorpo formado sob a superfície imunoabsorvente. A partícula de detecção adicionada à reação já contém em sua estrutura a enzima responsável pelo sinal colorimétrico gerado. A cor gerada ao final do processo é diretamente proporcional à concentração de complexo formado, ou seja, sem partículas alvo não haverá sinal (HSIEH *et al.*, 2010).

O método sanduíche consiste na utilização de duas moléculas de anticorpo para cada molécula de antígeno presente na matriz. O primeiro anticorpo, ou seja, o anticorpo de captura é o que apresenta a maior afinidade ao antígeno analisado, sendo fixado à superfície imunoabsorvente. O extrato da amostra é adicionado ao imunoabsorvente para possibilitar o contato do anticorpo de captura com o antígeno. Formado o complexo sob o imunoabsorvente, o segundo anticorpo, nomeado de anticorpo de detecção, é adicionado ao sistema. Esse anticorpo de detecção é complexado previamente à enzima responsável pela construção do sinal de resposta do método e introduz a enzima no sistema ao se ligar ao antígeno. Os dois anticorpos se ligam em diferentes epítomos do antígeno formando, então, um desenho semelhante a um sanduíche. Assim, como no método não-competitivo, a intensidade da coloração final da solução é diretamente proporcional a quantidade de complexo anticorpo-antígeno-anticorpo formado (HSIEH, 2010; COX *et al.*, 2014).

Já o método competitivo, como o próprio nome define, trata-se da competição entre antígenos íntegros e antígenos estruturados com a enzima de interesse para ocupar um número limitado de anticorpos presentes no sistema de análise (TOSCANO *et al.*, 1998). Os antígenos preparados com as enzimas são adicionados

em uma quantidade fixa, enquanto que a concentração de antígenos presentes no extrato é desconhecida. Seguindo a Lei de Ação das Massas, quanto maior a concentração de um tipo de antígeno em relação ao outro, esse de maior concentração tende a ocupar mais os sítios ativos dos anticorpos fixados no imunoabsorvente. Assim, conclui-se que o sinal observado é inversamente proporcional ao conteúdo de antígeno presente no extrato da amostra (COX *et al.*, 2014).

**Figura 6.** Etapas de reação dos três principais tipos de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).



**Fonte:** Adaptado de COX *et al.* (2014). a: técnica de ELISA Sanduíche; b: técnica de ELISA não-competitivo indireto; c: técnica de ELISA competitivo direto.

Como principais desvantagens do método de ELISA têm-se primeiramente possibilidade de falsos-positivos devido à reação contínua do substrato com a enzima, o que pode gerar cores que descrevem de forma imprecisa a concentração de substrato no meio. Além disso, o método de ELISA exige um refinado controle de contaminação sob o extrato da amostra devido a sua elevada sensibilidade, o que pode promover indevidos resultados falso-negativos. Assim, os métodos de ELISA são mais utilizados para detecção de resíduos, em processos de triagem, encaminhando as amostras positivas para confirmação por outras metodologias. Pode-se enumerar também como limitações a dificuldade de aplicar ELISA em MMR e a baixa disponibilidade de reagentes no mercado (SHAN *et al.*, 2002; HSIEH, 2010; GAN & PATEL, 2013).

#### 3.3.2.1.2 Inibição Enzimática

O termo imobilização enzimática apareceu pela primeira vez na literatura no início do século XX e referia-se às enzimas ligadas diretamente aos portadores. Atualmente, este termo foi expandido para incluir tanto as imobilizações diretas nos veículos quanto imobilizações suportadas com os agentes intermediários (JESIONOWSKI *et al.*, 2014).

Enzimas são componentes orgânicos catalisadores de proteínas que apresentam alta reatividade e seletividade em condições fisiológicas. A utilização de enzimas em um processo analítico possibilita o estudo de compostos, seja pela ação das enzimas adicionadas ou pela medição da atividade enzimática sobre o analito. Isso possibilitou um grande avanço na análise de substâncias relativamente instáveis mediante outras técnicas já que a análise enzimática pode ser conduzida com sucesso em condições mais brandas. Além disso, as reações enzimáticas permitem a detecção de componentes de misturas complexas sem o tempo e o custo de técnicas complicadas de separação cromatográfica (POWERS, 2010). Outros fatores relacionados à química verde também proporcionaram um ganho de conhecimento na utilização desses biocatalizadores, como a utilização de solventes

atóxicos a exemplo da água e a natureza biodegradável das enzimas (SHELDON, 2007).

O advento da técnica de inibição enzimática teve como evento precursor a criação de biossensores. O conceito básico do biossensor foi primeiro elucidado por Leland C. Clark, em 1962, em seu trabalho intitulado "eletrodo enzimático" (TURNER, 2013). Já em 1963, Guilbault utilizou um eletrodo duplo de platina com a enzima colinesterase insolubilizada imobilizada dentro da estrutura para detecção de agentes tóxicos no ar (GUILBAULT *et al.*, 2004).

Um biossensor é um dispositivo capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas seletivas a partir do seu ambiente circundante, utilizando um elemento de reconhecimento biológico que proporciona reações bioquímicas ou interações específicas. De forma ideal, os biossensores devem ser capazes de detectar os analitos proporcionando informação rápida e confiável. Os biossensores têm contribuído para o importante crescimento de ferramentas analíticas úteis na detecção de componentes químicos e biológicos perigosos para cuidados de saúde, segurança alimentar e monitorização ambiental (REBOLLAR-PÉREZ *et al.*, 2015).

A evolução dos biossensores resultou em equipamentos modernos com várias configurações para diferentes respostas. Atualmente, biossensores podem funcionar por meio da imobilização da enzima de interesse em um transdutor (mais importante comercialmente), do acoplamento do biossensor a um reator contendo a enzima imobilizada ou mesmo por imobilização de células de tecidos alvo que possuam a enzima de interesse. De acordo com o transdutor, o biossensor pode ser construído para detectar sinais eletroquímicos, térmicos ou óticos (AMINE *et al.*, 2006; DATTA *et al.*, 2013; REBOLLAR-PÉREZ *et al.*, 2015).

A enzima acetilcolinesterase é um exemplo de composto passível de utilização em análise por inibição. Essa substância atua no organismo humano finalizando a transmissão de impulsos em sinapses colinérgicas pela hidrólise rápida de acetilcolina, um neurotransmissor relacionado com a atenção, o aprendizado, a memória, a consciência, o sono e o controle de movimentos voluntários. Dentre os contaminantes capazes de inibir a ação da acetilcolinesterase, encontram-se

agrotóxicos organofosforados e carbamatos. A utilização dessa enzima em um biossensor possibilita a aplicação de técnica de detecção alternativa às técnicas mais tradicionais como métodos espectroscópicos e cromatográficos (CUARTERO *et al.*, 2013).

A aparelhagem moderna no campo dos biossensores se divide em dois grandes conjuntos. O primeiro agrupa equipamentos caros e sofisticados para uso na rotina dos laboratórios de análise que são capazes de analisar substâncias em matrizes complexas com alta taxa de precisão e rapidez. Já o segundo grupo corresponde aos aparelhos mais baratos, portáteis e de fácil utilização, que podem ser utilizados diretamente na área de coleta da amostra (TURNER, 2013).

O cuidado com as enzimas presentes nos biossensores quanto a temperatura de aplicação, ao limitado pH de ação e a perda de atividade após os ciclos de análise são os maiores desafios das técnicas que utilizam inibição enzimática (JESIONOWSKI *et al.*, 2014). Outro problema recorrente quanto à análise de agrotóxicos é a físico-química do processo já que, muitos dos resíduos de agrotóxicos são insolúveis em água. Assim, a aplicação do biossensor em soluções com presença de solventes orgânicos deve ser validada, pois a atividade das enzimas é afetada (VAN DYK & PLETSCHE, 2011).

No todo, o que se evidencia é que os métodos enzimáticos são alternativos em relação aos métodos cromatográficos para detecção e identificação dos agrotóxicos, assim como podem ser utilizados como procedimentos complementares as técnicas mais capacitadas. Isso porque os métodos enzimáticos são mais acessíveis técnica e economicamente. No entanto, no que diz respeito à determinação e sensibilidade metodológica, os métodos cromatográficos são mais apropriados (VAN DYK & PLETSCHE, 2011; WANG *et al.*, 2016).

### 3.3.2.2 *Técnicas Cromatográficas*

A cromatografia é um termo geral aplicado a uma ampla variedade de técnicas de separação com base na partição ou distribuição de uma amostra (soluto)

entre uma fase móvel e uma fase estacionária. A cromatografia tem um grande impacto em todas as áreas de análise e, portanto, no progresso da ciência em geral, incluindo as caracterizações e controle de qualidade de alimentos. A cromatografia difere de outras técnicas de separação devido à possibilidade de ser utilizada com uma grande variedade de materiais, equipamentos e técnicas de detecção/determinação. A cromatografia moderna originou-se na virada dos séculos XIX e XX a partir do trabalho independente de David T. Day, importante geólogo americano e engenheiro de mineração, e Mikhail Tsvett, botânico russo. Day desenvolveu procedimentos para fracionando do petróleo bruto aplicando-o em Terra de Fuller. Já Tsvet utilizou uma coluna cheia de giz para separar pigmentos de folhas em faixas coloridas. Como Tsvett reconheceu e interpretou corretamente os processos cromatográficos e chamou o fenômeno que havia presenciado de cromatografia. a ele geralmente é creditado com sua descoberta (ISMAIL & NIELSEN, 2010).

A cromatografia pode ser vista como uma série de equilíbrios dos analitos entre a fase móvel e estacionária (ISMAIL & NIELSEN, 2010). O tipo de interação entre fase estacionária, fase móvel e substâncias contidas na mistura é o componente básico efetivo na separação de moléculas (COSKUN, 2016). Em qualquer análise cromatográfica, o equilíbrio entre a eficiência da coluna e o tempo de análise deve ser alcançado (HAGGARTY & BURGESS, 2017). A fase móvel pode ser um gás (CG) ou líquido (CL). A fase estacionária pode ser um líquido ou, mais geralmente, um sólido. Assim, o campo da cromatografia pode ser subdividido de acordo com as várias técnicas aplicadas, ou de acordo com os princípios físico-químicos envolvidos na separação (ISMAIL & NIELSEN, 2010; COSKUN, 2016).

A resposta do detector, sob a forma de um sinal elétrico, pode ser registrada (cromatograma), usando um gravador gráfico ou um software computadorizado, permitindo a análise qualitativa ou quantitativa do analito. O coletor de frações pode ser configurado para coletar eluato em intervalos de tempo especificados ou depois da coleta de um determinado volume ou número de gotas. Os componentes da amostra que foram separadas por cromatografia e coletadas podem então ser analisados conforme necessário (ISMAIL & NIELSEN, 2010).

### 3.3.2.2.1 Cromatografia Gasosa

A CG é uma técnica de cromatografia em coluna, na qual a fase móvel é gasosa e a fase estacionária é um líquido imobilizado ou um sólido empacotado em um tubo fechado. A fase móvel para CG é um gás inerte inserido na coluna cromatográfica sob alta pressão. A amostra a ser analisada é vaporizada e, sob um gradiente de temperatura controlado, a amostra é transportada através da coluna pelo fluxo de uma fase móvel inerte e gasosa. Os voláteis são então separados com base em várias propriedades, incluindo ponto de ebulição, tamanho molecular e polaridade (ISMAIL & NIELSEN, 2010; COSKUN, 2016).

A cromatografia gasosa é aplicada para separação e detecção de compostos orgânicos voláteis e estáveis termicamente. A combinação de separação e detecção *on-line* permite uma determinação quantitativa de misturas complexas com alta sensibilidade e seletividade, incluindo vestígios de compostos até partes por trilhão em alguns casos específicos ou em partes por milhão para resíduos de agrotóxicos (HINSHAW, 2003; ISMAIL & NIELSEN, 2010; SIDDIQUI *et al.*, 2017).

A técnica de CG é aplicada a uma porção de detectores como ECD (detector de captura de elétrons), específico para detecção de agrotóxicos clorados; o NPD (detector nitrogênio-fósforo), próprio para a detecção de resíduos nitrogenados; e o FID (detector por ionização de chama) designado para análise de resíduos de agrotóxicos organofosforados. Alguns outros detectores são utilizados em menor escala, baseados em características térmicas, de emissão atômica ou por tempo de retenção dos fragmentos gerados (FERNANDES *et al.*, 2011). Porém, o principal detector aplicado a CG é o espectrômetro de massas, que eleva a capacidade de separação dos compostos, implicando em maior seletividade e sensibilidade. O progresso da técnica de CG-EM se apoiou no desenvolvimento das colunas cromatográficas e nas técnicas de extração e preparação das amostras e analitos (HAGGARTY & BURGESS, 2017). Já como principal desvantagem da técnica de CG, a forte influência que o equipamento sofre dos efeitos de matriz, ou seja, de interferentes co-extraídos com o analito (FERNANDES *et al.*, 2011).

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos se desenvolveu em torno da GC, principalmente com a aplicação dos MMR. A maioria dos agrotóxicos utilizados pertence às classes de inseticidas, acaricidas e fungicidas, que são aptos às análises em CG. Porém, uma nova geração de agrotóxicos possui uma natureza mais polar, sendo alguns encontrados na forma iônica para a aplicação. Essas características físico-químicas conferem aos resíduos desses novos agrotóxicos menor estabilidade térmica e volatilidade baixa, o que desfavorece a utilização da referida técnica para monitoramento de resíduos (FERNANDES, 2011; SIVAPERUMAL *et al.*, 2015).

#### 3.3.2.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A CL surgiu no campo de análise de resíduos de agrotóxicos como uma alternativa para a detecção e determinação de resíduos polares, não-voláteis e termolábeis para os quais a técnica de CG não é adequada. Exemplos desses compostos melhores analisados por CL são os carbamatos e as triazinas (LEDOUX *et al.*, 2011). Existem várias técnicas de cromatografia líquida aplicadas na análise de alimentos como cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida em coluna, todas envolvendo uma fase móvel líquida e uma fase estacionária sólida ou líquida (ISMAIL & NIELSEN, 2010; COSKUN, 2016). Dentre essas técnicas de cromatografia líquida, a cromatografia em coluna é o método mais útil de separação de compostos numa mistura. A fração de solutos ocorre como resultado da migração diferencial através de um tubo fechado de fase estacionária, e os analitos podem ser monitorados enquanto a separação está em andamento. Na cromatografia líquida em coluna, a fase móvel é líquida e a fase estacionária pode ser sólida ou líquida suportada por um sólido inerte. O processo de passagem da fase móvel através da coluna é chamado de eluição, e a porção que emerge da extremidade de saída da coluna é chamada de eluato ou efluente. A eluição pode ser isocrática (composição fixa da fase móvel) ou gradiente (fase móvel variável) durante a eluição de modo a aumentar a resolução e diminuir o tempo de análise. À medida que a eluição prossegue, os componentes da amostra são retardados seletivamente pela fase estacionária com base na força da interação com

a fase estacionária, e assim são eluídos em momentos diferentes (ISMAIL & NIELSEN, 2010).

As novas tecnologias de separação de CL são resultado da miniaturização do diâmetro interno da coluna cromatográfica, classificadas como cromatografia líquida de microfilme ou microcorreção ( $\mu$ CL), cromatografia líquida capilar (CLC) e cromatografia nano-líquida (nanoCL) com diâmetros internos de 0,5-1,0 mm, 100 a 500  $\mu$ m e  $\leq$  100  $\mu$ m, respectivamente. No entanto, essas novas abordagens para CL ainda são percebidas como menos robustas, e geralmente são mais difíceis de operar. No entanto são muito promissoras devido a capacidade de trabalhar com tamanhos de amostra menores, menores taxas de fluxo volumétrico e a melhoria no desempenho de detecção (MASIÁ *et al.*, 2016).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma forma avançada de cromatografia líquida utilizada na separação da mistura complexa de moléculas encontradas em sistemas químicos e biológicos. A especificidade da técnica de CLAE é o parâmetro de destaque, permitindo também altas taxas de precisão (SIDDIQUI *et al.*, 2017). Na CLAE, a fase móvel passa pelas colunas cromatográficas sob pressão de 10 a 400 vezes a pressão atmosférica e com uma taxa de fluxo maior (0,1-5 cm/seg). Assim, através do uso de pequenas partículas e da aplicação de alta pressão sobre a taxa de fluxo do solvente aumentam a potência de separação e agilizam o processo de separação (COSKUN, 2016). Agora, mesmo sendo uma técnica amplamente utilizada e de bons parâmetros analíticos, a CLAE ainda apresenta limitações como o preço do sistema, principalmente no que diz respeito ao custo das colunas e a necessidade de solventes (SIDDIQUI *et al.*, 2017).

Já a tecnologia mais atual diz respeito cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que corresponde a sistemas em que são utilizadas fases estacionárias embaladas com partículas entre 1,7 e 1,8  $\mu$ m, funcionando com altas pressões, superiores a > 400 bar. UHPLC tornou-se de rotina no estudo de contaminantes de alimentos, especialmente no estudo de agrotóxicos. As vantagens são a alta resolução dos picos cromatográficos e a separação rápida com menor consumo de solvente, mantendo ou aumentando a eficiência e a resolução. A desvantagem é a alta contrapressão produzida para pequenas colunas com baixo diâmetro de partícula, que requerem instrumentos especiais (MASIÁ *et al.*, 2016).

A CL foi associada às várias técnicas de monitoramento e determinação se aproveitando da capacidade dessa técnica cromatográfica de separar as moléculas presentes em uma solução. E na CL, a escolha da abordagem de detecção é fundamental para garantir que todos os componentes sejam corretamente identificados. Técnicas de detecção baseadas em ultravioleta, fluorescência e eletroquímica são amplamente utilizadas. No entanto, foi a utilização de EM acoplada à CL que ganhou notoriedade por apresentar adequados parâmetros de desempenho, principalmente no que diz respeito a seletividade e sensibilidade. A associação entre CL e EM permitiram o surgimento de vários MMR para análise de agrotóxicos em alimentos (ANNESLEY *et al.*, 2003; RUIZ *et al.*, 2011; MASIÁ *et al.*, 2016; SIDDIQUI *et al.*, 2017).

### 3.3.3 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (EM) é uma das ferramentas analíticas mais poderosas devido à sua alta sensibilidade, seletividade, precisão e alta capacidade de processamento (AWAD *et al.*, 2015). O estudo da EM iniciou-se com J. J. Thomson, em 1897, que mais tarde veio a ganhar o prêmio Nobel de física, em 1906, por seu trabalho no campo da eletricidade (PAVANELLI, 2010; DINIZ, 2011). A EM ganhou notoriedade no campo da química analítica por ser uma técnica de alta seletividade, capaz de analisar, na mesma corrida analítica, múltiplos compostos. A crescente adoção da EM acoplada a CL coincidiu com uma diminuição da oferta de kits, equipamentos e serviços associados aos imunoensaios (ADAWAY *et al.*, 2015).

A princípio, a EM era limitada a análise de moléculas pequenas e termoestáveis, devido ao procedimento lento de ionização, que gerava excesso de fragmentação dos compostos e apresentava dificuldade em transferir os íons para a fase gasosa. Já nos anos 80, o advento de equipamentos inovadores de ionização branda modificou o perfil de análise dessa técnica (DOMON & AEBERSOLD, 2006). Com o avanço tecnológico da EM, houve evolução nos parâmetros de desempenho da referida técnica, bem como a possibilidade de associação com procedimentos

simples de extração e preparo de amostras, como o QuEChERS (SCHWARZ *et al.*, 2011).

Tanto a CL quanto a CG, quando associadas a EM, são capazes de analisar uma quantidade considerável de resíduos. No entanto, a técnica de CL acoplada em linha a espectrômetro de massas apresenta um escopo maior de substâncias passíveis de análise (LEDOUX *et al.*, 2011). A CL-EM permitiu ganhos em robustez e aplicabilidade de métodos para análise de resíduos de agrotóxicos. A aplicação de cromatografia líquida acoplada e espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) em análises do tipo MMR possibilitou a determinação simultânea de um grande número de agrotóxicos com propriedades físico-químicas variadas sem a necessidade de um tratamento específico de separação dos compostos. Como consequência, a CL/EM-EM se tornou uma técnica menos susceptível aos efeitos de matriz (FILHO *et al.*, 2012).

Independentemente do instrumento de EM aplicado, o primeiro passo na análise de EM é a conversão de analitos alvo da fase líquida ou sólida em espécies ionizadas em fase gasosa. Existem muitas técnicas de ionização, e cada uma tem suas próprias vantagens e aplicações ideais. A escolha da fonte de ionização pode afetar significativamente a análise de EM e alterar substancialmente os dados qualitativos e quantitativos obtidos pela EM (AWAD *et al.*, 2015).

A fragmentação dos íons ocorre devido ao choque entre os íons formados na primeira etapa e um gás próprio para a colisão. Geralmente, o gás escolhido é argônio ou nitrogênio. A fragmentação por colisão é concluída pela simples energia cinética presente em cada partícula de gás lançada na câmara para a ocorrência do choque (ADAWAY *et al.*, 2015). A falta de seletividade da informação nominal da massa de íons moleculares foi superada pela fragmentação (espectrometria de massa em linha), mas usando monitoração por MMR apenas apropriada para análise de alvo. A introdução da EM de alta resolução melhorou a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes complexas por trabalharem no modo de varredura completo com alto poder de resolução. A versatilidade do EM permitiu o desenvolvimento de diferentes formas de trabalho, incluindo análise de analitos alvos e não-alvos (MASIÁ *et al.*, 2016). O desenvolvimento de EM de alta resolução deve-se à disponibilidade de instrumentação mais robusta, sensível e seletiva. Os

benefícios fornecidos pela EM de alta resolução incluem a coleta de espectros de varredura completa, que fornece uma melhor visão da composição de uma amostra. Isso fomenta mais liberdade ao analista de medir compostos sem ajuste prévio específico ao composto, a possibilidade de análise retrospectiva de dados e a capacidade de realizar elucidações estruturais de compostos desconhecidos ou suspeitos (SENYUVA *et al.*, 2015).

Os íons gerados na fonte de ionização são então separados de acordo com as proporções massa/carga no analisador de massa de EM (KRUIVE *et al.*, 2015a). Os analisadores de massa são caracterizados pela transmissão dos íons formados na fonte de ionização para o detector através da aplicação de campos magnéticos e elétricos em uma região de baixa pressão para selecionar os íons de interesse (MAHER *et al.*, 2015). O analisador de massa mais difundido na análise de rotina é o triplo-quadrupolo, seguido de armadilha de íons (*ion trap*) (KRUIVE *et al.*, 2015b).

Na etapa de leitura e interpretação dos dados, os fragmentos formados são escaneados e direcionados para o detector do aparelho que analisa a razão entre massa ( $m$ ) e carga ( $z$ ) dos fragmentos. Esses sinais  $m/z$  são interpretados pelo sistema e organizados em espectros. Para a construção de sinal, os íons passam pelo analisador de massas e por um detector. Os exemplos mais comuns são o quadrupolo, aprisionamento de íons e o de tempo de voo. Todos esses analisadores de massas, por meio de mecanismos diferentes, transformam os sinais captados na informação de  $m/z$ . Por sua vez, os detectores são responsáveis por receber os sinais vindos dos analisadores de massas e encaminhá-los para o processamento de dados (PAVANELLI, 2010; DINIZ, 2011).

A espectrometria avançou tecnologicamente a ponto de permitir a análise de múltiplos componentes em uma única corrida analítica, o que permite a conjuntura de uma metodologia de identificação e quantificação simultânea. Ainda assim, existem poucos kits de calibração para espectrômetros no mercado, exigindo a fabricação própria dos padrões (ADAWAY *et al.*, 2015). Atualmente, a técnica de CL-EM/EM associa os equipamentos de CL e EM em série, de forma que a detecção e determinação seja feita nas etapas de fragmentação primária e secundária. Isso permite ao aparelho gerar sinais com maior discriminação, reduzindo o efeito de

matriz e permitindo análise de compostos na ordem de nanogramas (JARDIM, 2009).

As medidas de massa precisas da molécula alvo e cada íon de fragmento característico, juntamente com sua composição elementar e tempo de retenção, forneceram informações adicionais para identificação, comumente realizadas extraíndo os cromatogramas de íons totais contra uma base de dados usando uma janela de 4-20 mDa, obtendo então cromatogramas ricos em informações capazes de quantificar a presença do analito (MASIÁ *et al.*, 2016). Sendo assim, no campo da segurança alimentar, a detecção e determinação de resíduos e contaminantes por EM é considerada a melhor escolha, devido aos excelentes parâmetros apresentados (DZUMAN *et al.*, 2015).

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos em matrizes com fins alimentícios exigem métodos analíticos com parâmetros de desempenho adequados e um amplo escopo. Com a progressão dos sistemas de acreditação e dos programas de proficiência, muitos laboratórios começaram a abrir mão dos métodos tradicionais em detrimento ao desenvolvimento e validação dos métodos desenvolvidos pela própria equipe de análise (AYSAL *et al.*, 2007). Portanto, o procedimento de medição completo, tem de passar por um processo de caracterização de desempenho antes de ser aplicado. Isso é comumente chamado validação do método (EMONS, 2013).

### **3.4 Validação de métodos**

Milhões de medidas analíticas são aplicadas em todo o mundo. Seja para fins comerciais, ou apoio a programas e sistemas sanitários, quase que todos os aspectos presentes em uma sociedade são baseados de alguma forma por medições analíticas. E os resultados obtidos nessas medições analíticas precisam apresentar o máximo de confiabilidade e precisão, já que impactam diretamente em questões econômicas e sanitárias (SOUZA, 2007; MAGNUSSON & ÖRNEMARK,

2014). A validação de métodos analíticos é indispensável para obter resultados confiáveis (KRUIVE *et al.*, 2015a).

A exigência em relação ao cumprimento de regulamentos nacionais e internacionais em todas as áreas de análise promoveu, assim, a necessidade de métodos analíticos confiáveis. Com tal objetivo, há o consenso de que todo o laboratório disposto a realizar análises, seja qual for a área, precisa adotar medidas apropriadas para assegurar que é capaz de fornecer os dados gerados com a qualidade exigida. Algumas das medidas preconizadas incluem: i) utilização de métodos de análise validados; ii) utilização de procedimentos de controle de qualidade internos; iii) participação em ensaios de proficiência; e iv) acreditação segundo requisitos de norma internacional reconhecida, de preferência a ISO / IEC 17025. Constata-se, então, que a validação dos métodos aplicados, seja qual for o laboratório, é um componente essencial que se deve implementar para gerar dados analíticos confiáveis (THOMPSON *et al.*, 2002).

A validação de um método em um laboratório de controle de qualidade é executada, principalmente, no momento da introdução de método novo no laboratório ou da transferência de método para outras instalações. No entanto, para modificações ou melhorias nos métodos já utilizados, também se faz necessária a validação (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014). Desta forma, a validação se sustenta nos pilares da qualidade das medidas instrumentais e na confiabilidade estatística dos dados construídos (FERREIRA, 2008). A importância do processo de validação ganhou seus contornos de fato com o advento e estabelecimento das séries de documentos ISO 9000, principalmente para padronização dos conceitos relativos às competências dos laboratórios, requisitos para materiais de referência e parâmetros para ensaios de proficiência (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014). Como reforço ao progresso da importância que a validação apresenta em diversas áreas, também se encontram no mercado algumas opções de *softwares* destinados à montagem de planilhas de validação (FERREIRA, 2008).

Em 2002, a IUPAC, em associação com a ISO e a AOAC, propôs reunir os princípios científicos essenciais dos documentos presentes na literatura para fornecer informações que foram submetidas à aceitação internacional e apontar o caminho a seguir para a melhor prática de validação intralaboratorial. Os conceitos e

processos apresentados por guias da AOAC, ICH e EURACHEM contribuíram para a formação de um guia harmonizado para direcionar a validação intralaboratorial (THOMPSON *et al.*, 2002).

Também na tentativa de harmonizar o conhecimento existente sobre o ato de validar uma metodologia de análise, Japão, União Europeia e Estados Unidos organizaram por meio da *International Conference Harmonization* (ICH), em 2005, conceitos relevantes para estabelecer um consenso maior sobre os trabalhos gerados nesses países, servindo também como parâmetro para outras nações que quisessem consultar o documento construído. Mesmo sendo uma comissão fundamentada para estudos farmacêuticos quanto à medicação humana, o guia foi construído sem especificações de metodologias próprias da área (ICH, 2005).

No entanto observa-se que não há ainda harmonia quanto ao conhecimento existente sobre a validação de um método. Um mesmo parâmetro de desempenho pode ser encontrado com diferentes descrições, dependendo do documento. Até mesmo um guia unitário pode apresentar diferentes conceitos para um parâmetro específico a medida que a leitura e interpretação do documento avançam. Além disso, conceitos pontuais como o critério de aceitação de um parâmetro, assim como o procedimento mais adequado para avalia-lo, são conhecimentos pouco discutidos e desenvolvidos. Isso acarreta problemas a longo prazo já que os métodos validados sob tais definições, sem a coesão necessária, são utilizados diariamente na rotina de laboratórios de diferentes áreas de interesse (ROTHER, 2007; KRUIVE *et al.*, 2015a).

#### 3.4.1 Definições

O termo validação origina-se do latim, ou seja, *validus*. O significado do termo antigo é forte, e a aplicação da palavra descreve que para algo ser verdade, útil e de um padrão aceitável, é preciso que seja provado. Segundo a Organização Internacional de Normalização (OIN), o termo validação é definido como a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para determinada metodologia sejam atendidos (ARAUJO, 2009).

Já o documento da ISO/IEC 17025, que estabelece os parâmetros de acreditação de um laboratório, define validação como a “confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos” (ABNT, 2005a).

Para a FDA, validar um método analítico é o processo de confirmação que um método é adequado para o seu fim. A validação inclui demonstrar características de desempenho como veracidade, precisão, sensibilidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, alcance e robustez, para garantir que os resultados sejam significativos e apropriados para tomar uma decisão (FDA, 2015).

Em uma das definições mais atuais, tem-se que validação é o processo de caracterização de desempenho esperado para o escopo de um método em termos de parâmetros como seletividade, veracidade e precisão (SANTE, 2015).

#### 3.4.2 Processo de validação

O cliente espera poder confiar nos resultados relatados e geralmente apenas os desafia quando surge uma discordância. Assim, o laboratório e seus analistas têm uma responsabilidade óbvia de justificar a confiança do cliente, fornecendo a resposta correta para a parte analítica do problema, ou seja, os resultados devem ser adequados ao propósito de uso (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014). A validação faz uso de um conjunto de processos que testam quaisquer pressupostos sobre os quais se baseia o método analítico e estabelecem e documentam suas características de desempenho, demonstrando se o método é adequado para um propósito analítico particular (THOMPSON *et al.*, 2002). Conceitualmente, validação de uma metodologia analítica está diretamente relacionada com os quatro principais tipos de processos analíticos que são os testes de identificação, os testes quantitativos para medição de impurezas, teste de limite para controle de contaminantes e análise de substâncias ativas em amostras (ICH, 2005).

Os principais protocolos internacionais reconhecidos descrevem a validação interlaboratorial, também conhecida como estudo colaborativo, como premissa para a comprovação de um método analítico. No entanto, há situações onde a validação da metodologia pode ocorrer em processos intralaboratoriais, como para estabelecimento da viabilidade do método antes do progresso de um estudo colaborativo, falta de praticidade para uma validação interlaboratorial ou para verificação da coesão e precisão dos resultados do método na rotina do laboratório. Sobretudo, destaca-se que um laboratório que utilize métodos já validados por estudos colaborativos, ou seja, validados interlaboratorialmente, apenas precisa demonstrar que a estrutura presente no laboratório é capaz de prover adequado desempenho da análise. Inclusive, é importante salientar que a verificação de método validado a nível interlaboratorial frequentemente custa menos recursos financeiros para as instituições participantes em comparação com uma validação intralaboratorial completa (THOMPSON *et al.*, 2002).

Resumidamente, pode-se dividir o processo de validação em cinco etapas: a qualificação do sistema, amostragem, preparação do analito, análise e leitura de resultado. A qualificação do sistema corresponde a montagem e estruturação do laboratório, preenchendo todos os requisitos necessários para a execução do método. A qualificação integra as dependências, reagentes, padrões, profissionais especializados e treinados e protocolos bem estabelecidos. A amostragem consiste na seleção da fração mais representativa possível do montante de amostras nas quais o analito se encontra. A análise nesse caso passa especificamente pela instrumentação necessária para a detecção e determinação qualitativa ou quantitativa do analito presente na matriz de interesse. Trata-se de como a preparação resulta em dados relevantes para os analistas. Em última etapa e diretamente ligado a análise termina-se o método com a avaliação dos dados. De acordo com as melhores ferramentas matemáticas e estatísticas, realiza-se a leitura dos dados procurando extrair as informações mais importantes (ARAUJO, 2009).

### 3.4.3 Parâmetros de desempenho

Geralmente, a validação do método é encarada como um processo fortemente ligado ao desenvolvimento do método, levando algumas vezes até a uma confusão entre os processos de desenvolvimento e de validação. Muitos dos parâmetros de desempenho do método que são observados durante seu desenvolvimento, estão associados com a validação do mesmo (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014).

Todos os parâmetros observados em uma metodologia, assim como sua funcionalidade e os resultados obtidos precisam ser documentados com os detalhes. No entanto, os dados que serão mais evidenciados e reportados dependem da exigência feita pelo cliente da análise. Os parâmetros de desempenho fornecem as informações necessárias para caracterizar a eficiência do método de acordo com o que foi proposto e pelo que foi encomendado pelo cliente (EMONS *et al.*, 2013).

Devido à importância da validação de métodos analíticos, várias organizações internacionais e conferências emitiram uma série de documentos orientativos voltados para a validação intralaboratorial (KRUIVE *et al.*, 2015a). Dentre os principais guias acerca de validação de métodos, destaca-se o guia SANTE, da União Europeia que trata especificamente para o processo de validação e controle de qualidade na análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. O documento não é de aplicação obrigatória, mas objetiva harmonizar as informações geradas naquele continente (SANTE, 2015). Importante dizer que tanto o referido guia quanto outros documentos de órgãos fiscalizadores e de pesquisa situados na Europa são considerados referências na área de segurança alimentar devido aos rigorosos regulamentos vigentes, os quais são aplicados desde os anos 70 (FERNANDES *et al.*, 2011).

### 3.4.3.1 *Guia IUPAC/ISO/AOAC*

Dentre os parâmetros enumerados no guia harmonizado pela IUPAC/ISO/AOAC, observa-se a importância destacada do cálculo de incerteza do método, devido as suas várias fontes de erro. Todo método está sujeito a erros vindos da corrida analítica, dos fatores intrínsecos ao laboratório, efeito de matriz e problemas relativos à precisão e veracidade.

Quanto aos parâmetros necessários, no documento da IUPAC/ISO/AOAC são tratados os seguintes:

- Seletividade – grau em que o método é capaz de mensurar efetivamente o analito de interesse frente a possíveis interferentes. Aconselha-se que seja realizada frente aos principais interferentes. Apesar de constituir uma verificação essencialmente qualitativa, seu cálculo pode ser feito por meio da razão entre a inclinação da curva de calibração do analito e a inclinação da curva de resposta produzida de forma independente sob a ação de um potencial interferente.
- Linearidade/Calibração – procedimento de medição das respostas do método ao analisar soluções de padrões de referência do analito de interesse e definição da função de calibração que explica a relação entre a resposta e a concentração do analito. Segundo o guia, na validação, é importante analisar se a função de calibração plausivelmente: i) é linear, ii) passar pela origem e ii) sofre interferência da matriz. A linearidade é realizada pela análise aleatória de, pelo menos, seis pontos de concentração igualmente espaçados, em replicata, dentro da faixa prevista de concentração do analito em amostras reais. A linearidade pode ser testada informalmente por meio do exame de um gráfico de resíduos produzido por regressão linear das respostas nas concentrações num conjunto de calibração apropriado. Os efeitos de matriz podem ser analisados pela comparação das inclinações da curva de calibração usual e da curva construída pela adição do analito em uma solução teste derivada da amostra típica.
- Veracidade – medida de aproximação entre resposta dada pelo método e o valor de referência aceito para a propriedade medida. Os valores de referência para os

experimentos de veracidade podem obtidos de materiais de referência certificados ou materiais de referência. Caso não seja possível, o analista poderá realizar a comparação dos resultados vindos da validação com os resultados obtidos por um método de referência. Também pode ser adotada a estratégia de adição controlada do analito (*spiking*) nas amostras, estudando a recuperação do método.

- Recuperação – estudo da capacidade do método extrair e mensurar o máximo de analito presente originalmente na amostra. Calcula-se pela diferença de resposta obtida na análise de uma amostra original e da resposta estimada para a amostra adicionada de analito a uma concentração conhecida.
- Precisão – parâmetro que descreve a concordância entre resultados independentes obtidos sob condições estipuladas. Descrita geralmente através do desvio-padrão absoluto ou relativo. A precisão deve ser observada sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade. Ambas precisões podem ser analisadas através de análises múltiplas e sucessivas de amostras em duplicata. A precisão varia frequentemente com a concentração do analito. Os pressupostos típicos são: (i) que não há alteração na precisão devido da concentração do analito, ou (ii) que o desvio padrão é proporcional à concentração do analito, ou é linearmente dependente. Em ambos os casos, o pressuposto deve ser verificado se o nível de analito for esperado variar substancialmente (ou seja, em mais de cerca de 30% do seu valor central).
- Amplitude de medição (faixa de medição) – refere-se a faixa de concentração de analito em que o método é considerado validado. Importante lembrar que essa amplitude, uma das principais fontes de incerteza, pode não ser idêntica a faixa de calibração estabelecida.
- Limite de Detecção – concentração mais baixa de analito cujo método é capaz de distinguir com confiança um sinal diferente de zero. Para sistemas analíticos em que a amplitude de validação não se aproxima do limite de detecção, tal parâmetro se torna dispensável.
- Limite de Quantificação – concentração mais baixa na qual o método é capaz de operar com precisão aceitável. No guia da IUPAC/ISO/AOAC, esse parâmetro

não é recomendado pois, dados abaixo desse limite podem ainda serem adequadas ao propósito do método.

- Sensibilidade – corresponde a um gradiente da função de calibração. Por ser arbitrário e dependente dos ajustes instrumentais, é considerado irrelevante para a validação.
- Robustez – parâmetro que avalia a coesão das respostas disponibilizadas por um método frente as pequenas modificações nas condições experimentais ideias propostas. Os parâmetros experimentais devem ser definidos no protocolo do método, assim como suas variações permitidas.
- Variação da Matriz – uma das principais fontes de incerteza do método. O sistema analítico a ser validado precisa, entre outras coisas, definir o escopo de análise a ser estipulado.
- Incerteza de Medição – modelo matemático que estima a influência dos erros relativos ao método sobre o resultado final.

A partir da publicação deste guia harmonizado, resultado dos trabalhos de THOMPSON *et al.* (2002), que os órgãos internacionais, por meio da publicação de seus guias específicos, reconheceram a importância dos dados gerados pela validação do método para a estimativa de incerteza de medição. Com o estabelecimento da estimativa de incerteza tendo como base dados confiáveis vindos da validação correta de uma metodologia, garante-se a qualidade dos resultados apontados por tal estratégia analítica (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014).

#### 3.4.3.2 SANTE

Para os métodos quantitativos, o guia SANTE prevê os seguintes parâmetros de desempenho necessários para a validação intralaboratorial:

- Sensibilidade/Linearidade – deve ser avaliada através de uma função de calibração apropriada e a curva de calibração não deve ser forçada através da origem sem justificativa. O ajuste da função de calibração deve ser plotado e inspecionado visualmente e/ou pelo cálculo dos resíduos, evitando a dependência excessiva dos coeficientes de correlação, para garantir que o ajuste seja satisfatório dentro da faixa de concentração dos agrotóxicos detectados. Se os resíduos individuais se desviarem em mais de  $\pm 20\%$  da curva de calibração na região relevante, deve ser utilizada uma função de calibração alternativa. Em geral, recomenda-se o uso de regressão linear ponderada ( $1/x$ ), em vez de regressão linear. Aconselha-se que a calibração seja feita em, pelo menos, três níveis. No entanto, entende-se que o ideal seja cinco níveis de concentração na faixa validada como descrito na tabela 5 do guia SANTE (2015).
- Efeitos de Matriz – consiste na influência que um ou mais componentes extraídos da amostra possam causar sobre a análise do analito em questão. Medida através dos resultados comparados entre soluções com padrão nas mesmas concentrações que amostras de curvas matrizadas.
- Veracidade – parâmetro que estuda a correspondência entre os valores encontrados nos testes e os valores reais das amostras. Realiza-se essa medida pela recuperação média das amostras adicionadas de padrão testadas, pelo menos, na concentração do limite de quantificação e outra concentração de duas a dez vezes maior que LOQ. Aconselha-se resultados de recuperação entre 70% a 120% para a metodologia a ser utilizada.
- Repetibilidade – parâmetro de precisão onde o método é repetido em curto espaço de tempo para que influência de material, equipamento e analista seja suprimida. Essa precisão é calculada pelo desvio padrão relativo vindo dos resultados de análise de amostras adicionadas de padrão. Recomenda-se um resultado menor que 20%.
- Precisão intermediária – diferente da repetibilidade, esse parâmetro é uma medida de precisão onde se espera analisar a influência dos analistas, diferentes materiais e equipamentos sobre o método. Tal precisão é calculada pelo desvio

padrão relativo das análises contínuas do laboratório. Assim como a repetibilidade, aconselha-se um resultado menor que 20%.

- Limite de quantificação – menor concentração na qual o método demonstra os critérios de veracidade e precisão aceitáveis. A menor concentração com os critérios aceitáveis deve ser de menor valor que o LMR, senão o método não atenderá ao propósito.
- Seletividade – parâmetro que mede a habilidade do método como um todo, contemplando extração, purificação, derivatização, separação e detecção, de gerar sinais de resposta que efetivamente identifiquem o analito. Essa medida se dá através das respostas obtidas em análises de soluções “brancas” e de amostras “brancas”. Recomenda-se que os sinais coletados devam ser menores que 30% do limite de resposta.
- Robustez – demonstrada pela recuperação média e pela reprodutibilidade.

Em relação aos métodos qualitativos para análise de agrotóxicos, o guia da SANTE (2015) preconiza que a confiabilidade do método deva ser avaliada por meio do limite de resposta encontrado no método quantitativo correspondente ou pela avaliação do limite de detecção da técnica. Nesse caso, a corrida da análise deve ter pelo menos a primeira e a última amostra com concentrações correspondentes ao limite de detecção para demonstrar que a técnica, durante toda a batelada em todos os pontos calibrados, é capaz de ser utilizada como técnica de confirmação/identificação (SANTE, 2015).

A estimativa de incerteza do método, segundo o guia, não é tratada como um parâmetro de validação e critério de aceitação do método, mas sim como uma estimativa estatística a partir dos dados obtidos na validação, como veracidade e reprodutibilidade. Assim, a incerteza de medição é o intervalo de confiança no qual o resultado reportado terá a maior probabilidade de ser encontrado (o nível de confiança, geralmente é calculado a 95%). Inclusive, a incerteza de medição possui um anexo próprio para exemplificar o cálculo necessário (SANTE, 2015).

### 3.5 Revisão Sistemática

Revisar a literatura nada mais é que um processo de levantamento de todo o conhecimento disponível acerca de um tema ou uma questão, visando um maior aprofundamento daquilo que já foi desenvolvido até então (BROOME, 2000).

Os estudos de revisão consistem na organização, esclarecimento e resumo das obras relevantes da área de interesse. Isso fornece um panorama do histórico científico existente sobre determinado tema. As revisões podem ser fomentadas para comparar pesquisas sobre temas semelhantes ou relacionados, apontar a evolução das teorias, dos aportes teóricos metodológicos e sua compreensão em diferentes contextos, indicar as tendências e procedimentos metodológicos utilizados (RAMOS VOSGERAU & ROMANOWSKI, 2014).

O processo de busca de uma revisão de literatura caracteriza-se como a busca, análise e descrição do conhecimento existente. Esse processo objetiva, ainda, enfatizar os estudos de maior qualidade, ou seja, aqueles que apresentam menor propensão a erros e vieses, o que é alcançado por meio de uma metodologia sólida que indica a força da evidência coletada na revisão. E o termo “literatura” representa toda a fonte de conhecimento que possui um registro escrito como levantamentos bibliográficos, revisões de literatura, revisões bibliográficas, estados de arte, estudos bibliográficos, revisões narrativas, revisões sistemáticas, revisões integrativas, meta-análises, metassumarizações e sínteses de evidências qualitativas (EFSA, 2010; RAMOS VOSGERAU & ROMANOWSKI, 2014).

Historicamente, o surgimento da técnica de revisão sistemática ocorreu em 1904, com Karl Pearson. Sua revisão acoplada à metanálise estudou o efeito preventivo das inoculações contra a febre entérica, ao observar pequenos estudos isolados que não conseguiam fornecer de forma adequada e confiável o resultado final sobre a relação. O reconhecimento da importância dessa metodologia de revisão surgiu em 1972, quando o professor Archie Cochrane publicou seu livro intitulado *Effectiveness and Efficiency: Random Reflections on Health Service*. A partir dos anos 90, em homenagem ao professor, surgiu a organização internacional

*Cochrane Collaboration*, responsável por avaliar e disseminar revisões sistemáticas na área de saúde (CORDEIRO *et al.*, 2007).

A revisão sistemática é considerada uma espécie de investigação científica que disponibiliza um quadro das evidências presentes na literatura sobre o tema estudado (CORDEIRO *et al.*, 2007; SAMPAIO, 2007). Essa modalidade de revisão consiste em uma metodologia de pesquisa delineada para responder a uma questão específica previamente formulada por meio de metodologias rígidas e explícitas de busca, seleção e análise de informações relevantes para a resposta desejada (KHAN *et al.*, 2003; CORDEIRO *et al.*, 2007; ERCOLE *et al.*, 2014). Devido às características criteriosas que a revisão sistemática exige, pode-se defini-la como sendo um estudo observacional retrospectivo, sendo considerada uma das mais importantes e fortes evidências científicas sobre determinado tema (CORDEIRO *et al.*, 2007). A revisão sistemática, ainda, é considerada um estudo secundário, já que seus resultados são construídos tendo como base resultados fomentados por estudos primários (SAMPALIO, 2007).

Em resumo, o protocolo de revisão sistemática deve abordar todos os passos necessários para a condução da revisão. Os passos são a formulação da questão a ser respondida, a definição do critério de inclusão e exclusão, o desenvolvimento e aplicação da estratégia de busca, seleção dos estudos encontrados, a análise dos dados, a avaliação da qualidade dos estudos e análise, a interpretação dos resultados e a publicação da revisão (**Quadro 4**) (UMAN, 2011).

A revisão sistemática sempre deve ser delineada de acordo com a pergunta que pretende responder. Por isso, a pergunta deve ser bem formulada antes da condução da revisão, sem gerar qualquer tipo de ambiguidade (KHAN *et al.*, 2003; CORDEIRO *et al.*, 2007). Isso permite que a revisão aborde todos os aspectos chaves sobre o tema e consiga encontrar com mais propriedade os estudos primários que trarão informações para responder à pergunta (EFSA, 2010). No entanto, mesmo que a revisão sistemática não responda à pergunta, ela também pode com isso identificar problemas que necessitem de mais evidências para que uma conclusão adequada seja alcançada (SAMPALIO, 2007).

A revisão é conduzida por, pelo menos, dois pesquisadores, que trabalham de maneira independente durante a condução do protocolo de pesquisa previamente construído (ERCOLE *et al.*, 2014). Nesse protocolo, devem estar especificados as estratégias de busca dos estudos relevantes, critérios de inclusão e exclusão dos estudos, definição dos dados de interesse, determinação da qualidade dos estudos e análise da estatística utilizada (SAMPAIO, 2007). O seguimento do protocolo pelos analistas permite a redução do viés na seleção dos estudos de pesquisa pela amplitude, reprodutibilidade da estratégia de busca e a transparência no relato de como os estudos são selecionados e incluídos na revisão. A metodologia do processo de revisão é documentada e publicada para que outros revisores possam avaliar criticamente a seleção do estudo, a coleta, análise e interpretação dos resultados para, se necessário, repetir ou atualizar a revisão sistemática (EFSA, 2010).

Quando possível, os resultados obtidos numa revisão sistemática podem ser sintetizados por meio de uma metanálise. Esse processo consiste na compilação e mensuração quantitativa dos resultados originários de múltiplos estudos independentes por meio de ferramentas estatísticas adequadas, que fornecem uma visão geral do parâmetro estudado. A metanálise permite uma avaliação mais sensível dos estudos, distribuindo os pesos adequados para cada estudo incluído na revisão. Porém, é preciso ter cuidado quando aplicar a metanálise para que essa ferramenta não gere confusão na síntese dos dados e nem distribua vieses e erros presentes na revisão (EFSA, 2010).

Por ser estruturada em meio a um rígido controle metodológico de busca e seleção, a revisão sistemática consta como um trabalho original (ROTHER, 2007). Também por conta do protocolo bem delineado, a revisão sistemática tem aguçada sua capacidade de síntese de informações de múltiplos estudos em um único trabalho, o que provê maior robustez a esse tipo de revisão. Mesmo assim, com todos os benefícios de uma revisão sistemática, a utilização dessa ferramenta nas áreas de agricultura e segurança alimentar são raras, fato constatado pela ausência de protocolos de pesquisa específicos para essas áreas (SARGEANT *et al.*, 2005).

**Tabela 3.** Roteiro de condução de uma revisão sistemática

<b>TÓPICO</b>	<b>DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS</b>
<b>Questão ou Hipótese</b>	Específica, devendo ser publicada.
<b>Critérios de inclusão e exclusão de estudos</b>	Estabelecidos previamente e documentados no protocolo de revisão. A aplicação deve ser objetiva.
<b>Metodologia de Revisão</b>	Deve ser informada e documentada no protocolo de revisão.
<b>Busca de Literatura</b>	Metodologia para recuperar estudos presentes na literatura relevantes à revisão. Deve ser capaz de captar o máximo de estudos possível.
<b>Avaliação da qualidade dos estudos incluídos</b>	Todos os estudos incluídos devem ser avaliados por meio de ferramenta apropriada para atestar sua qualidade.
<b>Publicação dos resultados</b>	Os resultados devem ser completos e referenciar todos os estudos selecionados de acordo com os critérios definidos
<b>Síntese</b>	Quando possível, sintetizar os resultados em uma metanálise

Fonte: Adaptado de EFSA (2010).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Bases de dados de produções científicas publicadas**

- *Cochrane Library*.
- *Food Science and Technology Abstracts (FSTA)*, via EBSCO host.
- *Latin American and Caribbean Health Sciences (LILACS)*.
- *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE/PubMED)*.
- *Scientific Electronic Library Online (SciELO)*.
- *System for Agricultural Science and Technology (AGRIS)*.
- *Web of Science*.

### **4.2 Bases de dados de trabalhos não publicadas (literatura cinzenta)**

- *Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações (BDTD)*.
- *OpenGrey*.

### **4.3 Softwares**

- *Endnote X 7.7.1* para estruturação e organização dos estudos selecionados;
- *Endnote Online*;
- *Microsoft Excel 2016* para a tabulação dos dados coletados.

#### 4.4 Metodologia de pesquisa

A revisão sistemática foi realizada recuperando estudos sobre validação de métodos analíticos de resíduos de agrotóxicos em alimentos em bases de dados eletrônicas e em bases de literatura cinzenta. Para cada uma dessas plataformas foi desenvolvida uma estratégia de busca adaptada para as ferramentas disponibilizadas. Os termos de busca variaram de acordo com os descritores disponíveis, flutuando entre os temas centrais que foram agrotóxicos, validação e alimento (**Tabela 4**).

As estratégias de busca foram refinadas em torno do intervalo de tempo fixado, com início em 2002, ano de publicação do guia harmonizado pela IUPAC/ISO/AOAC, o qual serviu de referência para as comparações dos processos de validação. O término correspondeu ao ano de 2017, ano de condução da revisão.

**Tabela 4.** Estratégias de busca para cada uma das bases de dados abordadas

Base de Dados	Estratégia de Busca
AGRIS	Search (pesticides OR pesticide OR pesticides residues OR pesticide residue OR insecticides OR insecticide OR herbicides OR herbicide OR fungicides OR fungicide) AND (validation) AND (food OR foods OR food safety OR food contamination) +publicationDate:[2002 TO 2017]
BDTD	Busca: (Todos os campos:(Pesticide* OR pesticide* OR Pesticida* OR pesticida* OR agrotóxico* OR Agrotóxico* OR Praguicida* OR Inseticida* OR Herbicida*) E Todos os campos:(validation OR validation studies OR Validation OR Validation Studies OR Validação OR validação OR Estudos de Validação OR estudos de validação))
	<b>Filtro: Ano de Publicação – 2002 a 2017</b>
Cochrane Library	<p>ID Search Hits</p> <p>#1 MeSH descriptor: [Pesticides] explode all trees 428</p> <p>#2 Pesticides (Word variations have been searched) 209</p> <p>#3 Pesticide Residue (Word variations have been searched) 21</p> <p>#4 Biological Pesticides (Word variations have been searched) 32</p> <p>#5 #1 or #2 or #3 or #4 557</p> <p>#6 MeSH descriptor: [Validation Studies] explode all trees 1</p> <p>#7 Validation Studies (Word variations have been searched) 8704</p> <p>#8 MeSH descriptor: [Validation Studies as Topic] explode all trees 38</p> <p>#9 Validation Studies as Topic (Word variations have been searched) 1154</p> <p>#10 validation (Word variations have been searched) 9344</p> <p>#11 #6 or #7 or #8 or #9 or #10 9344</p> <p>#12 MeSH descriptor: [Food] explode all trees 26581</p> <p>#13 "food" (Word variations have been searched) 29611</p> <p>#14 Food Analysis (Word variations have been searched) 12594</p> <p>#15 Food Analyses (Word variations have been searched) 13770</p> <p>#16 Food Contamination (Word variations have been searched) 415</p> <p>#17 #12 or #13 or #14 or #15 or #16 46336</p> <p>#18 #5 and #11 and #17 0</p>

FSTA via EBSCO host	<p>Search TX (((pesticide* OR pesticide* residue* OR fumigant* OR rodenticide* OR insecticide* OR herbicide* OR fungicide*)) AND TX ((validation OR validation studies)) AND TX ((food* OR food safety OR food contamination))</p> <p>Aplicar palavras relacionadas</p> <p>Aplicar assuntos equivalentes</p> <p>Limitadores: Data de publicação: 2002-2017</p>
LILACS	<p>Search (tw:(((pesticide* OR plaguicida* OR praguicida* OR acaricida* OR acaricide* OR herbicida* OR herbicide* OR insecticide* OR insecticida* OR inseticida* OR fungicide* OR fungicida* OR molluscacide* OR moluscocida* OR pesticide* residue* OR resíduo* de plaguicida* OR resíduo* de praguicida* OR rodenticide* OR rodenticida*)))) AND (tw:(validação OR validation OR validación)) AND (tw:((food* OR alimento* ))) AND (instance:"regional") AND ( db:("LILACS") AND year_cluster:("2015" OR "2014" OR "2012" OR "2013" OR "2011" OR "2010" OR "2009" OR "2016" OR "2008" OR "2007"))</p>
Medline/Pubmed	<p>Search (("Pesticides"[Mesh] OR Pesticides[Text Word]) AND ("Validation Studies as Topic"[Mesh] OR Validation Studies as Topic[Text Word]) OR Validation[Text Word]) AND (("Food"[Mesh] OR Food[Text Word]) OR Foods[Text Word]) OR nutrients[Text Word]) AND ("2002/01/01"[PDAT] : "2017/12/31"[PDAT])</p>
OpenGrey	<p>Search ((pesticide* OR pesticide* residue* OR fumigant* OR rodenticide* OR insecticide* OR herbicide* OR fungicide*) AND (validation OR validation studies) AND (food* OR food safety OR food contamination))</p>
Scielo	<p>Search ((pesticide* OR plaguicida* OR praguicida* OR acaricida* OR acaricide* OR herbicida* OR herbicide* OR insecticide* OR insecticida* OR inseticida* OR fungicide* OR fungicida* OR molluscacide* OR moluscocida* OR pesticide* residue* OR resíduo* de plaguicida* OR resíduo* de praguicida* OR rodenticide* OR rodenticida*)) AND (validação OR validation OR validación) AND (food* OR alimento* ) AND year_cluster:("2014" OR "2010" OR "2013" OR "2008" OR "2012" OR "2011" OR "2005" OR "2015" OR "2006" OR "2009" OR "2007" OR "2003" OR "2016" OR "2004" OR "2002")</p>
Web of Science	<p>Search TS=(pesticide* OR pesticide* residue* OR fumigant* OR rodenticide* OR insecticide* OR herbicide* OR fungicide*) AND TS=(validation OR validation studies) AND TS=(food* OR food safety OR food contamination)</p> <p>Refinado por: Anos da publicação: (2012 OR 2008 OR 2005 OR 2016 OR 2007 OR 2015 OR 2006 OR 2013 OR 2014 OR 2003 OR 2011 OR 2002 OR 2010 OR 2004 OR 2009 OR 2017)</p> <p>Tempo estipulado: Todos os anos. Índices: SCI-EXPANDED, SSCI, A&amp;HCI, CPCI-S, CPCI-SSH, ESCI.</p>

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os estudos selecionados foram agrupados no software *Endnote*, versão para desktop, e as duplicatas foram retiradas. No caso de duplicidade de trabalho na forma de artigo e de dissertação/tese, foi priorizada para inclusão na presente

revisão a dissertação/tese pelo fato de ser considerado um documento mais detalhado.

Antes do progresso da revisão, um piloto foi realizado com o intuito de avaliar as estratégias de busca, os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos e a concordância entre os revisores, validando a estratégia (EFSA, 2010). Com isso, uma amostra foi selecionada de forma aleatória a partir do conjunto de estudos obtidos nas buscas, utilizando-se uma estatística de dimensionamento amostral para estimativa de proporções para a obtenção de um tamanho amostral significativo, demonstrada na **Equação 4** (JUNQUEIRA, 2016):

$$n = \frac{z_0^2 pq}{e^2} \quad \text{Equação 4}$$

Sendo:

$n$  = tamanho amostral;

$z_0^2$  = coeficiente de confiabilidade para o nível  $\alpha$  escolhido;

$p$  = estimativa preliminar da proporção populacional;

$q = 1 - p$ ;

$e$  = margem absoluta de erro.

O cálculo amostral para a execução do piloto foi realizado a partir da pressuposição de que o valor  $p$  fosse referente à proporção de estudos a serem selecionados e  $q$  a proporção de estudos que seriam excluídos. Por se tratar de uma proporção desconhecida, foram definidos os valores de  $p$  e  $q$  como sendo 0,5 a um erro absoluto de 5%.

O valor Kappa de Cohen foi empregado para verificação da concordância entre os revisores, sendo estimado por meio da **Equação 5**, considerando a matriz apresentada na **Tabela 5** (SUN, 2011).

$$K = \frac{P_O - P_E}{1 - P_E} \quad \text{Equação 5}$$

Sendo:

$P_O$  = proporção de pontos em que os revisores concordam =  $\frac{a + e + i}{K}$

$P_E$  = proporção de concordância que seria esperado pelo acaso =

$$\frac{l_1 \times l_2 \times E_1 \times E_2 \times U_1 \times U_2}{K^2}$$

**Tabela 5.** Análise de concordância entre os revisores participantes

		Revisor 2			
		Incluído	Excluído	Dúvida	Total
Revisor 1	Incluído	a	b	c	$l_1$
	Excluído	d	e	f	$E_1$
	Dúvida	g	h	i	$U_1$
	Total	$l_2$	$E_2$	$U_2$	K

Fonte: Elaborado pelo autor.

A primeira etapa de seleção consistiu em leitura simultânea de título e resumo de todos os estudos catalogados nas buscas realizadas. As seleções obtidas por cada um dos revisores foram confrontadas, sendo as dúvidas e discordâncias resolvidas por consenso entre os revisores. A segunda etapa consistiu na leitura completa dos estudos selecionados na etapa prévia, a fim de confirmar a elegibilidade desses estudos para a construção da revisão. Assim como na primeira etapa, essa também foi realizada pelos mesmos revisores independentes, que resolveram dúvidas e discordâncias por consenso.

A organização dos dados coletados consistiu na divisão dos trabalhos: i) por ano, em uma avaliação cronológica ao longo do período pré-estabelecido; e ii) por método analítico, correspondendo às técnicas de detecção/quantificação utilizadas

para analisar os compostos de interesse. Em cada um desses dois grupos foram subdivididos os dados relativos aos métodos quantitativos e qualitativos, utilizando como base os principais guias nacionais e internacionais de validação de métodos analíticos.

Os parâmetros considerados relevantes para a validação tanto de métodos quantitativos quanto dos qualitativos, assim como os critérios de aceitação de estudo de cada um deles, foram baseados nos guias referências THOMPSON *et al.* (2002) e SANTE (2015). Toda e qualquer discrepância ou dúvida relativa a parâmetros e critérios que ocorreu entre os guias referências foram sanadas pela consulta de outros guias de validação nacionais e internacionais.

Todos os dados coletados para o desfecho primário foram dicotômicos, ou seja, vindos da presença ou não dos parâmetros de validação durante o estudo de cada metodologia de análise de resíduos de agrotóxicos encontrada na revisão. Assim, foram sumarizados em frequência absoluta e expressos em porcentagem.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Processo de revisão e caracterização dos trabalhos analisados

Para dar início a preparação do protocolo de revisão, foi preciso a *priori* definir a questão a ser respondida pelo estudo. Esta questão se conecta com o objetivo central proposto para a revisão, que é o estudo de métodos laboratoriais presentes na literatura atual para análise de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares.

Com isso, a questão que a ser respondida ao final da revisão foi “Os métodos de análises validados relativos ao estudo de resíduos de agrotóxicos em alimentos seguem as recomendações dos guias de validação intralaboratorial de métodos analíticos?”

Uma vez definida a questão, o protocolo foi construído tendo como pilares a obtenção da resposta e o respeito aos recursos disponíveis para desenvolvimento da revisão. Nele foram estabelecidos todos os critérios necessários para que os analistas captassem o máximo de estudos relevantes ao tema. O protocolo desenvolvido encontra-se apresentado no **Apêndice I**.

As buscas realizadas nas bases selecionadas resultaram em 2.568 trabalhos dos quais 759 foram duplicatas, gerando um resultado final de 1.809 estudos, com destaque para as bases *Web of Science*, FSTA e AGRIS que apresentaram maior número de trabalhos, enquanto a base *Cochrane Library* não permitiu a recuperação de nenhum trabalho. Os números de estudos selecionados por base de dados encontram-se relacionados na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Número de trabalhos selecionados por base de dados antes e após a remoção das duplicidades

Bases de dados	Número de trabalhos	
	Com duplicata	Sem duplicata
<b>AGRIS</b>	452	296
<b>BDTD</b>	174	159
<i>Cochrane Library</i>	0	0
<b>FSTA</b>	465	354
<b>LILACS</b>	216	168
<i>OpenGrey</i>	11	11
<b>MEDLINE/PubMED</b>	411	219
<b>SciELO</b>	296	208
<i>Web of Science</i>	543	394
<b>TOTAL</b>	<b>2.568</b>	<b>1.809</b>

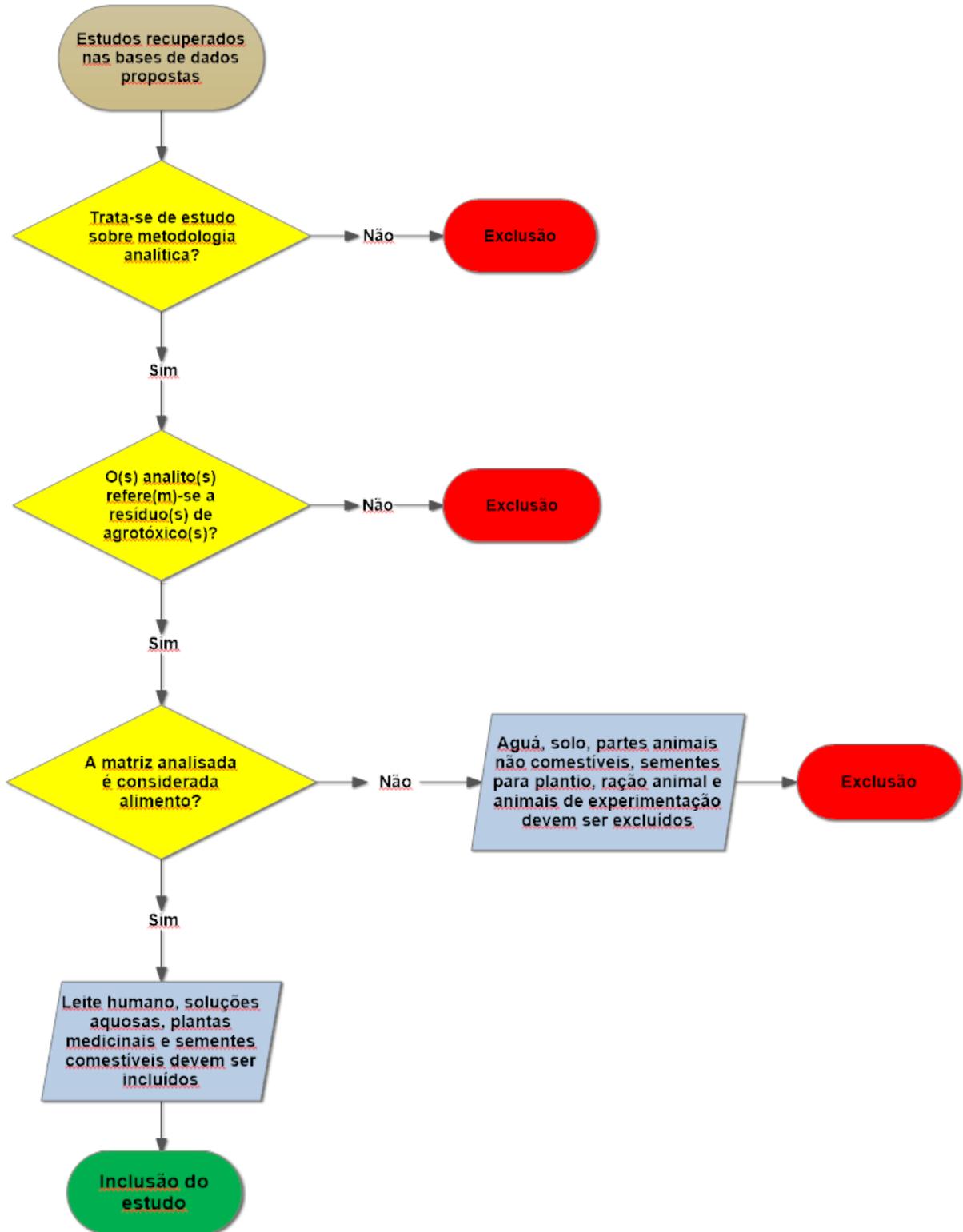
Fonte: Elaborado pelo autor.

Um ponto importante a ser ressaltado foi a grande contribuição da literatura cinzenta para o montante de estudos recuperados. Através do número total de trabalhos sem duplicatas identificados pelas estratégias de busca nas bases da *OpenGrey* e, principalmente, da BDTD observou-se que há na literatura muitos métodos de análises de resíduos de agrotóxicos de alimentos não publicados nos principais periódicos nacionais e internacionais, os quais podem contribuir com a construção de bases mais sólidas para a área de ciência de alimentos. Com isso, constatou-se que a literatura cinzenta não pode ser subjugada, devendo ser considerada no que diz respeito ao campo das análises de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares.

O cálculo amostral para execução do piloto partiu do volume total de trabalhos recuperados pelas estratégias de busca, após retirada das duplicatas. Trabalhando sobre um erro absoluto de 5%, o resultado obtido foi de 385 estudos necessários para a condução do piloto. Esses trabalhos foram coletados do todo, de forma aleatória, e analisados segundo os critérios pré-estabelecidos.

Como resultado do piloto obteve-se um fluxograma reprodutível com os critérios de inclusão e exclusão de estudos para a revisão (**Figura 7**) e a validação da metodologia, visto que foi alcançada uma concordância de 89,2% entre os revisores, que é classificada como excelente segundo os critérios do *Handbook da Cochrane* para revisão sistemática (ORWIN, 1994; HIGGINS & GREEN, 2011).

**Figura 7.** Fluxograma da seleção dos estudos para a revisão sistemática.



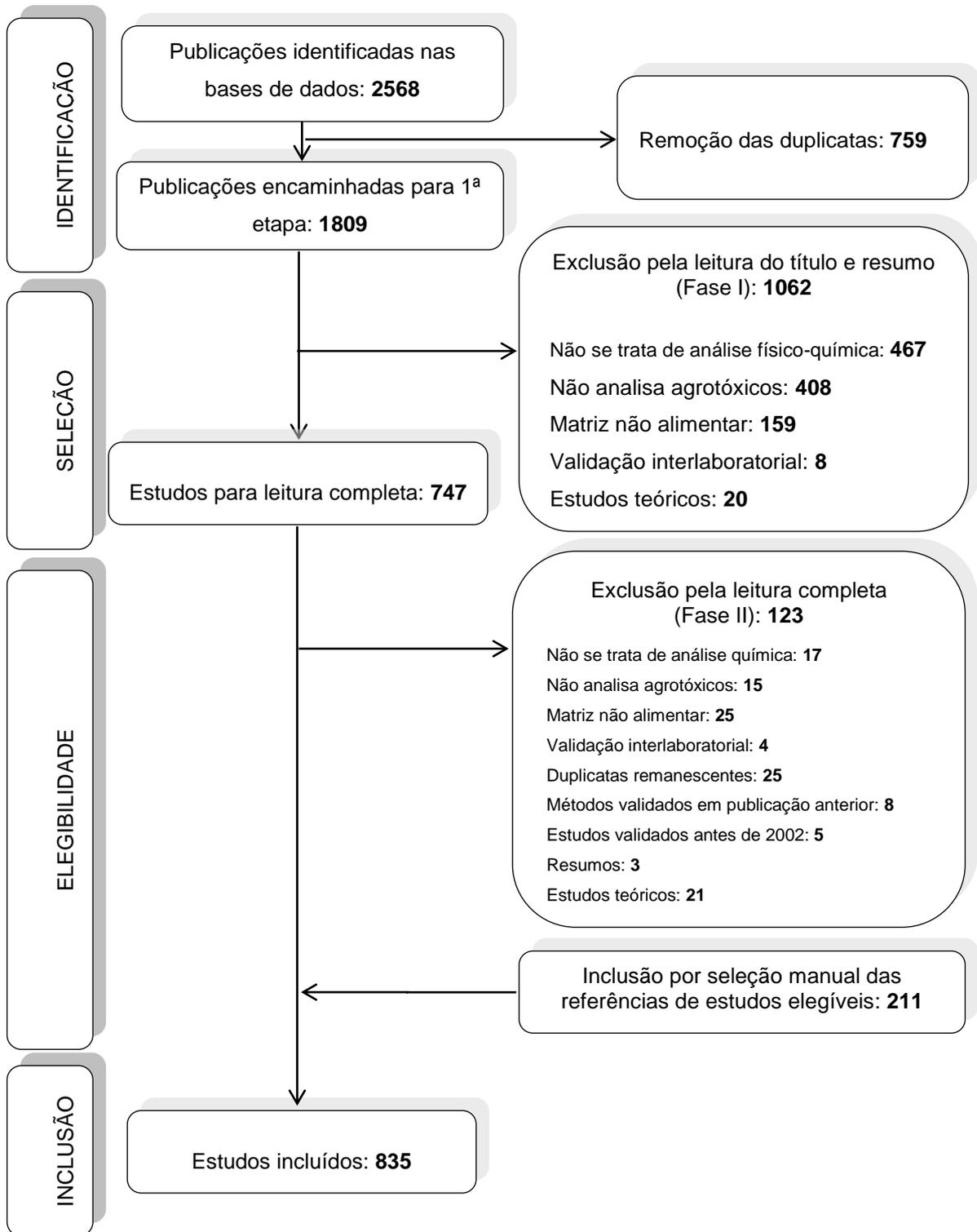
Fonte: Elaborado pelo autor.

A primeira etapa de seleção foi finalizada com a exclusão de 1.062 estudos que não se enquadraram aos critérios de seleção estabelecidos para a revisão. Isso resultou em 747 trabalhos encaminhados para a segunda etapa de seleção, que consistiu com a leitura completa dos estudos mantidos na etapa anterior.

A segunda etapa de seleção foi realizada em conjunto com a extração dos dados dos trabalhos que preencheram os critérios. Dos 747 estudos que permaneceram na revisão até este momento, 123 foram retirados por diferentes motivos, com destaque para as duplicatas remanescentes (**Figura 8**).

Sobre as duplicatas remanescentes, dois aspectos são relevantes discutir. O primeiro foi relacionado à ferramenta de remoção de duplicatas pelo programa *EndNote*, tanto a versão *online* quanto a versão 7.7.1 para *desktop*, que apresentou problemas devidos a acentos gramaticais e formas de citação de um mesmo autor com nomes abreviados ou não. Já o segundo aspecto foi devido à obtenção de dissertações e teses e dos estudos publicados a partir dessas. Nesses casos, a versão que trouxe menos informação foi excluída como duplicata.

**Figura 8.** Fluxograma de inclusão e exclusão de estudos por etapa de seleção.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o término da segunda etapa, 624 estudos foram selecionados para a continuidade da revisão. A partir desses é que se deu início a etapa final de recuperação de trabalhos, ou seja, a seleção manual. Por meio das referências bibliográficas dos estudos selecionados foram recuperados mais 211 estudos que se enquadraram nos critérios de seleção. Assim, o total de estudos selecionados para a revisão sistemática foi 835.

Tendo em vista que nenhum registro sobre uma revisão sistemática que aborde este tipo de tema tenha sido encontrado, não foi possível estabelecer uma estratégia com base em um padrão conhecido. Por isso, a estratégia de busca foi construída em uma tendência mais sensível, ou seja, uma estratégia capaz de recuperar o máximo de trabalhos relevantes possíveis, mesmo que para isso fosse obtido mais conteúdo impróprio para a revisão.

O perfil geral dos estudos recuperados e selecionados para a revisão sistemática foi traçado de acordo com os números de resíduos de agrotóxicos e matrizes alimentares validadas, as técnicas de extração/purificação e de detecção/determinação aplicadas, os tipos de métodos (quantitativos ou qualitativos) e o país de origem do estudo de acordo com o local de vínculo do autor principal.

Em relação aos agrotóxicos estudados, nos 835 artigos revisados as frequências observadas foram de 14,37% para um resíduo de agrotóxico, 48,93% para dois a 20 resíduos, 13,30% para 21 a 50 analitos, 9,38% para 51 a 100 analitos, 9,62% para 101 a 200 analitos e 4,39% para mais de 200 analitos.

Percebeu-se, assim, que os MRU foram menos estudados que os MMR. No entanto, ainda que seja interessante para a rotina analítica o desenvolvimento de um método capaz de monitorar com bons parâmetros de desempenho a maior quantidade de resíduos de agrotóxicos para uma determinada matriz alimentar, a parcela de estudos que monitorou mais de 20 agrotóxicos representou 36,90% do total de estudos revisados. E quando se analisou, especificamente, os estudos que propuseram análise de mais de 100 resíduos de agrotóxicos, observou-se uma frequência de apenas 14,01%. Em meio aos dados analisados pela revisão as justificativas para tais resultados permanecem no campo da especulação, podendo ser indícios das limitações das técnicas de extração/purificação e

detecção/determinação ou dificuldade na obtenção de padrões adequados à validação.

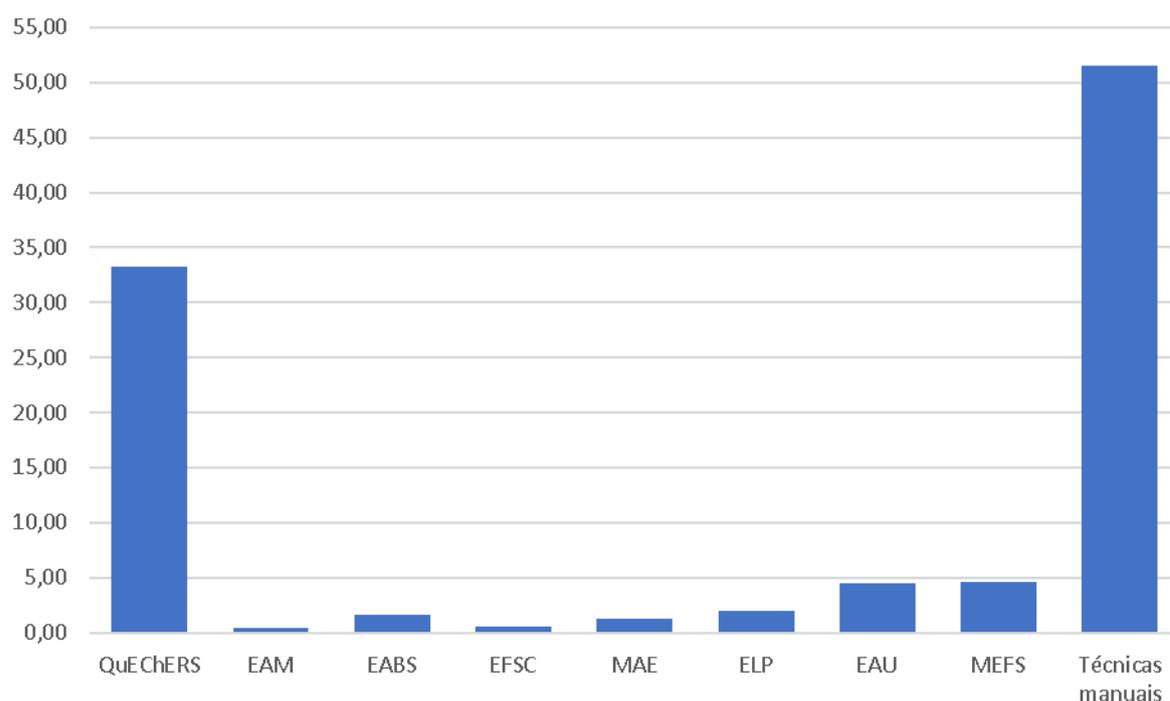
Para as matrizes alimentares monitoradas, 47,27% dos artigos inspecionaram apenas um alimento, 41,57% validaram análises para duas a cinco matrizes alimentares, 9,03% entre seis e 10 alimentos, 1,43% entre 11 e 20 produtos, enquanto em 0,71% envolveram mais de 20 diferentes matrizes alimentares.

Em relação as matrizes alimentares analisadas, notou-se que os estudos se concentraram na validação de poucas matrizes. Um aspecto a ser considerado é o número significativo de dados gerados em um processo de validação, o que poderia restringir a publicação de resultados para muitas matrizes alimentares, em função de limitações relacionadas aos números de páginas/palavras definidos pelos periódicos. Outro aspecto relevante é o estabelecimento de grupos de matrizes alimentares semelhantes e seus representantes alimentares típicos, como é encontrado no guia da SANTE (2015). As matrizes alimentares representativas são escolhidas com base na sua importância comercial e na semelhança de suas características de morfologia, bem como perfil de resíduos, com outras espécies relacionadas no grupo ou subgrupo. As matrizes idealmente representativas são aquelas consideradas mais importantes economicamente na produção ou consumo em um grupo ou subgrupo e têm uma carga alimentar maior e possuem características de resíduos semelhantes aos outros membros do grupo ou subgrupo. Com base no estabelecimento de matrizes representativas, existe o argumento de que os laboratórios não necessitam validar o método analítico proposto para várias matrizes de um mesmo grupo desde que adotem um alimento representativo (CODEX, 2017). Esse aspecto pode ser a justificativa mais plausível para a quantidade restrita de matrizes validadas nos métodos estudados na presente revisão.

As técnicas de extração/purificação utilizadas para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos também foram contabilizadas. Dos artigos revisados, 32,22% utilizaram a técnica de QuEChERS, desenvolvida por Anastasiades *et al.* (2003). A microextração em fase sólida foi utilizada em 4,49% dos trabalhos, enquanto a extração por ultrassom foi escolhida em 4,37% dos casos. As frequências das outras técnicas foram de 1,96% para extração por líquido pressurizado, 1,61% para barras absorvíveis, 1,27% para extração por micro-ondas,

0,58% para extração por fluido supercrítico e 0,46% para extração por membrana. Nos demais trabalhos, correspondentes a 53,04% do montante avaliado, técnicas manuais foram empregadas. Desta forma, as técnicas de extração/purificação mais prevalentes foram as técnicas manuais, executadas envolvendo de equipamentos, como extrações líquido-líquido ou sólido-líquido, seguidas pela técnica QuEChERS, correspondendo juntas a mais de 80,00% dos estudos analisados (**Figura 9**). Tais estratégias são de fácil execução e baixo custo, podendo ser rapidamente inseridas na rotina laboratorial, o que justifica sua alta prevalência em detrimento de outras mais sofisticadas e que necessitam de equipamentos especializados.

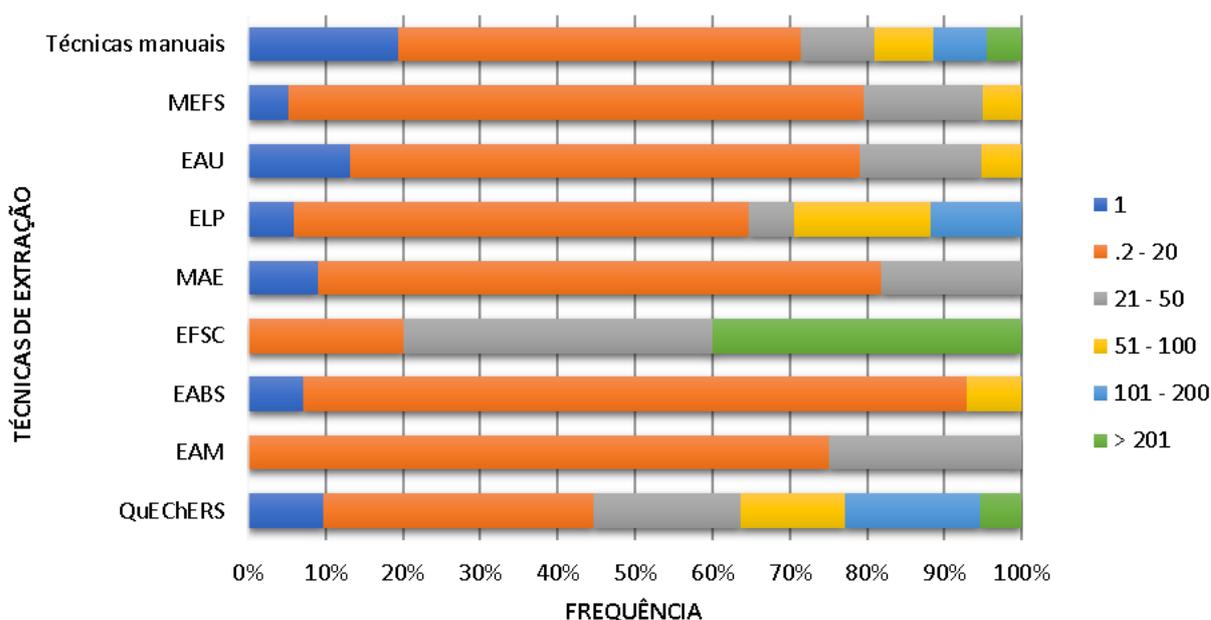
**Figura 9.** Frequência das técnicas de extração aplicadas para resíduos de agrotóxicos em alimentos.



**Fonte:** Elaborado pelo autor; MEFS: microextração em fase sólida; EAU: extração assistida por ultrassom; ELP: extração por líquido pressurizado; MAE: extração assistida por micro-ondas; EFSC: extração por fluido supercrítico; EABS: extração assistida por barra sortiva; EAM: extração assistida por membrana.

O número de analitos e de matrizes validados foi analisado, então, em função das diferentes técnicas de extração/purificação. Observou-se predomínio da análise de dois a 20 analitos, independentemente da técnica de extração/purificação, com exceção da EFSC. A análise de um único analito foi mais frequente nas técnicas manuais, embora tenha sido associada às diferentes técnicas identificadas, com exceção da EFSC. Por outro lado, a análise de mais de 100 analitos foi relacionada às técnicas EFSC, Quechers, ELP e técnicas manuais, sendo as duas últimas em menores proporções (**Figura 10**).

**Figura 10.** Número de resíduos de agrotóxicos validados de acordo com as técnicas de extração utilizadas.

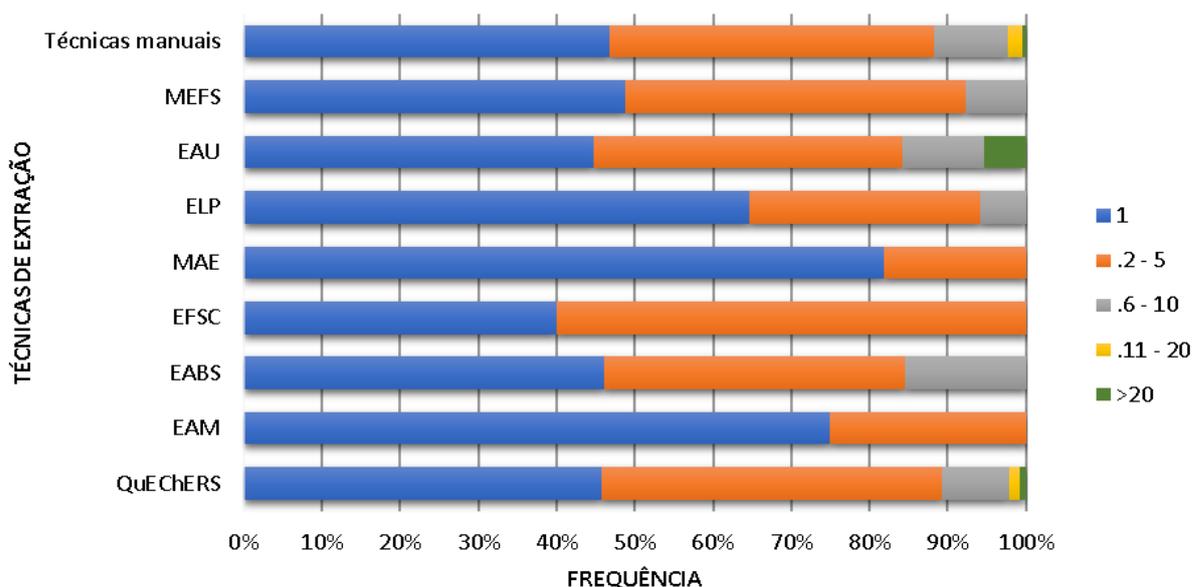


**Fonte:** Elaborado pelo autor; MEFS: microextração em fase sólida; EAU: extração assistida por ultrassom; ELP: extração por líquido pressurizado; MAE: extração assistida por micro-ondas; EFSC: extração por fluido supercrítico; EABS: extração assistida por barra sortiva; EAM: extração assistida por membrana.

Com relação aos produtos, a prevalência de estudos de uma e de duas a cinco matrizes foi evidenciada com independente da técnica de extração/purificação. Validações de escopos de seis a 10 matrizes foram evidenciados para a maioria das

técnicas, com exceção de MAE, EFCS e EAM. Mais que onze matrizes foram pesquisadas somente nas técnicas manuais, EAU e Quechers (**Figura 11**).

**Figura 11.** Frequência do número de matrizes alimentares validadas por técnica de extração.



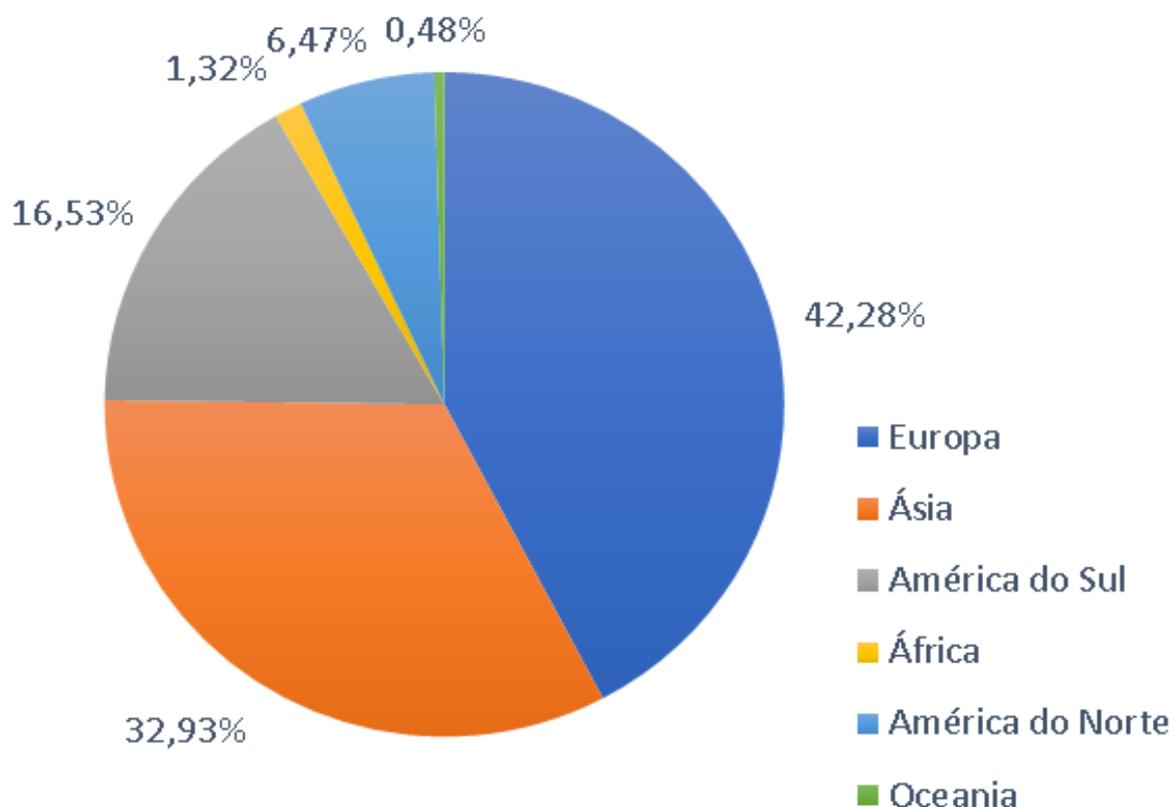
**Fonte:** Elaborado pelo autor; MEFS: microextração em fase sólida; EAU: extração assistida por ultrassom; ELP: extração por líquido pressurizado; MAE: extração assistida por micro-ondas; EFSC: extração por fluido supercrítico; EABS: extração assistida por barra sortiva; EAM: extração assistida por membrana.

Alguns dos artigos recuperados apresentaram comparação entre técnicas de detecção/determinação, validando e divulgando mais de um processo de validação no mesmo artigo. Nesse caso, o número de processos de validação analisados foi maior que o número de artigos recuperados. Ao todo, foram 868 métodos em 835 artigos, que se dividiram entre 404 (46,54%) métodos de CL, 400 (46,08%) de CG, 23 (2,65%) de imunoenaios e 41 (4,72%) de outras técnicas menos usuais, as quais foram agrupadas. Enquanto isso, foram contabilizados apenas 24 métodos qualitativos descritos nos 835 estudos recuperados.

Por fim, foram catalogados os países de origem das publicações por meio das instituições de vínculo dos primeiros autores de cada estudo. Os estudos foram

divididos por continente (**Figura 12**) e, adicionalmente, foram catalogados os países mais prevalentes na revisão. O resultado encontrado para os 835 estudos foi de 18,80% da Espanha, 15,93% originários da China e 15,09% do Brasil. Vale ressaltar que a alta porcentagem de trabalhos vindos do Brasil foi devida a recuperação de teses e dissertações (47% do total de estudos nacionais) em associação aos estudos recuperados nas principais bases de dados.

**Figura 12.** Origem dos estudos por local de vínculo dos primeiros autores.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Durante a extração de dados foi possível perceber que nem todos os autores utilizaram o termo “*validation*” ou “*validação*” ao longo do texto (**Tabelas 7 e 8**). Houve outros termos utilizados como “*method performance*”, “*analytical parameters*” e “*validated*”. Esse achado foi consistente com o observado por RUIZ-ANGEL *et al.*

(2014), sendo necessário levar em conta os demais termos encontrados em futuras buscas, apesar de figurar uma condição mais trabalhosa.

**Tabela 7.** Frequência de uso do termo “*validation*” em qualquer língua nos elementos iniciais do texto para métodos quantitativos, considerando diferentes técnicas de determinação

	LC		GC		Imunoensaios		Outras técnicas	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Palavra validação no título	92	22,77	90	22,50	2	8,70	9	21,95
Palavra validação nas palavras-chave	52	12,87	52	13,00	2	8,70	3	7,32
Palavra validação no resumo	267	66,09	241	60,25	9	39,13	18	43,90
<b>TOTAL</b>	<b>404</b>	<b>-</b>	<b>400</b>	<b>-</b>	<b>23</b>	<b>-</b>	<b>41</b>	<b>-</b>

**Fonte:** Elaborado pelo autor. CL: cromatografia líquida; CG: cromatografia gasosa; N: número de estudos.

**Tabela 8.** Frequência de uso do termo “*validation*” em qualquer língua nos elementos iniciais do texto para métodos qualitativos, considerando diferentes técnicas de detecção

	CL		CG		Outras Técnicas	
	N	%	N	%	N	%
Palavra validação no título	5	50,00	4	36,36	0	0,00
Palavra validação nas palavras-chave	3	30,00	3	27,27	0	0,00
Palavra validação no resumo	7	70,00	9	81,82	1	50,00
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>	<b>-</b>	<b>11</b>	<b>-</b>	<b>2</b>	<b>-</b>

**Fonte:** Elaborado pelo autor. CL: cromatografia líquida; CG: cromatografia gasosa; N: número de estudos.

Para análise dos dados extraídos foram escolhidos dois subgrupos: i) o metodológico (agrupamento por método analítico praticado na determinação); e ii) o cronológico (agrupamento dos estudos por ano de publicação), ambos para os estudos que validaram métodos de análise quantitativa. Devido ao número restrito de trabalhos sobre análise qualitativa de resíduos de agrotóxicos em alimentos, não

foi viável o processamento de dados agrupados por ano. Sendo assim, o subgrupo de processamento dos dados de estudos qualitativos foi o metodológico, ou seja, o agrupamento por técnica de detecção.

## 5.2 Comparação entre Guias de Validação

Dependendo do campo de estudo, diferentes diretrizes podem ocorrer em função de como e quais parâmetros são descritos. Em geral, a maioria dos guias e documentos orientativos é direcionada para medidas quantitativas (KRUIVE *et al.*, 2015a). Várias nações, por meio de seus órgãos regulamentadores ou comitês técnicos científicos, descrevem documentos nos quais estão descritos os parâmetros necessários para uma validação intralaboratorial de métodos analíticos. Uma comparação entre os guias tomados como referência no presente estudo, IUPAC/ISO/AOAC (THOMPSON *et al.*, 2002) e SANTE (2015), e as últimas versões de documentos publicados por organizações nacionais e internacionais, considerando métodos quantitativos e qualitativos, demonstrou variação tanto nos parâmetros exigidos quanto na maneira de obtê-los (**Tabelas 9 e 10**). Os guias nacionais consultados foram: i) RDC Nº 166, publicada pela ANVISA, em 24 de julho de 2017; ii) Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos (DOQ-CGCRE-008), emitido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), que é o órgão de acreditação brasileiro, em 2016; e iii) Manual de Garantia da Qualidade Analítica, elaborado pelo MAPA, em 2011. Dentre os documentos internacionais também foram considerados: i) *Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2<sup>nd</sup> edition*, emitido pelo FDA, em 2015; ii) *Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods* publicado pelo organismos de acreditação Australiano *National Association of Testing Authorities (NATA)*, em 2013; iii) *The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, estabelecido pelo EURACHEM, em 2014; e iv) *Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1)*, emitido pelo *International Conference on Harmonisation (ICH)*, em 2005.

### 5.2.1 Métodos quantitativos

Métodos quantitativos dizem respeito a procedimentos analíticos em que a quantidade ou concentração de um analito de interesse pode ser determinada (ou estimada) com veracidade e precisão aceitáveis e expressa por meio de um valor numérico expresso em unidades apropriadas (FDA, 2015).

Na **Tabela 9** são apresentados os parâmetros de desempenho considerados nos guias comparados na presente revisão. Veracidade e precisão são dois parâmetros básicos e capitais para análises quantitativas (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005). Ambos foram citados em todos os guias considerados. As faixas de valores estabelecidos como aceitáveis por nível de concentração não foram consideradas nessa análise, visto que a intenção da presente revisão foi evidenciar a influência dos principais guias de validação em relação aos processos praticados para análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos. A veracidade pode ser avaliada por meio da condução de experiências de recuperação, por comparação de métodos ou análises de materiais com valores atribuídos (BOŽOVIĆ & KULASINGAM, 2013). Para a revisão, foi seguida a recomendação prevalente nos guias.

A variação mais significativa entre os guias de validação diz respeito à precisão intermediária. Algumas referências preconizaram a avaliação da precisão intermediária por meio da repetição do método validado em diferentes dias, executado por analistas distintos (ANVISA, 2017). No guia harmonizado pela IUPAC/ISO/AOAC foi descrito que as condições entre corridas analíticas (*runs*) deveriam representar o que normalmente acontece no laboratório, incluindo variações em lotes de reagentes, analistas e equipamentos (THOMPSON *et al.*, 2002). Outras referências também preconizaram que os equipamentos de análise deveriam ser modificados em conjunto com analistas e dias (KELLEY & DE SILVA, 2007; NATA, 2013).

Algumas referências consideraram que não há necessidade de modificação de todos esses fatores simultaneamente, desde que as modificações sejam especificadas (INMETRO, 2016). No que tange o interesse desta revisão, para a

precisão em termos de repetitividade e precisão intermediária, os autores deveriam publicar os desvios padrões das medições realizadas em uma mesma corrida de análise (repetibilidade) e entre corridas analíticas em períodos distintos (precisão intermediária).

**Tabela 9.** Parâmetros descritos em documentos publicados por órgãos nacionais e internacionais para validação intralaboratorial de métodos analíticos quantitativos

Parâmetros	IUPAC/ISO/AOAC - 2002	SANTE - 2015	EURACHEM - 2014	FDA - 2015	ICH - 2005	ANVISA - 2017	INMETRO - 2016	MAPA - 2011	NATA - 2013
Aplicabilidade	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Efeitos de matriz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Faixa de validação	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Incerteza de medição	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Limite de detecção	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Limite de quantificação	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linearidade	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Precisão (repetibilidade)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Precisão (intermediária)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Robustez	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Seletividade	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sensibilidade	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Veracidade	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**Fonte:** Elaborado pelo autor. AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*; FDA: *United States Food and Drug Administration*; NATA: *National Association of Testing Authorities*; ICH: *International Conference on Harmonisation*; ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

Não foi evidenciado nos documentos analisados um consenso quanto à terminologia e forma de avaliação do parâmetro seletividade. No que diz respeito à definição, houve consenso na literatura de que o referido parâmetro diz respeito à determinação dos analitos na presença de interferentes (VERBIĆ *et al.*, 2013; DORKÓ *et al.*, 2015). Todos os guias estudados trataram o parâmetro seletividade, sendo que o processo correspondente à comprovação de que o método não sofre influência de interferentes advindos de algum componente pertencente à análise como a matriz ou solvente de trabalho. O critério de comprovação da seletividade aceito para a presente revisão consistiu na publicação da comparação de resultados obtidos das análises das matrizes “brancas” e adicionadas de analito na presença e ausência de interferentes, assim como ensaios de seletividade cruzada para métodos imunológicos ou a lista de espectros de massas de identificação e confirmação para os resíduos analisados, conforme evidenciado nos documentos analisados.

Os efeitos de matriz não compreenderam um parâmetro discutido separadamente nos documentos considerados no presente estudo, já que alguns deles trataram os efeitos de matriz como parte integrante do estudo de linearidade/calibração, como THOMPSON *et al.* (2002), enquanto outros consideraram como parte integrante da seletividade, como ICH (2005) e EURACHEM (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014). No entanto, mesmo que a discussão do parâmetro varie entre os guias, todos eles reconheceram a importância do mesmo e estipularam maneiras de avaliá-lo. Como não foi o objetivo da revisão sistemática discutir a estatística por parte da obtenção dos parâmetros analíticos, foram aceitas as comparações das curvas de calibração por visualização gráfica, diferença entre as inclinações das curvas ou outra forma de cálculo desde que especificada para confirmação do estudo de efeito de matriz.

A sensibilidade do método é a variação da resposta analítica gerada mediante a mudança de concentração do analito de interesse presente na amostra (VIM, 2012). A atribuição de um valor numérico para sensibilidade é arbitrário e depende do instrumento utilizado e suas configurações. Esta é a razão pela qual a sensibilidade não é universalmente incluída entre os parâmetros de validação (KRUIVE *et al.*, 2015b).

Assim como foi definido pela IUPAC/ISO/AOAC (THOMPSON *et al.*, 2002), os guias do INMETRO (2016), MAPA (2011), EURACHEM (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014), ANVISA (2017), NATA (2013) e FDA (2015) também propõem que a sensibilidade seja melhor interpretada pela inclinação da curva de calibração do método. O guia SANTE (2015) não discutiu e nem definiu o termo sensibilidade no corpo do texto ou no glossário, mas associou a obtenção da sensibilidade ao estudo da linearidade, deixando implícito que a sensibilidade deva ser representada pela inclinação. Já os guias da ANVISA (2017) e do ICH (2005) não discutiram a sensibilidade, apesar de trazerem a necessidade do coeficiente angular para obtenção da linearidade. Sendo assim, o presente estudo de revisão adotou como critério apenas contabilizar o estudo de sensibilidade se o estudo trouxesse a inclinação da curva, mesmo que de maneira indireta, ou seja, para cálculo de efeito de matriz ou para determinação dos limites de detecção e de quantificação.

Quanto à linearidade, os guias estudados foram unânimes ao afirmar que o estudo desse parâmetro consiste na obtenção da função analito-resposta (regressão linear ou quadrática), análise de resíduos (homocedasticidade), coeficiente angular significativamente diferente de zero e coeficiente de correlação, ou seja, para nenhum deles o coeficiente de correlação por si só seria o bastante para avaliar a linearidade do método. Os pontos calibrados deveriam apresentar índices de recuperação e precisão adequados para que fossem considerados apropriados para formar a curva de calibração. A função de resposta ou a curva de calibração de um método analítico é, dentro do intervalo, uma relação monotônica entre o sinal analítico (resposta) e a concentração de analito. A função de resposta pode ser linear, mas também são observados modelos não-lineares, como no ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) ou em plasma acoplado indutivamente (GONZÁLEZ & HERRADOR, 2007). Para a IUPAC/ISO/AOAC (THOMPSON *et al.*, 2002) e NATA (2013), a faixa de validação deveria compreender entre 0 – 150% do valor esperado, aceitando-se uma faixa de 50 – 150% com seis níveis de calibração. Os demais guias não estabeleceram uma faixa específica, mas aconselharam que o valor mais comumente esperado ou de referência estivesse compreendido no meio da faixa a ser validada. Sendo assim, a presente revisão considerou que os estudos cumpriram o parâmetro de linearidade quando reportaram as curvas de calibração com a significância da regressão (significância da inclinação ou coeficiente angular),

análise de resíduos e coeficiente de correlação, especificados nos guias da IUPAC/ISO/AOAC (THOMPSON *et al.*, 2002) e SANTE (2015). Para a faixa de validação, foram aceitos a publicação da faixa propriamente dita ou a informação das concentrações das soluções dos analitos de interesse que foram utilizadas no estudo de calibração.

Os parâmetros analíticos para os quais houve uma maior variedade nas definições e formas de estimar e avaliar foram os limites de detecção e quantificação (TAVERNIERS *et al.*, 2004b). O limite de quantificação foi discutido em todos os guias comparados, ressaltando que a IUPAC/ISO/AOAC (THOMPSON *et al.*, 2002) desaconselharam o estudo do parâmetro limite de quantificação em detrimento do limite de detecção. Já para o guia da SANTE (2015), métodos quantitativos precisariam apresentar apenas o limite de quantificação. Os demais guias preconizaram o estudo dos dois limites (ICH, 2005; MAPA, 2011; NATA, 2013; MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014; FDA, 2015; INMETRO, 2016; ANVISA, 2017).

A comparação também apresentou diferenças quanto a forma de cálculo dos limites. No entanto, como o objetivo da revisão não foi avaliar a matemática associada à obtenção dos limites, qualquer das fórmulas propostas foram aceitas. Sendo assim, a revisão considerou que os trabalhos selecionados estudaram os limites do método com base na forma de cálculo utilizada em conjunto aos valores encontrados.

A incerteza de medição leva em consideração fontes de erros aleatórios e sistemáticos, correspondendo ao cálculo de erros associados ao método que possam interferir na confiabilidade dos resultados apresentados. Se dados de precisão e veracidade adequados estiverem disponíveis e combinados, é possível obter uma estimativa da incerteza de medição, que caracteriza a acurácia total dos resultados da análise. Esse parâmetro gera um intervalo sob uma probabilidade específica na qual o resultado verdadeiro pode ser encontrado. É um parâmetro abrangente que cobre todas as fontes de erro e, portanto, mais do que a validação do método sozinha (TAVERNIERS *et al.*, 2004b; ARAUJO, 2009; KRUBE *et al.*, 2015b). Assim como foi descrito para outros parâmetros, não foi objetivo desta revisão analisar a abordagem utilizada para estudo de incerteza. Para tanto, o critério de aceitabilidade da incerteza para a presente revisão sistemática

correspondeu à publicação dos valores de incerteza individuais para as fontes relevantes ou a divulgação da incerteza expandida do método em conjunto com a forma de cálculo.

A robustez diz respeito a resposta do método frente a pequenas modificações deliberadas aplicadas em rotina analítica aos pontos críticos da marcha analítica, como condições cromatográficas (GONZÁLEZ & HERRADOR, 2007; TIWARI & TIWARI, 2010). Para o estudo da robustez, os guias recomendaram a utilização de planejamentos como o de Youden ou de Plackett-Burman para demonstrar a variabilidade do método frente a cada modificação introduzida. Há variações evidentes entre alguns guias que podem influenciar no estudo de validação. Os guias da NATA (2013), EURACHEM (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014) e INMETRO (2016) afirmaram que validações intralaboratoriais muitas vezes não necessitam do estudo de robustez por não apresentarem variações significativas, tornando esse parâmetro opcional dentro do processo de validação. Para o guia da SANTE (2015), robustez é um parâmetro demonstrado por meio do controle de qualidade aplicado na rotina analítica do método, mensurando tanto a veracidade e a precisão intermediária associada em determinado período quanto a estabilidade dos resultados frente a pequenos ajustes. Um desafio comum encontrado durante o desenvolvimento e validação de métodos é a separação apresentada pelos departamentos de pesquisa e desenvolvimento e garantia e controle de qualidade. A transferência de métodos analíticos entre os departamentos torna-se um passo importante para garantir que a validação adequada esteja em vigor para justificar o uso pretendido. Para que o método seja executado por vários grupos durante o seu progresso, desde o desenvolvimento até a validação, ele deve ser robusto. Uma fraqueza compartilhada no desenvolvimento e validação de métodos é que os métodos não são bastante robustos. Se a robustez não for incorporada aos métodos no início do desenvolvimento, os resultados provavelmente não terão eficiência nos testes de qualidade. A concepção e execução dos estudos requer um conhecimento profundo do produto testado, bem como uma boa compreensão da técnica de análise (BELOUFA *et al.*, 2017).

De acordo com algumas referências, há de se atribuir uma distinção entre os termos “*ruggedness*” e “*robustness*”. O primeiro se trata do estudo da influência de fatores externos (extrínsecos) ao método tal como analistas, instrumentos,

laboratórios, reagentes e tempo exercem sobre o método. Já o segundo termo deve ser aplicado quando se avalia a influência de fatores internos (intrínsecos) ao método como a taxa de fluxo, a temperatura da coluna, o volume da injeção, a composição da fase móvel (KELLEY & DESILVA, 2007; ARAUJO, 2009; GONZÁLEZ *et al.*, 2014). A robustez é um dos parâmetros discutidos em todos os guias de validação de métodos analíticos comparados na revisão. Mas assim como foi percebido por ARAUJO (2009), estes termos são utilizados na literatura de forma intercambiável, inclusive nos guias aqui considerados. Mas vale ressaltar, no entanto, que independentemente do termo utilizado, a avaliação desse parâmetro por meio de variações nos fatores críticos, sejam eles internos ou externos. Portanto, a avaliação da robustez para a presente revisão foi atribuída à avaliação dos fatores críticos por meio da publicação dos fatores e dos resultados associados a cada um deles.

O último parâmetro catalogado para a revisão foi a aplicabilidade. A aplicabilidade, segundo THOMPSON *et al.* (2002), é a publicação do protocolo do método incluindo analitos e matrizes validadas, faixa de validação, equipamentos, reagentes, processo com as instruções e a incerteza de medição (THOMPSON *et al.*, 2002; GONZÁLEZ & HERRADOR, 2007). Como já mencionado, através da definição de aplicabilidade descrita por THOMPSON *et al.* (2002), é possível concluir que para qualquer um dos guias comparados, a condução de um processo de validação completo que estude e publique todos os parâmetros discutidos da maneira como são especificados em cada guia termina por adequar este estudo dentro do parâmetro de aplicabilidade mesmo que esse não seja explicitamente discutido. Sendo assim, para esta revisão, o parâmetro de aplicabilidade considerado foi o descrito por THOMPSON *et al.* (2002).

### 5.2.2 Métodos qualitativos

Métodos qualitativos, segundo a IUPAC, correspondem à análise em que as substâncias são identificadas ou classificadas com base em suas propriedades químicas ou físicas, tais como reatividade química, solubilidade, peso molecular,

ponto de fusão, propriedades radiativas (emissão, absorção), espectros de massas, semi-vida nuclear, etc. (IUPAC, 2006). Esses métodos produzem resultados dicotômicos sobre a presença ou ausência de determinado analito na matriz analisada. Tais métodos que proveem respostas binárias são conhecidos também como testes limite ou métodos semi-quantitativos de triagem (ELLISON & FEARN, 2005; FDA, 2015).

Os métodos qualitativos são utilizados em rotinas analíticas como precursores de métodos quantitativos para, objetivamente, ganhar tempo e reduzir custos do laboratório. Tais métodos geralmente são dispostos em um sistema de triagem no qual determinam a presença ou não dos analitos de interesse no alimento selecionado. No caso de um resultado positivo, ou seja, na presença do analito é que o método quantitativo é aplicado. Nesse contexto, é clara a importância de se validar os métodos qualitativos. No entanto, a validação de métodos analíticos recebe um foco maior para métodos quantitativos. Como consequência, as principais diretrizes de validação que são aceitas por órgãos reguladores ou por comunidades de profissionais em campos específicos descrevem com mais ênfase o processo de validação para métodos quantitativos em detrimento de uma diretriz de validação geral para métodos analíticos qualitativos (TRULLOLS *et al.*, 2004).

Na literatura, é possível encontrar protocolos bem estabelecidos sobre as práticas de validação intralaboratorial e estudos colaborativos para métodos analíticos quantitativos. Enquanto isso, os métodos qualitativos recebem menor atenção (MIL'MAN & KONOPEL'KO, 2004; ELLISON & FEARN, 2005). O próprio guia harmonizado pela IUPAC/ISO/AOAC, utilizado como referência para revisão sistemática de métodos quantitativos, não aborda a validação de métodos qualitativos. As primeiras versões de alguns dos demais guias são contemporâneas, outras são anteriores ao guia harmonizado da IUPAC/ISO/AOAC e vêm sendo atualizadas com o passar dos anos, inclusive em relação aos parâmetros de validação de métodos qualitativos. Neste contexto, uma maior incongruência sobre os parâmetros necessários para validação de métodos qualitativos foi evidenciada em relação aos métodos quantitativos.

Os parâmetros dispostos na **Tabela 10** são aqueles considerados pelos guias comparados na revisão. Como pode ser notado, apenas o guia da FDA (2015)

discutiu todos os parâmetros. Apoiado pelas demais referências, o guia da FDA (2015) foi adotado como referência para métodos qualitativos (TRULLOLS *et al.*, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; MACARTHUR & HOLST, 2012; GONDIM *et al.*, 2014; LOPEZ *et al.*, 2015).

**Tabela 10.** Parâmetros de validação dispostos por guias de validação de métodos qualitativos de análise química

Parâmetros	IUPAC/ISO/AOAC - 2002	SANTE - 2015	EURACHEM - 2014	FDA - 2015	ICH - 2005	ANVISA - 2017	INMETRO - 2016	MAPA - 2011	NATA - 2013
Sensibilidade	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Seletividade	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Taxas de falsos resultados (falso-positivos e falso-negativos)	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Limite de detecção	-	+	+	+	+	+	+	-	*
Robustez	-	-	**	+	-	+	**	-	+
Precisão (por taxas de falsos resultados)	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Precisão (acordância - repetibilidade)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Precisão (concordância - intermediária)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Região de perda de confiabilidade (incerteza)	-	-	+	+	-	-	-	-	+

Fonte: Elaborado pelo autor.

\* apenas aconselhado para métodos que trabalham em concentrações próximas de zero; \*\* parâmetro opcional;

AOAC: Association of Official Analytical Chemists; FDA: United States Food and Drug Administration; NATA: National Association of Testing Authorities; ICH: International Conference on Harmonisation; ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

Destacou-se no guia do EURACHEM (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014) a abordagem da robustez. Assim como aconteceu nos parâmetros quantitativos, o guia afirma que muitos métodos intralaboratoriais não precisam avaliar a robustez. No anexo D, no qual é tratada a validação de métodos qualitativos, todos os parâmetros são explicados e exemplificados sem que haja a citação da robustez. Por isso, foi considerada a não necessidade da robustez por parte do guia de EURACHEM (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014).

O mais usual nos guias e referências para validação de métodos qualitativos foi que o parâmetro sensibilidade mensura a capacidade do método em identificar corretamente amostras positivas. Em complemento à sensibilidade, definiu-se a capacidade do método em determinar amostras verdadeiramente negativas como a especificidade do método (CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; ELLISON & FEARN, 2005; LOPEZ *et al.*, 2015). Os termos especificidade e seletividade ainda são utilizados sem distinção por alguns autores. Seletividade deve estar conectada com a palavra "escolha", enquanto especificidade com a palavra "certeza". Um analista envolvido em uma validação pode classificar a seletividade do método analítico como baixa, alta, ruim, parcial, boa, etc., para escolher a categoria apropriada para um propósito estipulado. Já o termo especificidade refere-se sempre a 100% de seletividade (ARAUJO, 2009; BOŽOVIĆ & KULASINGAM, 2013; ANDREASSON *et al.*, 2015). Portanto, a título dessa revisão, foram consideradas a sensibilidade a partir da confirmação das respostas verdadeiramente positivas e a pelos resultados verdadeiramente negativos, realizados em amostras controle.

A veracidade dos métodos qualitativos pode ser estimada pelas taxas de falsos resultados, as quais determinam se um teste binário identifica ou exclui corretamente uma condição. Desta forma, a taxa de falso-positivos seria definida como a probabilidade de se obter um resultado positivo para uma amostra que não possui o analito, enquanto a taxa de falso-negativos seria estabelecida como a probabilidade de se obter um resultado negativo para uma amostra que possui o analito (TRULLOLS *et al.*, 2004; GONDIM *et al.*, 2011; GONDIM *et al.*, 2014).

Mesmo não sendo considerados pela maioria dos guias, os métodos qualitativos também necessitam avaliar a precisão. O parâmetro de precisão é o

mais confuso em relação aos guias. Segundo o guia da EURACHEM, a precisão pode ser expressa como taxas de verdadeiro e falso positivos e taxas de verdadeiros e falso negativos (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014). A partir da necessidade de avaliação da sensibilidade e seletividade, a precisão sempre terá sua frequência de estudo atrelada aos estudos dos outros dois parâmetros supracitados. No documento do NATA (2013) a precisão é apresentada como a razão entre o número de resultados verdadeiramente positivos e o número de resultados positivos (verdadeiros e falsos). No guia da FDA (2015), a precisão não é tratada para métodos qualitativos, embora seja citada nos semi-quantitativos de forma pouco detalhada, provavelmente relacionada às taxas de falsos resultados. Langton et al. (2002) propuseram duas estatísticas como formas de estimar a precisão, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade, em análises qualitativas, os quais foram denominados acordância e concordância, respectivamente. Tais estimativas não avaliam a proximidade dos resultados em relação ao valor de referência (veracidade), mas indicam o quanto um procedimento analítico está suficientemente padronizado (GONDIM et al., 2011). Esta última abordagem foi adotada no presente estudo, por ser considerada mais apropriada que as demais, uma vez que não mistura conceitos de diferentes parâmetros e permite a avaliação da precisão sob diferentes condições, além de estar sendo tratada em publicações recentes de protocolos para validação de métodos qualitativos (GONDIM et al., 2014; MACARTHUR, 2012).

Para métodos qualitativos, o limite é definido como a "concentração limiar em que o teste perde a confiabilidade". A concentração de limiar ou "corte" é determinada visualmente com base em uma curva de resposta, traçando os percentuais de resultados positivos em relação à concentração (TAVERNIERS et al., 2004b). O limite de detecção é também tratado nos métodos qualitativos pelo termo capacidade de detecção ( $CC\beta$ ), concentração limite onde o método é capaz de identificar as amostras verdadeiramente positivas (geralmente assume-se uma probabilidade máxima de 5,0% de erro de falsos negativos acima desse limite). Em associação a  $CC\beta$ , existe o limite de decisão ( $CC\alpha$ ), chamado em inglês de "*cut-off limit*" ou "*threshold limit*", que corresponde à concentração máxima na qual o método é capaz de identificar as amostras verdadeiramente negativas (é comum assumir uma probabilidade máxima de 5,0% de erro de falsos positivos abaixo desse limite)

(LOPEZ *et al.*, 2015; KRUIVE *et al.*, 2015a). Ambos os parâmetros são importantes para definir a região de perda de confiabilidade (LOPEZ *et al.*, 2015).

A região de perda de confiabilidade é o último parâmetro considerado e avalia o intervalo de concentração do analito na amostra onde a confiabilidade do método é baixa. Esse intervalo fica entre  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  e é importante para ilustrar a faixa de concentração onde a probabilidade de um falso resultado é maior do que o aceitável (LOPEZ *et al.*, 2015). Assim, os critérios de aceitação para confirmar o estudo da região de perda de confiabilidade no presente trabalho foram a presença dos limites do método, ou seja, a publicação de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  independente da nomenclatura utilizada, como por exemplo, limite de detecção e *cut-off limit / threshold limit*.

### 5.3 Análise dos estudos de métodos quantitativos

#### 5.3.1 Subgrupo ano de publicação

O tratamento dos dados de frequência dos parâmetros de validação estudados nos métodos quantitativos para análises de agrotóxicos em alimentos visou analisar a evolução dos estudos de validação a partir da publicação do guia harmonizado pela IUPAC/ISO/AOAC (THOMPSON *et al.*, 2002), observando se os parâmetros presentes no guia são conduzidos de acordo com o proposto. Como foi demonstrado no **item 5.2**, não houve influência negativa em relação à escolha dos principais guias de validação de métodos intralaboratoriais por não se diferenciarem significativamente em relação aos parâmetros exigidos e a conduta experimental. No entanto, a produção de THOMPSON *et al.* (2002) consolidou uma conduta laboratorial para validação de métodos que auxiliou também no estabelecimento dos demais guias.

Como apresentado na **Tabela 11**, a veracidade e a precisão em termos de repetitividade estavam presentes em mais de 95,0% dos estudos revisados. O cálculo da precisão de um método não requer conhecimento do valor verdadeiro e

não pode avaliar o desempenho do método por conta própria. Portanto, para a validação, tanto a precisão quanto veracidade são necessárias, assim como está preconizado nos guias de validação (BOŽOVIĆ & KULASINGAM, 2013). A recuperação é, por vezes, tratada como um parâmetro isolado para validação (TAVERNIERS *et al.*, 2004b). No entanto, o estabelecimento por parte dos guias do estudo de veracidade por meio das taxas de recuperação do método fez com que a recuperação fosse predominantemente tratada como uma técnica de análise do parâmetro de veracidade quando não houve disponibilidade de materiais ou métodos de referência.

No caso de validações intralaboratorias, a “reprodutibilidade” é avaliada pelas condições de precisão intermediária (ARAUJO *et al.*, 2009). A reprodutibilidade propriamente dita diz respeito a concordância dos resultados de um mesmo método aplicado por dois ou mais laboratórios, devendo ser avaliada apenas se o método analítico desenvolvido for conduzido por laboratórios diferentes. Infelizmente, alguns autores também usaram o termo reprodutibilidade para estudos dentro do laboratório ao nível da precisão intermediária, o que deve ser evitado para não gerar confusão (PETERS *et al.*, 2007).

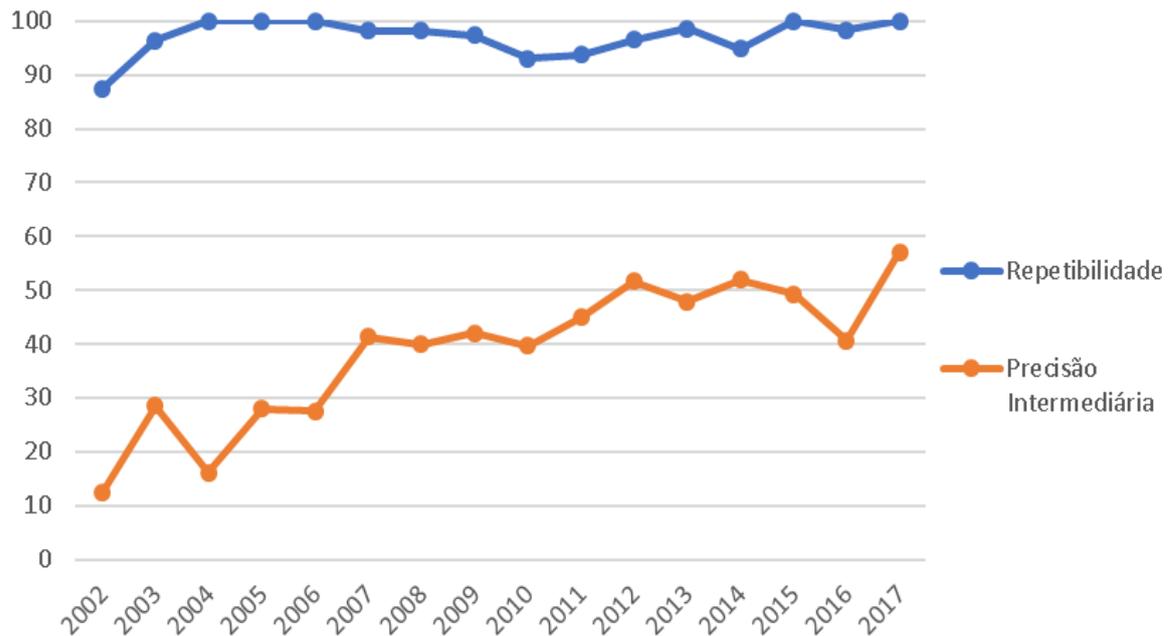
Observou-se, porém, que a comunidade científica tem negligenciado a precisão intermediária, apresentando apenas a repetitividade como parâmetro de validação, o que não é adequado (**Figura 13**). Apenas nos anos de 2012, 2014 e 2017 as frequências de estudos da precisão intermediária alcançaram 50,0% ou mais, ressaltando que em 2017 foram encontrados na revisão apenas cinco estudos. Ainda assim, constatou-se que o cenário ao longo dos anos apresentou discreta tendência de melhora.

**Tabela 11.** Frequência dos parâmetros de validação propostos no guia harmonizado pela IUPAC/ISO/AOAC nos estudos revisados, por ano

	Parâmetros	Aplicabilidade	Efeito de matriz	Faixa de validação	Incerteza de medição	Limite de detecção	Limite de quantificação	Linearidade	Precisão (repetibilidade)	Precisão (intermediária)	Robustez	Seletividade	Sensibilidade	Veracidade	TOTAL
2002	N	0	3	14	1	12	7	0	14	2	0	16	5	15	16
	%	0	18,75	87,5	6,25	75	43,75	0,00	87,5	12,5	0	100	31,25	93,75	-
2003	N	0	2	28	0	24	18	0	27	8	0	25	11	26	28
	%	0,00	7,14	100,0	0,00	85,71	64,29	0,00	96,43	28,57	0,00	89,3	39,29	92,86	-
2004	N	2	12	28	2	21	21	0	31	5	1	27	12	31	31
	%	6,45	38,71	90,32	6,45	67,74	67,74	0,00	100,0	16,13	3,23	87,10	38,71	100,0	-
2005	N	1	10	36	2	27	25	0	43	12	2	40	16	43	43
	%	2,33	23,26	83,72	4,65	62,79	58,14	0,00	100,0	27,91	4,65	93,02	37,21	100,0	-
2006	N	3	10	38	3	32	29	3	40	11	1	37	15	40	40
	%	7,50	25,00	95,00	7,50	80,00	72,50	7,50	100,0	27,50	2,50	92,50	37,50	100,0	-
2007	N	4	17	54	8	47	47	2	57	24	5	55	25	57	58
	%	6,90	29,31	93,10	13,79	81,03	81,03	3,45	98,28	41,38	8,62	94,83	43,10	98,28	-
2008	N	1	23	52	3	45	42	1	54	22	2	52	26	51	55
	%	1,82	41,82	94,55	5,45	81,82	76,36	1,82	98,18	40,00	3,64	94,55	47,27	92,73	-
2009	N	1	21	35	2	33	28	1	37	16	1	35	16	37	38
	%	2,63	55,26	92,11	5,26	86,84	73,68	2,63	97,37	42,11	2,63	92,11	42,11	97,37	-
2010	N	3	29	55	4	46	48	1	54	23	3	55	28	57	58
	%	5,17	50,00	94,83	6,90	79,31	82,76	1,72	93,10	39,66	5,17	94,83	48,28	98,28	-
2011	N	5	32	75	6	57	67	1	75	36	4	76	43	79	80
	%	6,25	40,00	93,75	7,50	71,25	83,75	1,25	93,75	45,00	5,00	95,00	53,75	98,75	-
2012	N	10	48	83	13	71	74	4	84	45	4	84	51	83	87
	%	11,49	55,17	95,40	14,94	81,61	85,06	4,60	96,55	51,72	4,60	96,55	58,62	95,40	-
2013	N	3	33	71	5	61	65	1	70	34	3	69	31	70	71
	%	4,23	46,48	100,0	7,04	85,92	91,55	1,41	98,59	47,89	4,23	97,18	43,66	98,59	-
2014	N	4	37	76	7	60	72	1	75	41	6	74	43	78	79
	%	5,06	46,84	96,20	8,86	75,95	91,14	1,27	94,94	51,90	7,59	93,67	54,43	98,7	-
2015	N	12	38	64	15	43	59	1	69	34	4	66	29	69	69
	%	17,39	55,07	92,75	21,74	62,32	85,51	1,45	100,0	49,28	5,80	95,65	42,03	100,0	-
2016	N	5	43	56	7	43	54	0	58	24	4	58	32	57	59
	%	8,47	72,88	94,92	11,86	72,88	91,53	0,00	98,31	40,68	6,78	98,31	54,24	96,61	-
2017	N	1	5	7	1	4	7	0	7	4	1	7	3	7	7
	%	14,29	71,43	100,00	14,29	57,14	100,00	0,00	100,00	57,14	14,29	100,00	42,86	100,00	-

Fonte: Elaborado pelo autor. N: número de estudos.

**Figura 13.** Comparação das frequências de estudo de repetibilidade e precisão intermediária ao longo dos anos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Muitos autores apresentaram como indicativo de linearidade apenas o coeficiente de correlação. No entanto, apenas o coeficiente de correlação dos pontos de calibração não permite avaliar conclusivamente a linearidade do método (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; GONZÁLEZ & HERRADOR 2007). A correlação pode ser descrita como o grau de associação entre duas variáveis, enquanto a regressão expressa a forma da relação entre valores especificados de uma variável (independente, exógena, explicativa) e os meios de todos os valores correspondentes do segundo (variável dependente, resultado, resposta) (ASUERO *et al.*, 2006). Após a retirada de *outliers* a partir dos dados e de um modelo avaliado visualmente, o ajuste do modelo também deve ser testado por métodos estatísticos apropriados. O ajuste dos modelos de regressão pode ser testado pelo teste de falta de ajuste da análise de variância (ANOVA). A prática generalizada para avaliar um modelo de calibração por meio de seus coeficientes de correlação ou determinação não é aceitável do ponto de vista estatístico (TIWARI & TIWARI, 2010).

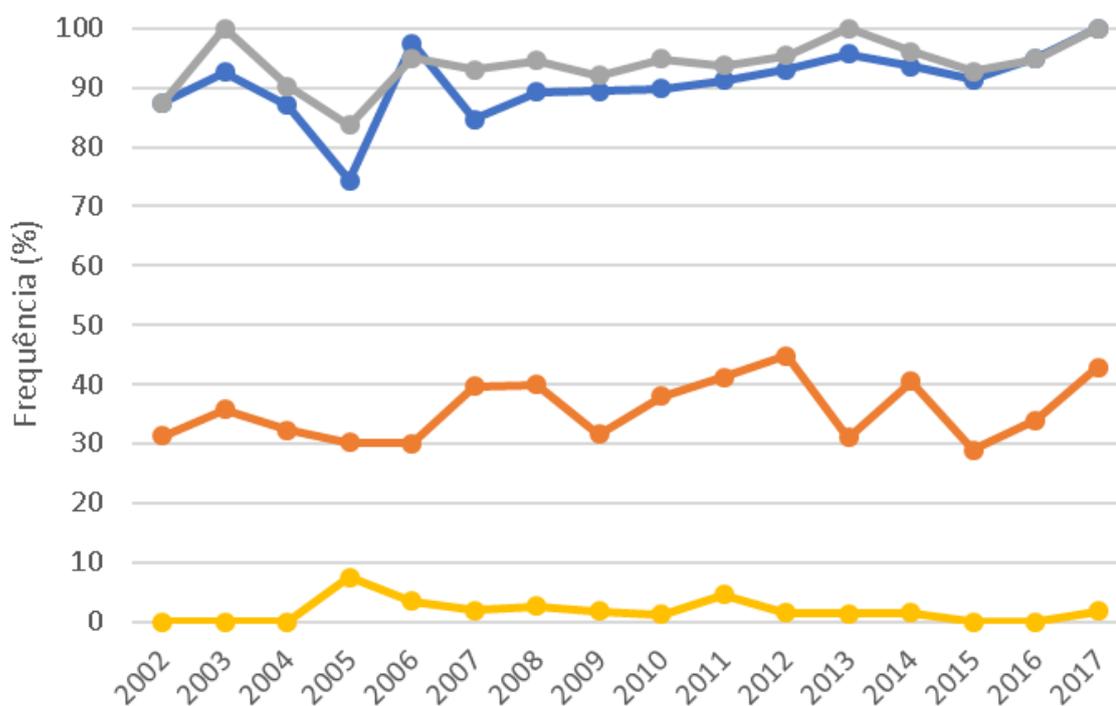
Como foi descrito por ARAUJO (2009), a linearidade para o sistema de validação de métodos de análise química consiste nos elementos básicos de entrada → conversor → saída, correspondente à suposição de que existe uma relação de linha reta entre as variáveis de entrada ( $x$ ) e saída ( $y$ ) que podem ser escritas matematicamente pela expressão  $y = f(x)$  se a linha reta atravessar a origem ou pela expressão  $y = f(x) + \delta$  se a linha reta não atravessar a origem. É prática comum verificar a linearidade de uma curva de calibração por inspeção do coeficiente de correlação, embora não seja certo afirmar que uma curva que apresente  $r = 0,999$  seja mais linear do que outra que apresente  $r = 0,997$ . Ainda, na literatura sobre a validação analítica, o uso do coeficiente de correlação no contexto do teste de linearidade é tratado como incorreto e desencorajado (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; BOUABIDI *et al.*, 2010; BELOUFA *et al.*, 2017) muitos laboratórios em todo o mundo baseiam a linearidade de seus métodos instrumentais no chamado por ARAUJO (2009) "*R-test*" ou teste de "r".

O estudo do parâmetro de linearidade foi outro ponto crítico da revisão sistemática para validação de métodos quantitativos. Adotando a abordagem estipulada pelos guias de referência, THOMPSON *et al.* (2002) e SANTE (2015), a frequência encontrada para o estudo de linearidade apresentou média histórica de apenas 1,69% (**Figura 14**). Desta forma, a frequência do estudo do referido parâmetro foi analisada para todos os sub-grupos de comparação de métodos quantitativos considerando-se duas outras abordagens: i) reportagem do coeficiente de correlação; e ii) reportagem da equação e do coeficiente de correlação. O perfil dos resultados diferiu significativamente. A frequência média de estudos da linearidade passou para 34,75%, na série histórica, quando considerada a reportagem da equação e do coeficiente de correlação. Frequências ainda superiores (média de 98,31% na série histórica) foram alcançadas quando somente o estudo do coeficiente de correlação foi considerado.

ARAUJO *et al.* (2009) apresentaram um resultado condizente com o que foi atestado nesta revisão. Segundo os autores, uma série de trabalhos reportou a linearidade apenas pelo coeficiente de correlação, utilizando sentenças como "*This method has a linear calibration range of 1.00–1000 ng/ml with a correlation coefficient of 0.9999.*"; "*The calibration graphs were linear with correlation coefficients*

*greater than 0.999 for all compounds.*”; *“It was clear that the calibration was linear as a result of a correlation coefficient close to 1 ( $r_{\text{experimental}} = 0.9996$ ).*”. A alta frequência atingida pela linearidade nesta revisão quando se considerou apenas o coeficiente de correlação como indicador positivo do estudo do referido parâmetro, confirmou a afirmação de ARAUJO *et al.* (2009) sobre a disseminação de conceitos errôneos de linearidade em apresentações orais, relatórios de laboratório e artigos científicos, sendo reforçados por uma frequência alta de estudos cuja linearidade é apresentada apenas pelo coeficiente de correlação.

**Figura 14.** Frequência de estudo de linearidade sob diferentes abordagens



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Azul: frequência do estudo de linearidade considerando apenas o coeficiente de correlação; Laranja: frequência do estudo de linearidade considerando a presença da equação e coeficiente de correlação; Amarelo: frequência do estudo de linearidade considerando os critérios de THOMPSON *et al.* (2002) e SANTE (2015); Cinza: frequência de estudo da faixa de validação

No cenário apresentado, é importante constatar que os guias não estão sendo seguidos quanto ao estudo de linearidade do método, uma vez que o coeficiente de

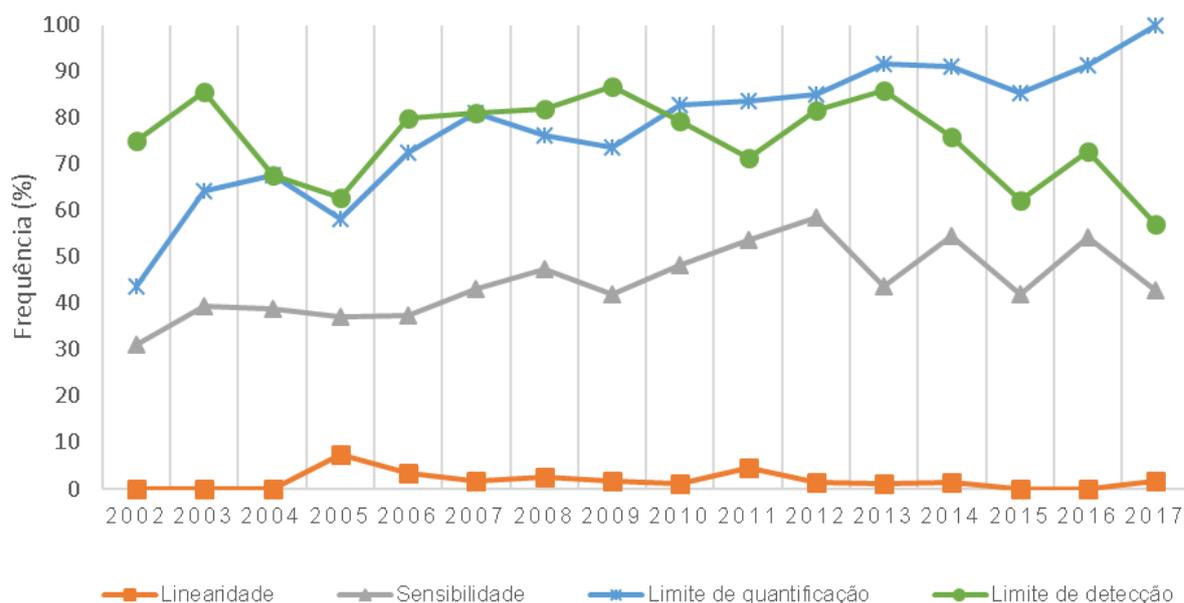
correlação vem sendo supervalorizado em detrimento dos demais aspectos que definem o estudo do referido parâmetro.

Associada a linearidade aparece a faixa de validação, que nada mais é que o intervalo de concentração do analito para o qual o método foi validado atendendo os critérios de precisão e veracidade (ARAUJO, 2009; BELOUAFIA *et al.*, 2017). O intervalo linear de respostas corresponde às concentrações do analito a partir do ponto que intersecta a linha  $y = 1,05b$  até o ponto que intersecta a linha  $y = 0,95b$ . É possível que não haja intersecções encontradas e, neste caso, o intervalo linear se aplica à faixa completa em estudo, se o nível mínimo de concentração for superior ao limite de detecção no caso de análise de analitos em concentrações traços (GONZÁLEZ & HERRADOR, 2007). O ponto mais importante reportado pela revisão sobre a faixa de validação é a associação das frequências de estudo desse parâmetro quando a linearidade é aceita apenas pela publicação do coeficiente de correlação, nota-se a esperada associação entre a faixa de validação e a linearidade, já que ambos são analisados durante a calibração do método, fato não observado quando a linearidade é tratada pelos critérios vinculados pelos guias.

A publicação da curva de calibração é importante não somente para a linearidade, mas também para a sensibilidade, visto que a sensibilidade corresponde ao gradiente da curva de resposta quando essa se comporta linearmente (ARAUJO, 2009; BELOUAFIA *et al.*, 2017). A sensibilidade do método, segundo os guias, é representada pela significância da inclinação da curva de calibração, pois esse parâmetro da equação demonstra como a resposta do método varia de acordo com a concentração de analito. Desta forma, como a inclinação da linha de regressão, a sensibilidade está entre os parâmetros necessários para a avaliação da linearidade. Embora a sensibilidade não possa ser confundida com o limite de detecção e o limite de quantificação, tais parâmetros também estão relacionados. Com uma relação sinal/ruído dada, quanto maior a sensibilidade, menores serão os limites (KRUIVE *et al.*, 2015b). No presente estudo observou-se uma média histórica para o parâmetro sensibilidade (44,64 %) foi inferior aquelas obtidas para limite de detecção (75,46 %) e quantificação (78,05 %). A definição da sensibilidade por meio dos limites de detecção ou quantificação e da linearidade pelo coeficiente de correlação constituem abordagens errôneas, algumas vezes sustentadas por guias de validação, que

podem justificar a baixa frequência evidenciada do estudo do parâmetro sensibilidade na presente revisão (**Figura 15**). Por exemplo, no guia de validação dos métodos bioanalíticos do FDA, a sensibilidade é definida como "a menor concentração de analito que pode ser medida com veracidade e precisão aceitáveis", ou seja, a mesma definição atribuída ao limite de quantificação (FDA, 2013).

**Figura 15.** Comparação dos parâmetros de validação relativos à sensibilidade



Fonte: Elaborado pelo autor.

Alguns autores não publicam a equação, porém levaram em consideração a curva de calibração, por meio da inclinação da curva, para determinação de três outros parâmetros, os efeitos de matriz e os limites de detecção e quantificação (TAVERNIERS *et al.*, 2004b). Segundo alguns guias, inclusive THOMPSON *et al.* (2002), o estudo dos efeitos de matriz deve ser conduzido pela comparação da sensibilidade do método frente ao analito de interesse examinado em solvente puro e em matriz alimentar, ou seja, as inclinações das curvas de calibração geradas a partir da resposta obtida em solvente puro e em solução obtida do alimento de interesse devem ser submetidas ao teste t-Student ou teste F-Snedecor para

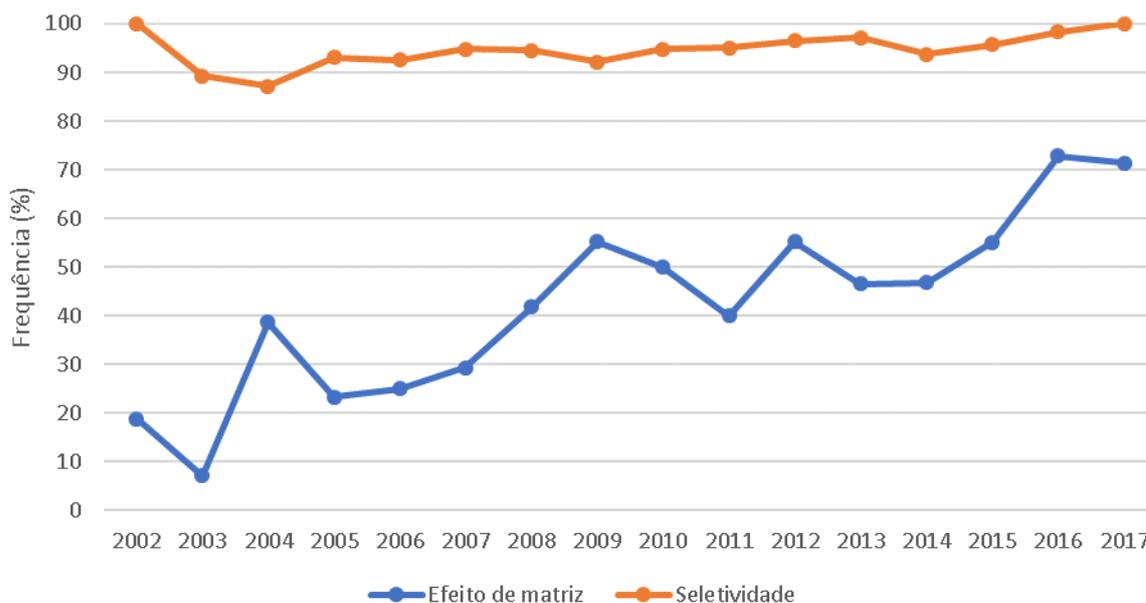
avaliação de diferenças significativas. No entanto, o guia da SANTE adota como critério de estudo de efeito de matriz a avaliação da resposta do método frente a uma certa quantidade de analito presente em solvente e alimento. Com isso, não necessariamente é preciso da inclinação da curva de calibração para constatar a existência do efeito de matriz. Também é possível encontrar a análise de efeito de matriz associado a estudos de robustez, veracidade e precisão (HELLER, 2007; KRUBE *et al.*, 2015b). Adotando o critério do guia da SANTE, torna-se possível examinar os efeitos de matriz através dos dados de veracidade e precisão para uma mesma concentração de analito, sendo que a resposta limite para tal é de  $\pm 20\%$ .

Interessante observar a inversão das frequências entre LOD e LOQ que ocorreu durante a faixa histórica analisada, que foi atribuída aos guias. O documento da SANTE (2015), que é atualizado bianualmente desde 2007 e formulado especificamente para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, é uma fonte frequentemente consultada para validação de metodologias na área. Por outro lado, o guia da IUPAC/ISO/AOAC (THOMPSON *et al.*, 2002) permaneceu estagnado em sua versão original, o que pode ter diminuído o número de consultas ao referido documento em relação aos processos de validação para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Nesse cenário, cumpre destacar que o guia de THOMPSON *et al.* (2002) recomenda o estudo do LOD, enquanto o guia da SANTE estipula apenas a estimativa do LOQ para validação de métodos quantitativos. Os demais guias propõem que o processo de validação avalie os dois limites, mas assim como o guia de THOMPSON *et al.* (2002), esses outros documentos não são específicos para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Outro ponto a ser considerado é a maior quantidade de trabalhos de origem europeia, onde o guia da SANTE pode exercer maior influência.

Os efeitos de matriz ainda se relacionam à seletividade em alguns documentos e referências (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014). Ainda que os efeitos de matriz sejam tratados como parte integrante do estudo de seletividade, as frequências de estudos desses parâmetros são significativamente diferentes. A seletividade é o quarto parâmetro mais prevalente dentro da média histórica abordada pela presente revisão, enquanto os efeitos de matriz figuraram como

sétimo parâmetro mais estudado, graças à evolução que a frequência do referido parâmetro demonstrou no final da série histórica (**Figura 16**).

**Figura 16.** Comparação dos parâmetros de validação relativos à seletividade.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A seletividade carrega uma grande desvantagem relacionada a sua definição que, embora possam ser satisfatórias para caracterizar um método completamente desenvolvido, não fornecem qualquer medida quantitativa desse parâmetro, nem mesmo uma aproximada, que poderia guiar o analista durante o desenvolvimento do método (DORKÓ *et al.*, 2015). Segundo os guias, os efeitos de matriz podem ser avaliados de forma quantitativa. Porém, para os estudos que avaliam apenas a seletividade sem os efeitos de matriz, a caracterização qualitativa é possível o que torna a avaliação da seletividade mais acessível e eleva a frequência observada. A diferença entre as frequências de estudo para seletividade e efeitos de matriz encontradas na revisão concordam com os achados de ARAUJO (2009) que afirma que a abordagem mais frequente para seletividade é a comparação dos resultados obtidos para análises em amostras com ou sem o analito, enquanto uma das

abordagens menos frequentes é a comparação das inclinações das curvas de calibração obtidas em solvente e em matriz alimentar, justamente o critério adotado para avaliar efeito de matriz pela grande maioria dos guias de validação.

Os métodos modernos geralmente são projetados combinando vários princípios de medição à sua própria seletividade para a operação geral. Desta forma, métodos analíticos de alta seletividade podem ser obtidos. Técnicas como cromatografia, eletroforese e separações de membrana para todos os tipos de espécies tendem a depender da seletividade em um processo de separação, muitas vezes chamado de seletividade de separação. Técnicas hífenizadas, como CL-EM, em que as seletividades são combinadas em relação à separação e detecção, podem ser aplicadas quando as exigências de seletividade são especialmente elevadas. A adição de CL-EM-EM produz uma seletividade raramente comprometida e muitas vezes é necessária em situações legais quando é necessária identificação positiva e não desejada. Esses equipamentos de alta resolução possuem uma seletividade inata e facilitam o estudo do parâmetro seletividade pelos tempos de retenção e íons de quantificação e qualificação dos analitos de interesse (VESSMAN *et al.*, 2001; SANTE, 2015). No entanto, isso não isenta os métodos atuais de sofrerem interferências de elementos vindos dos alimentos, principalmente métodos cuja seletividade intrínseca é menor como os métodos cromatográficos associados a detectores que não sejam espectrômetros de massas. Para ensaios em que a seletividade é alta (por exemplo, ensaios CL-EM/EM ou CG-EM/EM), é menos provável que os picos de co-eluição influenciem diretamente a quantificação dos analitos. Entretanto, a presença de compostos não monitorados e co-eluentes da matriz pode afetar a detecção de analitos (BANSAL & DE STEFANO, 2007; VERBIĆ *et al.*, 2013). Percebe-se pela revisão que a presença de modificações qualitativas nos resultados mensurados para estudo de seletividade, como por exemplo diferenças nos cromatogramas do analito em solvente puro e no alimento já seriam suficientes para que muitos autores tomem medidas corretivas para o efeito de matriz mesmo sem uma avaliação quantitativa prévia, assumindo o referido efeito como positivo.

As medidas corretivas para os efeitos de matriz comumente reportadas correspondem à construção de curvas de calibração nos extratos da matriz estudada

e adição de padrão em diferentes concentrações conhecidas nas matrizes de interesse (SANTE, 2015). O emprego de padrões marcados isotopicamente ou adição de padrões internos também é discutido na literatura, embora tenha sido demonstrado como insuficiente por Belo *et al.* (2016).

Os limites de detecção e quantificação, utilizados para caracterizar a performance do método, apresentaram médias de frequências de estudo acima de 75,0 % dentro do período histórico abordado. Ao longo da série histórica 60,25 % dos estudos revisados analisaram ambos os limites. Esse resultado demonstra que tanto o aconselhamento de THOMPSON *et al.* (2002) de não preconizar o limite de quantificação e quanto a recomendação por parte do guia da SANTE em não realizar o limite de detecção para métodos quantitativos apresentam pouca influência no estudo dos limites durante a validação de métodos quantitativos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. É possível que a taxa de estudo simultâneo dos limites fosse maior caso o guia harmonizado pela IUPAC/ISO/AOAC e o guia da SANTE aconselhassem avaliar ambos. No entanto, a maioria dos guias preconiza o estudo dos dois limites (**Tabela 9**) e, com base nos resultados demonstrados é possível afirmar que a importância dos dois limites para a validação de métodos analíticos quantitativos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos está sendo estabelecida.

Na maioria das fontes relacionadas à validação, a incerteza de medição não está incluída como um parâmetro de validação, mas é mantida separadamente, uma vez que a incerteza de medição caracteriza tradicionalmente um resultado de análise do que um método de análise. De acordo com as novas abordagens, a incerteza de medição também pode ser entendida como um parâmetro que caracteriza um método e a estimativa de incerteza é hoje em dia frequentemente exigida dos laboratórios (KRUIVE *et al.*, 2015b). A incerteza de medição é o critério mais importante tanto na validação do método quanto para a acreditação internacional (TAVERNIERS *et al.*, 2004a). Um resultado analítico deve sempre ser acompanhado de uma indicação de incerteza, sendo um indicador determinante tanto para a finalidade de um método como para a constatação de confiabilidade dos resultados analíticos alcançados em um laboratório (TAVERNIERS *et al.*, 2004b). Mesmo tratado como parâmetro analítico, a incerteza de medição atingiu uma média histórica de 8,91 %.

Afirma-se que para determinar a incerteza de medição é necessário o auxílio de um especialista familiarizado com as recomendações de sistemas de acreditação e implementação dos guias (ARAUJO, 2009). No entanto, não é possível por meio da presente revisão ser assertivo que a baixa frequência de estimativa de incerteza de medição dos métodos ocorra devido à ausência de especialistas durante a validação dos métodos analíticos.

O parâmetro de aplicabilidade foi um dos menos frequentes dentro dos trabalhos de validação. A comprovação desse parâmetro, seguindo as orientações de THOMPSON *et al.* (2002), depende da comprovação de diversos parâmetros em adição à publicação do protocolo de análise completo incluindo equipamentos, reagentes, configurações e escopo. A comprovação de aplicabilidade está fortemente associada com a incerteza de medição do método. Como disposto na **Tabela 11**, as frequências de análise de incerteza de medição e aplicabilidade se assemelham, demonstrando que a incerteza é um forte limitante para a conclusão de aplicabilidade nos termos descritos por THOMPSON *et al.* (2002). Geralmente, o termo aplicabilidade tem sido utilizado no sentido de execução, ou seja, colocar em prática o método recém validado para examinar amostrar reais, a título de monitoramento ou fiscalização de amostras. Isso descaracterizou o termo em relação ao estipulado por THOMPSON *et al.* (2002), o que pode ter feito com que a maioria dos outros guias não mais adotassem tal parâmetro. No entanto, como dito anteriormente no **item 5.2**, a execução completa dos demais guias de validação leva o método a apresentar as condições necessárias para que esse seja enquadrado dentro do parâmetro em questão.

O parâmetro de robustez, assim como está descrito na própria definição, avalia pequenas modificações em torno dos pontos críticos do método. Tal aspecto fundamenta a diferença que há entre robustez e otimização do método, visto que o primeiro analisa variações restritas enquanto o segundo avalia modificações mais abrangentes (GONZÁLEZ & HERRADOR, 2007). A robustez é o parâmetro menos frequente na série histórica revisada. A análise dos fatores críticos para a avaliação da robustez pode ser por metodologias clássicas e multivariados, como a abordagem de um fator por vez ou em um design fatorial como é proposto pelos

procedimentos de Youden ou Plackett-Burman (ARAUJO, 2009; NATA 2013; INMETRO, 2016).

Porém, nem todo método a nível intralaboratorial necessita de um estudo de robustez (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014). Afirma-se que a validação total não deve necessariamente incluir testes de robustez, apesar da avaliação desse parâmetro trazer alguma utilidade durante a fase de desenvolvimento / pré-validação do método, pois os problemas que podem ocorrer durante a validação são frequentemente detectados antecipadamente. A robustez deveria ser testada na eventualidade de transferência do método para outro laboratório (TIWARI & TIWARI, 2010).

Em uma revisão parcial de literatura de validação de métodos bioanalíticos, GONZÁLEZ *et al.* (2014), encontraram uma taxa de estudo de robustez de aproximadamente 20,0 %, enquanto a revisão em questão encontrou uma taxa dentro da média histórica de 4,92 %. Muitos autores segundo GONZÁLEZ *et al.* (2014), afirmaram não ter estudado o parâmetro de robustez ou por ausência dele nos guias seguidos ou por terem agregado o parâmetro ao estudo de reprodutibilidade de forma superficial. No caso dos guias comparados, a robustez é discutida em todos eles. No entanto, o “caráter opcional” atribuído à robustez para validações intralaboratoriais, como consta no guia EURACHEM (MAGNUSSON & ÖRNEMARK, 2014), por exemplo, associada a semelhança entre robustez e precisão intermediária ajudam a entender a menor frequência de avaliação apresentada dentro da série histórica desse parâmetro.

Tempo e recursos financeiros são limitadores da robustez. Os testes de robustez geralmente são realizados em um estágio final da validação do método, provavelmente devido à relação entre os conceitos de robustez e reprodutibilidade do método, para os quais os estudos entre laboratórios são comumente realizados em fase final do processo de validação. No entanto, realizar um teste de robustez ao final do processo de validação envolve o risco de encontrar problemas no método ao final da validação, o que implica que ele deve ser reconstruído e revalidado (ZEAITER *et al.*, 2004; GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Com isso, tempo e dinheiro gastos para a validação do método podem ser limitadores para o estudo de robustez, principalmente em estudos cujo número de fatores críticos for maior. Idealmente, a

robustez deve ser investigada como parte da validação do método porque um método não está completo sem uma avaliação de sua confiabilidade no uso de rotina, mas, infelizmente, como foi observado, muitas vezes é diferido ou completamente ignorado, devido à natureza demorada do estudo (GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

A série histórica revisada teve início a partir da publicação de THOMPSON *et al.* (2002). Ao longo dos anos, guia harmonizado publicado pela IUPAC/ISO/AOAC permaneceu o mesmo, enquanto os demais guias foram sendo atualizados. Mesmo assim, pouca diferença é notada entre os guias analisados e, com isso, atribui-se no geral menor influência dos guias no comportamento das validações quantitativas, com exceção dos parâmetros de efeito de matriz e robustez. A necessidade de confiabilidade dos dados analíticos é enfatizada pelo fato de que os resultados da medição serão utilizados e poderão constituir a base para a tomada de decisões. Resultados não confiáveis trazem um alto risco de decisões incorretas e podem levar a custos mais altos, riscos para a saúde e práticas ilegais (TAVERNIERS *et al.*, 2004a).

### 5.3.2 Subgrupo – Técnica de determinação

O subgrupo de tratamento dos dados por meio do método analítico empregado na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos procurou avaliar se os métodos em si influenciam na escolha dos parâmetros estudados para a validação. A análise dos resultados obtidos demonstra certas tendências aplicadas para validação do processo (**Tabela 12**).

**Tabela 12.** Frequência dos parâmetros de validação propostos no guia harmonizado pela IUPAC/ISO/AOAC nos estudos revisados por técnica de determinação

	CL		CG		Outras técnicas		Imunoensaios	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Aplicabilidade	30	7,43	28	7,00	0	0,00	0	0,00
Efeitos de matriz	220	54,46	132	33,00	7	30,43	27	65,85
Faixa de validação	383	94,80	364	91,00	23	100,00	41	100,00
Incerteza de medição	41	10,15	41	10,25	1	4,35	0	0,00
Limite de detecção	309	76,49	286	71,50	19	82,61	35	85,37
Limite de quantificação	346	85,64	331	82,75	17	73,91	7	17,07
Linearidade	148	36,63	144	36,00	16	69,57	15	36,59
Precisão (repetibilidade)	396	98,02	389	97,25	22	95,65	38	92,68
Precisão (intermediária)	192	47,52	137	34,25	9	39,13	14	34,15
Robustez	30	7,43	15	3,75	0	0,00	0	0,00
Seletividade	391	96,78	360	90,00	22	95,65	41	100,00
Sensibilidade	202	50,00	168	42,00	18	78,26	16	39,02
Veracidade	397	98,27	388	97,00	23	100,00	40	97,56

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

CL: cromatografia líquida; CG: cromatografia gasosa; N: número de estudos.

É importante destacar primeiramente que, dentre os estudos recuperados que trazem métodos quantitativos (868 métodos), 92,62 % empregaram técnicas cromatográficas para determinação (46,54 % corresponderam à CL e 46,08 % à CG). Quarenta e nove estudos recuperados para a revisão validaram métodos que empregaram de CL e CG simultaneamente, o que explica o número de metodologias revisadas superior ao número de estudos recuperados. Outro aspecto importante a ser salientado diz respeito ao grupo de técnicas classificadas como “outras”. Essas foram agrupadas por se tratarem de técnicas inovadoras ou pouco convencionais que foram estudadas nos trabalhos recuperados para revisão poucas vezes e, por isso, deixariam a comparação com as demais técnicas pouco produtivas. Como exemplo podem ser citadas técnicas como voltametria, espectrofotometria e EM não acoplada a cromatógrafos.

Assim como foi observado na análise por ano, os dados de frequência dos parâmetros veracidade, precisão (repetibilidade), seletividade e faixa de validação

foram os maiores, atingindo marcas superiores a 90 % para todas as técnicas envolvidas.

A precisão intermediária é outro parâmetro cujo o método analítico pouco influenciou na avaliação. A baixa frequência de estudo da precisão intermediária apenas diz respeito a como ela deve ser estabelecida. A diferença mais significativa quanto à precisão intermediária corresponde ao período pelo qual esse parâmetro é avaliado. Enquanto alguns guias como o do INMETRO (2016) e o do NATA (2013) estimam que a precisão intermediária deve ser examinada por um período, outros guias, como o da ANVISA, estipulam que a precisão intermediária deve ser avaliada em pelo menos dois dias de análise. Com isso, entende-se que nesse aspecto não há um consenso, o que pode ser um dificultador da execução desse parâmetro. Mesmo assim, entende-se nesses guias que a precisão intermediária deve ser analisada através da variação dos dias de análise, podendo ser variados os analistas e os equipamentos. Seja por um longo período ou por apenas dois dias de análise, certo que a precisão intermediária tem sido bem menos frequente e merece atenção já que é um dos parâmetros aconselhados por todos os guias analisados.

Tanto a robustez quanto a incerteza de medição, parâmetros de menor frequência de estudo, ficaram pautados quase que exclusivamente para os métodos cromatográficos, a não ser por um método não usual que também realizou a incerteza de medição. Isso demonstra uma tendência inadequada em desconsiderar a importância da avaliação das variáveis intrínsecas e extrínsecas sobre o método, principalmente para validação de métodos imunológicos. Por consequência, a aplicabilidade também apresenta uma frequência de estudo por ser um parâmetro dependente de outros, inclusive da incerteza de medição. Por isso, a frequência do parâmetro de aplicabilidade se assemelha a incerteza de medição. Importante notar que a realização da incerteza de medição não garante a aplicabilidade do método, por conseguinte, uma vez que demais pontos devem ser contemplados como já foi discutido.

Para a robustez cromatográfica, todos os compostos de interesse, incluindo os componentes em branco da amostra, devem estar presentes ao avaliar o efeito da modificação dos parâmetros cromatográficos. Para um método de impureza

construído em CLAE, isso pode incluir uma preparação de amostra com as impurezas conhecidas disponíveis ao seu nível de especificação ou, alternativamente, uma solução de amostra degradada forçada pode ser utilizada (TIWARI & TIWARI, 2010). Já para métodos imunológicos, por exemplo, fatores comuns a serem avaliados na robustez dizem respeito a mudanças em lotes de placas de microtitulação, tempos de incubação, temperatura, número de placas por corrida, lote de reagente e concentrações, ou instrumentação (SHANKAR *et al.*, 2008). Em vista da igualdade de tratamento que o parâmetro robustez recebe independente da metodologia aplicada, as implicações na execução de seu estudo em meio a validação é a mesma já abordada na análise do sub-grupo de revisão por ano.

Se as frequências de estudo de alguns parâmetros pouco variam com a metodologia aplicada na determinação dos resíduos de agrotóxicos, outros demonstraram uma tendência de acordo com o método analítico validado. O primeiro parâmetro que demonstra certas tendências na validação de cada tipo de método é o efeito de matriz. Esse parâmetro é um parâmetro especificamente relacionado aos métodos de espectrometria de massas (GONZÁLEZ *et al.*, 2014). A alta sensibilidade e seletividade da técnica de MS, especialmente quando acoplada a cromatografia líquida e utilizada em linha (CL-EM/EM), levou a uma tendência crescente em métodos com pouca ou nenhuma preparação de amostra e separação cromatográfica mínima. Mas mesmo com a alta seletividade dos métodos de CL-EM/EM não eliminam completamente os problemas causados pelos compostos de encolhimento. Com técnicas menos seletivas, como a detecção fotométrica, esses compostos geralmente podem ser detectados visualmente, pois aparecem como picos causando uma interferência, enquanto que em CL-EM podem não estar visíveis na relação massa/carga ou transição monitorada, mas ainda modificar o sinal do analito de interesse, suprimindo ou melhorando. O uso de detectores de massas em vez de outras técnicas menos seletivas, como a detecção fotométrica ou eletroquímica, especialmente quando usado no modo de monitoramento de múltiplos resíduos (MMR), reduz o problema de seletividade, mas é suscetível a complicações de efeito de matriz. Embora o efeito de matriz seja característico da detecção de massas independentemente da técnica utilizada para a separação, é mais frequente a análise do efeito de matriz em cromatografia líquida que em outras técnicas, como

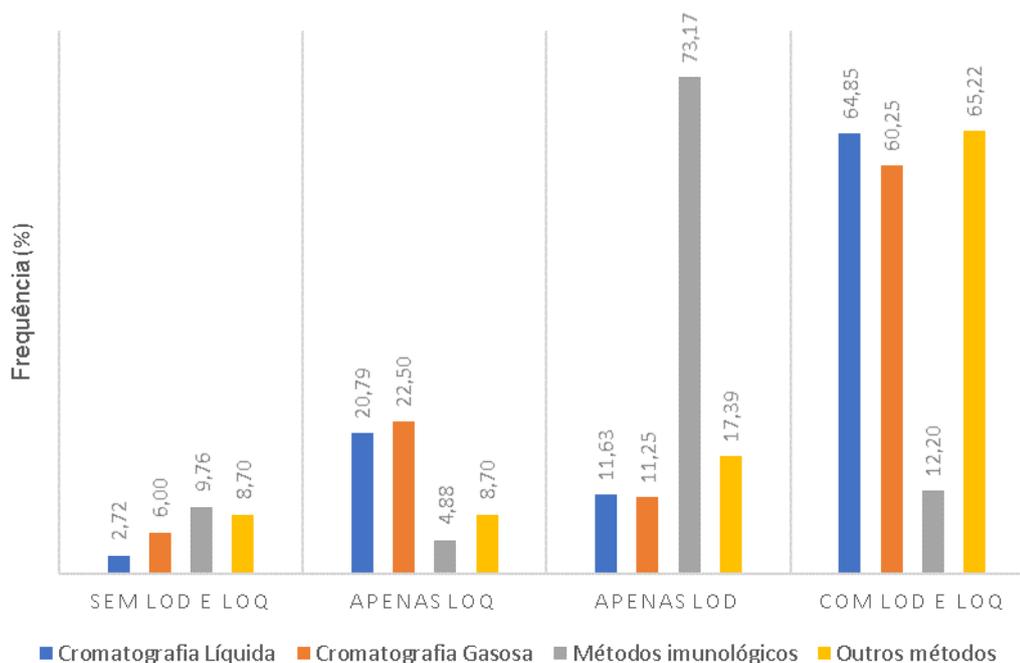
a análise de cromatografia em fase gasosa, sendo geralmente negligenciada quando a cromatografia gasosa é utilizada (NÚÑEZ *et al.*, 2013; GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Esse dado é congruente com os achados da revisão quando se compara os métodos de cromatografia líquida e gasosa.

A frequência de avaliação da linearidade presente na **Tabela 12** também demonstra algumas particularidades em relação ao método aplicado. Para a comparação dos métodos, foi utilizado o critério intermediário de aceitação da linearidade, correspondente a exigência do coeficiente de correlação e da equação, isso porque o critério previsto nos guias se aproximou de zero para qualquer das metodologias, inviabilizando a comparação. Enquanto os métodos cromatográficos se apoiam mais na publicação do coeficiente de correlação, os métodos imunológicos tendem a representar a linearidade através da ilustração gráfica da curva de calibração sem publicar a equação linear da faixa validada. Os métodos menos usuais demonstraram maior preocupação com a publicação da equação que define a resposta do método. Acredita-se que para os métodos menos usuais a análise completa da linearidade do método é uma boa ferramenta para enfatizar a qualidade da proposta analítica validada, o que a torna mais frequentemente estudada dentro desse grupo.

Os limites de quantificação e de detecção também demonstraram tendências na condução da validação de diferentes tipos de metodologia analítica. Como representado na **Figura 17** mais de 60,0% dos métodos quantitativos baseados em técnicas cromatográficas ou em outras menos usuais como espectrofotometria e fluorescência avaliam tanto os limites de detecção quanto o de quantificação. Enquanto isso, os métodos imunológicos se concentram na obtenção do limite de detecção. A obtenção dos limites de detecção e de quantificação são principalmente importantes para as metodologias que determinam compostos em baixas concentrações ou em concentrações traços (BOŽOVIĆ & KULASINGAM, 2013), como no caso da determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Os limites de detecção devem ser determinados apenas para métodos de impureza, mas não para métodos de ensaio. Já o limite de quantificação é irrelevante para métodos de ensaio, mas, para os testes de impureza e análise de rastreio, o limite de quantificação é representado pelo ponto inferior da faixa de validação calibrada na

linearidade (GONZÁLEZ & HERRADOR, 2007). Para métodos analíticos em que o limite de detecção não está imerso na faixa de concentração de analito validada, é necessário estimar apenas que é suficientemente baixo, mas sem necessidade de estabelecimento de um valor (THOMPSON *et al.*, 2002; KRUIVE, 2015a). Mesmo encontrando que algumas referências e guias demonstram que o limite de detecção não necessariamente é um parâmetro obrigatório para métodos quantitativos, percebe-se que ele ainda é um parâmetro considerado (**Figura 17**).

**Figura 17.** Agrupamento dos estudos revisados de acordo com a avaliação dos limites de detecção e de quantificação.



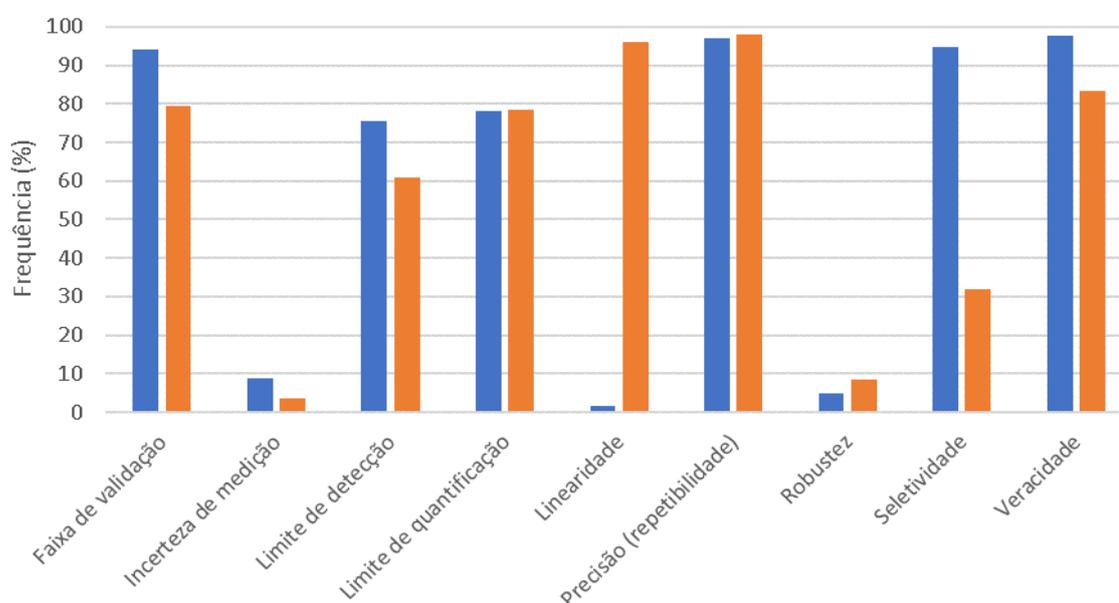
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Para métodos imunológicos, o desempenho do ensaio inicial é avaliado usando as recomendações do fabricante para verificar as especificações do kit. No entanto, tem-se atribuído em tais recomendações que o limite de detecção é

parâmetro capaz de descrever a sensibilidade do ensaio. Esse erro de conceito é frequentemente encontrado (LEE, 2006), sendo também evidenciado para o limite de quantificação (GONZÁLEZ *et al.*, 2014). A propagação da correlação direta entre sensibilidade e os limites foi bastante observada na revisão e é o fator mais relevante para explicar a alta frequência de avaliação dos limites de detecção e quantificação em relação à sensibilidade.

RUIZ-ANGEL *et al.* (2014) realizou uma revisão de literatura sobre trabalhos que trataram da validação intralaboratorial de métodos analíticos baseados em CL entre os anos de 2004 e 2013. Os resultados encontrados foram bastante consistentes com os achados por esta revisão para a referida técnica de determinação, demonstrando uma tendência dos métodos baseados em CL (**Figura 18**).

**Figura 18.** Comparação entre os resultados observados na presente dissertação e aqueles reportados por RUIZ-ANGEL *et al.* (2014).



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Azul: presente dissertação; laranja: RUIZ-ANGEL *et al.* (2014)

As duas revisões encontraram como parâmetros menos estudados a incerteza de medição e a robustez. Na revisão de RUIZ-ANGEL *et al.* (2014), foram separadas as frequências de robustez intrínseca e extrínseca. Como já foi dito anteriormente, a robustez extrínseca se assemelha as exigências e conceitos atribuídos para a precisão intermediária. Assumindo esse posicionamento, as frequências para robustez e incerteza de medição são as menores em ambas revisões.

Chama a atenção entre as duas revisões a diferença encontrada para os parâmetros de seletividade e linearidade. No entanto, na revisão de literatura desenvolvida por RUIZ-ANGEL *et al.* (2014), não foram especificados os critérios de aceitação para quantificação das frequências desses parâmetros.

A frequência observada para a linearidade se aproxima do achado por RUIZ-ANGEL *et al.* (2014) quando o critério de aceitação para o parâmetro é o coeficiente de correlação apenas. Caso a linearidade seja aceita por meio da publicação da equação, significância da regressão e análise de resíduos, as frequências observadas nas duas revisões se diferenciam drasticamente.

Para a seletividade também não foram descritos o critério de aceitação, assim como houve para RUIZ-ANGEL *et al.* (2014) a separação entre seletividade e especificidade. Caso a frequência dos dois parâmetros seja somada, acaba se aproximando da frequência de seletividade encontrada nesta revisão. Trata-se, provavelmente, de uma questão de terminologia, visto que muitos autores e mesmo guias de validação continuam atribuindo o termo especificidade para o parâmetro seletividade à revelia da recomendação da IUPAC de que o termo especificidade é equivocado e deve ser evitado para tratar da capacidade do método de identificar o analito na presença de compostos de comportamento similar (VESSMAN *et al.*, 2001).

Cumprir destacar uma diferença de critério de inclusão, quanto à veracidade, pois na revisão de RUIZ-ANGEL *et al.* (2014), veracidade e recuperação foram tratadas separadamente, enquanto nesta revisão foram agrupadas devido ao perfil de recomendação dos guias. Além disso, acurácia e veracidade também foram

tratados por RUIZ-ANGEL *et al.* (2014) como parâmetros diferentes, mas tiveram suas frequências somadas pela observação do intercâmbio dos termos nos estudos.

Por fim, a precisão foi parâmetro bastante frequente em ambas as revisões. No entanto, RUIZ-ANGEL *et al.* (2014) não especificou se a precisão catalogada consistiu apenas da repetibilidade ou se agrupou as precisões em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Fato que as frequências foram bem próximas, por se tratar de um parâmetro fundamental para a metodologia analítica.

De forma geral, em ambas as revisões foram evidenciadas tendências nas validações de metodologias analíticas baseadas em CL, independente do campo de estudo, sendo possível que tais tendências sejam observadas também para as outras técnicas.

Tanto em relação aos guias quanto a demais referências existentes sobre o tema validação, nada determina que haja diferença no processo de validação em relação à técnica de determinação adotada para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. No entanto, certas tendências adquiridas estão se propagando pela comunidade científica, o que certamente prejudica a reprodutibilidade e a confiabilidade dos métodos publicados.

Quando um método completamente validado (em um ensaio interlaboratorial ou colaborativo) anteriormente de acordo com um protocolo internacional é instaurado em um laboratório, esse não precisa realizar extensos estudos de validação internos. Fica a cargo desse laboratório verificar apenas que pode atingir as mesmas características de desempenho descritas no estudo colaborativo para o método, incluindo estudos de precisão, veracidade e linearidade, podendo ser omitido o estudo de robustez. Da mesma forma, é necessária uma validação limitada nos casos em que será realizada uma extensão de escopo analítico a um método totalmente validado; um método bem estabelecido, mas não validado em âmbito interlaboratorial; e um método cientificamente publicado com todas as características dadas. É necessária uma validação mais profunda para os métodos publicados na literatura como métodos de validação, sem a totalidade dos dados característicos e para métodos desenvolvidos por laboratórios para utilização interna. No entanto, isso não desqualifica as validações intralaboratoriais, que são fontes valiosas de dados

utilizáveis para demonstrar a finalidade e confiabilidade de um método analítico (WOOD, 1999; THOMPSON *et al.*, 2002; TAVERNIERS *et al.*, 2004b). É necessário atender aos padrões regulatórios atuais. Da melhoria de método para uma remodelação completa e posterior implementação é preciso estar atento às tendências atuais nas diretrizes regulatórias e adotar uma abordagem proativa das mudanças que podem afetar os programas de desenvolvimento e validação de metodologias analíticas (BELOUFA *et al.*, 2017).

## 5.4 Análise dos estudos de métodos qualitativos

### 5.4.1 Sub-grupo – Técnicas de detecção

Os métodos qualitativos recuperados predominantemente corresponderam às técnicas cromatográficas. Outros dois métodos distintos da técnica cromatográfica foram agrupados em um terceiro conjunto de dados.

Os parâmetros mais abordados nos guias, sensibilidade e limite de detecção, apresentaram maiores frequências de estudo em relação aos demais, seguidos pela seletividade e taxas de falsos resultados. Isso indicou que a ausência dos demais parâmetros de validação nos guias comparados de fato constituiu um fator limitante para a frequência de avaliação (**Tabela 13**).

A frequência de estudo de seletividade foi inferior à apresentada pela sensibilidade. A ausência do parâmetro seletividade em alguns guias figura um primeiro aspecto a ser considerado, uma vez que a falta de uma definição e critérios de aceitação para o referido parâmetro são aspectos que podem influenciar autores de métodos qualitativos a não considerarem esse parâmetro durante a validação.

Ao se tratar da detecção de um analito próximo ao limite de detecção, deve-se considerar a possibilidade de resultados falsos positivos e falsos negativos. A maneira comum de interpretar os dados do limite de detecção cuida de evitar falsos positivos, mas tolera falsos negativos. Se um pico que poderia pertencer ao analito

esteja lá, mas o cálculo obtém um valor abaixo do limite, então não é possível declarar de forma confiável que o analito foi detectado (e o resultado deve ser relatado como "abaixo do limite de detecção"), porque na realidade o analito pode estar presente, mas em uma concentração muito baixa. A explicação dessa particularidade sobre o limite de detecção não está incluída nas diretrizes de validação (KRUIVE *et al.*, 2015a).

A região de perda de confiabilidade foi descrita inicialmente como uma abordagem próxima ao conceito de incerteza de medição abordado para métodos quantitativos, uma vez que esse parâmetro quantitativo não cabe para metodologias qualitativas. São parâmetros similares, mas não são equivalentes. A região de perda de confiabilidade é onde os erros estão alocados, enquanto o intervalo de incerteza estabelece uma faixa onde os resultados são esperados aplicando o método à mesma amostra  $n$  vezes. (MIL'MAN & KONOPEL'KO, 2004; CÁRDENAS & VALCÁRCEL, 2005; GONDIM *et al.*, 2014). Comparando as frequências obtidas para métodos quantitativos e qualitativos, percebe-se que os autores de métodos qualitativos são mais preocupados com a estimativa da incerteza, mas não o suficiente para tornar a região de perda de confiabilidade em um dos parâmetros mais frequentes na validação de métodos qualitativos. Ainda assim, é importante observar que apenas um dos artigos reportou de forma explícita que analisou o parâmetro de região de perda de confiabilidade. Os demais estudos que preencheram os requisitos de análise desse parâmetro adotados no presente estudo, estimativa do limite de detecção e cut-off, não citaram em nenhum momento que de fato estavam visando alcançar esse objetivo.

**Tabela 13.** Frequência dos parâmetros de validação propostos no guia do FDA nos estudos revisados por técnica de detecção

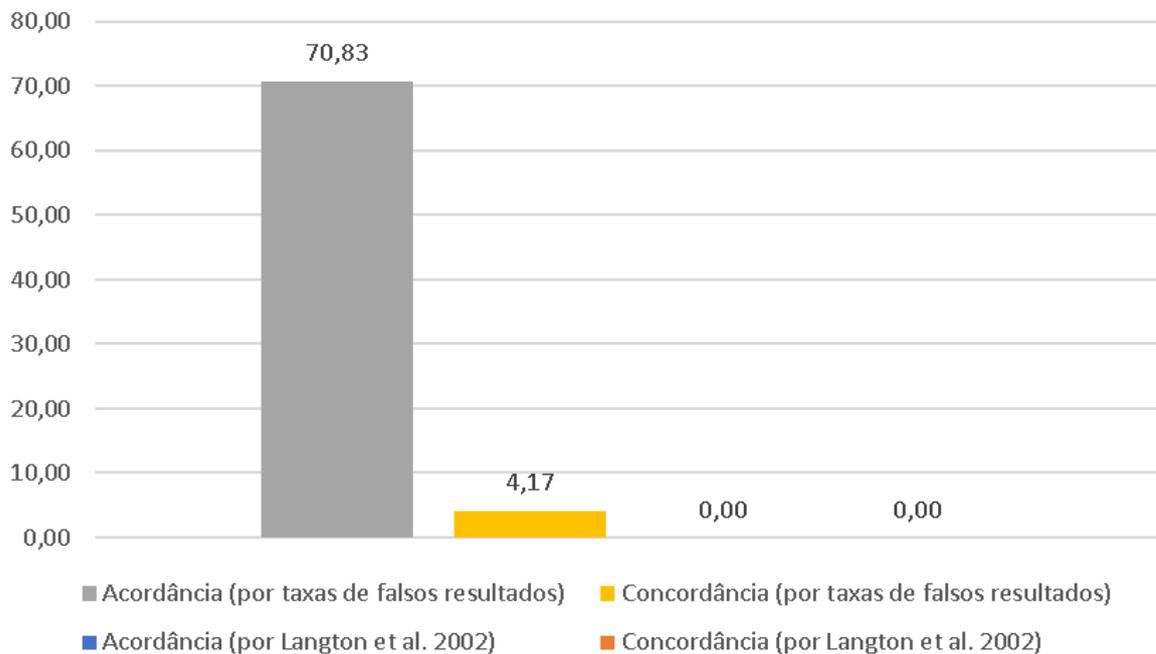
	CL		CG		Outros Métodos	
	N	%	N	%	N	%
Sensibilidade	9	81,82	11	100,00	2	100,00
Especificidade	8	72,73	8	72,73	1	50,00
Taxa de falso positivo	8	72,73	8	72,73	1	50,00
Taxa de falso negativo	9	81,82	11	100,00	2	100,00
Limite de detecção	10	90,91	10	90,91	2	100,00
Robustez	0	0,00	1	9,09	0	0,00
Precisão (repetibilidade por taxas de falso resultado)	8	72,73	8	72,73	1	50,00
Precisão (precisão intermediária por taxas de falso resultado)	1	9,09	0	0,00	0	0,00
Acordância (repetibilidade)	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Concordância (intermediária)	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Região de perda de confiabilidade	4	36,36	5	45,45	0	0,00
<b>TOTAL</b>	11	-	11	-	2	-

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

CL: cromatografia líquida; CG: cromatografia gasosa; N: número de estudos.

A precisão, no caso dos métodos qualitativos, foi o parâmetro para o qual foi evidenciada maior variabilidade em relação aos guias e definições encontradas na literatura. Os principais documentos de referência em validação de métodos ainda não incorporaram o estudo de tal parâmetro, muitas vezes atrelando a avaliação do parâmetro precisão às taxas de falsos resultados, o que impactou diretamente na frequência dos mesmos nos artigos analisados. No entanto, uma vez que os resultados positivos e negativos corretamente reportados se relacionam mais com a obtenção dos parâmetros de sensibilidade e seletividade, e as das taxas de falsos resultados estão atreladas à veracidade (GONDIM et al., 2011). Adotando a abordagem de Langton *et al.* (2002), percebeu-se que a precisão, definida pelos autores como acordância e concordância, se tornaram os parâmetros menos frequentes do estudo, por atingirem a frequência de zero (**Figura 19**).

**Figura 19.** Comparação das frequências de acordância e concordância pelas abordagens dos guias e de Langton *et al.* (2002).



A robustez foi também um parâmetro muito pouco estudado para os métodos qualitativos, assim como para os métodos quantitativos. Para a robustez, um paralelo entre as validações quantitativas e qualitativas pôde ser traçado, uma vez que esse parâmetro não se diferencia em nada para qual seja o objetivo do método, quantificar ou identificar. O aspecto financeiro discutido anteriormente para justificar o cenário observado para a robustez nas validações de métodos quantitativos pode ser também para os métodos qualitativos, uma vez que o princípio do parâmetro é o mesmo para ambos os tipos de métodos.

Ao comparar os métodos em relação aos processos qualitativos, diferentemente do que foi constatado para os métodos quantitativos, não há uma tendência clara para qualquer das práticas. No caso da validação qualitativa, as características apresentadas pelos guias são bem mais influentes no comportamento dos autores do que propriamente a natureza do método de determinação escolhido.

A revisão não permitiu, e nem intencionou, desclassificar a informação obtida sobre as validações intralaboratoriais de métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Os resultados demonstraram que apesar do aumento significativo das referências e guias sobre validação intralaboratorial, ainda há um caminho longo a ser percorrido para alcançar a harmonização dos dados gerados na literatura científica.

No passado, os autores geralmente não seguiam nenhuma orientação para validar seus resultados. Eles apenas aplicavam a lógica e avaliaram alguns parâmetros, como linearidade, veracidade, precisão e limites, mas sem seguir nenhum critério específico ou apenas seguindo o que outros autores fizeram, fato que aumentou a variabilidade dos estudos. Hoje em dia, a maioria dos autores tende a meticulosamente seguir diretrizes para validar seus métodos. Isso permite comparar os resultados de vários autores com mais facilidade. No entanto, como no passado, ainda é possível encontrar alguns autores que não seguem nenhum protocolo de validação. Os critérios de validação nem sempre são aplicados com o mesmo rigor. Alguns pesquisadores validaram completamente seus métodos, mas outros avaliaram apenas alguns parâmetros de desempenho (RUIZ-ANGEL, 2014).

## 6 CONCLUSÕES

O propósito da revisão sistemática foi responder à questão: As análises validadas em estudos de resíduos de agrotóxicos em alimentos seguem as recomendações dos guias oficiais de validação de métodos analíticos? E a resposta para essa pergunta foi não.

O perfil identificado pela revisão sistemática demonstrou que a comunidade científica tem dado preferência para técnicas manuais, incluindo a técnica QuEChERS na etapa de extração de resíduos de agrotóxicos de matrizes alimentares por se tratarem de técnicas mais acessíveis em termos de custo, instalação e aplicabilidade. Em relação às técnicas de detecção/determinação as escolhas primordiais corresponderam às técnicas cromatográficas, principalmente acopladas a espectrômetros de massas. No entanto, embora as técnicas empregadas sejam capazes de analisar, simultaneamente, mais de 100 analitos, identificou-se que ainda há limitações a respeito dos métodos desenvolvidos, uma vez que esses são validados em sua maioria para de 2 a 20 resíduos de agrotóxicos em 1 a 5 matrizes alimentares.

Em relação às análises quantitativas de resíduos de agrotóxicos em alimentos foram evidenciadas tendências para certos parâmetros no que diz respeito a aspectos conceituais e práticos. Foi possível identificar desacordos entre os principais guias no que diz respeito aos efeitos de matriz, seletividade, sensibilidade e linearidade. Alguns parâmetros foram mais valorizados ou estudados do que outros, com predomínio dos parâmetros de veracidade e precisão em termos de repetibilidade em detrimento dos parâmetros de incerteza de medição, aplicabilidade e robustez, independentemente da técnica analítica empregada. Isso prejudica a uniformidade dos estudos disponíveis na literatura, dificultando possíveis reproduções ou comparações. Com base nos resultados observados, conclui-se que o guia harmonizado pela IUPAC/ISO/AOAC (THOMPSON *et al.*, 2002), embora não seja periodicamente revisto, constituiu a referência de escolha para a validação de métodos quantitativos por se tratar de um documento específico para processos de

validação intralaboratorial construído por entidades referência no campo da química analítica e por abordar com a devida profundidade quase todos os aspectos relativos a essa prática, deixando a desejar apenas no que diz respeito ao LOQ.

Já para os métodos qualitativos, os guias se tornaram uma variável mais significativa do que as técnicas de detecção. A variabilidade sobre quais e como os parâmetros de desempenho devem ser estudados no caso dos métodos qualitativos foi considerada como o fator preponderante para justificar a falta de padronização observada, tornando a validação de métodos qualitativos algo intuitivo. Desta forma, o guia da FDA (2015) foi considerado como alternativa mais completa para validação de métodos qualitativos. Assim como foi para métodos quantitativos, os parâmetros de robustez e incerteza, representada pela região de perda de confiabilidade, estavam entre os parâmetros menos estudados. Embora a precisão tenha sido destacada, neste caso, como parâmetro menos avaliado. Os parâmetros mais frequentes nas validações qualitativas foram a sensibilidade e o LOD.

Entendeu-se que há aspectos relativos a validação de metodologias dentro das áreas de controle e garantia da qualidade que precisam ser resolvidos para que os estudos sobre validação de métodos analíticos de resíduos de agrotóxicos em alimentos sejam mais coesos e harmonizados. Isso permitirá a comunidade científica um maior entendimento da relação das tecnologias atuais no campo das análises de alimentos, identificando as técnicas mais promissoras e eficientes para a análise de agrotóxicos por meio de procedimentos sistematizados e objetivos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULRA'UF, L. B.; HAMMED, W. A.; TAN, G. H.; SPME fibers for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 42, n. 2, p. 152-161, 2012.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISO 9000. Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário, 2005. 35 p. (b)

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2ª ed., 2005. 31 p. (a).

ABU-SAMRA, A.; MORRIS, J.S.; KOIRTYOHANN, S.R.; Wet Ashing of Some Biological Samples in a Microwave Oven; *Analytical Chemistry*, VOL. 47, NO. 8, julho, 1975.

ADAWAY, J. E.; KEEVIL, B. G.; OWEN, L. J.; Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Annals of clinical biochemistry*, 52(1), 18-38; 2015.

AGROFIT (Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários); Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS, Brasil; disponível em [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons); acessado em 14 de fevereiro de 2018.

AKTAR, M.W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A.; Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards; *Interdisc Toxicol.*, Vol. 2(1): 1–12; 2009.

ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J.; World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. Rome, FAO: ESA Working paper, 2012.

AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I.; PALLESCI, G.; Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(8), 1405-1423; 2006.

ANAGNOSTOPOULOS; C.J.; SARLI, P.A.; LIAPIS, K.; HAROUTOUNIAN, S.A.; MILIADIS, G.E.; Validation of Two Variations of the QuEChERS Method for the Determination of Multiclass Pesticide Residues in Cereal-Based Infant Foods by LC-MS/MS; *Food Anal. Methods*, 5:664-683; 2012.

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, p. 412-431, 2003.

ANDREASSON, U. et al. A practical guide to immunoassay method validation. *Frontiers in neurology*, v. 6, 2015.

ANNESLEY, T. M.; Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 49(7), 1041-1044; 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2011 e 2012. Brasília, 44 p. 2013.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012. Brasília, 32 p. 2014.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); Perfil Analítico Da Rede Nacional De Laboratórios De Vigilância Sanitária; disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33860/266831/Rede+Nacional+de+Laborat%C3%B3rios+da+Vigil%C3%A2ncia+Sanit%C3%A1ria+por+perfil+anal%C3%ADtico/2819dd39-4f87-48d7-97fa-78225e1ba08b>; acessado em 16 de março de 2018.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2013 e 2015. Brasília, 2016 (b).

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 Referência: Relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA de 2013 a 2015; Gerência-Geral de Toxicologia – GGTOX; Brasília, 2017.

ARAUJO, P.; Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of chromatography B*, 877(23), 2224-2234; 2009.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M.; Green Analytical Chemistry; *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 6, 2008.

ASUERO, A. G., SAYAGO, A., & GONZALEZ, A. G.; The correlation coefficient: An overview. *Critical reviews in analytical chemistry*, 36(1), 41-59; 2006.

AUSTRALIA, Australian Pesticides and Veterinary Authority (APVMA); Acceptable Daily Intakes (ADI) for Agricultural and Veterinary Chemicals Used in Food Producing Crops or Animals; Edition 1 / 2017 current as of 31 March 2017.

AWAD, H.; KHAMIS, M. M.; EL-ANEED, A.; Mass spectrometry, review of the basics: ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 50, n. 2, p. 158-175, 2015.

AYSAL, P.; AMBRUS, A.; LEHOTAY, S.J.; CANNAPAN, A.; Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction.; *Journal of Environmental Science and Health Part B* 42, 481–490, 2007.

BANSAL, S., & DE STEFANO, A.; Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. *The AAPS journal*, 9(1), E109-E114.; 2007.

BARBA, F. J., ZHU, Z., KOUBAA, M., SANT'ANA, A. S., & ORLIEN, V.; Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 96-109; 2016.

BELOUAFI, S.; HABTI, F.; BENHAR, S.; BELAFKIH, B.; TAYANE, S.; HAMDOUN, S.; BENNAMARA, A.; ABOURRICHE, A.; Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples. *International Journal of Metrology and Quality Engineering*, 8, 9; 2017.

BOOBIS, A.R.; OSSENDORP, B.C.; BANASIAK, U.; HAMEY, P.Y., SEBESTIEN, I.; MORETTO, A.; Cumulative risk assessment of pesticide residues in food; *Toxicology Letters* 180, 137–150; 2008.

BOŽOVIĆ, A.; KULASINGAM, V.; Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: From small molecules to proteins. *Clinical biochemistry*, v. 46, n. 6, p. 444-455, 2013.

BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J.A.; A Química dos Agrotóxicos; *Química Nova Na Escola*, vol. 34, nº 1, p. 10-15, fevereiro 2012.

BRASIL.; Ministério da Agricultura e do Abastecimento; Portaria SNVS nº 03, 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 09/12/91".

BRASIL; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA N.º 42, de 31 de Dezembro de 2008. Institui o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal. *Diário Oficial da União*. Brasília, 05 de janeiro, Seção 1, p. 2. 2009.

BRASIL; Presidência da República Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos; 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* de 08/01/2002, Seção 1, Página 1.

BRASIL; Presidência da República Casa Civil, Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional; *Brasileiros consomem 7 litros de agrotóxicos por ano, revela a revista Problemas Brasileiros*; disponível em <http://www4.planalto.gov.br/consea/comunicacao/noticias/2017/abril/brasileiros-consomem-7-litros-de-agrotoxicos-por-ano-revela-pesquisa>; acessado em 01 de março de 2018.

BRASIL; Presidência da República Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos; Decreto Nº 6.913, de 23 de julho de 2009. Acresce dispositivos ao Decreto no 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que 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; Diário Oficial da União - Seção 1 - 24/7/2009, Página 8 (Publicação Original).

BROOME, M. E.; Integrative literature reviews for the development of concepts. Concept development in nursing: foundations, techniques and applications. Philadelphia: WB Saunders Company, p. 231-50, 2000.

CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M.; Analytical features in qualitative analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 24(6), 477-487; 2005.

CARNEIRO, F. F. (Org.); Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde / Organização de Fernando Ferreira Carneiro, Lia Giraldo da Silva Augusto, Raquel Maria Rigotto, Karen Friedrich e André Campos Búrigo. - Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; MEULLEMIESTRE, A.; TURK, M.; PERINO, S.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M.; Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 41, 357-377; 2017.

CHEN, X. Development and validation of a method for the determination of 159 pesticide residues in tobacco by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, v. 61, p. 5746-5757, 2013.

CODEX Alimentarius; *Principles And Guidance On The Selection Of Representative Commodities For The Extrapolation Of Maximum Residue Limits For Pesticides To Commodity Groups*; disponível em [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/fr/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2BGL%2B84-2012%252FCXG\\_084e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/fr/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2BGL%2B84-2012%252FCXG_084e.pdf); acessado em 17 de março de 2018.

CORDEIRO, A. M.; DE OLIVEIRA, G. M.; RENTERÍA–TCBC-RJ, J. M.; GUIMARÃES–TCBC-RJ, C. A.; Revisão sistemática: uma revisão narrativa; 2007.

COSKUN, O.; Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, v. 3, n. 2, p. 156, 2016.

COX, K.L.; DEVANARAYAN, V.; KRIAUCIUNAS A., et al.; Immunoassay Methods. 2012 May 1 [Updated 2014 Dec 24]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

CUARTERO, M.; GARCÍA, M. S.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; ORTUÑO, J. Á.; New approach for the potentiometric-enzymatic assay of reversible-competitive enzyme inhibitors. Application to acetylcholinesterase inhibitor galantamine and its determination in pharmaceuticals and human urine. *Talanta*, 110, 8-14; 2013.

DA SILVA, R.J.N.B.; DIAS, P.M.V.B.F.; CAMÕES, M.F.G.F.C.; Development and validation of a grouping method for pesticides analysed in foodstuffs; *Food Chemistry* 134, 2291–2302; 2012.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S.; Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9; 2013.

DE CASTRO, M.D.L.; JIMENEZ-CARMONA, M.M.; Where is supercritical fluid extraction going?; *trends in analytical chemistry*, vol. 19, no. 4, 2000.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 92, p. 115-176, 2014.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R.; Mass spectrometry and protein analysis. *science*, v. 312, n. 5771, p. 212-217, 2006.

DORKÓ, Z., VERBIĆ, T., & HORVAI, G.; Selectivity in analytical chemistry: Two interpretations for univariate methods. *Talanta*, 132, 680-684; 2015.

DINIZ, M. E. R.; Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas; 2011.

DZUMAN, Z.; ZACHARIASOVA, M.; VEPRIKOVA, Z.; GODULA, M.; HAJŠLOVA, J.; Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids; *Analytica Chimica Acta* 863, 29–40, 2015.

EC (European Commission. Directorate General for Health and Consumer Protection DG-SANCO). Safety of the food chain. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/12571/2013. 2014

EFSA (European Food Safety Authority); Application of systematic review methodology to food and feed safety assessments to support decision making; *EFSA Journal*, 2010; Disponível em: [http://lib.dr.iastate.edu/vdpam\\_pubs/30](http://lib.dr.iastate.edu/vdpam_pubs/30); Acessado em: 27 de agosto de 2016.

ECOBICHON, D.J.; Chapter 22, Toxic Effects of Pesticides; Presente em KLAASSEN, C. D., and AMDUR, M.O.; "Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons.", 6<sup>a</sup> ed., 2001.

ELLISON, S. L. R.; FEARN, T.; Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(6), 468-476; 2005.

EMONS, H. Method validation. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 6, n. 18, p. 457-458, 2013.

EPA (US Environmental Protection Agency); *Guidance for Identifying Pesticide Chemicals and Other Substances That Have a Common Mechanism of Toxicity*. January 29, 1999. Office of Pesticide Programmes, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, Washington, D.C. 1999; Disponível em: <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-1999-01-29/pdf/FR-1999-01-29.pdf>; Acessado em: 22 de setembro de 2016.

EPA (US Environmental Protection Agency); *Assessing Human Health Risk from Pesticides*; disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/assessing-human-health-risk-pesticides>; acessado em 05 de março de 2018.

ERCOLE, F. F.; MELO, L. S.; ALCOFORADO, C. L. G. C.; *Revisão Integrativa versus Revisão Sistemática*; *Rev Min Enferm.*, 18(1): 1-260, 2014.

ESKILSSON, C.S.; BJÖRKLUND, E.; *Analytical-scale microwave-assisted extraction*; *Journal of Chromatography A*, 902; 2000.

FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura); *Global Initiative on Food Loss and Waste Reduction*, 2015; Disponível em <http://www.fao.org/3/a-i4068e.pdf>; Acessado em 22 de setembro de 2016.

FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura); *Occurrence, sources and toxicological significance of pesticide residues in food grains*; Disponível em <http://www.fao.org/wairdocs/x5003e/X5003e02.htm>; Acessado em 27 de agosto de 2016.

FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura); *The State Of Food Security And Nutrition In The World 2017*; Building resilience for peace and food security. Rome, FAO; 2017.

FDA, US Department of Health and Human Services. Draft guidance for industry: bioanalytical method validation (Revised). [Online] September 2013. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>

FERNANDES, V. C.; DOMINGUES, V. F.; DELERUE-MATOS, C.; MATEUS, N.; Determination of pesticides in fruit and fruit juices by chromatographic methods. An overview. *Journal of chromatographic science*, 49(9), 715-730; 2011.

FERREIRA, M. M. C.; Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, v. 31, n. 1, 164-171, 2008.

FILHO, N. F.; NASCIMENTO, C. A.; FARIA, E. O.; CRUVINEL, A. R.; & OLIVEIRA, J. M.; Within-laboratory validation of a multiresidue method for the analysis of 98 pesticides in mango by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(4), 641-656; 2012.

GABRIEL, D.;SAIT, S. M.; KUNIN, W. E.; BENTON, T. G.; Food production vs. biodiversity: comparing organic and conventional agriculture; *Journal of Applied Ecology* 50, 355–364, 2013.

GAN, S. D.; PATEL, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*, v. 133, n. 9, p. e12, 2013.

GUILBAULT, G.G.; PRAVDA, M.; KREUZER, M.; O'SULLIVAN, C.K.; 'Biosensors—42 Years and Counting', *Analytical Letters*, 37:8, 1481 – 1496; 2004.

GODOY, R. C. B. de.; Agrotóxicos no Brasil [recurso eletrônico]: processo de registro, riscos à saúde e programas de monitoramento / Rossana Catie Bueno de Godoy, Maria Ionária de Oliveira. - Dados eletrônicos. - Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004.

GONDIM, C.S.; COELHO, O.A.M.; ALVARENGA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; SOUZA, S.V.C. An appropriate and systematized procedure for validating qualitative methods: Its application in the detection of sulfonamide residues in raw milk. *Analytica Chimica Acta*, v. 830, p. 11-22, 2014.

GONZÁLEZ, A. G., HERRADOR, M. Á.; A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(3), 227-238; 2007.

GONZÁLEZ, O., BLANCO, M. E., IRIARTE, G., BARTOLOMÉ, L., MAGUREGUI, M. I., & ALONSO, R. M; Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *Journal of Chromatography A*, 1353, 10-27; 2014.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERRERA-HERRERA, A. V.; GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á.; Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169-185; 2015.

HAGGARTY, J.; BURGESS, K. E.; Recent advances in liquid and gas chromatography methodology for extending coverage of the metabolome. *Current opinion in biotechnology*, 43, 77-85; 2017.

HEDRICK, J.L.; MULCAHEY, L.J.; TAYLOR, L.T.; Supercritical Fluid Extraction; Department of Chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia 24061, U.S.A; *Mikrochim. Acta* 108, 115-132, 1992.

HELLER, D. N.; Ruggedness testing of quantitative atmospheric pressure ionization mass spectrometry methods: the effect of co-injected matrix on matrix effects. *Rapid communications in mass spectrometry*, v. 21, n. 5, p. 644-652, 2007.

HERCEGOVA, A.; DOMOTOROVA, M.; MATISOVA, E.; Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination; *Journal of Chromatography A*, 1153, 54–73, 2007.

HIGGINS J. P. T.; GREEN, S.; Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Available from [www.cochrane-handbook.org](http://www.cochrane-handbook.org).

HINSHAW, J. V.; Solid-Phase Microextraction; Serveron Corp., Hillsboro, Oregon, EUA, 2003.

HSIEH, Y. H. P.; Immunoassays. In: Food Analysis. Springer US; p. 301-316, 2010.

ICH Harmonised Tripartite Guideline (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use) Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology; Disponível em : <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>; 2005.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia); DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos, Revisão 05, p. 19.; 2016.

IPARRAGUIRRE, A.; NAVARRO, P.; RODIL, R.; PRIETO, A.; OLIVARES, M.; ETXEBARRIA, N.; ZULOAGA, O.; Matrix effect during the membrane-assisted solvent extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in wastewater; Journal of Chromatography A, 1356, 163–170, 2014.

ISMAIL, B; NIELSEN, S.S; *Basic Principles of Chromatography*; IN: Nielsen, S. S. (4<sup>th</sup> Ed.). Food analysis. New York: Springer; 2010.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org>; created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>. Last update: 2014-02-24; version: 2.3.3; 2006.

JARDIM, I. C. S. F. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. Química Nova, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B.; Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, 20(5-6), 801-821; 2014.

JUNQUEIRA, R.G. – Notas de aula Poder de teste e tamanho amostral, baseado em Arango, H. G. *Bioestatística: teórica e computacional*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Belo Horizonte, Pós graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia, UFMG, setembro de 2016.

KATAOKA, H.; LORD, H.L.; PAWLISZYN, J.; Applications of solid-phase microextraction in food analysis; *Journal of Chromatography A*, 880, 2000.

KELLEY, M.; DESILVA, B.; Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules. *The AAPS journal*, v. 9, n. 2, p. E156-E163, 2007.

KHAN, K. S.; KUNZ, R.; KLEIJNEN, J.; ANTES, G.; Five steps to conducting a systematic review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 96(3), 118-121; 2003.

KHAW, K. Y.; PARAT, M. O.; SHAW, P. N.; FALCONER, J. R.; Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: a review. *Molecules*, 22(7), 1186; 2017.

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

KNEZ, Ž.; MARKOČIČ, E.; LEITGEB, M.; PRIMOŽIČ, M.; HRNČIČ, M. K.; ŠKERGET, M.; Industrial applications of supercritical fluids: A review. *Energy*, 77, 235-243; 2014.

KRUBE (a), A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; PEKKA, R.; LEITO, I.; Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica chimica acta*, v. 870, p. 29-44, 2015.

KRUBE (b), A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; PEKKA, R.; LEITO, I.; Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Analytica chimica acta*, 870, 8-28; 2015.

LANGTON S.D.; CHEVENNEMENT R.; NAGELKEKE N. A.; LOMBARD B.; Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: concordance and concordance; *Int J Food Microbiol* 79:171-181; 2002.

LEDOUX, M.; Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades; *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 1021-1036, 2011.

LEHOTAY, S.J.; US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Baltimore, EUA. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods; *Journal of Chromatography A*, 1997.

LEQUIN, R. M.; Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry*, v. 51, n. 12, p. 2415-2418, 2005.

LOPEZ, M. I.; CALLAO, M. P.; RUISÁNCHEZ, I.; A tutorial on the validation of qualitative methods: From the univariate to the multivariate approach. *Analytica chimica acta*, 891, 62-72; 2015.

LUTHRIA, D.; VINJAMOORI, D.; NOEL, K.; EZZELL, J.; Oil Extraction Analysis, Critical Issues and Comparative Studies; Chapter 3: Accelerated Solvent Extraction; 2004.

MACARTHUR, R.; HOLST, C. A protocol for the validation of qualitative methods of detection. *Analytical Methods*, v. 4, p. 2744-2754, 2012.

MACHADO, A. P. D. F.; PASQUEL-REÁTEGUI, J. L.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J.; Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*, 77, 675-683; 2015.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U.; The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics; 2014.

MAHER, S.; JJUNJU, F. P. M.; TAYLOR, S.; Colloquium: 100 years of mass spectrometry: Perspectives and future trends. *Reviews of Modern Physics*, v. 87, n. 1, p. 113, 2015.

MANDAL, V.; HEMELATHA, S.; Microwave Assisted Extraction - An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research; *Pharmacognosy Reviews* Vol 1, 2007.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento); Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC / Animal; disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>; acessado em 05 de março de 2018 (a).

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento); Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal; disponível em [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/copy\\_of\\_pncrc-vegetal](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/copy_of_pncrc-vegetal); acessado em 05 de março de 2018 (b).

MASIÁ, A.; SUAREZ-VARELA; M. M.; LLOPIS-GONZALEZ, A.; PICO, Y.; Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: a review. *Analytica chimica acta*, 936, 40-61; 2016.

MATAMOROS, V.; CALDERÓN-PRECIADO, D.; DOMÍNGUEZ, C.; & BAYONA, J. M.; Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review. *Analytica chimica acta*, 722, 8-20; 2012.

MAZOYER, M; História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea; Marcel Mazoyer, Laurence Roudart; [tradução de Cláudia F. Falluh Balduino Ferreira]; São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF: NEAD, 2010.

MCKENZIE, Fiona C.; WILLIAMS, John. Sustainable food production: constraints, challenges and choices by 2050. *Food Security*, v. 7, n. 2, p. 221-233, 2015.

MIL'MAN, B. L.; KONOPEL'KO, L. A. Uncertainty of qualitative chemical analysis: general methodology and binary test methods. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 59, n. 12, p. 1128-1141, 2004.

MOEDER, M.; BAUER, C.; POPP, P.; VAN PINXTEREN, M.; REEMTSMA, T.; Determination of pesticide residues in wine by membrane-assisted solvent extraction and high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(6), 1731-1741. 2012.

NATA (National Association of Testing Authorities); technical note 17 - 2013: Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods; Sidney, 2013.

NÚÑEZ, O., GALLART-AYALA, H., MARTINS, C. P., LUCCI, P., & BUSQUETS, R.; State-of-the-art in fast liquid chromatography–mass spectrometry for bio-analytical applications. *Journal of Chromatography B*, 927, 3-21; 2013.

ORWIN, R.G.; Evaluating coding decisions. In: Cooper H, Hedges LV (editors). *The Handbook of Research Synthesis*. New York (NY): Russell Sage Foundation, 1994.

PAVANELLI, S. P.; Degradação de corantes da indústria alimentícia por processos oxidativos e redutivos: monitoramento por espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS); 2010.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S.; Agrotóxicos, Saúde E Ambiente: Uma Introdução Ao Tema; 2003; Disponível em: [http://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/cap\\_01\\_veneno\\_ou\\_remedio.pdf](http://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/cap_01_veneno_ou_remedio.pdf); Acessado em 22 de setembro de 2016.

PERES, F.; Saúde, trabalho e ambiente no meio rural brasileiro. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 14, n. 6, 2009.

PERIS-VICENTE, J.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S.; Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: an overview. *Analytical Separation Science*, 2015.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, Frank. Validation of new methods. *Forensic science international*, v. 165, n. 2, p. 216-224, 2007.

PINGALI, P. L.; Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, v. 109, n. 31, p. 12302-12308, 2012.

POWERS, J. R. Application of enzymes in food analysis. In: Food Analysis. Springer US, 2010. p. 283-299.

PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R.; QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos; *Scientia Chromatographica*, 3(1):51-64. 2011.

PRIETO, A.; TELLERIA, O.; ETXEBARRIA, N.; FERNÁNDEZ, L. A.; USOBIAGA, A.; ZULOAGA, O.; Simultaneous preconcentration of a wide variety of organic pollutants in water samples: Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 1214(1-2), 1-10; 2008.

RAHMAN, M., ABD EL-ATY, A. M., KIM, S. W., SHIN, S. C., SHIN, H. C., SHIM, J. H.; Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation approach for pesticide residue analysis using traditional detectors in chromatography: A review. *Journal of separation science*, 40(1), 203-212; 2017.

RAMOS VOSGERAU, D. S. A.; ROMANOWSKI, J. P.; Estudos de revisão: implicações conceituais e metodológicas. *Revista Diálogo Educacional*, 14(41); 2014.

REBOLLAR-PÉREZ, G.; CAMPOS-TERÁN, J.; ORNELAS-SOTO, N.; MÉNDEZ-ALBORES, A.; TORRES, E.; Biosensors based on oxidative enzymes for detection of environmental pollutants. *Biocatalysis*, 1(1), 118-129; 2015.

REJCZAK, T., TUZIMSKI, T.; A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry*, 13(1); 2015.

RICHTER, B.E.; JONES, B.A.; EZZELL, J.L.; PORTER, N.L.; Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation; *Anal. Chem.*, 68, 1033-1039. 1996.

ROCHA, D.G.; Desenvolvimento e Validação de Metodologia Multirresíduos por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas para Análise de Fluorquinolonas em Músculo e Rim de Frangos; Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química; Belo Horizonte, 2014.

RODIL, R.; SCHRADER, S.; MOEDER, M.; Non-porous membrane-assisted liquid-liquid extraction of UV filter compounds from water samples; *Journal of Chromatography A*, 1216, 2009.

RODRIGUEZ, J.A.; AGUILAR-ARTEAGA, K.; DÍEZ, C.; BARRADO, E.; Recent Advances in the Extraction of Triazines from Water Samples; *Herbicides -Advances in Research*, Chapter 13, InTech, 2013.

ROTHER, E. T.; Revisão sistemática X revisão narrativa. *Acta paulista de enfermagem*, v. 20, n. 2, p. v-vi, 2007.

RUIZ, I.; MORALES, A.; OLIVA, J.; BARBA, A.; Validation of an analytical method for the quantification of pyrethrins on lemons and apricots using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46(6), 530-534; 2011.

RUIZ-ANGEL, M. J.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C.; BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S.; Are analysts doing method validation in liquid chromatography?. *Journal of Chromatography A*, 1353, 2-9; 2014.

SADEGHI, A.; HAKIMZADEH, V.; & KARIMIFAR, B.; Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Food: A Review. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 7(1), 19-27; 2017.

SAMPAIO, R.F.; Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. 2007.

SANTE/11945/2015, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, [http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant\\_pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_11945\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/docs/plant_pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945_en.pdf); [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_11945.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf)

SAPKALE, G.N.; PATIL, S.M.; SURWASE, U.S.; BHATBHAGE, P.K.; Supercritical Fluid Extraction; Department of Pharmacognosy, ASPM, S K. T. Patil College of

Pharmacy, Siddharth Nagar, Barshi Road, OSMANABAD, INDIA ; Int. J. Chem. Sci.: 8(2), 2010.

SARGEANT, J.M.; AMEZCUA, M.D.R.; RAJIC, A.; WADDELL, L.; A Guide to Conducting Systematic Reviews in Agri-Food Public Health; Department of Clinical Epidemiology and Biostatistics, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada, 2005.

SEIBER, J.N.; Introduction; Presente em: LEE, P.W.; Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals VOLUME 1 and VOLUME 2; John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, Inglaterra; 2003.

SEKHON, B. S.; Nanotechnology in agri-food production: an overview. Nanotechnology, science and applications, v. 7, p. 31, 2014.

SENYUVA, H. Z.; GÖKMEN, V.; SARIKAYA, E. A.; Future perspectives in Orbitrap™-high-resolution mass spectrometry in food analysis: A review. Food Additives & Contaminants: Part A, v. 32, n. 10, p. 1568-1606, 2015.

SHAN, G., LIPTON, C., GEE, S. J., HAMMOCK, B. D.; Immunoassay, biosensors and other nonchromatographic methods. Handbook of residue analytical methods for agrochemicals, 623-679; 2002.

SHANKAR, G. et al.; Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 48, n. 5, p. 1267-1281, 2008.

SHARIF, K. M., RAHMAN, M. M., AZMIR, J., MOHAMED, A., JAHURUL, M. H. A., SAHENA, F.; ZAIDUL, I. S. M.; Experimental design of supercritical fluid extraction—A review. Journal of Food Engineering, 124, 105-116; 2014.

SHELDON, R. A.; Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Advanced Synthesis & Catalysis, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

SIDDIQUI, M. R.; ALOTHMAN, Z. A.; RAHMAN, N.; Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of chemistry*, 10, S1409-S1421; 2017.

SIEBERS, J.; HANEL, R.; Assessment of residue analytical methods for crops, food, feed, and environmental samples: the approach of the European Union; Presente em: *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals VOLUME 1 and VOLUME 2*; John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, Inglaterra; 2003.

SINDIVEG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal); *Balanco 2015 – Setor de agroquímicos confirma queda de vendas*; 2015; Disponível em <http://sindiveg.org.br/balanco-2015-setor-de-agroquimicos-confirma-queda-de-vendas/>; acessado em 22 de fevereiro de 2016.

SINDIVEG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal); *Setor de defensivos agrícolas registra queda nas vendas em 2016* - <http://sindiveg.org.br/sindiveg-setor-de-defensivos-agricolas-registra-queda-nas-vendas-em-2016/>; acessado em 06 de dezembro de 2017.

SIVAPERUMAL, P.; ANAND, P.; RIDDHI, L.; Rapid determination of pesticide residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Food chemistry*, 168, 356-365; 2015.

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

SOUZA, S.V.C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. 2007. 296 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA-SILVA, E. A.; GIONFRIDDO, E.; PAWLISZYN, J.. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. *Food analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 236-248, 2015.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E.; Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 7, p. 480-490, 2004 (a).

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E.; Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004 (b).

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

TIWARI, G., TIWARI, R.; Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharmaceutical methods*, 1(1), 25-38; 2010

TORRES, C. M. Determination of pesticides residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, v. 754, p. 301-331, 1996.

TOSCANO, I. A. S.; NUNES, G. S.; BARCELÓ, D.; Immunoassays for pesticide analysis in environmental and food matrices. *Food Technology and Biotechnology*, p. 245-255, 1998.

TRULLOLS, E., RUISANCHEZ, I., RIUS, F. X.; Validation of qualitative analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(2), 137-145; 2004.

TUCKER, A.J.; Pesticide residues in food e Quantifying risk and protecting the consumer; *Trends in Food Science & Technology* 19, S49 – S55; 2008.

TURNER, A. P.; Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184-3196.; 2013.

UNESP (Universidade Estadual Paulista), Campus Botucatu; *Tipos de Revisão de Literatura*; Biblioteca Professor Paulo de Carvalho Mattos; Botucatu, 2014.

UMAN, L. S.; Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 20(1), 57–59; 2011.

USDA (United States Department of Agriculture). Pesticide Data Program (PDP). Annual Summary, Calendar Year 2008. December 2009.; Disponível em: <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/2009%20PDP%20Annual%20Summary.pdf>; Acessado em 27 de agosto de 2016.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B.; Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere*, v. 82, n. 3, p. 291-307, 2011.

VERBIĆ, T., DORKÓ, Z., & HORVAI, G.; Selectivity in analytical chemistry. *Revue Roumaine de Chimie*, 58(7-8), 569-575.; 2013

VESSMAN, J., STEFAN, R. I., VAN STADEN, J. F., DANZER, K., LINDNER, W., BURNS, D. T., ... & Müller, H.; Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry*, 73(8), 1381-1386.; 2001.

VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia): conceitos fundamentais e gerais de termos associados.; Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012.

WANG, B.; WANG, H.; ZHONG, X.; CHAI, Y.; CHEN, S.; YUAN, R.; A highly sensitive electrochemiluminescence biosensor for the detection of organophosphate pesticides based on cyclodextrin functionalized graphitic carbon nitride and enzyme inhibition. *Chemical Communications*, 52(28), 5049-5052; 2016.

WHO (World Health Organization); The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification; Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety; ([http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard\\_2009.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf)); 2009.

WHO (World Health Organization); Preventing Disease Through Healthy Environments; Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety; ([http://www.who.int/ipcs/features/hazardous\\_pesticides.pdf?ua=1](http://www.who.int/ipcs/features/hazardous_pesticides.pdf?ua=1)); 2010.

WOOD, R.; How to validate analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 18, n. 9, p. 624-632, 1999.

YADAV, I. C.; DEVI, N. L.; Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment; In: ENVIRONMENTAL SCIENCE AND ENGINEERING, Edition: Vol. 6: Toxicology, Chapter: 7, Publisher: Studium Press LLC, USA, Editors: Anil Kumar, J C Singhal, Kuaanan Techato, Luisa T. Molina, Neetu Singh, Prashant Kumar, Pravinder Kumar, Ram Chandra, Santiago Caprio, Seema Upadhye, Seiichiro Yonemura, Surampalli Y Rao, Tian C Zhang, U C Sharma and Y P Abrol, pp.140-158

ZACHARIA, J.T.; Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides; Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-437-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-trends-in-pesticidesanalysis/identity-physical-and-chemical-properties-of-pesticides>, 2011

ZEAITER, M., ROGER, J. M., BELLON-MAUREL, V., & RUTLEDGE, D. N.; Robustness of models developed by multivariate calibration. Part I: The assessment of robustness. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 23(2), 157-170; 2004.

# APÊNDICE

## Apêndice I

Protocolo da revisão sistemática publicado em <https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>

### Systematic review

#### 1. \* Review title.

Give the working title of the review, for example the one used for obtaining funding. Ideally the title should state succinctly the interventions or exposures being reviewed and the associated health or social problems. Where appropriate, the title should use the PI(E)COS structure to contain information on the Participants, Intervention (or Exposure) and Comparison groups, the Outcomes to be measured and Study designs to be included.

Method validation for the analysis of pesticide residues in food: a systematic review and implications

#### 2. Original language title.

For reviews in languages other than English, this field should be used to enter the title in the language of the review. This will be displayed together with the English language title.

### 3. \* Anticipated or actual start date.

Give the date when the systematic review commenced, or is expected to commence.

20/03/2017

### 4. \* Anticipated completion date.

Give the date by which the review is expected to be completed.

30/01/2018

### 5. \* Stage of review at time of this submission.

Indicate the stage of progress of the review by ticking the relevant Started and Completed boxes. Additional information may be added in the free text box provided.

Please note: Reviews that have progressed beyond the point of completing data extraction at the time of initial registration are not eligible for inclusion in PROSPERO. Should evidence of incorrect status and/or completion date being supplied at the time of submission come to light, the content of the PROSPERO record will be removed leaving only the title and named contact details and a statement that inaccuracies in the stage of the review date had been identified.

This field should be updated when any amendments are made to a published record and on completion and publication of the review.

The review has not yet started: yes

	<b>Started</b>	<b>Completed</b>
<b>Review stage</b>		
Preliminary searches	Yes	Yes
Piloting of the study selection process	Yes	Yes
Formal screening of search results against eligibility criteria	Yes	Yes
Data extraction	Yes	Yes
Risk of bias (quality) assessment	No	No
Data analysis	Yes	Yes

Provide any other relevant information about the stage of the review here (e.g. Funded proposal, protocol not yet finalised).

## 6. \* Named contact.

The named contact acts as the guarantor for the accuracy of the information presented in the register record.

Mr Sousa

Email salutation (e.g. "Dr Smith" or "Joanne") for correspondence:

Mr. Sousa

## 7. \* Named contact email.

Give the electronic mail address of the named contact.

[desousaroberto@bol.com.br](mailto:desousaroberto@bol.com.br)

## 8. Named contact address

Give the full postal address for the named contact.

Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha - CEP 31270-901, Belo Horizonte - MG - Brasil

## 9. Named contact phone number.

Give the telephone number for the named contact, including international dialling code.

+55 31 985177898

## 10. \* Organisational affiliation of the review.

Full title of the organisational affiliations for this review and website address if available. This field may be completed as 'None' if the review is not affiliated to any organisation.

Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais

Organisation web address:

[alimento@farmacia.ufmg.br](mailto:alimento@farmacia.ufmg.br)

## 11. Review team members and their organisational affiliations.

Give the title, first name, last name and the organisational affiliations of each member of the review team. Affiliation refers to groups or organisations to which review team members belong.

Mr Roberto Cesar Santos de Sousa. Master's Degree student

Dr Scheilla Vitorino Carvalho de Souza. Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais

Dr Vânia Eloisa de Araújo. Pontífica Universidade Católica de Minas Gerais

## 12. \* Funding sources/sponsors.

Give details of the individuals, organizations, groups or other legal entities who take responsibility for initiating, managing, sponsoring and/or financing the review. Include any unique identification numbers assigned to the review by the individuals or bodies listed.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

## 13. \* Conflicts of interest.

List any conditions that could lead to actual or perceived undue influence on judgements concerning the main topic investigated in the review.

None

## 14. Collaborators.

Give the name and affiliation of any individuals or organisations who are working on the review but who are not listed as review team members.

## 15. \*Review question.

State the question(s) to be addressed by the review, clearly and precisely. Review questions may be specific or broad. It may be appropriate to break very broad questions down into a series of related more specific questions. Questions may be framed or refined using PI(E)COS where relevant.

Are the guidelines for the validation of analytical methods being followed in the studies related to methods for determination of pesticide residues in food?

## 16. \* Searches.

Give details of the sources to be searched, search dates (from and to), and any restrictions (e.g. language or publication period). The full search strategy is not required, but may be supplied as a link or attachment.

A systematic bibliographic search of electronic research databases and grey literature will be performed. A literature search, until 2017, will be carried out, independently, by two reviewers, with a third reviewer to solve cases of disagreements. The following electronic databases will be used: MEDLINE/PubMed, FSTA Food Science and Technology Abstracts, International System for Agricultural Science and Technology (AGRIS), Scientific Electronic Library Online (SciELO), Latin American and Caribbean Health Sciences (LILACS) and Web of Science. Theses and dissertations will be searched in the Brazilian Digital Library of Theses and Dissertations (BDTD). Already the grey literature will be assessed in OpenGrey, which represents the collection of unpublished theses and dissertations in Europe. The search strategy will include terms related to pesticides, alidation and food on the title, abstract, key words and role text.

## 17. URL to search strategy.

Give a link to the search strategy or an example of a search strategy for a specific database if available (including the keywords that will be used in the search strategies) Alternatively, upload your search strategy to CRD in pdf format. Please note that by doing so you are consenting to the file being made publicly accessible.

Do not make this file publicly available until the review is complete

## 18. \* Condition or domain being studied.

Give a short description of the disease, condition or healthcare domain being studied. This could include health and wellbeing outcomes.

Methods of analysis of pesticide residues in food.

## 19. \* Participants/population.

Give summary criteria for the participants or populations being studied by the review. The preferred format includes details of both inclusion and exclusion criteria.

Foods for human consumption.

## 20. \* Intervention(s), exposure(s).

Give full and clear descriptions or definitions of the nature of the interventions or the exposures to be reviewed.

Single-laboratory validation processes of methods for analyzing pesticide residues in food matrices.

## 21. \* Comparator(s)/control.

Where relevant, give details of the alternatives against which the main subject/topic of the review will be compared (e.g. another intervention or a non-exposed control group). The preferred format includes details of both inclusion and exclusion criteria.

The “Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis” published by AOAC / IUPAC / ISO and the European Commission (SANTE) “Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed”.

## 22. \* Types of study to be included.

Give details of the types of study (study designs) eligible for inclusion in the review. If there are no restrictions on the types of study design eligible for inclusion, or certain study types are excluded, this should be stated. The preferred format includes details of both inclusion and exclusion criteria.

Relevant studies for this systematic review will be of any type that includes single-laboratory validation of qualitative or quantitative methods for the analysis of pesticide residues in food. The selected studies should be dated from 2002, year of publication of the AOAC / IUPAC / ISO harmonized guideline.

Exclusion: studies whose analytes are not pesticides, or matrices are not food, will be excluded from the review.

### 23. Context.

Give summary details of the setting and other relevant characteristics which help define the inclusion or exclusion criteria.

The objective is to demonstrate that many validated methods for pesticide determination in foods are not meeting the requirements of the validation guidelines. Failure to comply with the validation guidelines results in poor reliability of analytical methods, which can lead to serious errors in the measurement of pesticides in foodstuffs for human consumption. The present concern about health risks due to pesticide residues in the diet has increased the analytical approach with emphasis on food quality and safety. Governments and private entities around the world conduct pesticide residue analyses on food and environmental samples since the 1960s. Since then, several multiresidue methods have been developed to address the issues related to new technologies in agriculture and current legislation. Therefore, national and international standards for quality management systems in analytical laboratories highlight and require the validation of analytical methods for obtaining reliable results. Trustworthy analytical methods are required for compliance with national and international regulations in all areas of analysis. However, while there exists some consensus regarding which method parameters should be evaluated in validation processes, there is great variation as to how validation experiments should be delineated and conducted and their applicable statistics. Even with the documented guidelines, some authors argued that there still exists difficulty in validating their methodologies developed for analysis of pesticide residues. The lack

of understanding of the existing references concerning validation of methods is a common source of error found in validated and applied methodologies.

## 24. \* Primary outcome(s).

Give the pre-specified primary (most important) outcomes of the review, including details of how the outcome is defined and measured and when these measurement are made, if these are part of the review inclusion criteria.

The parameters analyzed in each study will be compared with the parameters required in the validation guidelines (i.e. AOAC / IUPAC / ISO and SANTE). If the study adopted a different reference, this guideline will be considered.

## Timing and effect measures

## 25. \* Secondary outcome(s).

List the pre-specified secondary (additional) outcomes of the review, with a similar level of detail to that required for primary outcomes. Where there are no secondary outcomes please state 'None' or 'Not applicable' as appropriate to the review

Secondary results will be related to method, including the most frequent food matrices studied, techniques for extraction, purification and determination of pesticides residues (failure to comply with validation guidelines results in poor reliability of analytical methods, which can lead to serious errors in the measurement of pesticides in foodstuffs for human consumption).

## Timing and effect measures

### 26. Data extraction (selection and coding).

Give the procedure for selecting studies for the review and extracting data, including the number of researchers involved and how discrepancies will be resolved. List the data to be extracted.

Two researchers will be involved in the data extraction. One researcher will conduct the review and load all the publications into EndNote. The studies found in duplicate will be deleted. Two independent reviewers will evaluate the titles and abstracts of the articles to identify studies that potentially meet the inclusion criteria for reading the full text. Data will be extracted and collected in duplicate in a software Microsoft Excel (2016) spreadsheet developed for this purpose and previously tested. Dichotomous data will be related to the absence or presence of the different validation parameters and of the extraction and determination techniques. Continuous data will be related to trueness, precision, detection and quantification limits of the studies that researched the most frequent food matrices. If the abstracts do not contain sufficient information to allow decision-making as regards inclusion or exclusion, the full article will be obtained and reviewed before making a final decision. Disagreements will be solved by consensus between the two reviewers.

### 27. \* Risk of bias (quality) assessment.

State whether and how risk of bias will be assessed (including the number of researchers involved and how discrepancies will be resolved), how the quality of individual studies will be assessed, and whether and how this will influence the planned synthesis.

The quality assessment of the studies selected in this review will be performed by comparing the published data with those discussed in the studies and analyzing the confirmation criteria of the parameters evaluated. Any disagreement will be resolved by consensus among the reviewers.

## 28. \* Strategy for data synthesis.

Give the planned general approach to synthesis, e.g. whether aggregate or individual participant data will be used and whether a quantitative or narrative (descriptive) synthesis is planned. It is acceptable to state that a quantitative synthesis will be used if the included studies are sufficiently homogenous.

The frequency of validation parameters, extraction and determination techniques will be grouped according to the type of method (qualitative or quantitative) and compared. In addition, the performance of the extraction and determination methods, grouped according to the type of method, will be evaluated using the trueness, precision and limits values.

## 29. \* Analysis of subgroups or subsets.

Give details of any plans for the separate presentation, exploration or analysis of different types of participants (e.g. by age, disease status, ethnicity, socioeconomic status, presence or absence or comorbidities); different types of intervention (e.g. drug dose, presence or absence of particular components of intervention); different settings (e.g. country, acute or primary care sector, professional or family care); or different types of study (e.g. randomised or non-randomised).

Year of publication; validation parameter; extraction and determination techniques; and type of method (qualitative or quantitative) will be analyzed as subgroups.

## 30. \* Type and method of review.

Select the type of review and the review method from the lists below. Select the health area(s) of interest for your review.

## Type of review

Methodology

## Health area of the review

### 31. Language.

Select each language individually to add it to the list below, use the bin icon to remove any added in error.

English

### 32. Country.

Select the country in which the review is being carried out from the drop down list. For multi-national collaborations select all the countries involved.

Brazil

### 33. Other registration details.

Give the name of any organisation where the systematic review title or protocol is registered (such as with The Campbell Collaboration, or The Joanna Briggs Institute) together with any unique identification number assigned. (N.B. Registration details for Cochrane protocols will be automatically entered). If extracted data will be stored and made available through a repository such as the Systematic Review Data Repository (SRDR), details and a link should be included here. If none, leave blank.

### 34. Reference and/or URL for published protocol.

Give the citation and link for the published protocol, if there is one Give the link to the published protocol. Alternatively, upload your published protocol to CRD in pdf format. Please note that by doing so you are consenting to the file being made publicly accessible.

No I do not make this file publicly available until the review is complete

Please note that the information required in the PROSPERO registration form must be completed in full even if access to a protocol is given.

### 35. Dissemination plans.

Give brief details of plans for communicating essential messages from the review to the appropriate audiences.

Do you intend to publish the review on completion?

Yes

### 36. Keywords.

Give words or phrases that best describe the review. Separate keywords with a semicolon or new line. Keywords will help users find the review in the Register (the words do not appear in the public record but are included in searches). Be as specific and precise as possible. Avoid acronyms and abbreviations unless these are in wide use.

pesticides, pesticides residues, food, food analysis, analytical chemistry, validation, validation process

### 37. Details of any existing review of the same topic by the same authors.

Give details of earlier versions of the systematic review if an update of an existing review is being registered, including full bibliographic reference if possible.

### 38. \* Current review status.

Review status should be updated when the review is completed and when it is published. Please provide anticipated publication date

Review\_Ongoing

### 39. Any additional information.

Provide any other information the review team feel is relevant to the registration of the review.

### 40. Details of final report/publication(s).

This field should be left empty until details of the completed review are available. Give the link to the published review.