

ELIANE HOOPER AMARAL

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS  
ORGANOFOSFORADOS: VALIDAÇÃO DE  
MÉTODO DE CROMATOGRÁFIA A GÁS E  
QUANTIFICAÇÃO EM PRODUTOS AGRÍCOLAS**

Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2007

ELIANE HOOPER AMARAL

**RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS  
ORGANOFOSFORADOS: VALIDAÇÃO DE  
MÉTODO DE CROMATOGRÁFIA A GÁS E  
QUANTIFICAÇÃO EM PRODUTOS AGRÍCOLAS**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós –  
Graduação em Ciência de Alimento da Faculdade  
de Farmácia da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial à obtenção do título  
de mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Roberto Gonçalves Junqueira

Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG

2007

A485r Amaral, Eliane Hooper.  
Resíduos de agrotóxicos organofosforados: validação de método de cromatografia a gás e quantificação em produtos agrícolas / Eliane Hooper Amaral. – 2007.  
141f. : il.

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

1. Alimentos – Contaminação – Teses. 2. Análise cromatográfica – Teses. 3. Pesticidas – Resíduos em alimentos – Teses. 4. Produtos agrícolas – Análise – Teses. 5. Validação de método – Teses. I. Título. II. Junqueira, Roberto Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD: 664.07

Meu marido e filhos  
Meus familiares sem exceção  
Meus amigos com "A" maiúsculo  
Meus colegas de convívio cotidiano

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Professor Roberto Gonçalves Junqueira, pela dedicação, orientação e por ter me possibilitado enxergar outros caminhos.

À Faculdade de Farmácia da UFMG e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos por ampliarem os meus conhecimentos.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA por apoiar e acreditar na necessidade constante de qualificação técnica de seus funcionários e oportunidade de crescimento profissional.

Aos colegas Alexandre, Dilma, Isis, Leandro e Regina, do Laboratório de Análise de Resíduos de Agrotóxicos, e a ex-colega Ana Paula pelo incentivo, carinho, grande disposição e eficiência para a realização das análises e sobretudo pelo sentimento de equipe.

A Scheilla Vitorino pela valiosa contribuição e pelo incentivo no início deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Química Agropecuária pelo apoio.

Aos colegas do IMA do interior pela coleta das amostras.

Aos colegas do mestrado pela breve, mas agradável convivência.

A minha mãe, irmãos, sobrinhos e sobrinha, pela compreensão e apoio em todos os momentos.

E a todos aqueles que ajudaram tornar possível a realização deste Trabalho.

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem."

Guimarães Rosa

# SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	10
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	12
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	13
<b>RESUMO</b>	14
<b>ABSTRACT</b>	15
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2 OBJETIVOS</b>	18
2.1 OBJETIVOS GERAIS	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>	19
3.1 AGROTÓXICOS	19
3.2 INSETICIDAS DO GRUPO DOS ORGANOFOSFORADOS	23
3.3 CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS NO BRASIL E NO MUNDO	27
3.4 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS	30
3.4.1 Amostragem, transporte e armazenamento da amostra	30
3.4.2 Técnicas de extração e concentração da amostra	31
3.4.3 Técnicas de purificação de amostras	32
3.4.4 Outras técnicas de extração e purificação	33
3.4.5 Métodos analítico	34
3.4.6 O uso da cromatografia gasosa	36
3.4.7 O uso da cromatografia líquida de alta eficiência	38
3.4.8 Aplicação da Cromatografia de Camada Delgada	39
3.4.9 Métodos de Confirmação	40
3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	41
3.5.1 Aplicabilidade, seletividade, efeito de matriz e sensibilidade	42
3.5.2 Faixa de trabalho e linearidade	44
3.5.3 Exatidão e precisão	45
3.5.4 Limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção	47
3.5.5 Robustez	49
3.5.6 Revalidação	50
3.5.7 Matrizes representativas	50
3.5.8 Analitos representativas	51
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	53
4.1 ANALITOS	53
4.2 EQUIPAMENTOS	54
4.3 REAGENTES E PADRÕES	54
4.4 SOLUÇÕES	54
4.4.1 Solução padrão estoque	54
4.4.2 Solução pool padrão Intermediária 1	55
4.4.3 Solução pool padrão Intermediária 2	55
4.4.4 Preparo da curva de calibração	55
4.4.5 Solução extratora	56

<b>4.5</b>	<b>AMOSTRAS USADAS NA VALIDAÇÃO</b>	<b>56</b>
<b>4.6</b>	<b>MÉTODO DE ENSAIO</b>	<b>56</b>
<b>4.7</b>	<b>MÉTODO DE ENSAIO MODIFICADO</b>	<b>57</b>
<b>4.7.1</b>	<b>Extração</b>	<b>57</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Preparo da curva de calibração no extrato da matriz</b>	<b>57</b>
<b>4.7.3</b>	<b>Separação, detecção e quantificação</b>	<b>58</b>
<b>4.8</b>	<b>VALIDAÇÃO</b>	<b>59</b>
<b>4.8.1</b>	<b>Linearidade</b>	<b>60</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Efeito do dia</b>	<b>61</b>
<b>4.8.3</b>	<b>Efeitos de matriz</b>	<b>62</b>
<b>4.8.4</b>	<b>Seletividade, exatidão (recuperação) e precisão</b>	<b>62</b>
<b>4.8.5</b>	<b>Limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção</b>	<b>66</b>
<b>4.9</b>	<b>ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ORGANOFOSFORADOS EM HORTIFRUTÍCOLAS</b>	<b>67</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>ESCOLHA DOS ANALITOS E MATRIZES REPRESENTATIVAS</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b>SELETIVIDADE</b>	<b>69</b>
<b>5.3</b>	<b>LINEARIDADE</b>	<b>74</b>
<b>5.4</b>	<b>EFEITO DO DIA</b>	<b>80</b>
<b>5.5</b>	<b>EFEITO DE MATRIZ</b>	<b>83</b>
<b>5.6</b>	<b>RECUPERAÇÃO E PRECISÃO</b>	<b>87</b>
<b>5.7</b>	<b>LIMITES DE DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO, DECISÃO E CAPACIDADE DE DETECÇÃO</b>	<b>92</b>
<b>5.8</b>	<b>ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ORGANOFOSFORADOS EM HORTIFRUTÍCOLAS</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>102</b>
	<b>APÊNDICES A - GRÁFICOS DOS RESÍDUOS DA REGRESSÃO DAS TRÊS CURVAS DE SOLVENTES COM INDICAÇÕES DOS RESPECTIVOS OUTLIERS DIAGNOSTICADOS PELO TESTE DE RESÍDUOS PADRONIZADOS DE JACKKNIFE</b>	<b>115</b>
	<b>APÊNDICES B – GRÁFICOS DA AVALIAÇÃO DA NORMALIDADE DOS RESÍDUOS PELO TESTE DE RYAN-JOINER DAS TRÊS CURVAS DE SOLVENTE.</b>	<b>117</b>
	<b>APÊNDICES C – GRÁFICOS DA AVALIAÇÃO DE AUTOCORRELAÇÃO DOS RESÍDUOS PELO TESTE DURBIN-WATSON DAS TRÊS CURVAS DE SOLVENTE.</b>	<b>119</b>
	<b>APÊNDICES D - GRÁFICOS DA AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DA VARIÂNCIA PELO TESTE DE LEVENE MODIFICADO DAS TRÊS CURVAS DE SOLVENTE.</b>	<b>121</b>
	<b>APÊNDICES E - GRÁFICOS DAS CURVAS DE REGRESSÃO LINEAR, APÓS A RETIRADA DOS OUTLIERS.</b>	<b>123</b>



<b>APÊNDICES F - GRÁFICOS DA CURVAS DE CALIBRAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE AGROTÓXICOS NO SOLVENTE E NA SOLUÇÃO MATRIZ DE ALFACE.</b>	125
<b>APÊNDICES G - GRÁFICOS DA CURVAS DE CALIBRAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE AGROTÓXICOS NO SOLVENTE E NA SOLUÇÃO MATRIZ DE BANANA.</b>	126
<b>APÊNDICES H - GRÁFICOS DA CURVAS DE CALIBRAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE AGROTÓXICOS NO SOLVENTE E NA SOLUÇÃO MATRIZ DE TOMATE</b>	127

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
1 Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseada na Dose Letal <sub>50</sub> e na Concentração Letal <sub>50</sub> de formulações líquida e sólida	21
2 Informações sobre a classificação toxicológica e ingestão diária aceitável dos inseticidas organofosforados	26
3 Níveis de adição de padrões em amostras brancas de alface, banana e tomate para cálculo de exatidão, precisão, limite de quantificação, limite de decisão e capacidade de detecção	63
4 Cálculo das variâncias para o delineamento fatorial completamente aninhado	65
5 Expressões da precisão em condições de repetitividade e de reprodutibilidade parcial	65
6 Tempo de retenção dos oito organofosforados estudados	69
7 Número de outliers retirados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife nas curvas de solventes obtidas no estudo de linearidade	74
8 Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de clorfenvinfós (12,24 ng ml <sup>-1</sup> a 93,84 ng ml <sup>-1</sup> )	76
9 Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de clorpirifós (12,12 ng ml <sup>-1</sup> a 92,92 ng ml <sup>-1</sup> )	76
10 Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de diclorvós (12,24 ng ml <sup>-1</sup> a 93,84 ng ml <sup>-1</sup> )	77
11 Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de dimetoato (12,12 ng ml <sup>-1</sup> a 92,92 ng ml <sup>-1</sup> )	77
12 Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de etiona (12,0 ng ml <sup>-1</sup> a 92,0 ng ml <sup>-1</sup> )	78
13 Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de etoprofós (12,0 ng ml <sup>-1</sup> a 92,0 ng ml <sup>-1</sup> )	78
14 Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de parationa metílica (12,0 ng ml <sup>-1</sup> a 92,0 ng ml <sup>-1</sup> )	79
15 Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de pirimifós metílico (12,0 ng ml <sup>-1</sup> a 92,0 ng ml <sup>-1</sup> )	79
16 Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de clorfenvinfós	80
17 Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de clorpirifós	80
18 Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de diclorvós	81
19 Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de dimetoato	81
20 Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de etiona	81
21 Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de etoprofós	82
22 Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de parationa-metilica	82
23 Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de pirimifós-metilico	82
24 Número de outliers retirados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife	83

nas curvas de solventes e matriz obtidas no estudo de efeito matriz	
25 Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de alface para etoprofós, pirimifós-metílico, parationa-metílica e etiona (12 ng mL <sup>-1</sup> a 92 ng mL <sup>-1</sup> )	84
26 Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de alface para clorfenvinfós e diclorvós (12,24 ng mL <sup>-1</sup> a 93,84 ng mL <sup>-1</sup> ) e clorpirifós e dimetoato (12,12 ng mL <sup>-1</sup> a 92,92 ng mL <sup>-1</sup> )	84
27 Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de banana para etoprofós, pirimifós-metílico, parationa-metílica e etiona (12 ng mL <sup>-1</sup> a 92 ng mL <sup>-1</sup> )	85
28 Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de banana para clorfenvinfós e diclorvós (12,24 ng mL <sup>-1</sup> a 93,84 ng mL <sup>-1</sup> ) e clorpirifós e dimetoato (12,12 ng mL <sup>-1</sup> a 92,92 ng mL <sup>-1</sup> )	85
29 Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de tomate para etoprofós, pirimifós-metílico, parationa-metílica e etiona (12 ng mL <sup>-1</sup> a 92 ng mL <sup>-1</sup> )	86
30 Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de tomate para clorfenvinfós e diclorvós (12,24 ng mL <sup>-1</sup> a 93,84 ng mL <sup>-1</sup> ) e clorpirifós e dimetoato (12,12 ng mL <sup>-1</sup> a 92,92 ng mL <sup>-1</sup> )	86
31 Números de outliers retirado pelo teste de Grubbs nos resultados de recuperação obtidos dos organofosforados nas três matrizes estudadas	88
32 Médias de recuperação e desvios padrão relativo, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de alface adicionadas de resíduos de organofosforados em diferentes níveis de concentração	89
33 Médias de recuperação e desvios padrão relativo, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de banana adicionadas de resíduos de agrotóxicos em diferentes níveis de concentração	90
34 Médias de recuperação e desvios padrão relativo, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de tomate adicionadas de resíduos de agrotóxicos em diferentes níveis de concentração	91
35 Valores de limites de decisão e capacidade de detecção	94
36 Amostras com resíduos e em desacordo com a legislação	96

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1 Estrutura química de malationa e aldicarbe	19
2 Grupo funcional dos compostos inseticidas organofosforados	23
3 Estrutura química de inseticidas organofosforados típicos de cada um dos grupos funcionais	24
4 Estruturas químicas dos inseticidas organofosforados analisados	53
5 Fluxograma da metodologia de análise	59
6 Cromatogramas típicos de soluções <i>pool</i> de padrões de organofosforados	70
7 Cromatogramas típicos de amostras brancas das matrizes, alface (a), banana (b) e tomate (c)	71
8 Cromatogramas típicos de soluções <i>pool</i> de padrões de organofosforados na solução matriz de alface	72
9 Cromatogramas típicos de soluções <i>pool</i> de padrões de organofosforados na solução matriz de banana	72
10 Cromatogramas típicos de soluções <i>pool</i> de padrões de organofosforados na solução matriz de tomate	73
11 Cromatogramas típicos de presença de resíduos de organofosforados em amostras de hortifrutícolas	73
12 Frequência de resíduos de organofosforados encontrados nas amostras de hortifrutícolas	95
13 Número de amostras de morango com de resíduos de organofosforados não autorizado para a cultura	97
14 Número de amostras de tomate com resíduos de organofosforados	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AOAC - Association of Official Analytical Chemists  
CL<sub>50</sub> – Concentração Letal<sub>50</sub>  
CCFAE - Cromatografia de Camada Fina de Alta Eficiência  
CG – Cromatografia gasosa  
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência  
CPG – Cromatografia de permeação a gel  
DAD – Detector de arranjo de diodos  
DCE – Detector de captura de elétrons  
DFC – Detector fotométrico de chama  
DIC – Detector de ionização de chama  
DL50 - Dose Letal<sub>50</sub>  
DNF – Detector nitrogênio e fósforo  
DPR<sub>r</sub> – Desvio padrão relativo de repetitividade  
DPR<sub>R</sub> – Desvio padrão relativo de reprodutibilidade parcial  
DTE – Detector Termiônico Específico  
EFS – Extração em fase sólida  
EM – Espectrômetro de massas  
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial  
LMR – Limite Máximo de Resíduos  
LD – Limite de Detecção  
LQ – Limite de Quantificação  
MEFS – Microextração em fase sólida  
MMQO - Método dos mínimos quadrados ordinários  
NA – Não Autorizado  
NATA - National Association of Testing Authorities - Australia  
PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos  
SIA – Sistema de Informação em Agrotóxicos  
SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola  
SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas  
SPE - Solução padrão estoque  
SPI - Solução pool padrão Intermediária  
UV – Ultra violeta

## RESUMO

Uma validação intralaboratorial de um método de multiresíduos para ensaio de inseticidas organofosforados em produtos agrícolas por cromatografia gasosa com detector termiônico específico foi realizada dentro de um procedimento detalhado, incluindo um delineamento experimental. O método foi validado para os analitos clorfenvinfós, clorpirifós, diclorvós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa-metílica e pirimifós-metílico nas matrizes alface, banana e tomate. Foram realizados ensaios com curvas de solventes e de matriz, amostras brancas e adicionadas. As premissas relacionadas às estatísticas empregadas foram avaliadas e confirmadas. A linearidade do método foi obtida na faixa de 12 a 92 ng mL<sup>-1</sup>. Houve efeito do dia nos estudos de linearidade do método. Comprovou-se o efeito de matriz, com exceções para dimetoato em alface, clorpirifós em banana e clorfenvinfós em tomate. As médias de recuperação, na faixa do limite de quantificação, variaram de 76,7% a 104,2%. O método apresentou precisão aceitável, desvios padrão relativos sob condições de repetitividade entre 5,2% a 14,3% e reprodutibilidade parcial entre 5,7% a 21,4%. Não houve precisão para o clorfenvinfós no nível de adição de 8,0 µg kg<sup>-1</sup> nas matrizes alface e banana, para o diclorvós no nível 8,0 µg kg<sup>-1</sup> para a matriz alface e nos três níveis de adição estudados para as matrizes banana e tomate. Os limites de detecção foram de 5,0 µg kg<sup>-1</sup> e 8,0 µg kg<sup>-1</sup>. Os limites de quantificação foram de 8,0 µg kg<sup>-1</sup> a 40,0 µg kg<sup>-1</sup>. Foram determinados limite de decisão de 6,7 µg kg<sup>-1</sup> a 5,1 mg kg<sup>-1</sup> e capacidade de detecção de 11,3 µg kg<sup>-1</sup> a 5,5 mg kg<sup>-1</sup>. Das 309 amostras analisadas, 18,4% apresentaram resíduos de OF, sendo que 13,6% estavam em desacordo com a legislação vigente. Destas, 92,9% apresentaram resíduos de OF não autorizado para a cultura e 7,1% apresentaram limites acima do permitido.

**Palavras-chave:** validação intralaboratorial; análise de multiresíduos; organofosforados; cromatografia gasosa; produtos agrícolas; análise de alimentos.

## ABSTRACT

An in-house validation of a multi-residues method for quantitative determination of organophosphorus compounds in fruits and vegetables by gas chromatography using a thermionic specific detection was carried out. The method was validated for the analytes chlorfenvinphos, chlorpyrifos, dichlorvos, dimethoate, ethion, ethoprophos, parathion-methyl and pirimiphos-methyl on the matrices lettuce, banana and tomato. Experiments with solvent and matrix-matched calibration curves, blanks and spiked samples were performed. The assumptions related to the statistics used were evaluated and confirmed. The method linearity was obtained between 12 to 92 ng mL<sup>-1</sup>. The day affected the method linearity studies. It was proved the matrix effect, except dimethoate in lettuce, chlorpyrifos in banana and chlorfenvinphos in tomato. The recovery averages, in the range of the quantification limit, varied from 76.7% to 104.2%. The method presented acceptable precision, relative standard deviations under repeatability conditions between 5.2% and 14.3% and partial reproducibility between 5.7% and 21.4%. In the matrices lettuce and banana there was not precision for chlorfenvinphos in the level of addition of 8.0 mg kg<sup>-1</sup>, for dichlorvos in level 8.0 µg kg<sup>-1</sup> for lettuce and in the three addition levels studied for the matrices banana and tomato. The experimental detection limits were 5.0 µg kg<sup>-1</sup> and 8.0 µg kg<sup>-1</sup>. The quantification limits were 8.0 µg kg<sup>-1</sup> to 40.0 µg kg<sup>-1</sup>. Decision limits ranging from 6.7 µg kg<sup>-1</sup> to 5.1 mg kg<sup>-1</sup> and detection capabilities ranging from 11.3 µg kg<sup>-1</sup> to 5.5 mg kg<sup>-1</sup> were determined. Of the 309 samples collected in different cities of Minas Gerais, 13.6% presented non authorized residues of organophosphorus for the culture and 1.0% exceeded the maximum residue limits.

**Keywords:** in-house validation; multi-residue analysis; organophosphorus; chromatography gas; fruits and vegetables; food analysis.

# 1 INTRODUÇÃO

A utilização dos agrotóxicos na agricultura iniciou-se na década de 1920, época em que eram pouco conhecidos do ponto de vista toxicológico. Durante a Segunda Guerra Mundial, foram utilizados como arma química, tendo seu uso se expandido enormemente a partir de então, chegando a produção industrial mundial a atingir dois milhões de toneladas de agrotóxicos por ano. No Brasil, foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas, passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 1960 (BRASIL, 1997).

O aumento da produção de alimentos nos países desenvolvidos, e em grande parte dos países em desenvolvimento, se deve à modernização das práticas agrícolas, incluindo a mecanização, a utilização de variedades melhoradas, de fertilizantes e agrotóxicos (CAMPANHOLA et al, 1998). No entanto, as técnicas deficientes de aplicação de agrotóxicos e o desrespeito aos períodos de carência vêm causando sérios problemas de ordem ambiental e de segurança alimentar, com a contaminação do solo, água e alimentos (HENAO & COREY, 1991).

Dados da Organização Mundial das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação apontam o Brasil como um dos países que mais aplicam agrotóxicos. (VICENTE et al.,1998). A maior utilização dessas substâncias é na agricultura, especialmente nos sistemas de monocultura, em grandes extensões. São também utilizados em saúde pública, na eliminação e controle de vetores transmissores de doenças endêmicas. E, ainda, no tratamento de madeira para construção, no armazenamento de grãos a sementes, na produção de flores, para combate a piolhos e outros parasitas, na pecuária (BRASIL, 1997).

A exposição de produtores rurais e consumidores aos resíduos de agrotóxicos constituem um dos principais alvos de preocupação com a saúde pública em diversos países e vários programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos têm sido implementados. No Brasil, o problema se agrava ao se considerar o fato de que os próprios agricultores ainda não têm consciência do perigo a que estão expostos quando utilizam agrotóxicos e desrespeitam as medidas de segurança recomendadas (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2001).

Dentre os agrotóxicos utilizados na agricultura merecem destaque os inseticidas



organofosforados (OF), que são os que mais causam intoxicações e ainda grande número de morte no Brasil, devido a sua alta toxicidade aguda (SINITOX, 1998). São largamente usados na agricultura como inseticidas e podem contaminar uma variedade de produtos agrícolas. Devido sua toxicidade e risco potencial para o consumidor, a quantificação nos alimentos de consumo é de preocupação pública (ALBANIS & LAMBROPOULOU, 2003).

Os OF são ésteres do ácido fosfórico com diferentes substituintes. Estes compostos menos persistentes no ambiente que os organoclorados podem acumular ao longo da cadeia alimentar, podendo representar um risco para a saúde humana (PAGLIUCA et al., 2005).

Os OF são aplicados mundialmente. A preocupação pública com o excesso de resíduos de agrotóxicos ganhou relevância na última década. Uma determinação exata dos resíduos de agrotóxicos em frutas, vegetais e matrizes relacionadas é certamente de grande importância na análise de alimentos (CUADROS-RODRIGUEZ et e al, 2003).

Devido à preocupação com os resíduos de agrotóxicos nos alimentos, são realizadas análises a cada dia em milhares de laboratórios ao redor do mundo. A necessidade progressiva de dados analíticos comparáveis e consistentes é essencial para a eliminação de barreiras técnicas entre os países. Uma vez efetuada a medição, para que ela seja aceita em qualquer país, requisitos legais, de acreditação devem ser observados. As normas nacionais e internacionais do sistema da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido. Validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica (BARROS, 2002).

Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para assegurar que um método analítico forneça informações confiáveis e interpretações corretas das amostras ele deve passar por uma avaliação, denominada de validação (RIBANI et al, 2004).

Mesmo que o método analítico já tenha sido objeto de um estudo colaborativo, ainda assim, o analista deve validá-lo no seu laboratório por meio de teste de recuperação e avaliação da linearidade, sensibilidade, especificidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação (EURACHEM, 1998; SOARES, 2001).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

- Validar um método de análise de resíduos de inseticidas organofosforados.
- Quantificar os níveis de resíduos de inseticidas organofosforados em produtos agrícolas de alguns municípios de Minas Gerais.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Validar um método de análise de resíduos de clorpirifós, clorfenvinfós, diclorvós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa-metílica e pirimifós-metílico nas matrizes alface, banana e tomate.
- Quantificar os níveis de 27 organofosforados em: alface, banana, batata, cenoura, chuchu, jiló, morango pepino, pimentão e tomate
- Verificar se os níveis de resíduos atendem ao Limite Máximo de Resíduos (LMR) e se são de agrotóxicos permitidos para as culturas analisadas, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Agrotóxicos

O uso de substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas com o propósito de proteger as culturas agrícolas data de tempos antigos. Nos primórdios da agricultura, romanos e gregos descreveram o uso de produtos como o arsênio e o enxofre para o controle de pragas. A partir do século XVI até fins do século XIX, substâncias orgânicas como a nicotina e piretros, extraídos de plantas, eram constantemente utilizados na Europa e EUA, do mesmo modo, para o controle fitossanitário. No início do século XX, iniciaram-se os estudos buscando o emprego de substâncias inorgânicas à base de cobre, chumbo, mercúrio, cádmio, empregados contra uma grande variedade de pragas, porém com eficácia limitada e elevada toxicidade (LUNA, 2006).

Posteriormente, com a descoberta por Paul Müller, em 1939, das propriedades inseticidas do diclorodifeniltricloroetano (DDT) teve início a geração dos agrotóxicos constituídos de compostos organossintéticos, começando com a utilização de organoclorados no controle das pragas (ALMEIDA, 1980; GUEDES, 1991). Para substituir os organoclorados, em razão das características indesejáveis destes, tais como bioacumulação e longa persistência, surgiram os OF, com destaque para o malationa e também os inseticidas carbamatos (Figura 1). Entretanto, com o desenvolvimento da resistência dos insetos a esses inseticidas, especialmente à malationa, a comunidade científica foi motivada a pesquisar outras formulações mais eficazes no combate às pragas (PACHECO et al., 1994).

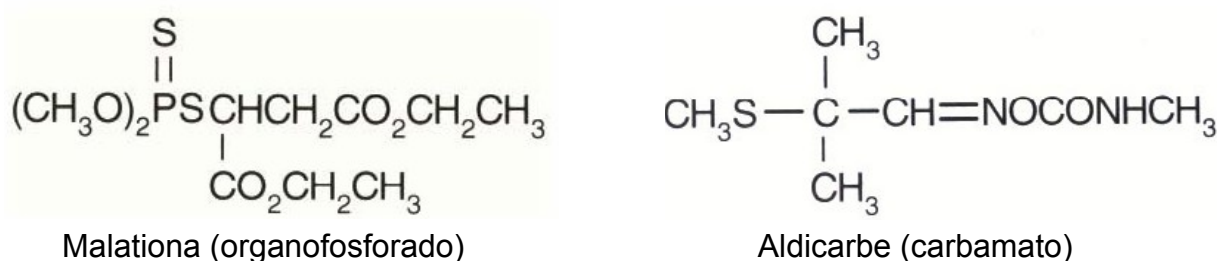


Figura 1 – Estrutura química de malationa e aldicarbe

Foi a partir dos anos 70 que a utilização dos agrotóxicos ocorreu em larga escala no Brasil, especialmente no sul, nas monoculturas convencionais, como solução de

curto prazo para a infestação de pragas e doenças. Hoje, o país é um dos maiores consumidores dessas substâncias no mundo, gastando-se, anualmente, cerca de U\$ 2,5 bilhões para sua compra deste produto. O Brasil supera em 7 vezes a média mundial de 0,5 kg de agrotóxicos por habitante. Após 1986, com o ganho financeiro momentâneo do plano cruzado o consumo saltou de 128 mil para 166 mil toneladas por ano (LUCCHESI, 2005).

Os principais tipos de agrotóxicos são: acaricida (controle de ácaros); bactericidas (controle de bactérias); formicidas (controle das formigas); fungicidas (controle dos fungos); herbicidas (controle das plantas daninhas ou invasoras); inseticidas (controle dos insetos) e nematicidas (controle de nematóides) (NOGUEIRA, 2006).

Os termos agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas e produtos fitossanitários têm sido utilizados com a mesma finalidade. Porém a Lei nº 7802, vigente no país desde 11 de julho de 1989, utiliza o termo agrotóxicos, cuja definição é: “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” (BRASIL, 1989).

O Decreto Estadual 41.203 (MINAS GERAIS, 2000), define como resíduo de agrotóxicos: “substância ou mistura de substâncias remanescentes ou existentes em alimento, em outro produto ou no meio ambiente, decorrente de uso ou não de agrotóxico ou afim, inclusive qualquer derivado específico, tais como: produto de conversão, de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas.”

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

A classificação toxicológica dos agrotóxicos está apresentada na Tabela 1, tendo como parâmetros a Dose Letal ( $DL_{50}$ ) e a Concentração Letal ( $CL_{50}$ ), que representam as doses estatisticamente derivadas a partir da administração única de uma substância química a qual se espera causar a morte de 50% dos animais de uma dada população

de organismos expostos, de acordo com a via de administração, em condições experimentais definidas.

No que se refere à quantidade de vendas realizadas em 2004 por grupo de agrotóxicos, os herbicidas (40%) foram os mais comercializados e, em segundo lugar, estão os fungicidas (31%) e logo a seguir, os inseticidas (24%), acaricidas (2%) e outros (3%). As maiores vendas do produto por culturas foram: soja (50%), algodão (10%); milho e cana de açúcar (7%); trigo, citros e café (3%) e arroz (2%). Os agrotóxicos em linha de comercialização por classe toxicológicas no ano de 2003 foram: classe I (19%); classe II (25,8%); classe III (32,0%) e classe IV (23,2%) (SINDAG, 2007). Como podemos observar, quase 50% dos agrotóxicos comercializados no país ainda pertence a classe I e II.

Tabela 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseada na Dose Letal<sub>50</sub> e na Concentração Letal<sub>50</sub> de formulações líquida e sólida

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

DL: Dose Letal; CL: Concentração Letal; Fonte: BRASIL, 1989

As culturas com maior uso de agrotóxicos por unidade de área são a maçã, tomate e batata, que em 2000 consumiram, em média, 49,0; 43,8; e 24,2 kg de ingredientes ativos de agrotóxicos por hectare, respectivamente (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2001). Comparando os consumos médios de ingredientes ativos por hectare de vários países no ano de 2002, o Brasil ocupa o oitavo lugar. Os países que lideram em termos de intensidade de uso são a Holanda, Bélgica, Itália, Grécia, Alemanha, França e Reino Unido (SINDAG, 2007).

A legislação federal de agrotóxicos e afins, Lei nº. 7.802/89, tem como aspecto relevante o estabelecimento das competências dos órgãos nos níveis federal, estadual e municipal quanto aos aspectos de controle, inspeção e fiscalização, das infrações e das sanções penais e administrativas, permitindo ao governo realizar ações mais eficientes de controle e fiscalização (GARCIA & ALMEIDA, 1991).

No Decreto nº. 4.074/2002, que regulamenta lei 7.802/89, cabe aos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Saúde e do Meio Ambiente, no âmbito de suas respectivas áreas de competências: I - estabelecer as diretrizes e exigências para registro e reavaliação de registro dos agrotóxicos, seus componentes e afins; II - estabelecer diretrizes e exigências objetivando minimizar os riscos apresentados por agrotóxicos; III - estabelecer o LMR e o intervalo de segurança; IV - estabelecer os parâmetros para rótulos e bulas; V - estabelecer metodologias oficiais de amostragem e de análise para determinação de resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem vegetal, animal, na água e no solo; VI - promover a reavaliação de registro de agrotóxicos, seus componentes e afins quando surgirem indícios da ocorrência de riscos que desaconselhem o uso de produtos registrados ou quando o país for alertado nesse sentido, por organizações internacionais responsáveis pela saúde, alimentação ou meio ambiente, das quais o Brasil seja membro integrante ou signatário de acordos; VII - avaliar pedidos de cancelamento ou de impugnação de registro; VIII - autorizar o fracionamento e a reembalagem; IX - controlar, fiscalizar e inspecionar a produção, a importação e a exportação dos agrotóxicos, bem como os respectivos estabelecimentos; X - controlar a qualidade dos agrotóxicos; XI - desenvolver ações de instrução, divulgação e esclarecimento sobre o uso correto e eficaz; XII - prestar apoio às Unidades da Federação nas ações de controle e fiscalização; XIII - indicar e manter representantes no Comitê Técnico de Assessoramento para Agrotóxicos; XIV - manter o Sistema de Informações sobre Agrotóxicos – SIA; e XV - publicar no Diário Oficial da União o resumo dos pedidos e das concessões de registro (BRASIL, 2002b).

A competência exclusiva da ANVISA, após a avaliação dos dados disponíveis, é estabelecer o LMR para cada cultura, considerando uma série de variáveis que podem interferir neste cálculo. O principal objetivo é garantir, com certa segurança, que a população possa consumir alimentos cujos níveis de resíduos, dentro destes limites estabelecidos, não causem problemas à saúde. Compete ao Ministério da Saúde, em conjunto com o Ministério da Agricultura, estabelecer os intervalos de segurança para os agrotóxicos e afins, com base nos LMR determinados (BRASIL, 2002b).

### **3.2 Inseticidas do grupo dos organofosforados**

Os denominados inseticidas OF, inseticidas fosforados, fosforados orgânicos, inseticidas fosfatos, ésteres do ácido fosfórico tiveram sua utilização na agricultura tremendamente aumentada nos últimos anos, à medida que os inseticidas organoclorados foram banidos do comércio em virtude de sua alta persistência e poder residual. Entre os OF, derivados estruturalmente dos ácidos fosfórico, tiosfosfórico, ditiosfosfórico e fosfônico, com seus análogos na forma de ésteres, encontram-se substâncias com alto grau de ação inseticida (MIDIO & MARTINS, 2000).

A toxicidade de uma substância em insetos não a qualifica necessariamente como inseticida. Diversas propriedades devem estar associadas à atividade, tais como eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxicidade frente a mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ser cumulativo no tecido adiposo de seres humanos e de animais domésticos (SANTOS et al., 2007).

Segundo MIDIO & MARTINS (2000) os inseticidas OF podem ser derivados estruturalmente dos ácidos fosfórico, tiosfosfórico, ditiosfosfórico e fosfônico, com seus análogos na forma de ésteres (Figura 2).

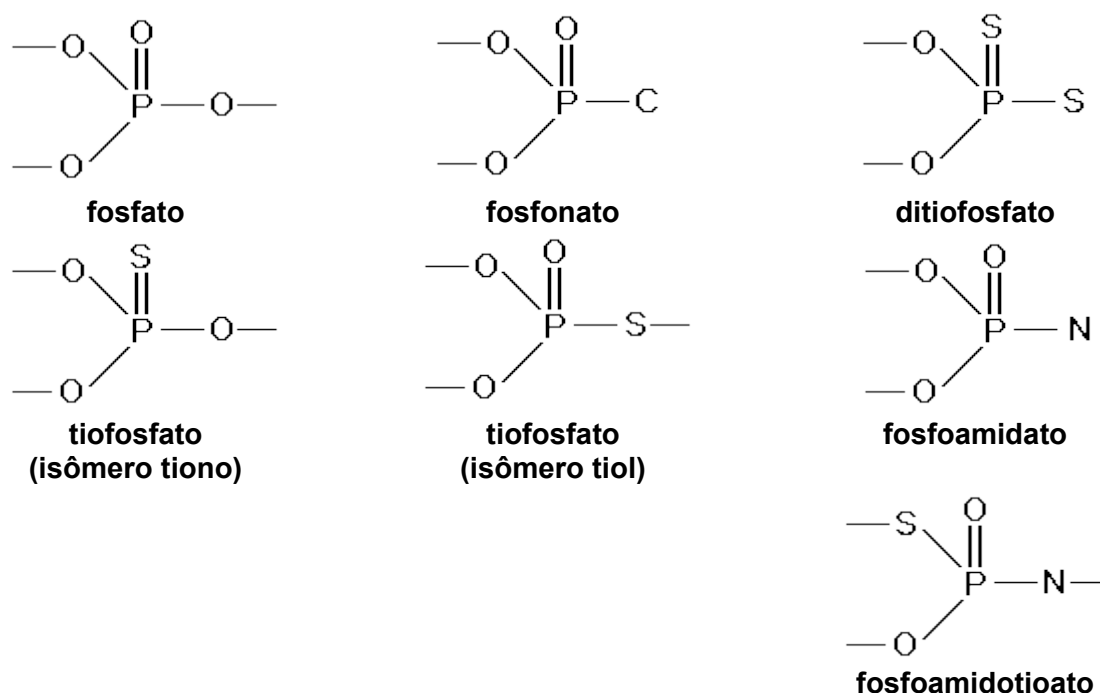


Figura 2– Grupo funcional dos compostos inseticidas organofosforados

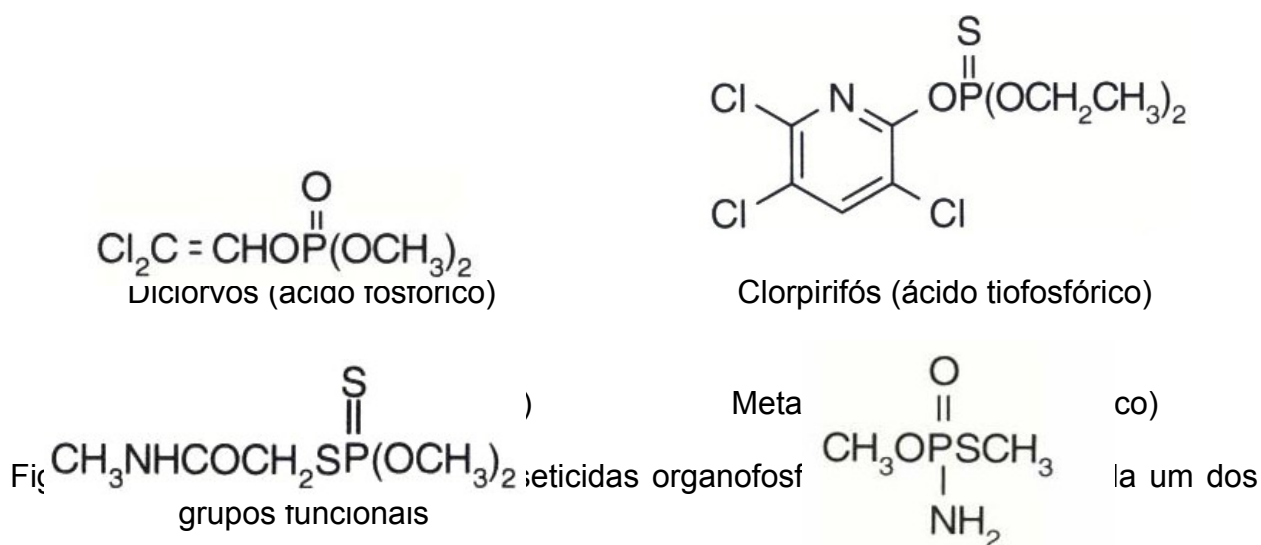
Fonte: MIDIO & MARTINS, 2000.

De acordo com esta classificação, os OF em linha de comercialização no Brasil (ANVISA; 2006a) são derivados dos ácidos:

- **fosfórico**: diclorvós; mevinfós; monocrotofós; nalede; triclorfon;

- **tiofosfórico**: azametiofós; bromofós; caduzafós; clorpirifós; diazinona, etoprofós; fenclorfós; fenitrotiona; fentiona; fosmete; foxim; parationa-metílica; piridafentiona; pirimifós-metílico; profenofós; temefós; triazofós;
- **ditiofosfórico**: dimetoato; dissulfotom; etiona; fentoato; forato; fosalona; fosmete; malationa; metidationa; protiofós; terbufós; teburinfós
- **fosfônico**. acefato; fenamifós; fostiazato; metamidofós.

As estruturas químicas de inseticidas OF típicos de cada um dos grupos descritos estão apresentados na Figura 3.



O interesse por esta classe de agrotóxicos deve-se à facilidade de síntese de novos derivados, à possibilidade de síntese de pró-inseticidas, que sofrem ativação preferencial em insetos e não em mamíferos, e à maior biodegradabilidade em comparação com os organoclorados. Os OF apresentam baixa ação residual, com pouca estabilidade no meio ambiente e acumulação limitada em organismos vivos, sendo que 80 a 90% dos compostos são eliminados após 48 h do contato (SANTOS et al., 2007).

De acordo com a Tabela 2 estão autorizados no país para a utilização pelo agricultor, 37 ingredientes ativos de agrotóxicos do grupo químico dos organofosforados. Dez recebem a classificação toxicológica I (extremamente tóxico), dezesseis a classificação II (altamente tóxico), nove a classificação III (medianamente tóxico) e um a classificação IV (pouco tóxico). Cumpre destacar que 70,3% estão entre a classificação I e II, extremamente e altamente tóxico para o ser humano. A Ingestão Diária Aceitável (IDA) variou de 0,01 a 0,0008 mg kg<sup>-1</sup> por peso corpóreo (ANVISA; 2007a).



A ação desses agrotóxicos se dá pela inibição de enzimas no organismo, principalmente a acetilcolinesterase levando a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas, desencadeando uma série de efeitos parassimpaticomiméticos. Essas enzimas estão presentes na transmissão de impulsos nervosos em diversos órgãos e músculos. Quando ocorre uma contaminação por organofosforados, há inibição dessas enzimas, impedindo que as mesmas realizem sua função (FUSSEL et al, 2004).

Vários sinais e sintomas clínicos estão associados à intoxicação por organofosforados, tais como: síndrome colinérgica (sudorese, salivação excessiva, pupilas puntiformes, hipersecreção brônquica, vômitos, cólicas, diarreias); síndrome nicotínica (tremores, abalos musculares, alterações da pressão arterial); síndrome neurológica (confusão mental, dificuldade para andar, convulsões, depressão cardíaco-respiratória, coma e morte). Além das colinesterases, alguns grupos de inseticidas organofosforados podem alterar outras enzimas, sendo a principal delas a esterase neurotóxica. Esta enzima, quando inibida, pode determinar paralisia irreversível dos músculos das pernas e braços por ação neurotóxica retardada, que surge após 15 dias da intoxicação aguda inicial (TRAPÉ, 2001).

A atividade da acetilcolinesterase pode ser determinada por meio de teste específico em sangue total, plasma ou eritrócitos. A acetil linesterase eritrocitária, também conhecida como acetilcolinesterase verdadeira, é mais específica. Intoxicações graves apresentarão níveis muito baixos de acetilcolinesterases. No caso dos organofosforados, a atividade da acetilcolinesterase eritrocitária poderá permanecer diminuída durante até noventa dias após o último contato. Apesar de ser possível mensurar a atividade das neurotoxicoesterases por metodologia laboratorial (análise em linfócitos), esta não está ainda disponível no país. É importante ressaltar que a análise da atividade dessas enzimas não deve ser utilizada de maneira isolada. O exame pode ser bastante útil, quando entendido e usado como instrumento auxiliar, tanto no diagnóstico clínico quanto nas ações de vigilância. (BRASIL, 1997).

TABELA 2: Informações sobre a classificação toxicológica e ingestão diária aceitável dos inseticidas organofosforados

<b>I.A ou nome comum</b>	<b>IDA (mg kg<sup>-1</sup> mc)</b>	<b>Classe Toxicológica</b>
acefato	0,03	III
azametifós		III
bromofós	0,04	II
cadusafós	0,0003	I
clorpirifós	0,01	II
diazinona	0,002	II

diclorvós	0,004	II
dimetoato	0,002	II
dissulfotom	0,0003	I
etiona	0,002	II
etoprofós	0,0004	I
fenclofós		III
fenitrothiona	0,005	II
fentiona	0,007	II
fentoato		III
forato	0,0005	I
fosalona	0,02	II
fosmete	0,01	II
fostiazato		II
foxim		III
iodofenfós		
malationa	0,3	III
metamidofós	0,004	I
metidationa	0,001	II
mevinfós	0,0008	I
monocrotofós	0,0006	I
nalede		III
parationa-metílica	0,003	I
piridafentiona		IV
pirimifós-metílico	0,03	III
profenofós	0,01	II
protiofós		II
tebupirinfós	0,0002	I
temefós		III
terbufós	0,0002	I
triazofós	0,001	II
triclorfom	0,01	II

Fonte: Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA), (ANVISA, 2007c)

I. A: Ingrediente ativo. IDA: Ingestão Diária Aceitável. mc: massa corporal

### 3.3 Contaminação de alimentos no Brasil e no mundo

A exposição de produtores rurais e consumidores aos resíduos de agrotóxicos constituem um dos principais alvos de preocupação com a saúde pública. Muitos países criaram programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos. No Brasil, em âmbito federal, há o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), que é gerenciado pela ANVISA. As análises são realizadas pelos laboratórios: Instituto Adolfo Lutz em São Paulo – SP, Instituto Tecnológico do Estado de Pernambuco em Recife – PE e Instituto Octávio Magalhães da Fundação Ezequiel Dias em Belo Horizonte – MG. Entre as 4001 amostras analisadas de alimentos *in natura* coletadas em supermercados, no período de junho de 2001 a dezembro de

2004, foram detectados 3271 ingredientes ativos. Concluiu-se que várias amostras apresentavam mais de um resíduo, os quais poderiam estar de acordo ou não com a legislação vigente. Do total de resíduos de agrotóxicos detectados, 71,5% eram regulares e 28,5% irregulares. Entre as amostras em desacordo, 83,4% continham agrotóxicos não autorizados para a cultura e 16,6% apresentavam resíduos acima do LMR permitido (ANVISA, 2006b).

Vários estados brasileiros adotaram também projetos de monitoramento e fiscalização de resíduos de agrotóxicos. No estado do Paraná, SCUCATO et al. (2001) analisaram 523 amostras de hortifrutigranjeiros monitorados pela Secretaria de Estado, no período de 1987 a 1992. Os resultados encontrados mostraram que 155 amostras (29,63%) apresentaram resíduos. Em 2000, a mesma Secretaria de Estado havia analisado 117 amostras, sendo que 37 amostras (31,62%) apresentaram resíduos não autorizados para a cultura de morango.

Em Minas Gerais, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) analisou resíduos de agrotóxicos em 71 amostras de morangos, coletadas nas Centrais de Abastecimento (CEASAMINAS), no período de 2001 a 2004. Constatou-se que das 31 amostras analisadas em 2002, 21 (67,7%) apresentaram resíduos de agrotóxicos, em 2003 das 10 amostras, 8 (80,0%) continham resíduos e em 2004 das 30 analisadas 18 (60,0%) apresentaram resíduos de agrotóxicos. As amostras que apresentaram irregularidades, ou seja, resíduos em níveis acima dos LMR ou resíduos de produtos não autorizados para morango, foram 29,0% em 2002, 80,0% em 2003 e 46,7% em 2004 (AMARAL & ALTOÉ, 2006).

No estado de São Paulo, a Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), em programa conjunto com o Instituto Biológico da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, analisou resíduos de agrotóxicos em 365 amostras de produtos agrícolas, durante o ano de 2003. Observou-se que em 63% das amostras analisadas não foram detectados resíduos de agrotóxicos, em cerca de 15% verificou-se a presença de resíduos abaixo do limite de tolerância e em menos de 1% havia resíduos acima dos LMR. Por outro lado, em quase 22% das amostras foram detectados resíduos de ingredientes ativos não registrados para a cultura (GORENSTEIN, 2004).

Em nível internacional, países com os Estados Unidos, Canadá e membros da Comunidade Européia têm programas nacionais de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos *in natura* e alimentos processados (EUROPEAN COMMISSION, 2005; USDA, 2007; CFIA, 2007). Nos Estados Unidos, por exemplo, o

*Pesticide Data Program* (PDP), coordenado pelo Departamento de Agricultura daquele país, iniciou-se em 1990. Foram analisados desde então cerca de 60 tipos de alimentos (*in natura* e processados), para mais de 400 agrotóxicos diferentes (inseticidas, fungicidas, herbicidas e reguladores de crescimento), com as amostras sendo coletadas próximas ao ponto de consumo nos 10 estados participantes. Em seu resultado mais recente, relativo ao ano de 2005 e divulgado em novembro de 2006, foram analisadas 14749 amostras, sendo que 10154 eram frutas e hortaliças, incluindo ameixas frescas e secas, laranja e suco de laranja, maçãs, melão, melancia, morango, pêra, uva, abóbora, alface, berinjela, couve-flor, vagens frescas e congeladas. Em termos gerais, 73% das frutas frescas e hortaliças e 61% dos produtos processados apresentaram resíduos detectáveis, sendo que, produtos frescos apresentaram um maior número de amostras com resíduos do que em grãos e produtos processados. Entre todas as amostras testadas, excluindo a água de beber, 34% não continham nenhum agrotóxico detectável, 30% continham um agrotóxico e 36% mais de um. Foram detectados níveis de resíduos abaixo do LMR em melão, couve-flor, vagens, alface, melancia e abóbora e resíduos acima do LMR em 0,2% das amostras testados em 2005, o que correspondeu a 25 amostras com resíduo de agrotóxico (USDA, 2007).

Vários trabalhos têm sido publicados sobre a avaliação da ocorrência de resíduos de agrotóxicos em várias partes do mundo. Em Portugal, no período de julho a dezembro de 1994, resíduos foram monitorados em vegetais. Onze das 96 amostras de alface apresentaram resíduos de endosulfan excedendo os limites máximos de resíduos, embora endosulfan não fosse permitido para aquela cultura. Similarmente, resíduos de ditiocarbamatos foram encontrados em espinafre, embora também este agrotóxico não fosse permitido para a cultura (CNPPA, 1995).

Pesquisa de resíduos de 22 ingredientes ativos de agrotóxicos, realizadas em 371 amostras de morango, no período de 1996 a 2000, em 5 províncias no sudeste da Polônia, 76,1% das amostras não apresentaram resíduos e 23,9% apresentaram resíduos com níveis abaixo do permitido. Os ingredientes ativos encontrados foram os fungicidas: diclofluanida (16% das amostras); procimidona (14,8%); vinclozolina (3,4%) e iprodiona (2,7%). Não foram encontrados resíduos de herbicidas e inseticidas (ROGOZINSKA et al, 2001). Por outro lado, em 2001, das 2.125 amostras de produtos vegetais analisados, 18% continham resíduos de agrotóxicos e aproximadamente 0,9% excederam LMR (SADIO, 2003).

Traços de agrotóxico foram encontrados em 53% das 76 amostras de alimentos infantis, obtidos de supermercados em Denver, Filadélfia e em São Francisco. O maior

número de agrotóxicos (5) foi encontrado em pêras. Todos os níveis encontrados estavam abaixo do LMR, sendo que o maior foi detectado em ameixas (46 ppb) e pêssegos (29 ppb) (BRIGDES, 1995).

Resíduos dos inseticidas OF, largamente utilizados na Turquia, foram pesquisados em 32 amostras de maçãs e 32 de morangos. Das 32 amostras de maçãs analisadas, 13 (40,6%) apresentaram resíduos com limites abaixo da tolerância de acordo como Codex Alimentarius e seis (19,2%) com limites acima do permitido, sendo o malationa, azinfós metil, metidationa e clorpirifós os ingredientes ativos encontrados. No morango, 23 (71,9%) das 32 amostras apresentaram resíduos e 17 (53,1%) excederam o LMR e os ingredientes ativos encontrados foram diazinona, metidationa, parationa e clorpirifós etil. Das 32 amostras, 21 apresentaram resíduos de diclorvós, 15 excederam o LMR e algumas com limites 10 a 77 vezes maiores (DURMUSOGLU, 2003).

Em um trabalho realizado em Shaanxi na China foram analisados oito OF, dentre eles o diclorvós, demetom, diazinom, dimetoato, parationa-metílica, pirimifós-metil, sumitiona e parationa por CG-DFC. Em 18, de 200 amostras, foram encontrados diclorvós, dimetoato, parationa-metílica, pirimifós-metílico e parationa, em concentrações que variaram de 0,004 a 0,257 mg kg<sup>-1</sup>. Os níveis médios do dimetoato e parationa nas frutas excederam os LMR permitidos pelo Ministério de Saúde daquele país (BAI et al., 2005).

Na Dinamarca foram monitorados resíduos de agrotóxicos em 4.150 amostras de frutas e hortaliças, as amostras foram testadas para 130 agrotóxicos, dos quais 80 foram detectados, sendo 79 e 28 diferentes agrotóxicos para amostras importadas e nacionais, respectivamente. Resíduos de agrotóxicos foram mais freqüentes em frutas (54%) do que em hortaliças (13%) (ANDERSEN & POULSEN, 2001).

### **3.4 Análise de resíduos de inseticidas organofosforados**

#### **3.4.1 Amostragem, transporte e armazenamento da amostra**

As quantidades mínimas de produtos frescos de origem vegetal a serem encaminhadas ao laboratório dependem do peso do produto. Para produtos menores que 25g deverá ser encaminhado 1kg, para produtos entre 25 a 250g deverá ser encaminhado 1kg e no mínimo 10 unidades e produtos maiores que 250g deverão ser encaminhados 2kg e no mínimo 5 unidades (CODEX ALIMENTARIUS, 1999).

Amostras embaladas no comércio varejista não devem ser desembaladas no momento da amostragem. Para evitar que deteriore, produtos perecíveis ou muito frágeis podem ser congelados e transportados em gelo seco ou similar. Enquanto as amostras que se danificam pelo resfriamento (por ex. bananas) devem ser protegidas das baixas e altas temperaturas. Durante o transporte da amostra até o laboratório, deverão ser evitadas a contaminação e a deterioração da amostra em todas as fases que poderão afetar os resultados analíticos. As amostras frescas deverão ser mantidas resfriadas e as congeladas permanecerem congeladas. Para amostras de produtos frescos é essencial o transporte até ao laboratório, preferencialmente no prazo de um dia (CODEX ALIMENTARIUS, 1999; EUROPEAN COMMISSION, 2006).

Todas as amostras que chegam ao laboratório deverão vir identificadas claramente e acompanhadas de informações completas sobre a origem, as análises requeridas e os possíveis perigos que podem ocorrer na sua manipulação. A amostra deverá receber um código de identificação único que acompanhará durante todo o período de análise até a emissão do resultado (CODEX ALIMENTARIUS, 2003, EUROPEAN COMMISSION, 2006).

As análises, se possível, deverão ser realizadas imediatamente, se não, estas devem ser armazenadas de 1 a 5° C, sem exposição à luz solar direta e serem analisadas em um prazo de poucos dias. No entanto, as amostras que chegam congeladas, deverão ser mantidas à temperatura de  $\leq -16^{\circ}$  C até o momento da análise. Em alguns casos é necessário armazenar as amostras por um período mais longo antes de proceder a análise. Em tais ocasiões, a temperatura de armazenamento deverá ser aproximadamente de  $-20^{\circ}$  C, sendo que a esta temperatura a degradação do resíduo de agrotóxicos pela ação de enzimas é muito lenta. Sendo necessário o congelamento das amostras, é recomendável que se tomem as porções que serão analisadas antes de proceder o congelamento, para reduzir ao mínimo o efeito da separação da água em forma de cristais de gelo durante o congelamento (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

### **3.4.2 Técnicas de extração e concentração da amostra**

Em sua maioria, os protocolos relacionados com a determinação de OF em alimentos envolvem o processo de extração, purificação, concentração do extrato e a determinação utilizando a cromatografia (NORMA & PANTON, 2001; KRISTENSON et al, 2001). Os solventes mais comuns utilizados na extração são acetona, acetato de

etila e acetoneitrila (KRISTENSON et al, 2001).

A escolha do método de extração depende da propriedade da matriz, das propriedades dos analitos e dos equipamentos e detectores disponíveis para o analista. Para cada tipo de matriz é determinado um método de extração. É conveniente separar os alimentos em quatro categorias de matriz, com base nos conteúdos de umidade e gordura: (1) alta umidade, baixa gordura (frutas e vegetais); (2) alta umidade, alta gordura (carne); (3) baixa umidade, baixa gordura (frutas secas); (4) baixa umidade, alta gordura (castanhas) (MARSHALL, 1998).

Para amostras não gordurosas, alguns procedimentos de extração estão disponíveis. Em um método executa-se a extração do analito pela agitação da amostra com acetato de etila e o sulfato de sódio (CUADROS-RODRIGUEZ et e al, 2003). Em outro, usa-se acetona para extração, seguida da partição líquido-líquido com um solvente orgânico, como diclorometano e éter de petróleo (LUCK et al, 1975).

O método de extração com acetato de etila é mais eficiente que o com acetona para compostos de alta polaridade. Com respeito à seletividade, a partição com acetona em presença de sulfato de sódio é mais favorável que a extração com acetato de etila, que em geral diminui a quantidade de interferentes polares da matriz. Entretanto, recentemente tem sido usado um método simplificado de extração/partição com acetona, derivado originalmente do método de LUCK (1975), o que reduz o tempo de análise bem como a quantidade de solventes (NETHERLANDS, 1996).

A acetona foi selecionada como o solvente de extração de 90 agrotóxicos, sendo 36 inseticidas OF e seus produtos de degradação, em frutas e vegetais. A escolha se deveu, por ser o solvente mais efetivo para moléculas polares e apolares em diversas variedades de matrizes. Entre outras vantagens, incluem a baixa toxicidade e custo, miscível em água e facilidade de evaporação (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003).

Durante o processo de concentração da amostra, podem ocorrer perdas de analitos, em quantidade traços, quando os extratos são evaporados até a secura. Um pequeno volume de um solvente com alto ponto de ebulição pode ser usado como protetor e a temperatura de evaporação deve ser a mais baixa possível. A secagem final do extrato em corrente de nitrogênio seco ou centrifuga de evaporação a vácuo é geralmente melhor que corrente de ar, pois o ar pode levar à oxidação ou à introdução de água ou outros contaminantes. A estabilidade do analito no extrato deve ser investigada no processo de validação. Estocagem dos extratos sob refrigeração ou congelamento pode minimizar a degradação, mas a perda na bandeja do amostrador

automático não deve ser ignorada, devido à temperatura da sala de cromatografia (EUROPEN COMMISSION, 2006).

### 3.4.3 Técnicas de purificação de amostras

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

A cromatografia em coluna é um dos processos utilizado na purificação. É utilizada uma coluna de 10 ou 20 cm x 2,5 cm, empacotada com florisil, sílica gel ou alumina (MARSHALL, 1998).

Cromatografia de permeação em gel (CPG) foi inicialmente a técnica de purificação mais eficiente e versátil nas análises de resíduos de organofosforados. A maior vantagem da CPG sobre a técnica convencional de cromatografia em coluna é o fato do grande número de agrotóxicos analisados. A mesma coluna pode ser usada para a purificação de várias amostras, com isto é requerido um menor tratamento e torna-se possível a automatização. A desvantagem é o grande volume de eluato que tem que ser processado (NETHERLANDS, 1996).

Método de purificação usando a cromatografia líquida com coluna de fase normal é boa alternativa para a automatização da purificação de amostras gordurosas comparado ao método de cromatografia de coluna que utiliza florisil, alumina ou sílica (NETHERLANDS, 1996).

Para matrizes gordurosas, geralmente é necessária uma etapa adicional de purificação para remover os resíduos de gordura. Com este propósito, as técnicas em uso são: CPG; partição líquido-líquido; cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Esta ultima técnica executa uma separação em coluna de sílica que combina fracionamento e purificação. A partição líquido-líquido envolve somente a separação entre analito e gordura e, então, é necessária uma etapa adicional de purificação. Para substâncias não gordurosas nem sempre é requerida uma etapa de purificação após a extração (NETHERLANDS, 1996).



### 3.4.4 Outras técnicas de extração e purificação

Progressivamente, técnicas alternativas para extração e purificação de amostra são adaptadas para análise de resíduos de OF. A principal vantagem destas técnicas é a diminuição do tempo de análise e diminuição do consumo de solvente e conseqüentemente a diminuição do custo. Dentre estas podemos citar: extração em fase sólida (EFS); microextração em fase sólida (MEFS); extração por microondas e extração por fluido supercrítico (MARSHALL, 1998).

A EFS pode ser uma valiosa alternativa clássica na preparação de amostra, porque permite uma significativa redução no tamanho da amostra e no consumo de solvente necessário para análise de multirresíduos. Além disso, dependendo da natureza do adsorvente selecionado, ocorre uma simultânea purificação do extrato. O material utilizado no empacotamento geralmente são sílicas quimicamente modificadas (Sílica - C<sub>18</sub>, Sílica - C<sub>8</sub>) e sílica gel (KRISTENSON et al, 2001, STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003).

A EFS tipicamente envolve uma pequena quantidade de material empacotado (30mg a 10g de adsorventes) em cartuchos de polipropileno de 30 a 40 µm de diâmetro. As funções destes cartuchos são reter os interferentes enquanto elui seletivamente o analito. Para o material do cartucho, a capacidade de retenção é de 5% da massa do adsorvente, aproximadamente. Entretanto, outros componentes do extrato bruto também podem ser retidos (MARSHALL, 1998). A eficiência da EFS depende do tipo e quantidade de adsorvente, volume da mostra, velocidade do fluxo e pH, assim como o conteúdo de compostos orgânicos modificados e volume do solvente eluído (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003).

A MEFS envolve a imersão do polímero que recobre a fibra dentro do extrato aquoso ou o aquecimento da amostra permitindo difundir o analito para o interior do revestimento. Após o equilíbrio a agulha da fibra é transferida para a porta do injetor do cromatógrafo a gás (CG), enquanto os analitos são termicamente arrastados para dentro da coluna (MARSHALL, 1998). O método de MEFS por “*headspace*” em combinação com CG-EM se mostrou eficiente para a extração e quantificação dos organofosforados diazinona, fenitrotiona, fentiona, parationa, bromofós-etilico e etion em amostras de morango e ameixa. O método foi desenvolvido usando fibras revestidas com 100 µm de polidimetilsiloxano (ALBANIS & LAMBROPOULOU, 2003).

As extrações com microondas geralmente podem diminuir consideravelmente o

tempo de extração e a quantidade de solvente utilizado. Os sistemas comerciais têm capacidade para a extração de 8 a 12 amostras. A vantagem deste procedimento é que a temperatura excede o ponto de ebulição do solvente, e conseqüentemente ocorre mais rapidamente a extração do analito (MARSHALL, 1998).

A extração por fluido supercrítico envolve o uso de quantidade limitada de solvente convencional em elevada temperatura (em torno de 200°C) e pressão (1500 a 2000 psi), extraindo a amostra sólida em um curto período de tempo, freqüentemente inferior a 10 min (MARSHALL, 1998). O fluido supercrítico tem densidade semelhante ao líquido, porém baixa viscosidade e alto coeficiente de difusão. Esta combinação de propriedades resulta em um fluido com maior poder de penetração e solvatação, extraindo o soluto mais rapidamente que o líquido. O CO<sub>2</sub> é um fluido apropriado para a extração de resíduos de agrotóxicos e tem a vantagem de estar disponível livremente na natureza. Um método automatizado usando o CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico foi utilizado para análise de resíduos de OF em milho e trigo com boa recuperação e baixo limite de detecção (NORMA & PANTON, 2000).

### **3.4.5 Métodos analítico**

O método de análise de resíduos de OF geralmente compreende as seguintes etapas: extração da amostra, purificação, separação cromatográfica e quantificação (BOTITSI et al., 2000).

O método deve ser adequado para a determinação dos resíduos em conformidade com os LMR. A escolha do método depende da propriedade do analito e os solventes mais utilizados em análise de resíduos de vários organofosforados em amostras de produtos de origem vegetal são a acetona e acetato de etila (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

O desenvolvimento do método capaz de analisar vários resíduos de organofosforados pode ser dificultado pelo fato de alguns compostos apresentarem diferentes polaridades, solubilidades, volatilidades e valor de pK<sub>a</sub>, e ter que ser simultaneamente extraído e analisado (STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003).

Quando se trabalha com o grupo de agrotóxico, os métodos de multiresíduos são geralmente preferíveis; devido à detecção de vários analitos em uma única extração. Os métodos de multiresíduos usados nas análises de agrotóxicos são freqüentemente determinados por cromatografia com diferentes detectores seletivos (JANSSON et al, 2004).

O método de multiresíduos contém a etapa de preparação da amostra, extração, e purificação do extrato, seguido pela separação cromatográfica e quantificação com emprego de detectores altamente seletivos. Dos dez métodos de multiresíduos usados pelo Food and Drug Administration (FDA) e United States Department of Agriculture (USDA), oito são baseados em CG e dois em CLAE. Esses métodos usados atualmente vêm sendo modificados, expandidos e otimizados ao longo dos anos. Entretanto estes métodos não detectam todos os resíduos em todos os tipos de amostra (MARSHALL, 1998).

As diferentes classes químicas dos agrotóxicos bem como os diferentes tipos de alimentos contaminados determinam diferentes estratégias de análise. Uma dificuldade no desenvolvimento de métodos de resíduos é a necessidade de cobrir a grande diferença química destas substâncias, usando um único procedimento analítico. Os resíduos de OF são determinados por CG e CLAE usando várias combinações de coluna e detectores, alcançando a necessária seletividade e sensibilidade para as diferentes classes (HAIB et al, 2003).

As técnicas geralmente disponíveis para análise de resíduos de OF, são CG, principalmente com detectores nitrogênio e fósforo (DNF), fotométrico de chama (DFC) e espectrômetro de massas (EM). São utilizados também detector de captura de elétrons (DCE), ionização de chama (DIC) e CLAE com detector de: ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD), EM/EM, fluorescência, eletroquímico (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

### **3.4.6 O uso da cromatografia gasosa**

A CG é tradicionalmente o método de escolha para análise de OF, sendo uma técnica poderosa de separação largamente utilizada para análise de traços. A técnica tem sido aprimorada com o passar do tempo, melhorando sua eficiência, tempo e custo efetivo e ampliando o espectro de compostos a serem analisados (HAJSLOVA et al, 2001).

As colunas utilizadas podem ser classificadas de acordo com o diâmetro em empacotadas, *megabore* e capilar. As colunas capilares são fabricadas de sílica fundida e são revestidas com uma cobertura de poliamida impermeável. A vantagem dessa coluna é que ela apresenta uma resolução 12 vezes maior que as colunas empacotadas de comprimento similar. As colunas *megabore* têm diâmetro

intermediário entre a empacotada e capilar (0,75 - 1,0 mm), também são vantajosas e apresentam algumas características ainda melhores, que as colunas empacotadas e capilares (MARSHALL, 1998). A coluna capilar é atualmente a mais utilizada para análise de resíduos de OF e possui 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m (NORMA & PANTON, 2001; KRISTENSON et al, 2001; CUADROS-RODRIGUEZ et e al, 2003).

A escolha da fase estacionária é auxiliada pela seguinte regra, semelhante dissolve semelhante (analitos apolares interagem mais fortemente com fase líquida apolares e vice versa). Em geral, a natureza do analito determina a escolha da fase estacionária. Para a separação de alguns compostos mais polares, semelhantes aos compostos OF, OV-17 (ou DB- 1701) pode ser aplicada, e é bastante recomendada quando se usa o detector fotométrico de chama (NETHERLANDS, 1996). Para análise de resíduos de OF, três colunas com polaridades diferentes são utilizadas tais como: 14% cianopropila-fenila e 86% dimetilpolisiloxano (DB-1701) (NETHERLANDS, 1996; CUADROS-RODRIGUEZ et e al, 2003), 5% de fenila e 95% de dimetilpolisiloxano (DB-5) (NETHERLANDS, 1996; NORMA & PANTON, 2000; KRISTENSON et al, 2001; CUADROS-RODRIGUEZ et e al, 2003, PAGLIUCA et al, 2005) e 100% de dimetilpolisiloxano (DB-1) (NETHERLANDS, 1996; TADEO, 2001).

O sucesso na aplicação de CG nas análises de resíduos de OF depende do uso de detectores altamente sensíveis e seletivos. Os detectores mais utilizados são: DNF (NETHERLANDS, 1996; MARSHALL, 1998; TADEO et al, 2001, PAGLIUCA et al, 2005), DFC (NETHERLANDS, 1996; MARSHALL, 1998; CUADROS-RODRIGUEZ et e al, 2003; FUSSELL et al, 2004). O DFC pulsado é um excelente detector para análise de OF devido a sua bem conhecida seletividade, alta sensibilidade e linearidade de resposta (CUADROS-RODRIGUEZ et e al, 2003).

Outro detector bastante utilizado atualmente é o espectrômetro de massas acoplada a cromatografia gasosa que oferece a possibilidade de alta seletividade de detecção e quantificação de resíduos de OF. Esta técnica oferece um desempenho em termos de seletividade, com o poder de confirmação em um universo de analito que pode ser detectado (MARSHALL, 1998). Os equipamentos usados no laboratório de resíduos podem ser baseados em dois diferentes tipos de analisador de massas, de um lado os detectores baseados em analisador quadrupolo e do outro mais recentemente torna-se disponível os detectores baseados em *ion trap* (NETHERLANDS, 1996).

Os dados de resíduos obtidos pelo EM podem representar a definitiva evidência comparando a massa espectral e a razão do número adequado de fragmentos de

massa (NETHERLANDS, 1996). Para assegurar a presença do composto, todos os fragmentos de massa deveriam ser diferenciados no espectro do CG – EM com abundância maior que 10% da base do pico no tempo de retenção estabelecido (CUADROS-RODRIGUEZ et al., 2003).

Vários trabalhos utilizam o CG – EM para análise de confirmação e quantificação, progressivamente tem se tornado o primeiro equipamento de escolha para determinação de resíduos de OF em alimentos. (KRISTENSON et al., 2001; TADEO et al., 2001; CUADROS-RODRIGUEZ et al., 2003; STAJNBAHER & ZUPANCIC-KRALJ, 2003; ZROSTLIKOVA et al., 2003; ALBANIS & LAMBROPOULOU, 2003). Alguns autores recomendam o uso de varredura (*full scan*), mas este método tem certas limitações de sensibilidade em baixa concentração do analito alvo em presença de altas concentrações dos interferentes da matriz. O aumento da seletividade e sensibilidade da técnica tem sido realizado usando o modo de seleção de íons monitorados (*S/M*) (VIDAL et al., 2003).

A EM é a técnica de confirmação preferível, podendo oferecer provas definitivas. Geralmente as análises de resíduos mediante EM se aplicam conjuntamente com outras técnicas cromatográficas de separação, com a finalidade de obter simultaneamente dados sobre o tempo de retenção, a relação massa/carga dos íons e abundância dos mesmos. Ao confirmar a identificação dos resíduos, há de levar em conta a abundância relativa dos íons no espectro e a ausência dos íons que interferem. É um dos métodos menos seletivos e deve-se ter o cuidado para evitar a interferência dos contaminantes durante o preparo e armazenamento dos extratos. Podem-se conseguir uma confirmação complementar: i) utilizando outra coluna cromatográfica; ii) utilizando outra técnica de ionização (por ex: ionização química); iii) controlando outros produtos de reação de determinados íons mediante EM/EM; ou iv) controlando outros íons com uma massa maior de resolução (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2003).

### **3.4.7 O uso da cromatografia líquida de alta eficiência**

Em contraste com as moléculas apolares, os agrotóxicos recentemente introduzidos no mercado são freqüentemente mais polares e menos voláteis. Esta complicada natureza dos agrotóxicos levou ao desenvolvimento de técnicas especiais como a CLAE-EM, que tem sido usada com sucesso em análise de resíduos de OF (JANSSON, 2004).

A aplicação da CLAE para análise de multiresíduos tem sido limitada a compostos não voláteis ou que possuem instabilidade térmica, usando UV, EM e eletroquímicos (MARSHALL, 1998; PÉREZ-RUIZ et al, 2005).

PÉREZ- RUIZ et al (2005) descreveram um método para determinação de fosfatos e OF em uma matriz complexa, apresentando uma alta seletividade e especificidade, acoplando uma reator pós-coluna à CLAE com detector de fluorescência. Entretanto, para quantificação de OF, o comprimento de onda de 215 nm é geralmente utilizado, mas a baixa absorção na região do UV faz dele um detector não muito desejável, principalmente em presença de grande quantidade de interferentes

A CLAE é bem conhecida como uma técnica que tem boa operabilidade, porque pode ser realizada a temperatura ambiente. Entretanto, não fornece uma separação eficiente quando é aplicada a análise de uma matriz biológica. Neste caso, é necessário um complexo procedimento de purificação (LACORTE et al, 1997).

A CL-EM é uma nova técnica analítica que foi desenvolvida para resolver os problemas da CLAE, CG e CG-EM. É reconhecido como uma técnica analítica ideal que combina CLAE, que é grandemente utilizada para medidas de compostos termicamente instáveis, altamente polares e não voláteis, com EM que tem excelente sensibilidade e especificidade (LACORTE et al., 1997).

A nova técnica tornou-se rapidamente aceita para análises de resíduos de OF em frutas e vegetais com o propósito de monitoramento. A principal tarefa foi desenvolver um método para multiresíduos em várias matrizes, que pudesse substituir os métodos específicos e incluir novos agrotóxicos que até agora não haviam sido analisados. O estudo tem demonstrado que não são necessárias as etapas de purificações, com isto diminuindo o tempo de análise. Neste tipo de cromatografia duas técnicas de ionização estão sendo propostas: ionização química a pressão atmosférica e a *electrospray* (JANSSON et al., 2004).

O emprego da CL-EM pode proporcionar dados adequados, porém considerando que os espectros gerados são muito simples e apresentam uma escassa fragmentação característica é improvável que os resultados obtidos mediante CL-EM sejam definitivos. Uma técnica mais potente é a aplicação de CL-EM/EM, que combina seletividade e especificidade e fornece provas adequadas da identidade do composto (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

### **3.4.8 Aplicação da Cromatografia de Camada Delgada**

A CCD tem sido usada como uma técnica valiosa e barata para purificação, separação, identificação e uma estimativa semiquantitativa de resíduos de agrotóxicos. Para análise de OF são utilizados como suporte sólido à sílica gel (H, G, G-HR), alumina neutra G e o Adsorbosil G-1, e como fase móvel: hexano:acetona, 1:4; benzeno:ciclohexano, 3:1; benzeno: hexano, 1:1; benzeno: diclorometano, 4:1; acetona: hexano, 15:85. Para identificação dos OF as placas são submetidas a vapores orgânicos de bromo. Alguns dos procedimentos para visualização dos inseticidas OF nas placas de CCD incluem o uso de sílica gel fluorescente GF<sub>254</sub> e também a visualização das manchas expostas aos vapores de bromo, com lâmpadas de UV (BOWMAN, 1971).

Uma bem sucedida aplicação da CCD é a dos agrotóxicos que inibem as colinesterases. Vários inseticidas OF e carbamatos são capazes de inibir este grupo de enzimas. As placas CCD são preparadas com solução contendo uma ou mais dessas enzimas, o extrato que possui o agrotóxico são hidrolisados por essas enzimas e formam um produto colorido (MARSHALL, 1998).

Relativo às técnicas cromatográficas automatizadas, a CCD geralmente fornece um décimo da capacidade da resolução das colunas empacotadas do CG. Além disso, a falta de precisão associada com a quantificação e os limites de detecção levou a redução do uso do método. Entretanto, a CCD possui fatores que podem ser explorados vantajosamente, quando usada em uma separação semiquantitativa, para um limitado grupo de agrotóxicos (MARSHALL, 1998).

Um apreciável aprimoramento na resolução tem sido obtido com a redução do tamanho da partícula da fase estacionária, dando origem à Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência - CCFAD, acoplada ao equipamento para a localização do analito sobre a placa. A quantificação em densitômetro tem apresentado apreciável melhora na reprodutibilidade da técnica (MARSHALL, 1998).

Entre vários métodos cromatográficos, a CCFAD é comparativamente simples, rápida e conveniente para identificação de várias substâncias químicas. Entretanto, há poucos relatos para métodos de separação de inseticida OF por CCFAD (OISHI et al, 1997).

### **3.4.9 Métodos de confirmação**

Quando se trabalha com análise de fiscalização, é importante a confirmação dos dados antes de se fornecer o resultado da amostra que contém resíduos de

agrotóxicos não autorizados para a cultura ou acima do LMR. As amostras podem conter substâncias químicas que interferem com a análise, que são erroneamente identificadas como agrotóxicos. Em CG, por exemplo; os interferentes são os ésteres de ftalato nos DCE e composto contendo enxofre e nitrogênio nos detectores seletivos de fósforo (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

As seguintes técnicas de confirmação são consideradas aceitas: CG-EM; CLAE-EM/EM; CLAE – DAD; princípios cromatográficos (CG ↔ CLAE); detectores diferentes; derivação (se este não for o método de escolha); diferentes fases estacionárias e diferentes fases móveis. Além disto, variações nas etapas de partição e purificação da amostra, em casos especiais, também são consideradas métodos de confirmação. Quando o método for realizado por CG-EM ou CLAE-EM/EM não são necessários métodos de confirmação (CODEX ALIMENTARIUS, 2003; EUROPEAN COMMISSION, 2004).

A confirmação dos resíduos detectados por CLAE é mais problemática que por CG. Se a detecção se efetua pela absorção dos raios UV, a obtenção de um espectro completo pode proporcionar uma prova adequada da identidade do composto. Entretanto, os espectros UV de alguns agrotóxicos não são úteis para o diagnóstico, por serem análogos aos produzidos por muitos outros compostos que possuem grupos funcionais ou estruturas similares. Os dados sobre absorção no UV obtidos em diversos comprimentos de onda podem apoiar ou refutar a identificação, porém em geral por si só não são suficientemente característicos. Podem-se empregar dados da fluorescência e a derivação para confirmar os resíduos detectados por CLAE (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

### **3.5 Validação de métodos**

Validação de métodos analíticos é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. O laboratório deve validar os métodos não normalizados, criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos, ampliações e modificações dos métodos normalizados (ABNT, 2005). Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio



que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. (INMETRO, 2003).

Estudo colaborativo interlaboratorial é um dos meios de avaliar os atributos do método, proficiência do analista, os valores de referência do material ou comparar os métodos de análise (NATA, 1997). O laboratório que utilizar um método validado por estudos interlaboratoriais, que tenha sido avaliado como adequado para o propósito de uso, precisa demonstrar somente que está aplicando o método de forma correta e que obtém determinadas características (EURACHEM, 1998).

A validação completa de um método analítico inclui avaliação das características do método em um estudo interlaboratorial, mas nem sempre é prático ou mesmo necessário este tipo de validação. Nestes casos uma validação intralaboratorial é indicada para garantir a viabilidade do método antes de realizar uma dispendiosa validação interlaboratorial e fornecer evidência da confiabilidade de um método quando validações interlaboratoriais não forem disponíveis ou praticáveis (THOMPSON et al., 2002).

É essencial que os estudos de validação representem a realidade do ensaio, isto é, devem ser conduzidos em condições, as mais próximas possíveis, das de uso normal do método, e ainda cobrir as faixas de concentração e os tipos de amostras dentro do escopo do método (THOMPSON et al., 2002).

Está implícito no processo de validação de um método, que os estudos para determinação dos parâmetros sejam realizados utilizando equipamentos dentro das especificações, em boas condições de trabalho e adequadamente calibrados. Da mesma forma, o analista envolvido nos estudos deve ser competente na área em questão, e ter conhecimento suficiente sobre o trabalho e ser capaz de tomar decisões apropriadas durante a realização do estudo (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003).

Como formas para a determinação do desempenho de um método são citadas pela NBR ISO/IEC 17025:2005: a calibração com uso de padrões ou materiais de referência, as comparações com resultados obtidos por outros métodos, as comparações intralaboratoriais, a avaliação sistemática de fatores que influenciam o resultado e, a avaliação da incerteza dos resultados com base no conhecimento científico dos princípios teóricos do método e na experiência prática (ABNT, 2005).

Os parâmetros de desempenho típicos na validação intralaboratorial a serem estudados em um determinado protocolo são: aplicabilidade, seletividade, linearidade da curva de calibração analítica, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação, sensibilidade.

### 3.5.1 Aplicabilidade, seletividade, efeito de matriz e sensibilidade

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

A EUROPEAN COMMISSION (2002) define como especificidade a capacidade de um método distinguir o analito de outra substância. Esta característica depende, essencialmente, da técnica de medição descrita, podendo variar de acordo com o tipo de composto na matriz. Entretanto, segundo a IUPAC (VESSMAN et al., 2001), este conceito expressa a seletividade do método.

A seletividade é a capacidade do método em distinguir o analito de interesse de materiais interferentes. Para verificar a seletividade do método os resultados devem ser testados sob circunstâncias experimentais diferentes, por exemplo, dois analitos diferentes ou duas técnicas diferentes da detecção. O comportamento do analito durante a análise deve ser indistinguível do padrão na matriz apropriada (AOAC, 1998).

Os termos seletividade e especificidade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações (EURACHEM, 1998; AOAC, 1998; EUROPEAN COMMISSION, 2002; THOMPSON et al., 2002). Um método instrumental de separação que produz resposta para uma única substância de interesse, normalmente um dado elemento, pode ser chamado de específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo (INMETRO, 2003). Considerando que há poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas uma substância, o termo seletividade é mais apropriado, conforme sugerido pela IUPAC (VESSMAN et al., 2001; RIBANI et al., 2004).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

Muito esforço foi dedicado para resolver os problemas de seletividade freqüentemente encontrados com as técnicas mais comuns de espectrofotometria de

UV/Visível ou de CLAE. Comparações de resultados podem ser usadas, variando as condições de medição e análise, para verificar se os interferentes estão sendo determinados junto com o analito. Algumas vezes devem-se usar técnicas adicionais, como CCD ou EM, após a separação e a coleta do analito. Para este propósito, as amostras utilizadas nos ensaios são estudadas cuidadosamente para provar que nenhum produto de degradação possa alterar o sinal do analito (INMETRO, 2003).

Os efeitos de matriz não significativos simplificam enormemente o processo de validação, visto que os padrões dos analitos podem ser preparados diretamente no solvente. Para que esta estratégia seja adotada, o efeito de matriz deve ser avaliado na validação (THOMPSON et al., 2002). A matriz pode conter compostos, os quais interferem na medida feita pelo detector selecionado. Os compostos interferentes podem fortalecer ou reduzir o sinal e magnitude do efeito. Os diferentes tipos de amostras, extratos e concentrações da matriz podem exibir efeitos de valores diferentes. Uma matriz representativa pode ser usada para calibrar vários tipos de amostras (BRUCE et al., 1998; EUROPEAN COMMISSION, 2006).

A sensibilidade é a medida da mudança na resposta do equipamento correspondente à mudança na concentração do analito. Quando a resposta é linear com respeito à concentração, a sensibilidade corresponde ao gradiente da resposta da curva (WILLETTS & WOOD, 2000). A sensibilidade do método depende primariamente das características da função de calibração e a variabilidade da recuperação do analito sobre a faixa de concentração de interesse. Este termo é, às vezes, usado inapropriadamente quando se refere à capacidade de detecção do processo de medida (AOAC, 1998).

A sensibilidade é o gradiente da função de calibração do equipamento. Como é usualmente arbitrário, dependendo de ajustes instrumentais, não é útil em validações, podendo ser útil em procedimentos de garantia de qualidade (THOMPSON et al., 2002).

### **3.5.2 Faixa de trabalho e linearidade**

A faixa de trabalho de um método analítico é o intervalo entre os maiores e os menores níveis (incluindo estes níveis) que tenham demonstrado precisão, exatidão e linearidade usando o método como descrito. É normalmente expressa dentro das mesmas unidades dos resultados dos testes obtidos pelo método analítico (HUBER, 1998).

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores impeditivos são os limites de detecção e de quantificação e no limite superior, os fatores dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de trabalho, pode existir uma faixa de resposta linear, isto é, a resposta do sinal ter uma relação linear com a concentração do analito. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa linear de trabalho (INMETRO, 2003).

Um número suficiente de soluções padrão é necessário para definir a resposta em relação a uma faixa de concentração. Na maioria dos casos, no mínimo de cinco concentrações da solução padrão, sem incluir o zero, é apropriada para o preparo da curva de calibração e esta deve ser estatisticamente testada (AOAC, 1998).

Linearidade é a habilidade de um método analítico produzir resultados os quais sejam proporcionais à concentração do analito em amostras, dentro de uma faixa de concentração, tanto diretamente quanto por meio de uma transformação matemática bem definida (NATA, 1997; HUBER, 1998).

Linearidade define a capacidade do método de obter resultados proporcionais à concentração do analito (EURACHEM, 1998). É necessário avaliar a curva de calibração na faixa de concentração na qual o método pode ser aplicado, e dentro desta faixa de trabalho, se existe uma resposta linear (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). O método de avaliação da linearidade proposto por SOUZA & JUNQUEIRA (2005) estabelece: (i) definição da faixa de interesse, considerando que a concentração esperada na amostra deve estar no centro da faixa; (ii) preparação de soluções de calibração em solvente ou matriz, dependendo dos resultados dos estudos de efeitos de matriz, em pelo menos seis níveis de concentração, igualmente espaçados, em três replicatas independentes e um nível zero, preparado como uma ferramenta de controle para ajuste do zero instrumental; (iii) medida da resposta das soluções de calibração em uma ordem aleatória.

### **3.5.3 Exatidão e precisão**

Exatidão é o grau de concordância entre o valor médio de uma grande série de resultados de ensaios e o valor de referência aceito, sendo geralmente expresso como erro sistemático ou tendência (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Podem também ser definidos como a extensão na qual os resultados gerados por um método e os valores verdadeiros concordam (HUBER, 1998).

A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. É declarada quantitativamente em termos de tendência (*bias*) ou erro sistemático, com pequenas tendências indicando exatidão (THOMPSON et al, 2002; INMETRO, 2003).

A exatidão expressa a proximidade de um resultado do seu valor real. Pode ser estudada da seguinte forma: comparando os resultados de um método com outro previamente validado; por análise de materiais de referência certificados, uso do método de referência de incerteza conhecida ou por testes de recuperação com adição de padrões, quando materiais certificados não estiverem disponíveis (BRUCE et al., 1998, AOAC, 1998).

Para avaliar a exatidão usando um material de referência, deve-se determinar a média e o desvio padrão de uma série de replicatas e comparar com o valor do material de referência. Um material de referência ideal é um material certificado, de uma matriz natural, muito similar às amostras de interesse. Obviamente, a disponibilidade de tais materiais é limitada. Alternativamente, materiais de referência para validação podem ser preparados por adição de substâncias puras certificadas a matrizes típicas. Uma forma de determinar a eficiência da extração é adicionar diferentes concentrações do analito a porções da matriz, proceder à extração e medir a concentração do analito. O problema é que o analito introduzido desta forma, provavelmente não estará tão fortemente ligado à matriz, como um naturalmente presente neste meio e assim, a técnica poderá indicar uma eficiência de extração superior à real. Apesar desta limitação, esta é a técnica mais comumente usada para determinação da eficiência de recuperação e é reconhecida entre os especialistas da área (EURACHEM, 1998).

Thompson et al. (2002) consideram que, na ausência de materiais de referência, a exatidão pode ser investigada por meio de experimentos de adição de padrões. Estes autores também afirmam que estudos de adição e recuperação de padrões podem ser fortemente sujeitos a erros de observação. Entretanto, enquanto boa recuperação não é uma garantia de exatidão, certamente uma recuperação pobre é uma indicação de falta de exatidão.

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI et al, 2004).

A precisão indica o grau de dispersão de diversos valores individuais em torno do valor mais provável, sendo usualmente representada em termos de desvio padrão

ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação). Depende somente da distribuição de erros aleatórios e não é relacionada ao valor verdadeiro ou valor específico. (EURACHEM, 1998). THOMPSON et al (2002) define precisão como sendo proximidade de concordância entre resultados independentes obtidos sob condições estipuladas. É usualmente especificado em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativo.

As duas medidas de precisão mais comuns são a repetitividade e reprodutibilidade, o que implica em um estudo adicional, utilizando análise estatística de variância. A repetibilidade avalia a variabilidade encontrada quando resultados independentes são obtidos utilizando o mesmo método, em um mesmo laboratório, com o mesmo analista, usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade representa a variabilidade encontrada quando resultados são obtidos utilizando o mesmo método, em laboratórios diferentes, com diferentes analistas e usando equipamentos diferentes. Tanto a repetitividade quanto a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito (EURACHEM, 1998; BRUCE et al., 1998).

Existe ainda o termo reprodutibilidade parcial também chamado precisão intermediária para definir a avaliação da precisão sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, o mesmo laboratório, porém avaliando a variabilidade dos resultados analíticos com mudança de vários fatores: diferentes operadores; diferentes equipamentos e diferentes dias (MAROTO et al., 2001). Outros fatores incluem condições ambientais diferentes, lotes de reagentes, solventes e temperatura ambiente (EUROPEAN COMMISSION, 2002)

Segundo KUTTATHARMMAKUL et al, (1999) quatro fontes de variação contribuem para a variabilidade das medidas dentro de um laboratório. Os fatores considerados são operador, instrumento, tempo, e erro aleatório. Estes quatro fatores são as principais fontes que contribuem para a variabilidade das medidas dentro de um laboratório. Para cada método analítico, a amostra é analisada por vários operadores. Cada operador executa a análise em cada um dos instrumentos, com replicatas em dias diferentes. A precisão intermediária é útil para indicar a habilidade do método analítico de repetir o resultado de teste sob as circunstâncias definidas.

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004).

### 3.5.4 Limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção

Em termos gerais, o limite de detecção (LD) é a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser significativamente distinguida de zero. Entretanto, apesar da aparente simplicidade deste conceito, existem muitas definições sobre LD na literatura (THOMPSON et al 2002).

O LD pode ser definido como a menor concentração detectada em amostras adicionadas, mas não necessariamente quantificada e distinguida de zero (sinal/ruído  $\geq 3$ ) (SOUZA et al., 2007). Segundo a AOAC (1998), “é a média das leituras de amostras brancas ( $n \geq 20$ ) mais 3 vezes o desvio padrão, expresso em concentração do analito”. Como define HUBER (1998), “é a menor concentração de um analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada.” Para sistemas cromatográficos, é a quantidade injetada que resulta em um pico com altura pelo menos 2 ou 3 vezes a linha de base do ruído. O LD pode ainda ser descrito como a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser separada do *background* do instrumento utilizado para a medição (BRUCE et al., 1998).

Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão (repetitividade) e exatidão sob as condições estabelecidas no teste (EURACHEM, 1998). É a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinado com precisão e exatidão apropriadas para o analito e matriz considerados (AOAC, 1998). Pode também ser descrito como a menor concentração do analito medida com níveis aceitáveis de exatidão e precisão (BRUCE et al., 1998) ou a concentração abaixo da qual o método analítico não pode operar com precisão e exatidão aceitáveis (THOMPSON et al., 2002).

Limite de decisão ( $CC\alpha$ ) é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não-conforme com uma probabilidade de erro  $\alpha$ , que mede a taxa de resultados falsos não-conformes (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Quando os resultados obtidos forem menores que  $CC\alpha$ , a amostra pode ser declarada como conforme, o que significa ausência do analito ou presença do analito em uma concentração menor que o LMR, com um nível de confiança de  $(1 - \alpha)$  (ANTIGNAC et al., 2003).

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

que mede a taxa de resultados falsos conformes. Em caso de substâncias para as quais não se encontre definido um limite permitido,  $CC\beta$  é a concentração mais baixa que o método é capaz de detectar em amostras realmente contaminadas com uma certeza estatística de  $1 - \beta$ . No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a capacidade de detecção é a concentração que o método é capaz de detectar, na faixa de concentração do limite permitido, com uma certeza estatística de  $1 - \beta$  (EUROPEAN COMMISSION, 2002; VAN OVERMEIRE, 2004).

Quando o resultado obtido é maior ou igual a  $CC\beta$ , com um limite de confiança de  $(1 - \beta)$ , a amostra pode ser declarada como não-conforme, indicando a presença do analito ou em uma concentração maior que o LMR. Quando o resultado estiver entre  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  há suspeita sobre a conformidade da amostra, mas, sob o ponto de vista estatístico, o resultado não pode ser classificado e a aplicação prática destes parâmetros depende de decisões políticas que envolvem a proteção do consumidor e do produtor de alimentos (ANTIGNAC et al., 2003).

Para substâncias com limite máximo de resíduos definido, em  $CC\alpha$ , a proporção de resultados falsos não-conformes (erro  $\alpha$ ) será de 5%, com confiança de 95%, mas de falsos conformes (erro  $\beta$ ) será de 50%. Por outro lado, em  $CC\beta$ , a proporção de amostras falsamente declaradas não-conformes será muito baixa e a proporção de amostras verdadeiramente não-conformes apresentarem um resultado conforme será igual a 5%. Se o método é utilizado com propósitos confirmatórios, nos quais a identificação inequívoca da presença de uma substância é pretendida, tanto  $CC\alpha$  como  $CC\beta$  terão aplicação e o método será capaz de identificar os analitos em 95% dos casos em  $CC\beta$  e em 50% de todos dos casos em  $CC\alpha$  (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

$CC\alpha$  e  $CC\beta$  devem ser estabelecidos através do procedimento da curva de calibração ou analisando o sinal ruído de pelo menos 20 amostras brancas por matriz. A curva é representada graficamente em função do sinal do equipamento e a concentração de amostras brancas adicionadas, próximo ao nível mínimo de desempenho requerido ou do LMR. Em caso de substâncias relativamente às quais não se encontre definido um limite permitido, o  $CC\alpha$  é igual à concentração obtida na curva de calibração mais 2,33 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial ou três vezes o sinal ruído. Em caso de substâncias com um LMR definido, o  $CC\alpha$  pode ser estabelecido como igual à concentração correspondente ao limite permitido mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial.



A  $CC\beta$  é igual à concentração correspondente ao  $CC\alpha$  mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial do teor médio medido (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

### 3.5.5 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida da sua capacidade de manter-se inalterado com pequenas variações nos parâmetros do método (THOMPSON, 2002). A determinação da robustez consiste em fazer variações deliberadas no método e investigar seus efeitos. É possível então, identificar as variáveis que têm um efeito mais significativo e garantir que, quando o método for utilizado, não afetem os resultados obtidos (EURACHEM, 1998).

Testes de robustez examinam o efeito dos parâmetros operacionais nos resultados de análise. Se a influência do parâmetro estiver dentro de uma tolerância previamente especificada, é dito que o parâmetro está dentro da robustez do método. Dados obtidos nestes efeitos permitirão avaliar se um método precisa ser revalidado quando um ou mais destes parâmetros são alterados (HUBER, 1998).

O método analítico deve ser testado em diferentes condições experimentais. Devem ser efetuados estudos prévios para a seleção de fatores do pré-tratamento, da limpeza e da análise da amostra, capazes de influenciarem os resultados da medição. Ao se identificarem possíveis fatores que possam influenciar os resultados, devem-se variar levemente cada fator. Quando se verificarem que um fator influencia significativamente os resultados das medições, devem se fazer mais experiências para decidir quanto aos limites de aceitabilidade deste fator. Nesse caso, os resultados devem ser claramente identificados no protocolo do método. Estes fatores podem incluir o analista, a fonte e a idade dos reagentes, solventes, padrões e extratos de amostra, a taxa de aquecimento, a temperatura, o pH assim como muitos outros fatores que se podem verificar no laboratório. As alterações introduzidas devem ser importantes e geralmente são avaliadas utilizando a abordagem de YOUNG & STEINER (1975), que é de concepção fatorial fracionária (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

De acordo com EURACHEM (1998), a robustez deve ser tratada como parte do desenvolvimento e de otimização do método. THOMPSON et al (2002) defendem que os estudos de robustez em processos da validação devem somente ser conduzidos quando os parâmetros experimentais e seus respectivos limites não forem estabelecidos previamente.

### 3.5.6 Revalidação

A validação original de um método deve localizar os pontos fracos do procedimento e prover dados suficientes para avaliar a qualidade do método. Revalidação deve ser considerada quando o objetivo, o cliente ou o nível de qualidade requerido do método muda, quando o procedimento é modificado e mesmo quando o método é usado novamente no laboratório após certo período de tempo. O esforço necessário aumentará com o aumento da complexidade do método e a extensão das mudanças (BRUCE et al., 1998).

Uma revalidação é necessária sempre quando se altera os parâmetros de análise, matriz e tipo ou características do instrumento. Deverá ser realizada, também, uma nova validação se resultados da análise da amostra controle estiverem fora dos critérios pré-ajustados da aceitação e a fonte de erro não puder ser localizada (HUBER, 1998).

### 3.5.7 Matrizes representativas

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

Para o procedimento de validação do método, poderá ser selecionado um produto representativo de cada grupo com propriedades comuns. A experiência indica que em matrizes de produtos/amostras similares geralmente se obtém um rendimento similar na extração e purificação, podendo ser assim agrupado: elevado conteúdo de água e clorofila (por ex: alface, espinafre, brócolis); elevado conteúdo de água e conteúdo escasso ou ausência de clorofila (por ex: maçã, pêra, cerejas, uvas, tomate, pimentão, morango, cenoura e batata); elevado conteúdo de ácido (por ex: laranja e limão); elevado conteúdo de açúcar (por ex: uva seca e tâmara); elevado conteúdo de óleo ou gordura (por ex: abacate, nozes ou pistache); materiais secos (por ex: arroz, trigo ou milho em grão) e produtos que requerem testes individuais (por ex: alho, chá, temperos ou amora) (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

Se o método é idêntico para todas as matrizes listadas acima, a validação deve

ser realizada com no mínimo duas matrizes, sendo uma delas com alto teor de água (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

Para métodos de multiresíduos, matrizes representativas podem ser usadas. Entretanto, matrizes representativas podem ser escolhidas cuidadosamente com base na sua similaridade biológica ou analítica. Isto pode ser com relação a fatores tais como conteúdo de água; gordura; açúcar ou pH. Assim, por exemplo, laranja pode ser escolhida como representativas das frutas cítricas, as alfaces como representativas das folhosas verdes (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

### **3.5.8 Analitos representativas**

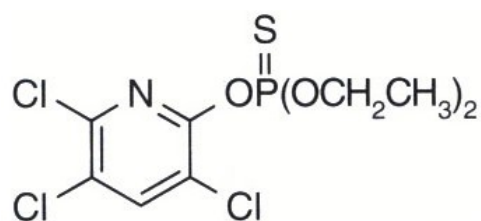
Segundo o CODEX ALIMENTARIUS (2003) para avaliar o rendimento de um método pode-se utilizar analitos representativos, devendo selecionar compostos que possuem propriedades físicas e químicas dos analitos que se pretende determinar no método. A seleção dos analitos representativos deve ser efetuada em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

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

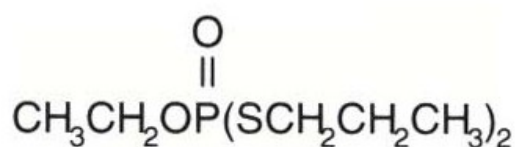
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Analitos

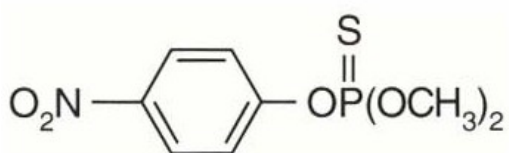
As estruturas químicas dos ingredientes ativos analisados estão apresentadas na figura 4.



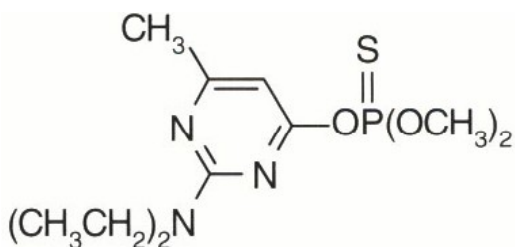
clorpirifós: derivado do ác. tiofosfórico



etoprofós: derivado do ác. tiofosfórico



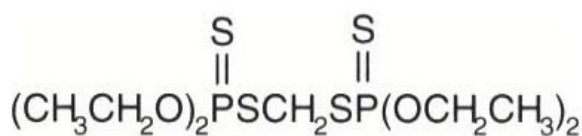
parationa-metilica: derivado do ác. tiofosfórico  
tiofosfórico



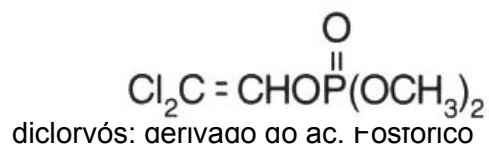
pirimifós-metilica: derivado do ác.



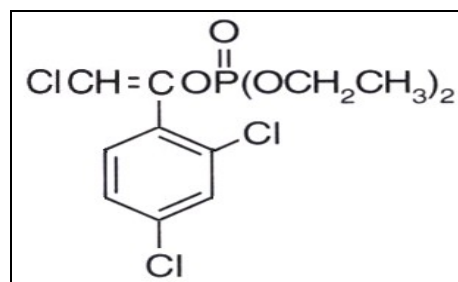
dimetoato: derivado do ác. ditiofosfórico



etiona: derivado do ác. ditiofosfórico



diclorvós: derivado do ác. fosfórico



clorfenvinfós: derivado do ác. fosfórico

Figura 4: Estruturas químicas dos inseticidas organofosforados analisados

## 4.2 Equipamentos

Balança analítica marca Gehaka (São Paulo, Brasil) modelo HR-200, balança semi-analítica marca Mettler (Zürich, Switzerland) modelo P1210, bomba de vácuo marca Marconi (São Paulo, Brasil) modelo MA057, capela de segurança química marca Veco (São Paulo, Brasil) modelo VLFS-09, cromatógrafo a gás (CG) marca Varian (California, USA) modelo CP3800 equipado com: amostrador automático modelo CP8200; detector termiônico específico (DTE) e coluna cromatográfica capilar CP-Sil 19CB (14% cianopropil-fenil e 86% dimetilsilano) ; 30m de comprimento; 0,32mm de diâmetro externo; 0,25mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25µm, estufa marca Fanem (São Paulo, Brasil) modelo 315SE; evaporador rotatório marca Büchi (Flawil, Switzerland) modelo W240N, micropipetas automáticas de volume variável: de 10,0 a 20,0 µL (P20); de 10,0 a 100,0 µL (M100); de 50,0 a 200,0 µL (P200); de 200,0 a 1000,0 µL (M1000); de 1000,0 a 5000,0 µL (P5000); de 1000,0 a 10.000,0 µL (P10mL) marca Gilson (Villiers-le-Bel, France); mufla marca Fornitec (São Paulo, Brasil) modelo Piromatic; homogeneizador do tipo *ultra turrax* marca Marconi (São Paulo, Brasil) modelo MA102E; triturador de amostras marca Skymesen (Santa Catarina, Brasil) modelo CR-4L.

## 4.3 Reagentes e padrões

Acetato de etila e diclorometano (grau para análise de resíduos) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha); acetona (grau para análise) foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), acetona (grau para análise de resíduos) e n-hexano (grau para análise de resíduos) da Tédia (Fairfield, OH, EUA), sulfato de sódio anidro (grau para análise) da Spectrum (New Jersey, EUA), água destilada e deionizada foi preparada no laboratório.

Os padrões analíticos de agrotóxicos (clorfenvinfós, clorpirifós etílico, diclorvós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa metílica e pirimifós metílico) foram fornecidos por Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha).

## 4.4 Soluções

#### 4.4.1 Solução padrão estoque (SPE)

A solução estoque de etiona, etoprofós, parationa metílica e pirimifós metílico de  $200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada por dissolução de  $10,0 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$  do padrão para  $50,0 \text{ mL}$  de acetato de etila. A solução estoque de clorpirifós etílico e dimetoato de  $202,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de  $10,1 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$  do padrão para  $50,0 \text{ mL}$  de acetato de etila e a de clorfenvinfós e diclorvós de  $204,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  por dissolução de  $10,2 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$  do padrão para  $50,0 \text{ mL}$  de acetato de etila. Esta solução foi armazenada sob congelamento entre  $-14^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$  e preparada com frequência anual.

#### 4.4.2 Solução pool padrão Intermediária 1 (SPI 1)

Foram pipetados  $1000,0 \mu\text{L}$  da SPE de cada analito e transferidos para um balão volumétrico de  $10,0 \text{ mL}$ . O volume foi completado com acetato de etila, homogeneizando-se a seguir. As concentrações dos analitos no pool da SPI 1 foram: de  $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  para etiona, etoprofós, parationa metílica e pirimifós metílico; de  $20,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  para clorpirifós etílico e dimetoato e de  $20,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  para clorfenvinfós e diclorvós. Esta solução foi armazenada sob congelamento entre  $-14^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  e preparada com frequência semestral.

#### 4.4.3 Solução pool padrão Intermediária 2 (SPI 2)

Foram pipetados  $1000,0 \mu\text{L}$  da SPI 1 e transferidos para um balão volumétrico de  $25,0 \text{ mL}$ . O volume foi completado com acetato de etila, homogeneizando. As concentrações dos analitos no pool da SPI 2 foram: de  $0,800 \mu\text{g mL}^{-1}$  para etiona, etoprofós, parationa metílica e pirimifós metílico; de  $0,808 \mu\text{g mL}^{-1}$  para clorpirifós etílico e dimetoato e de  $0,816 \mu\text{g mL}^{-1}$  para clorfenvinfós e diclorvós. Esta solução foi preparada com frequência diária.

#### 4.4.4 Preparo da curva de calibração

Alíquotas de  $150, 350, 550, 750, 950$  e  $1150 \mu\text{L}$ , respectivamente, da SPI 2 foram transferidas para balões volumétricos de  $10^{\circ}\text{mL}$ . Foram preparadas, três replicatas independentes de cada ponto da curva de calibração, além do branco de solvente. Os volumes foram completados com acetato de etila, homogeneizando-os. As

faixas de concentrações das soluções nos *pools* da curva de calibração foram de: 12,00; 28,00; 44,00; 60,00; 76,00 e 92,00 ng mL<sup>-1</sup> para etiona, etoprofós, parationa metílica e pirimifós metílico; 12,12; 28,28; 44,44; 60,60; 76,76 e 92,92 ng mL<sup>-1</sup> para clorpirifós etílico e dimetoato de e 12,24; 28,56; 44,88; 61,20; 77,52 e 93,84 ng mL<sup>-1</sup> para clorfenvinfós e diclorvós. Esta solução foi preparada com frequência diária.

#### 4.4.5 Solução extratora

A Solução extratora de diclorometano:n-hexano (1:1 v/v) foi preparada, medindo em proveta, 500 mL de n-hexano grau para análise de resíduos e 500 mL de diclorometano grau para análise de resíduos. Os solventes foram transferidos diretamente para um frasco âmbar de 2500 mL e armazenada à temperatura ambiente e preparados com frequência diária.

### 4.5 Amostras usadas na Validação

As amostras brancas de alfaces, bananas e tomates foram adquiridas de lojas que revendem produtos orgânicos em Belo Horizonte – MG, e também de produtores que não utilizam agrotóxicos.

As amostras foram trituradas, acondicionadas, devidamente identificadas e armazenadas sob congelamento entre -14°C e -20°C, até o momento dos ensaios.

### 4.6 Método de ensaio

O método validado foi baseado no método de multiresíduos descrito por NETHERLANDS (1996). Adicionar 30 mL de acetona em 15 g de amostras trituradas, agitar a mistura por aproximadamente 30 segundos no homogeneizador do tipo *ultra turrax*. Em seguida adicionar 30 mL de diclorometano e 30 mL de éter de petróleo e agitar a mistura no *ultra turrax* por mais aproximadamente 30 segundos. Centrifugar por 2 minutos a 4.000 rpm. Pipetar 25 mL do extrato e evaporar até a secura. Retomar com 5 mL de isooctano/tolueno (90:10) e injetar 0,8 µL do extrato em CG-DFC .

## 4.7 Método de ensaio modificado

O método de ensaio validado fundamentou-se na extração de resíduos de inseticidas OF em amostras previamente trituradas e homogeneizadas. A extração foi realizada em homogeneizador do tipo *ultra turrax* com acetona e em seguida com solução de diclorometano e n-hexano. Após a extração realizou a filtração a vácuo, pegou uma alíquota secou em corrente de nitrogênio e retomou com acetato de etila. Empregou-se a CG para identificação e quantificação dos resíduos, utilizando-se o DTE.

### 4.7.1 Extração

As amostras *in natura* de alface, banana e tomate foram descongeladas e homogeneizadas. Alíquotas de aproximadamente 15 g foram pesadas em um béquer de 600 mL, utilizando uma balança semi-analítica. Foram adicionados no béquer aproximadamente 15 g de sulfato de sódio anidro, agitando-se o béquer cuidadosamente para que toda a amostra entrasse em contato com o sulfato de sódio. Adicionou-se 40 mL de acetona para análise de resíduos e agitou-se a mistura por aproximadamente 30 segundos no homogeneizador do tipo *ultra turrax*. Em seguida foram adicionados 60 mL da solução extratora de diclorometano:n-hexano (1:1 v/v) e agitou-se a mistura no *ultra turrax* por mais aproximadamente 30 segundos. Filtrou-se a mistura à vácuo, com funil de *Buchner* e papel de filtro, lavando-se a haste do *ultra turrax* e o béquer com a solução extratora de diclorometano:n-hexano (1:1 v/v), passando-se a solução de lavagem pelo papel de filtro. O extrato foi transferido para uma proveta calibrada de 100 mL e completou-se o volume com a solução extratora de diclorometano:n-hexano (1:1 v/v). O extrato da amostra foi acondicionado em um frasco de vidro com tampa esmerilhada, previamente identificado. Pipetou-se 10 mL do extrato em balão de fundo chato, levou-o ao evaporador rotatório para a evaporação até quase a secura e em seguida foi seco completamente com ar comprimido. Após a secagem os resíduos foram retomados com 1 mL de acetato de etila. Brancos das amostras foram preparados em cada bateria analítica.

### 4.7.2 Preparo da curva de calibração no extrato da matriz



Após a extração da amostra branca, através do procedimento descrito anteriormente, pipetou-se 10 mL do extrato em balão de fundo chato, levou-o ao evaporador rotatório para a evaporação até quase a secura e em seguida foi seco completamente com ar comprimido. Adicionou-se 15, 35, 55, 75, 95 e 115  $\mu\text{L}$  da SPI 2,. Após a secagem da solução, os resíduos foram retomados com 1 mL de acetato de etila. As faixas de concentrações das soluções nos *pools* da curva de calibração foram de: 12, 28, 44, 60, 76 e 92  $\text{ng mL}^{-1}$  para etiona, etoprofós, parationa metílica e pirimifós metílico; 12,12; 28,28; 44,44; 60,60; 76,76 e 92,92  $\text{ng mL}^{-1}$  para clorpirifós etílico e dimetoato de e 12,24; 28,56; 44,88; 61,20; 77,52 e 93,84  $\text{ng mL}^{-1}$  para clorfenvinfós e diclorvós.

#### 4.7.3 Separação, detecção e quantificação

As condições de operação do sistema CG - DTE foram: temperatura do forno: 80°C (espera 1 min), aquecimento de 30°C  $\text{min}^{-1}$  até 200°C (espera 3 min), aquecimento de 15°C  $\text{min}^{-1}$  até 230°C (espera 6 min.), aquecimento de 5°C  $\text{min}^{-1}$  até 250°C (patamar 10 min.); tempo total da corrida: 30 min; modo de injeção: *splitless*; temperatura do injetor: 230°C; temperatura do detector: 300°C; gás de arraste: hélio; fluxo do gás de arraste: 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ ; pressão: 12,8 psi; volume de amostra injetada: 1  $\mu\text{L}$ .

Curvas de calibração da resposta (área dos picos) versus a concentração de cada OF foram construídas. As equações das curvas foram estimadas pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e utilizadas para cálculo da concentração dos resíduos de OF nas amostras.

O fluxograma da metodologia de análise está apresentada na figura 5.

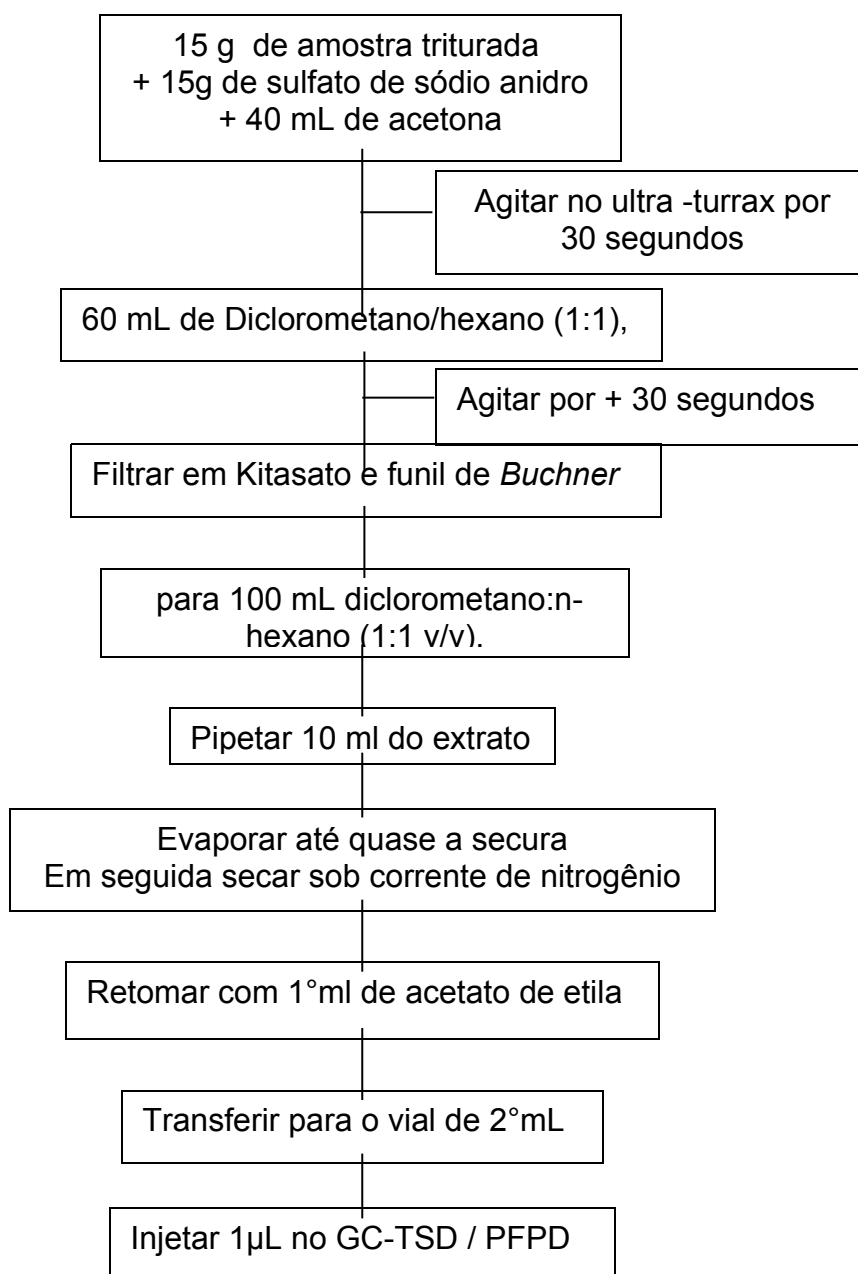


Figura 5 – Fluxograma da metodologia de análise

## 4.8 Validação

A validação do método foi conduzida por três técnicos treinados no método utilizado, dentro das boas praticas de laboratório, e desempenhada em diferentes dias.

Os parâmetros linearidade, efeito dia, efeito matriz, seletividade, exatidão, precisão, reprodutibilidade parcial, LD, LQ, CC $\alpha$  e CC $\beta$  foram estabelecidos em ensaios com soluções padrão, amostras brancas e adicionadas de padrão. A

adequação para uso do método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos.

#### 4.8.1 Linearidade

Linearidade foi avaliada de acordo com o procedimento proposto por SOUZA & JUNQUEIRA (2005). Foram preparadas, em três diferentes dias, curvas de calibração em seis níveis e três replicatas independentes de cada nível nas concentrações de 12, 28, 44, 60, 76 e 92  $\mu\text{g L}^{-1}$  (correspondente a 8; 18,7; 29,3; 40; 50,7 e 61,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de cada resíduo de agrotóxicos nos produtos agrícolas). Para preparo destas curvas, foram utilizadas alíquotas de 150, 350, 550, 750, 950 e 1150  $\mu\text{L}$  da SPI 2, respectivamente. Dentro de cada dia, as soluções foram analisadas em ordem aleatória. O ajuste do zero do equipamento foi feito, para todas as curvas, com soluções do solvente, sem a presença dos analitos. Em triplicata, foram preparados brancos, para todas as curvas como ferramenta de controle de qualidade interno para ajuste do zero do equipamento, mas não foram incluídos nos cálculos.

O modelo  $Y_i = a + bX_i$ , em que  $Y_i$  representa as respostas (áreas dos picos),  $X_i$  as concentrações dos padrões dos analitos,  $a$  e  $b$  estimativas dos parâmetros da equação foi adotado para o ajuste das curvas pelo MMQO. Com os resultados da análise de regressão, foram construídos gráficos de resíduos ( $Y_i - a - bX_i$ ) e examinados para detecção de heteroscedasticidade ou desvio de linearidade. Os resíduos fora do intervalo  $\pm t_{0,975;(n-2)}S_{res}$ , identificados como *outliers* (valores extremos), foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife (BELSLEY, et al. 1980). Este teste foi aplicado sucessivamente para excluir o dado, até que novos *outliers* não fossem detectados ou até um limite de exclusão de 2/9 no número original de resultados (IUPAC, 1987). Todas as premissas da análise de regressão foram previamente verificadas: normalidade (teste de Ryan & Joiner), homoscedasticidade (teste de Levene, modificado por Brown & Forsythe) e independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin & Watson). Após a análise, testes de F foram adotados para verificar a adequação do ajuste ao modelo linear pelas significâncias da regressão e do desvio de linearidade, avaliado contra o erro puro de repetitividade (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

#### 4.8.2 Efeito do dia

A avaliação do efeito do dia foi baseada nas curvas de calibração, empregadas para os estudos de linearidade, obtidas em três dias. As estimativas das inclinações e das interseções das curvas foram comparadas pelo teste de  $t$ , aplicado a dois contrastes ortogonais.

Para comparação das estimativas das inclinações, as estatísticas  $t$  foram propostas pelas seguintes equações:

$$t(Y_A) = \frac{b_1 - b_2}{EP(b_1 - b_2)} = \frac{b_1 - b_2}{s_c \sqrt{1/S_{XX_1} + 1/S_{XX_2}}}$$

$$t(Y_B) = \frac{b_1 + b_2 - 2b_3}{EP(b_1 + b_2 - 2b_3)} = \frac{b_1 + b_2 - 2b_3}{s_c \sqrt{1/S_{XX_1} + 1/S_{XX_2} + 4/S_{XX_3}}}$$

Analogamente, para comparação das interseções foram utilizadas:

$$t(Y_A) = \frac{a_1 - a_2}{EP(a_1 - a_2)} = \frac{a_1 - a_2}{s_c \sqrt{\sum X_1^2 / (n_1 S_{XX_1}) + \sum X_2^2 / (n_2 S_{XX_2})}}$$

$$t(Y_B) = \frac{a_1 + a_2 - 2a_3}{EP(a_1 + a_2 - 2a_3)} = \frac{a_1 + a_2 - 2a_3}{s_c \sqrt{\sum X_1^2 / (n_1 S_{XX_1}) + \sum X_2^2 / (n_2 S_{XX_2}) + 4 \sum X_3^2 / (n_3 S_{XX_3})}}$$

sendo  $S_{XX} = \sum X^2 - (\sum X)^2 / n$ ,  $X$  a concentração dos analitos e  $n$  o número de pontos de cada curva. Os subscritos 1, 2 e 3 representam os dias;  $Y_A$  e  $Y_B$  os contrastes ortogonais e  $EP = \sqrt{Var(Y)}$ , o erro padrão dos contrastes.

Após a verificação da homogeneidade das variâncias individuais extremas dos parâmetros estimados para as curvas de calibração pelo teste de Pearson & Hartley (SNEDECOR & COCHRAN, 1989), foram calculadas as estimativas das variâncias dos contrastes ortogonais ( $Var$ ), com base na variância combinada ( $s_c^2$ ):

$$s_c^2 = \frac{(n_1 - 2)s_1^2 + (n_2 - 2)s_2^2 + (n_3 - 2)s_3^2}{n_1 + n_2 + n_3 - 6}$$

O efeito do dia foi considerado significativo quando a estatística  $t$  excedeu ao valor de  $t$  crítico para  $n_1 + n_2 + n_3 - 6$  graus de liberdade e  $\alpha = 0,05$  para qualquer um dos contrastes ortogonais.

#### 4.8.3 Efeitos de matriz

Para avaliação dos efeitos de matriz foi empregado o método de adição de padrão. Duas curvas de calibração em concentrações exatas em torno de 12, 28, 44, 60, 76 e 92 ng mL<sup>-1</sup> foram estudadas, sendo que cada nível foram preparados três replicatas independentes, analisadas em ordem aleatória, no mesmo dia. A curva do analito no solvente (acetato de etila) foi preparada conforme descrito nos experimentos de avaliação da linearidade. A curva do analito na matriz utilizou-se extratos de amostras brancas de alface, banana e tomate adicionados de 15, 35, 55, 75, 95 e 115 µL da SPI 2. Brancos da amostra foram preparados para cada curva e utilizados como ferramenta de controle para ajuste do zero do equipamento, mas não foram incluídos nos cálculos.

Foram estimados os parâmetros da regressão e verificadas as premissas relativas ao MMQO para estas curvas. Os outliers foram diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. Comprovadas as premissas de normalidade, homoscedasticidade, independência e ajuste ao modelo linear, a inclinação e a interseção obtida para a curva de solventes foram comparadas com a inclinação e interseção calculadas para a curva de matriz. A homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas foi avaliada pelo teste de Pearson & Hartley (SNEDECOR & COCHRAN, 1989) e as inclinações e interseções foram comparadas pelo teste de  $t$ , de maneira análoga aos contrastes  $Y_A$  descritos na avaliação do efeito do dia. A variância combinada foi obtida por:

$$s_c^2 = \frac{(n_1 - 2) s_1^2 + (n_2 - 2) s_2^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

#### 4.8.4 Seletividade, exatidão (recuperação) e precisão

Ensaio com amostras brancas e adicionadas de padrão foram utilizados para cálculo de seletividade; exatidão; precisão sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial; limites de detecção e quantificação; CC $\alpha$  e CC $\beta$ . Os três níveis

de adição estudados estão descritos na Tabela 3. Foram realizadas dezoito replicatas independentes para o primeiro nível de clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós e parationa e pirimifós e também para o segundo nível de clorfenvinfós e diclorvós. Para os demais níveis, foram utilizadas doze replicatas. As amostras foram divididas, para o nível com 18 replicatas, em seis lotes com três replicatas, analisados em seis diferentes dias por três analistas: dias 1 e 2 pelo analista 1; dias 3 e 4 pelo analista 2 e 5 e 6 pelo analista 3. Para os níveis com 12 replicatas, as amostras foram divididas em quatro lotes com três replicatas, analisados em quatro diferentes dias por dois analistas: dias 1 e 2 pelo analista 1 e dias 3 e 4 pelo analista 2. As concentrações de OF nas amostras adicionadas foram calculadas pelas equações das curvas de calibração na solução matriz, com base nos resultados dos estudos de efeitos de matriz.

Tabela 3 – Níveis de adição de padrões em amostras brancas de alface, banana e tomate para cálculo de exatidão, precisão, limite de quantificação, limite de decisão e capacidade de detecção

Ingrediente ativo	Níveis de adição		
	Alface ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Banana ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Tomate ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Clorfenvinfós	8,16 - 35,36 - 62,56	8,16 - 40,80 - 62,56	8,16 - 35,36 - 62,56
Clorpirifós	8,08 - 35,01 - 61,95	8,08 - 40,40 - 61,95	8,08 - 35,01 - 61,95
Diclorvós	8,16 - 35,36 - 62,56	8,16 - 40,80 - 62,56	8,16 - 35,36 - 62,56
Dimetoato	8,08 - 35,01 - 61,95	8,08 - 40,40 - 61,95	8,08 - 35,01 - 61,95
Etiona	8,00 - 34,67 - 61,33	8,00 - 40,00 - 61,33	8,00 - 34,67 - 61,33
Etoprofós	8,00 - 34,67 - 61,33	8,00 - 40,00 - 61,33	8,00 - 34,67 - 61,33
Parationa-metílica	8,00 - 34,67 - 61,33	8,00 - 40,00 - 61,33	8,00 - 34,67 - 61,33
Pirimifós-metílico	8,00 - 34,67 - 61,33	8,00 - 40,00 - 61,33	8,00 - 34,67 - 61,33

A ausência de picos cromatográficos nos tempos de retenção dos ingredientes ativos estudados, para todas as amostras brancas de alface, banana e tomate, associada à capacidade do método separar, detectar e quantificar os oito resíduos de OF, com tempo de retenção distintos, foram consideradas suficientes para estabelecimento da seletividade.

A presença de outliers nos resultados obtidos dos testes de recuperação foi analisada pelo teste de Grubbs (GRUBBS, 1969; BURKE, 2001). As estatísticas de Grubbs para um outlier ( $G_1$ ), dois outliers vicinais ( $G_2$ ) e dois outliers polares ( $G_3$ ) foram calculadas simultaneamente, de acordo com as equações abaixo para cada nível de concentração. A indicação de outlier por pelo menos uma destas estatísticas foi

suficiente para excluir o dado. Os cálculos foram feitos de modo iterativo, sendo o teste de Grubbs sucessivamente aplicado até que novos outliers não fossem detectados ou até um limite de 22,2 % no número original de resultados (HORWITZ, 1995).

$$G_1 = \frac{|\bar{X} - X_i|}{s} \quad G_2 = \frac{X_n - X_1}{s} \quad G_3 = 1 - \left( \frac{(n-3)s_{n-2}^2}{(n-1)s^2} \right)$$

sendo,  $s$  o desvio padrão,  $X_i$  o outliers suspeito, isto é, o valor absoluto mais distante da média,  $\bar{X}$  a média,  $n$  o número de dados,  $X_n$  e  $X_1$  são os valores extremos,  $s^2$  a variância calculada para  $n$  dados e  $s_{n-2}^2$  a variância calculada desconsiderando os valores extremos superior e inferior (BURKE, 2001).

Exatidão foi avaliada por meio das médias de recuperação das amostras adicionadas de padrão, obtidas em pelo menos doze replicatas independentes nos níveis de adição descritos na Tabela 3. Foram consideradas aceitáveis médias de recuperação entre 70 % e 110 % para amostras adicionadas em níveis próximos de 8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e de 80 % a 110 % para as amostras adicionadas em níveis de próximos de 35, 40 e 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

As precisões sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial foram expressas em termos de desvios padrão relativos e estimadas por análise de variância dos resultados de recuperação obtidos de, no mínimo, doze replicatas de amostras brancas adicionadas em níveis próximos de 8; 35 e 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (alface e tomate) e próximos de 8, 40 e 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (banana).

Foi adotado um delineamento fatorial completamente aninhado que forneceu as estimativas da variância de repetitividade ( $s_r^2$ ); da variância entre bateladas ( $s_{\text{Entre Batelada}}^2$ ) que inclui as fontes de variação confundidas do dia e do analista; e da variância de reprodutibilidade parcial ( $s_R^2$ ), também denominada de variância da precisão intermediária, como representado nas Tabela 4 e 5 (VAN LOCO & BEERNAERT, 2003; MAROTO et al., 1999; MAROTO et al., 2001).

Tabela 4 – Cálculo das variâncias para o delineamento fatorial completamente aninhado

Fonte	Graus de liberdade	Somas de Quadrados	Quadrados Médios
-------	--------------------	--------------------	------------------

Batelada	$u - 1$	$\sum_{k=1}^u \frac{1}{n_k} \left( \sum_{j=1}^{n_k} X_{kj} \right)^2 - \frac{1}{n} \left( \sum_{i=1}^n X_i \right)^2$	$QM_{Batelada} = \frac{SQ_{Batelada}}{u - 1}$
Resíduo	$n - u$	$SQ_{Total} - SQ_{Batelada}$	$QM_{Residuo} = \frac{SQ_{Residuo}}{n - u}$
Total	$n - 1$	$\sum_{i=1}^n X_i^2 - \frac{1}{n} \left( \sum_{i=1}^n X_i \right)^2$	

sendo  $u$  o número de bateladas;  $n_k$  o número de replicatas da  $k$ -ésima batelada;  $n = \sum_{k=1}^u n_k = \sum_{i=1}^n 1$  o número total de resultados de recuperação;  $X_{kj}$  o  $j$ -ésimo resultado de recuperação da  $k$ -ésima batelada;  $X_i$  o  $i$ -ésimo resultado de recuperação;  $SQ$  as somas de quadrados e  $QM$  os quadrados médios.

Tabela 5 – Expressões da precisão em condições de repetitividade e de reprodutibilidade parcial

Fonte	Variância	Desvio Padrão (DP)	DP relativo
Repetitividade	$s_r^2 = QM_{Residuo}$	$s_r = \sqrt{s_r^2}$	$100s_r / \bar{X}$
Entre bateladas	$s_{Entre\ Bateladas}^2 = (QM_{Batelada} - s_r^2) / \bar{n}_k$		
Reprodutibilidade e parcial	$s_R^2 = s_r^2 + s_{Entre\ Batelada}^2$	$s_R = \sqrt{s_R^2}$	$100s_R / \bar{X}$

sendo  $\bar{n}_k = \sum_{k=1}^u n_k / u$  o número médio de replicatas das bateladas;  $\bar{X} = \sum_{i=1}^n X_i / n$  a média global dos valores de recuperação;  $s_r^2$  a variância da repetitividade e  $s_R^2$  a variância da reprodutibilidade parcial ou da precisão intermediária.

Quando a estimativa da variância de repetitividade foi maior que o quadrado médio da batelada, a estimativa da variância entre bateladas  $s_{Entre\ Bateladas}^2$  foi considerada como sendo igual a zero. Neste caso, as estimativas das variâncias de repetitividade e de reprodutibilidade parcial foram consideradas equivalentes (KUTTATHARMMAKUL et al., 1999; MAROTO et al., 1999).

A normalidade (teste de Ryan & Joiner) e a homoscedasticidade (teste de Brown & Forsythe) dos resultados de recuperação utilizados na análise de variância foram previamente testadas, como proposto por SOUZA et al. (2007). Desvios padrão relativos de repetitividade ( $DPR_r$ ) foram considerados aceitáveis até um limite de 66,7% do valor da precisão interlaboratorial estimada pela equação de THOMPSON (2000). Os desvios padrões relativos de reprodutibilidade parcial ( $DPR_R$ ) foram considerados aceitáveis se inferiores ao valor estimado pela equação de HORWITZ (1982) e THOMPSON (2000). Como a fração de massa de todos os níveis adicionados, para todos os analitos, era inferior a  $1,2 \times 10^{-7}$ ,  $DPR_r$  e  $DPR_R$  menores ou iguais a 14,7% e 22,0 %, respectivamente, foram os critérios de precisão adotados.



#### 4.8.5 Limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção

O LD foi a menor concentração detectada nas amostras adicionadas, mas não necessariamente quantificada, distinguida de zero (sinal/ruído  $\geq 3$ ). O LQ foi estabelecido como a concentração abaixo da qual o método não se pôde operar com exatidão e precisão aceitáveis de acordo com SOUZA et al.(2007).

O  $CC\alpha$  e a  $CC\beta$  foram estimados utilizando-se os resultados de recuperação obtidos nos experimentos de avaliação da reprodutibilidade parcial. A informação se o produto é autorizado e qual é seu LMR foi utilizada para o cálculo destes parâmetros, para os oito OF estudados, de acordo com VAN LOCO & BEERNAERT (2003). O valor da resposta que conduz à conclusão de que a resposta excede à quantidade máxima autorizada, com uma probabilidade de  $1 - \alpha$ , denominado valor significativamente crítico da variável da resposta ( $y_c$ ) foi determinado pela equação:

$$y_c = a + bX_L + s_{res} t_{(n-2),\alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(X_L - \bar{X})^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

sendo  $a$  a interseção;  $b$  a inclinação;  $X_L$  = a concentração nominal do limite permitido ( $X_L = LMR$  ou  $X_L = \text{zero}$ , para analito não autorizado);  $s_{res}$  o erro padrão da estimativa da regressão linear;  $n$  o número total de resultados utilizados no cálculo,  $X_i$  a concentração adicionada do analito,  $t_{(n-2),\alpha}$  o  $t$  de Student para  $(n - 2)$  graus de liberdade e  $\alpha = 0,05$  para analito com  $LMR$  definido ou  $\alpha = 0,01$  para analitos não autorizados.

$CC\alpha$  foi obtido no modelo de regressão linear ( $y = a + bx$ ) por

$$CC\alpha = \frac{y_c - a}{b}$$

Calculou-se  $CC\beta$  resolvendo-se iterativamente a equação:

$$y_c = a + bCC\beta - s_{res} t_{(n-2),\beta} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(CC\beta - \bar{X})^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

sendo  $t_{(n-2),\beta}$  o  $t$  de Student para  $(n-2)$  graus de liberdade e  $\beta = 0,05$ .

Para o cálculo iterativo de  $CC\beta$ , uma primeira estimativa deste parâmetro  $CC\beta^{(1)}$  foi obtida pela equação:

$$CC\beta^{(1)} \approx 2CC\alpha - X_L$$

deduzida das equações para determinação de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  pelo método de uma única concentração:  $CC\alpha = X_L + z_{S_L} \Rightarrow z_{S_L} = CC\alpha - X_L$  e  $CC\beta = CC\alpha + z_{S_{CC\alpha}}$  (EUROPEAN COMMISSION, 2002), assumindo que  $z_{S_L} \approx z_{S_{CC\alpha}}$ . O cálculo foi considerado convergente quando a diferença das estimativas de  $y_c$  de interações subsequentes foi inferior a  $1 \times 10^{-10}$ .

#### 4.9 Análise de resíduos de organofosforados em hortifrutícolas

As análises foram conduzidas nas dependências do Laboratório de Análise de Resíduos e Agrotóxicos (LARA) do Laboratório de Química Agropecuária (LQA), Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), no período de setembro a dezembro de 2006.

Foram coletadas 307 amostras de hortifrutícolas sendo 10 de alface, 52 de banana, 6 de batata, 16 de cenoura, 14 de chuchu, 14 de jiló, 57 de morango, 12 de pepino, 15 de pimentão e 111 de tomate.

A amostragem foi realizada pelos funcionários do Instituto Mineiro de Agropecuária, nas propriedades rurais dos seguintes municípios do estado de Minas Gerais: Alfredo Vasconcelos; Araguari; Arapuá; Barbacena; Bom Repouso; Caeté; Cajuri; Capim Branco; Carandaí; Caratinga; Carmo do cajuru; Coimbra; Curvelo; Estiva; Gouveia; Igarapé; Jaboticatubas; Jaíba; Jequitibá; Lagoa Formosa; Maravilhas; Nova Ponte; Nova União; Onça do Pitangui; Paracatu; Paraopeba; Patrocínio; Piedade de Caratinga; Pimenta; Pirapora; Pouso Alegre; Rio Manso; Rio Paranaíba; Sabará;

Sacramento; Santa Rita de Minas; Santo Antônio da Serra; São Joaquim de Bicas; São José da Lapa; Sete Lagoas; Teófilo Otoni; Uberaba; Unai e Vespasiano.

A coleta das amostras foi baseada no Codex Alimentarius, representando bem o lote do produto; sem preferência por determinadas características como tamanho; cor ou tipo; evitando toda e qualquer contaminação das amostras pelas mãos roupas ou qualquer outro material que tenha contato com agrotóxicos. As amostras coletadas foram acondicionadas em embalagens plásticas e lacradas na presença do proprietário ou de um representante. Foram enviadas ao laboratório, em caixa de isopor, no período de 24 horas, acompanhadas de um termo de coleta contendo informações sobre o produtor e aplicações dos agrotóxicos. Para a cultura do morango e jiló, a quantidade de amostra coletada foi de 1 kg, assumindo as unidades amostrais de morango e jiló menores que 25 g. Para as culturas de alface foram coletadas 10 unidades e de banana, batata, cenoura, chuchu, pepino, pimentão, tomate, 1 kg e um mínimo de 10 unidades amostrais, considerando o peso unitário entre 25 a 250g (CODEX ALIMENTARIUS, 1999).

Os ingredientes ativos analisados foram: acefato, azinfós etílico, azinfós metílico, clorfenvinfós, clorpirifós, clorpirifós metílica, diazinona, diclorvós, dimetoato, dissulfotom, etiona, etoprofós, etrinfós, fenitrotona, fentoato, forato, malationa, metamidofós, metidationa, mevinfós, monocrotofós, parationa etílica, parationa-metílica, pirimifós-metílica, profenofós, perbufós e triazofós.

As extrações, os preparos dos padrões, da curva de calibração no extrato da matriz, as separações, detecções e quantificações foram baseadas no método validado.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Escolha dos analitos e matrizes representativas

A seleção das matrizes foi baseada no CODEX ALIMENTARIUS (2003). Foram escolhidos: a alface (elevado conteúdo de água e clorofila); a banana (elevado conteúdo de açúcar) e o tomate (elevado conteúdo de água e conteúdo escasso ou ausência de clorofila). Além disto, também foi levado em consideração, serem as culturas expressivas no estado de Minas Gerais. A comercialização, no ano de 2006, na CEASAMINAS, no entreposto Grande BH, de alface; banana e tomate chegou a 785,2; 105.519,1 e 113.551,7 toneladas, respectivamente. O Brasil é o segundo maior produtor de banana do mundo, com 6,8 milhões de toneladas anuais, sendo que o Norte de Minas se destaca nesta produção. (AGRIANUAL, 2001; CEASAMINAS, 2007)

### 5.2 Seletividade

Os cromatogramas típicos obtidos das soluções padrão de OF, amostras brancas e amostras adicionadas encontram-se representados na Figuras 5 a 10, indicando seletividade do método. Os tempos de retenção dos organofosforados estudados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Tempo de retenção dos oito organofosforados estudados

Organofosforados	Tempo de retenção
diclorvós	5,95 ± 0,11 min
etoprofós	9,16 ± 0,24 min
dimetoato	12,03 ± 0,33 min
pirimifós metílico	12,58 ± 0,43 min
clorpirifós	13,23 ± 0,46 min
parationa-metílica	13,50 ± 0,44 min
clorfenvinfós	15,79 ± 0,67 min
etiona	20,32 ± 0,77 min

Picos cromatográficos não detectados (sinal/ruído < 3) foram obtidos para todas as amostras brancas analisadas, não havendo interferências significativas nos tempos de retenção para os OF pesquisados. Os perfis dos cromatogramas obtidos para soluções matriz foram muito semelhantes àqueles obtidos para as soluções padrão de organofosforados de concentrações correspondentes. A resolução dos picos indicou

capacidade do método em determinar clorfenvinfós, clorpirifós, diclorvós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa-metílica e pirimifós-metílico sem interferências mútuas.

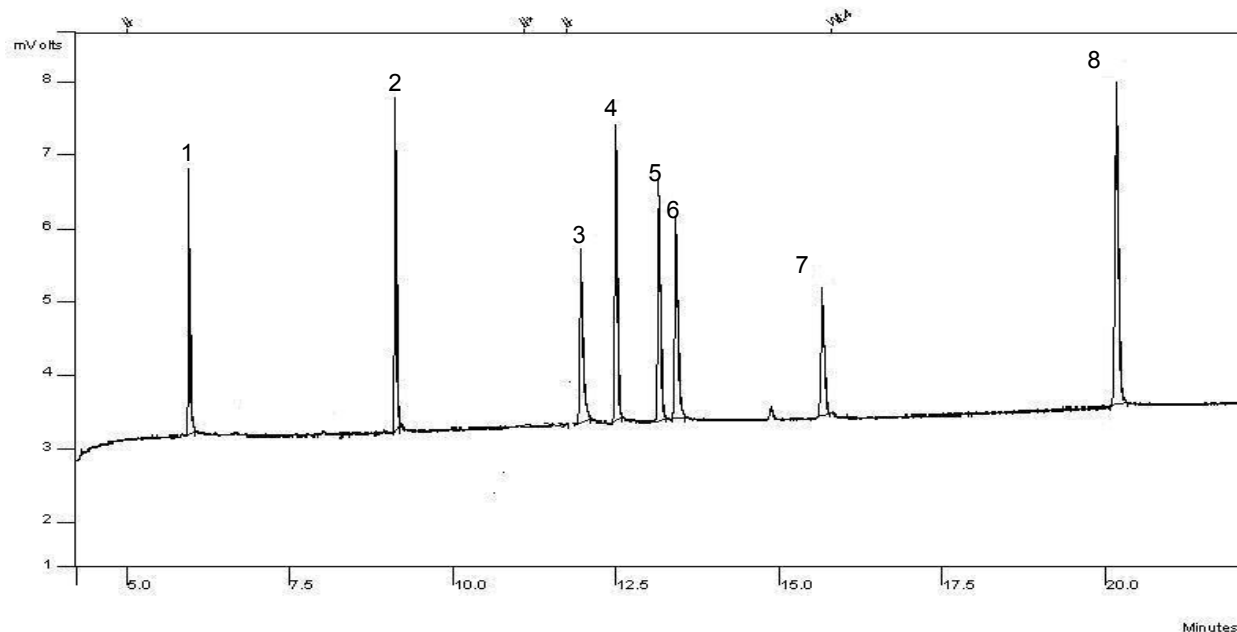
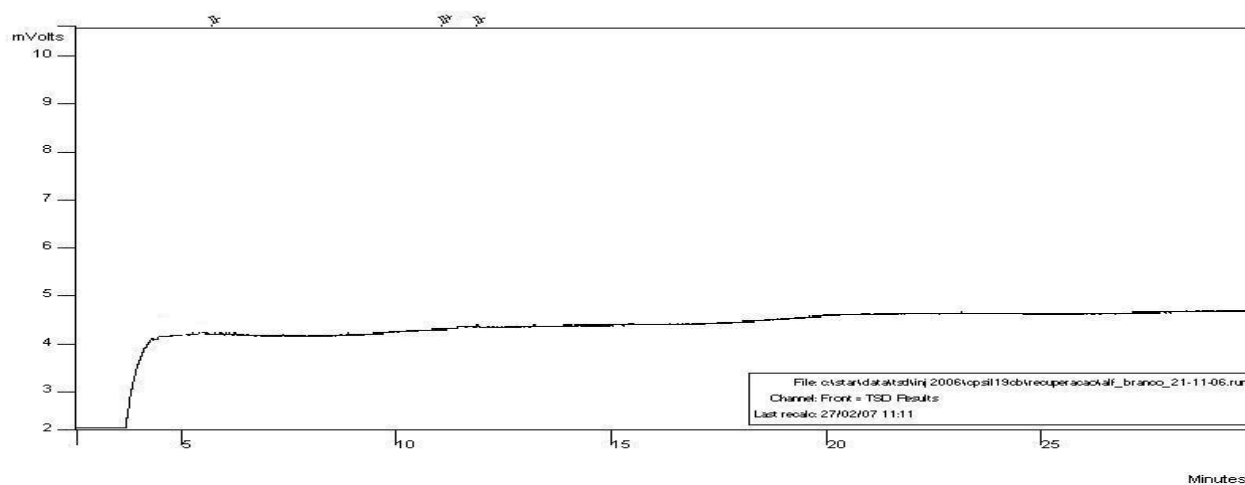
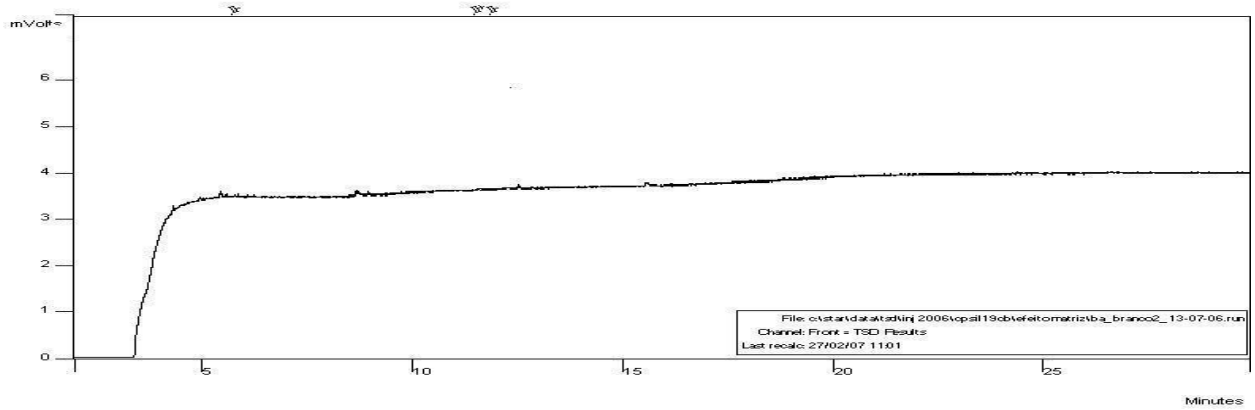


Figura 6 - Cromatogramas típicos de soluções *pool* de padrões de organofosforados: (1) diclorvós; (2) etoprofós; (3) dimetoato; (4) pirimifós; (5) clorpirifós; (6) parationa; (7) clorfenvinfós e (8) etiona. Resolução > 3,2.

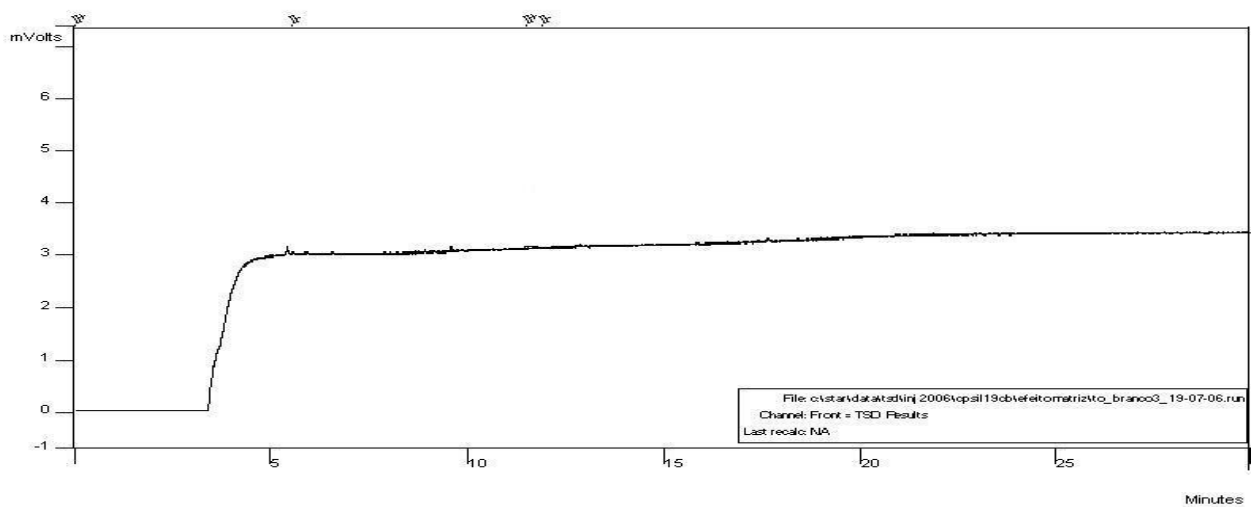
Condições experimentais: temperatura do forno: 80°C (espera 1 min), aquecimento de 30°C min<sup>-1</sup> até 200°C (espera 3 min), aquecimento de 15°C min<sup>-1</sup> até 230°C (espera 6 min.), aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> até 250°C (patamar 10 min.); tempo total da corrida: 30 min; modo de injeção: *splitless*; temperatura do injetor: 230°C; temperatura do detector: 300°C; gás de arraste: hélio; fluxo do gás de arraste: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; pressão: 12,8 psi; volume de amostra injetada: 1 µL.



(a)



(b)



(c)

Figura 7 – Cromatogramas típicos de amostras brancas das matrizes, alface (a), banana (b) e tomate (c).

Condições experimentais: temperatura do forno: 80°C (espera 1 min), aquecimento de 30°C min<sup>-1</sup> até 200°C (espera 3 min), aquecimento de 15°C min<sup>-1</sup> até 230°C (espera 6 min.), aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> até 250°C (patamar 10 min.); tempo total da corrida: 30 min; modo de injeção: *splitless*; temperatura do injetor: 230°C; temperatura do detector: 300°C; gás de arraste: hélio; fluxo do gás de arraste: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; pressão: 12,8 psi; volume de amostra injetada: 1 µL.

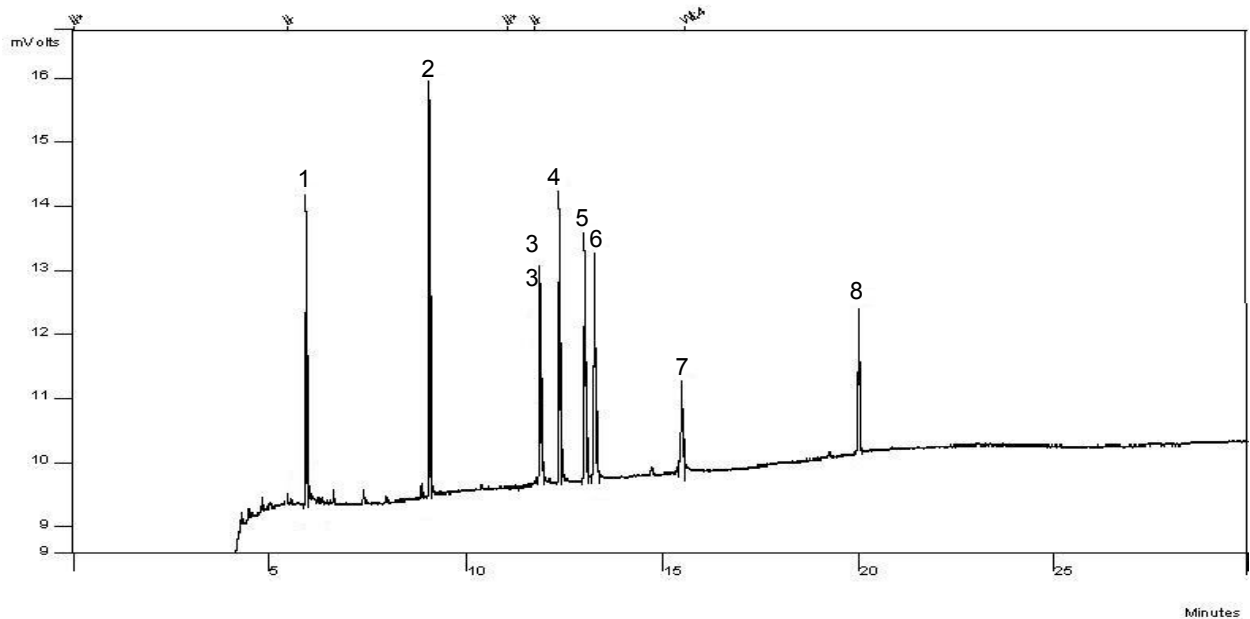


Figura 8 – Cromatogramas típicos de soluções *pool* de padrões de organofosforados na solução matriz de alface. Sendo: (1) diclorvós; (2) etoprofós; (3) dimetoato; (4) pirimifós; (5) clorpirifós; (6) parationa; (7) clorfenvinfós e (8) etiona. Resolução > 3,2. Condições experimentais: temperatura do forno: 80°C (espera 1 min), aquecimento de 30°C min<sup>-1</sup> até 200°C (espera 3 min), aquecimento de 15°C min<sup>-1</sup> até 230°C (espera 6 min.), aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> até 250°C (patamar 10 min.); tempo total da corrida: 30 min; modo de injeção: *splitless*; temperatura do injetor: 230°C; temperatura do detector: 300°C; gás de arraste: hélio; fluxo do gás de arraste: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; pressão: 12,8 psi; volume de amostra injetada: 1 µL.

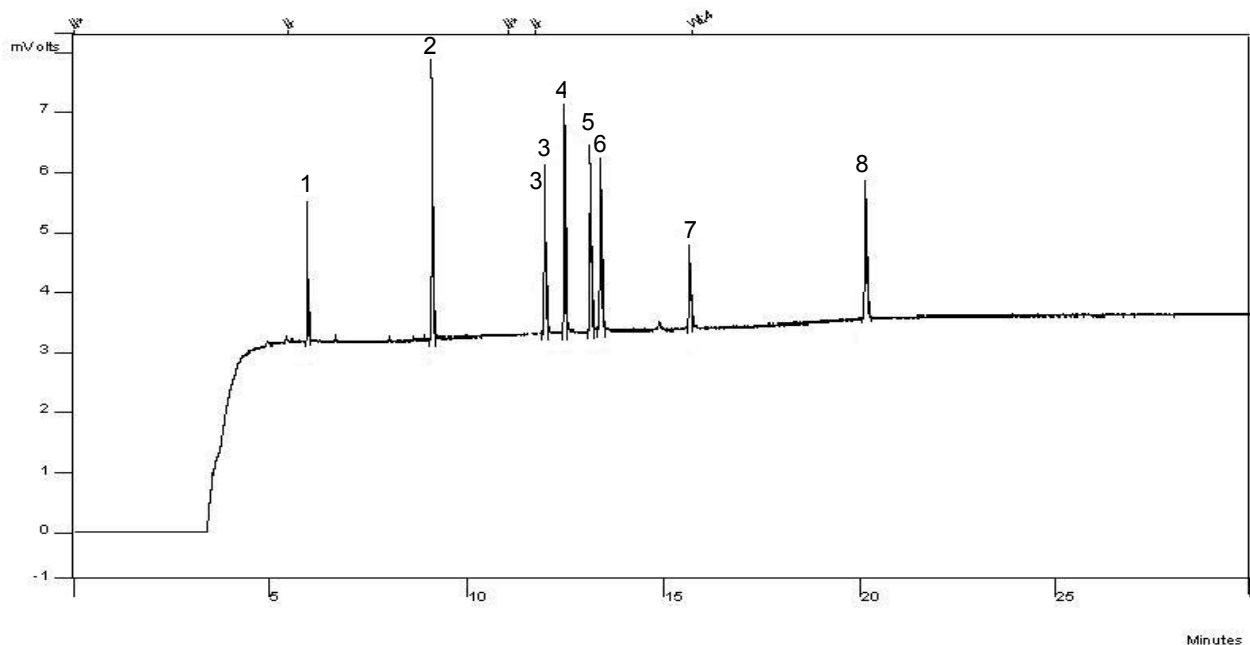


Figura 9 – Cromatogramas típicos de soluções *pool* de padrões de organofosforados na solução matriz de banana. Sendo: (1) diclorvós; (2) etoprofós; (3) dimetoato; (4) pirimifós; (5) clorpirifós; (6) parationa; (7) clorfenvinfós e (8) etiona. Resolução > 3,2. Condições experimentais: temperatura do forno: 80°C (espera 1 min), aquecimento de 30°C min<sup>-1</sup> até 200°C (espera 3 min), aquecimento de 15°C min<sup>-1</sup> até 230°C (espera 6 min.), aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> até 250°C (patamar 10 min.); tempo total da corrida: 30 min; modo de injeção: *splitless*; temperatura do injetor: 230°C; temperatura do detector: 300°C; gás de arraste: hélio; fluxo do gás de arraste: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; pressão: 12,8 psi; volume de amostra injetada: 1 µL.

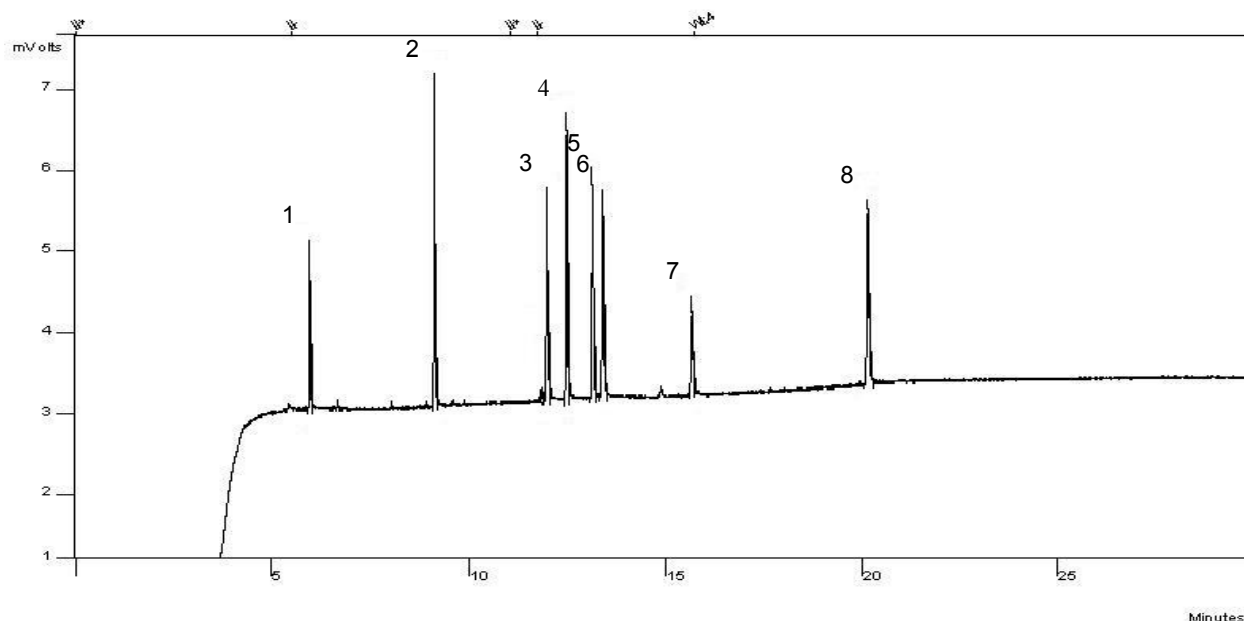


Figura 10 – Cromatogramas típicos de soluções *pool* de padrões de organofosforados na solução matriz de tomate. Sendo: (1) diclorvós; (2) etoprofós; (3) dimetoato; (4) pirimifós; (5) clorpirifós; (6) parationa; (7) clorfenvinfós e (8) etiona. Resolução > 3,2.

Condições experimentais: temperatura do forno: 80°C (espera 1 min), aquecimento de 30°C min<sup>-1</sup> até 200°C (espera 3 min), aquecimento de 15°C min<sup>-1</sup> até 230°C (espera 6 min.), aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> até 250°C (patamar 10 min.); tempo total da corrida: 30 min; modo de injeção: *splitless*; temperatura do injetor: 230°C; temperatura do detector: 300°C; gás de arraste: hélio; fluxo do gás de arraste: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; pressão: 12,8 psi; volume de amostra injetada: 1 µL.

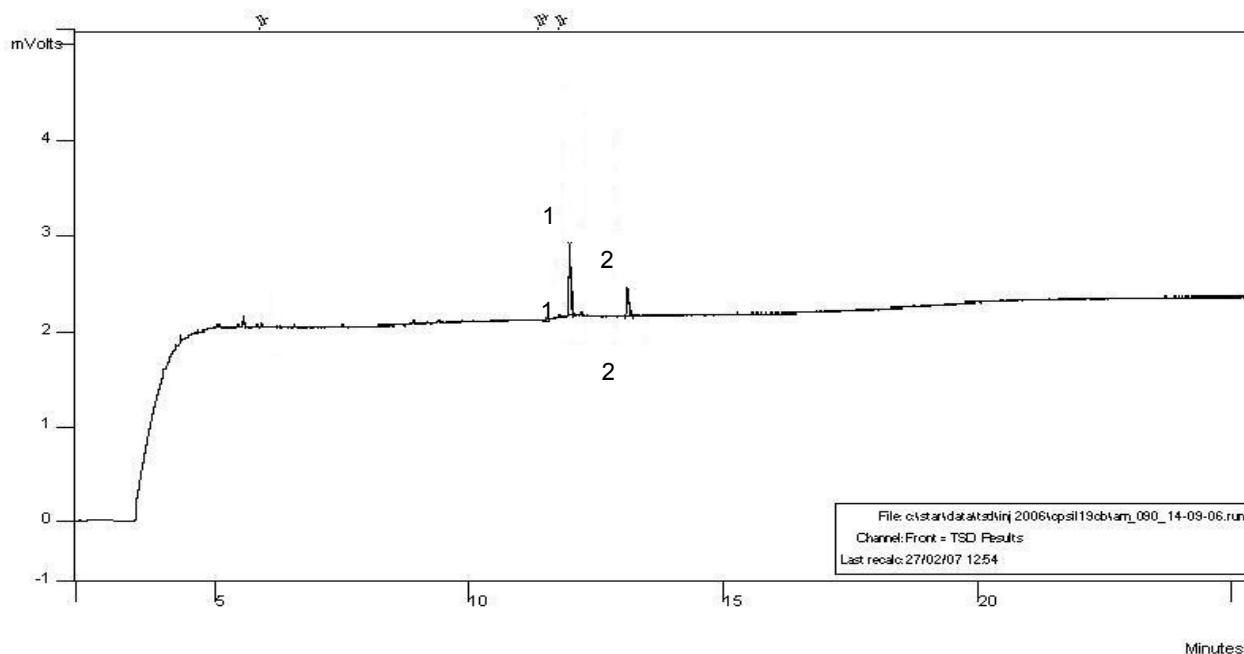


Figura 11 – Cromatogramas típicos de presença de resíduos de organofosforados em amostras de hortifrutícolas. Sendo (1) pirimifós-metílico; (2) clorpirifós.

Condições experimentais: temperatura do forno: 80°C (espera 1 min), aquecimento de 30°C min<sup>-1</sup> até 200°C (espera 3 min), aquecimento de 15°C min<sup>-1</sup> até 230°C (espera 6 min.), aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> até 250°C (patamar 10 min.); tempo total da corrida: 30 min; modo de injeção: *splitless*; temperatura do injetor: 230°C; temperatura do detector: 300°C; gás de arraste: hélio; fluxo do gás de arraste: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; pressão: 12,8 psi; volume de amostra injetada: 1 µL.



### 5.3 Linearidade

Foram aplicados o teste de resíduos padronizados Jackknife com intervalos de confiança dos resíduos ( $\pm t_{0,975;(n-2)} S_{res}$ ), para a retirada de outliers, nas curvas de solventes, os números de outliers retirados estão apresentados na Tabela 7. Em três casos, curva do dia 1 de etoprofós, dia 3 de parationa-metílica e de pirimifós-metílico, houve indicação de um número maior que quatro outliers; acima do limite máximo de 22,2% dos dezoito dados originais. Nestes casos, foram retirados apenas quatro outliers e a análise de regressão foi conduzida incluindo os demais.

Tabela 7 - Número de outliers retirados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife nas curvas de solventes obtidas no estudo de linearidade

Ingrediente ativo	Número de outliers retirados		
	Curva do dia 1	Curva do dia 2	Curva do dia 3
clorfenvinfós	2	–	1
clorpirifós	4	3	2
diclorvós	3	2	4
dimetoato	2	2	4
etiona	1	1	–
etoprofós	4	0	3
parationa-metílica	0	2	4
pirimifós-metílico	3	–	4

(–): nenhum outlier retirado.

Os resultados obtidos nos experimentos para avaliação da linearidade para clorfenvinfós, clorpirifós, diclorvós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa-metílica e pirimifós-metílico estão demonstrados nas Tabelas 8 a 15, respectivamente. Foram confirmados que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, são independentes e homoscedásticos, permitindo ação mais segura dos testes de hipóteses de  $t$  e  $F$ , além do emprego adequado da análise de variância para estimativa da significância da regressão e do desvio da linearidade. Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicaram que os desvios da normalidade não foram significativos com  $p > 0,10$ , com exceção do dia 1 para etoprofós e parationa, em que esta probabilidade foi  $p > 0,05$ . Autocorrelação dos resíduos da regressão não foi observada ( $p > 0,10$ ), visto que as estatísticas de Durbin-Watson demonstraram independência dos mesmos. A variância dos erros ao longo dos níveis de concentração estimada pelo teste de

Levene modificado também não foi significativa ( $p > 0,05$ ), indicando homoscedasticidade. Os dados obtidos foram avaliados como bem ajustados ao modelo linear. Significância da regressão ( $p < 0,001$ ) e desvios de linearidade não significativos ( $p > 0,05$ ) indicaram linearidade na faixa de 12 ng mL<sup>-1</sup> a 92 ng mL<sup>-1</sup> para as curvas 1, 2 e 3 dos oito OF pesquisados.

Não foram encontrados trabalhos na literatura de métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos que demonstrassem inequivocamente uma relação linear entre a concentração do analito e a resposta. O emprego do coeficiente de correlação é comumente utilizado na avaliação da linearidade destes métodos. Entretanto, este coeficiente não é adequado para demonstrar a linearidade (MULHOLLAND & HIBBERT, 1997; BURKE, 1998; THOMPSON et al, 2002). O uso de critérios equivocados para avaliação da linearidade é predominante na literatura de validação de métodos analíticos (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Com base apenas no coeficiente de correlação ( $r > 0,986$ ), LAMBROPOULOU & ALBANIS (2003) demonstraram que o método de MEFS por “*headspace*”, em combinação com CG-EM, foi eficiente para quantificação dos organofosforados diazinona, fenitrotona, fentiona, parationa, bromofós-etílico e etion em amostras de morango e ameixa, com linearidade na faixa de 50 a 500 µg kg<sup>-1</sup>. Em um método de análise de OF por CLAE com detector de fluorescência e reação pós-coluna, assumiu-se uma relação linear entre a concentração do analito e a área do pico dentro da faixa de 0,016 a 7,0 µg mL<sup>-1</sup> com coeficiente de correlação de 0,9995 (PÉREZ-RUIZ et al, 2005). Um método multiresíduos para análise de OF utilizando detector nitrogênio e fósforo e captura de elétrons foi considerado linear com coeficientes da correlação de pelo menos 0,99 (OLIVA et al, 2000).

Tabela 8 - Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de clorfenvinfós (12,24 a 93,84 ng ml<sup>-1</sup>)

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
<i>n</i>	16	18	17
<i>R</i>	0,9854	0,9912	0,9695
<i>p</i>	> 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>d</i>	2,704	1,784	1,90
<i>p</i>	> 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>t<sub>L</sub></i>	-0,979	-0,272	0,874
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<i>F</i> (1)	1.912,05	3.169,32	834,90
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>F</i> (2)	0,959	1,368	1,405
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05

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

Tabela 9 - Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de clorpirifós (12,12 a 92,92 ng ml<sup>-1</sup>)

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
<i>n</i>	14	15	16
<i>R</i>	0,9865	0,9810	0,9865
<i>p</i>	> 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>d</i>	2,539	2,426	1,674
<i>p</i>	> 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>t<sub>L</sub></i>	-0,193	-1,334	-0,136
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<i>F</i> (1)	10.937,15	14.687,56	1.073,28
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>F</i> (2)	0,582	1,038	3,208
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05

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

Tabela 10 - Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de diclorvós (12,24 a 93,84 ng ml<sup>-1</sup>)

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
<i>n</i>	15	16	14
<i>R</i>	0,9862	0,9711	0,9786
<i>p</i>	> 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>d</i>	2,883	2,059	2,325
<i>p</i>	> 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>t<sub>L</sub></i>	-1,493	-1,679	0,635
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<i>F</i> (1)	8.418,02	4.339,67	1.585,61
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001

$F(2)$	0,748	2,423	1,361
$p$	> 0,05	> 0,05	> 0,05

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

Tabela 11 - Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de dimetoato (12,12 a 92,92 ng ml<sup>-1</sup>)

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
$n$	16	16	14
$R$	0,9695	0,9657	0,9761
$p$	> 0,10	> 0,10	> 0,10
$d$	1,887	1,927	2,434
$p$	> 0,10	> 0,10	> 0,10
$t_L$	-0,129	0,998	-1,141
$p$	> 0,05	> 0,05	> 0,05
$F(1)$	784,72	4.614,39	1.020,12
$p$	< 0,001	< 0,001	< 0,001
$F(2)$	1,849	0,143	2,134
$p$	> 0,05	> 0,05	> 0,05

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

Tabela 12 - Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de etiona (12,0 a 92,0 ng ml<sup>-1</sup>)

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
$n$	17	17	18
$R$	0,9636	0,9785	0,9844
$p$	> 0,10	> 0,10	> 0,10
$d$	1,965	1,731	1,824
$p$	> 0,10	> 0,10	> 0,10
$t_L$	-0,669	0,280	-1,526
$p$	> 0,05	> 0,05	> 0,05
$F(1)$	2.384,22	4.119,76	938,34
$p$	< 0,001	< 0,001	< 0,001
$F(2)$	2,070	1,572	1,716
$p$	> 0,05	> 0,05	> 0,05

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

Tabela 13 - Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de etoprofós (12,0 a 92,0 ng ml<sup>-1</sup>)

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
<i>n</i>	14	17	15
<i>R</i>	0,9471	0,9694	0,9850
<i>p</i>	< 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>d</i>	2,407	1,641	2,162
<i>p</i>	> 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>t<sub>L</sub></i>	0,909	-0,966	-0,050
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<i>F</i> (1)	11.667,67	1.468,53	1.121,80
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>F</i> (2)	1,034	0,922	2,928
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05

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

Tabela 14 - Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de parationa metílico (12,0 a 92,0 ng ml<sup>-1</sup>)

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
<i>n</i>	18	16	14
<i>R</i>	0,9487	0,9621	0,9657
<i>p</i>	< 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>d</i>	2,739	2,737	2,271
<i>p</i>	> 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>t<sub>L</sub></i>	-1,968	-0,739	-1,109
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<i>F</i>	2.471,05	18.595,49	881,32
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>F</i>	0,859	0,509	3,626
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05

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

Tabela 15 - Avaliação da linearidade para as três curvas de solvente de pirimifós metílico (12,0 a 92,0 ng ml<sup>-1</sup>)

Estatística	Curva 1	Curva 2	Curva 3
<i>n</i>	15	18	14
<i>R</i>	0,9791	0,9768	0,9795
<i>p</i>	> 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>d</i>	2,831	1,839	2,003
<i>p</i>	> 0,10	> 0,10	> 0,10
<i>t<sub>L</sub></i>	1,354	-1,339	0,072
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<i>F</i>	10.034,25	4.589,37	919,98
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>F</i>	0,407	0,716	2,202
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05	> 0,05

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

## 5.4 Efeito do dia

A confirmação do modelo linear, conforme descrito anteriormente, das três curvas dos padrões de OF indicou a possibilidade de comparação das inclinações e interseções pelo teste de  $t$  para avaliação do efeito do dia. Os valores de  $t$  e  $p$ , conforme Tabelas 16 a 23, demonstraram que não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) quando as interseção, porém houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) para a inclinação. Com base nestes resultados, foi possível observar que as curvas de solvente não fornecem as mesmas respostas nos três dias avaliados, diante disto, as curvas de padrões não poderão ser reutilizadas para quantificação de resíduos de OF.

Tabela 16 - Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de clorfenvinfós

Estatística	Inclinações	Interseções
$t(Y_A)$	$3,78 \times 10^1$	$2,50 \times 10^{-2}$
$p$	$< 0,001$	$> 0,05$
$t(Y_B)$	$4,90 \times 10^1$	$1,40 \times 10^{-2}$
$p$	$< 0,001$	$> 0,05$
$s_c^2$	$5,87 \times 10^4$	

$t(Y_A)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_A = dia_1 - dia_2$ );  $t(Y_B)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_B = dia_1 + dia_2 - 2dia_3$ ),  $p$  = significância,  $s_c^2$  = variância combinada.

Tabela 17 - Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de clorpirifós

Estatística	Inclinações	Interseções
$t(Y_A)$	7,75	$3,34 \times 10^{-2}$
$p$	$< 0,001$	$> 0,05$
$t(Y_B)$	$3,90 \times 10^1$	$1,43 \times 10^{-1}$
$p$	$< 0,001$	$> 0,05$
$s_c^2$	$6,44 \times 10^4$	

$t(Y_A)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_A = dia_1 - dia_2$ );  $t(Y_B)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_B = dia_1 + dia_2 - 2dia_3$ ),  $p$  = significância,  $s_c^2$  = variância combinada.

Tabela 18 - Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de diclorvós

Estatística	Inclinações	Interseções
$t(Y_A)$	$2,05 \times 10^1$	$1,06 \times 10^{-1}$
$p$	$< 0,001$	$> 0,05$
$t(Y_B)$	$8,02 \times 10^1$	$1,03 \times 10^{-1}$

$p$	< 0,001	> 0,05
$s_c^2$	5,22 x 10 <sup>4</sup>	

$t(Y_A)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_A = dia_1 - dia_2$ );  $t(Y_B)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_B = dia_1 + dia_2 - 2dia_3$ ),  $p$  = significância,  $s_c^2$  = variância combinada.

Tabela 19 - Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de dimetoato

Estatística	Inclinações	Interseções
$t(Y_A)$	1,19 x 10 <sup>2</sup>	1,45 x 10 <sup>-1</sup>
$p$	< 0,001	> 0,05
$t(Y_B)$	1,07 x 10 <sup>2</sup>	6,71 x 10 <sup>-2</sup>
$p$	< 0,001	> 0,05
$s_c^2$	4,12 x 10 <sup>4</sup>	

$t(Y_A)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_A = dia_1 - dia_2$ );  $t(Y_B)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_B = dia_1 + dia_2 - 2dia_3$ ),  $p$  = significância,  $s_c^2$  = variância combinada.

Tabela 20 - Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de etiona

Estatística	Inclinações	Interseções
$t(Y_A)$	3,39 x 10 <sup>1</sup>	1,03 x 10 <sup>-2</sup>
$p$	< 0,001	> 0,05
$t(Y_B)$	1,55 x 10 <sup>2</sup>	1,85 x 10 <sup>-2</sup>
$p$	< 0,001	> 0,05
$s_c^2$	2,20 x 10 <sup>5</sup>	

$t(Y_A)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_A = dia_1 - dia_2$ );  $t(Y_B)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_B = dia_1 + dia_2 - 2dia_3$ ),  $p$  = significância,  $s_c^2$  = variância combinada.

Tabela 21 - Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de etoprófós

Estatística	Inclinações	Interseções
$t(Y_A)$	4,02 x 10 <sup>1</sup>	6,63 x 10 <sup>-2</sup>
$p$	< 0,001	> 0,05
$t(Y_B)$	8,31 x 10 <sup>1</sup>	1,39 x 10 <sup>-1</sup>
$p$	< 0,001	> 0,05
$s_c^2$	1,15 x 10 <sup>5</sup>	

$t(Y_A)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_A = dia_1 - dia_2$ );  $t(Y_B)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_B = dia_1 + dia_2 - 2dia_3$ ),  $p$  = significância,  $s_c^2$  = variância combinada.

Tabela 22 - Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de parationa-metilica



Estatística	Inclinações	Interseções
$t(Y_A)$	$1,68 \times 10^1$	$3,61 \times 10^{-3}$
$p$	$< 0,001$	$> 0,05$
$t(Y_B)$	$1,04 \times 10^1$	$1,05 \times 10^{-1}$
$p$	$< 0,001$	$> 0,05$
$s_c^2$	$7,99 \times 10^4$	

$t(Y_A)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_A = dia_1 - dia_2$ );  $t(Y_B)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_B = dia_1 + dia_2 - 2dia_3$ ),  $p$  = significância,  $s_c^2$  = variância combinada.

Tabela 23 - Avaliação do efeito dia com as três curvas de solvente do cálculo de linearidade de pirimifós-metilico

Estatística	Inclinações	Interseções
$t(Y_A)$	$1,68 \times 10^1$	$3,61 \times 10^{-3}$
$p$	$< 0,001$	$> 0,05$
$t(Y_B)$	$1,04 \times 10^1$	$1,05 \times 10^{-1}$
$p$	$< 0,001$	$> 0,05$
$s_c^2$	$7,99 \times 10^4$	

$t(Y_A)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_A = dia_1 - dia_2$ );  $t(Y_B)$  = estatística  $t$  para contraste ( $Y_B = dia_1 + dia_2 - 2dia_3$ ),  $p$  = significância,  $s_c^2$  = variância combinada.

## 5.5 Efeito de matriz

Foram aplicados o teste de resíduos padronizados Jackknife, para a retirada de outliers, nas curvas de solventes e matriz, os números de outliers retirados estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Número de outliers retirados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife nas curvas de solventes e matriz obtidas no estudo de efeito matriz

Ingrediente	Número de outliers retirados					
	alface		banana		tomate	
	solvente	matriz	solvente	matriz	solvente	matriz
clorfenvinfós	3	1	4	2	4	1
clorpirifós	1	4	1	4	3	3
diclorvós	4	2	4	2	4	4
dimetoato	1	4	4	4	3	2
etiona	3	1	2	2	2	4
etoprofós	4	3	4	3	4	-
parationa	2	4	4	4	4	2
pirimifós	2	3	4	4	3	3

(-): nenhum outlier retirado.

Foram verificadas para as curvas de solventes e matriz, as premissas relativas ao MMQO, dos oito analitos para as três culturas. Distribuição normal dos resíduos da regressão foi observada pelos coeficientes de correlação de Ryan-Joiner e desvios da normalidade não significativos ( $p > 0,05$ ). Independência dos resíduos da regressão foi indicada pelas estatísticas de Durbin-Watson (auto-correlação não significativa,  $p > 0,10$ ). Homoscedasticidade foi observada com estatísticas  $t$  de Levene não significativas ( $p > 0,05$ ). Regressões significativas ( $p < 0,001$ ) e desvios de linearidade não significativos ( $p > 0,05$ ) foram diagnosticados pelos testes de  $F$  da análise de variância. Estes resultados de confirmação do modelo linear indicaram a possibilidade de comparação das inclinações e interseções pelo teste de  $t$  para avaliação dos efeitos matriz. O teste de  $F$  indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas de solventes e matrizes e a possibilidade do uso do teste de  $t$  com variâncias combinadas.

Nas três matrizes estudadas as inclinações e interseções das curvas de solventes foram comparadas com aquelas estimadas para as curvas de matriz. Na matriz alface não houve diferença significativa para interseções, com exceção para o etoprofós ( $p < 0,05$ ), quanto à inclinação não houve diferença para dimetoato enquanto os demais agrotóxicos apresentaram diferença significativa (Tabela 25 e 26).

Tabela 25 - Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de alface para etoprofós, pirimifós-metílico, parationa-metílica e etiona ( $12 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $92 \text{ ng mL}^{-1}$ )

Estatística	etoprofós	pirimifós	parationa	etiona
Comparação da inclinação das curvas				
$t_a$	16,150	3,207	2,57	2,548
$p$	0,001	0,01	0,05	0,05
$GL$	25	27	26	28
Comparação da interseção das curvas				
$t_b$	2,470	0,960	0,362	1,317
$p$	0,05	0,05	0,05	0,05
$GL$	25	27	26	28

$t_a$  = estatística  $t$  para contrastes entre inclinações,  $t_b$  = estatística  $t$  para contrastes entre interseções,  $p$  = significância,  $GL$  = graus de liberdade ( $n_s + n_m - 4$ ), sendo  $n_s$  número de pontos da curva em solvente e  $n_m$  número de pontos da curva em matriz.

Tabela 26 - Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de alface para clorfenvinfós e diclorvós ( $12,24 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $93,84 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e clorpirifós e dimetoato ( $12,12 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $92,92 \text{ ng mL}^{-1}$ )

Estatística	clorfenvinfós	diclorvós	clorpirifós	dimetoato
Comparação da inclinação das curvas				
$t_a$	2,109	5,373	2,228	1,010
$p$	< 0,05	< 0,001	< 0,05	> 0,05
$GL$	28	26	27	27
Comparação da interseção das curvas				
$t_b$	1,148	1,459	0,199	1,803
$p$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$GL$	28	26	27	27

$t_a$  = estatística  $t$  para contrastes entre inclinações,  $t_b$  = estatística  $t$  para contrastes entre interseções,  $p$  = significância,  $GL$  = graus de liberdade ( $n_s + n_m - 4$ ), sendo  $n_s$  número de pontos da curva em solvente e  $n_m$  número de pontos da curva em matriz.

Na matriz de banana e tomate não houve diferença significativa para interseções, com exceção para diclorvós ( $p < 0,05$ ), quanto à inclinação não houve diferença para clorpirifós na matriz de banana e clorfenvinfós no tomate, enquanto os demais agrotóxicos apresentaram diferença significativa (Tabela 27 a 30). Diante disto, foi possível verificar que não há efeito de matriz para dimetoato em alface, clorpirifós em banana, clorfenvinfós em tomate, enquanto os demais agrotóxicos apresentaram efeito de matriz.

Tabela 27 - Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de banana para etoprofós, pirimifós-metílico, parationa-metílica e etiona (12 ng mL<sup>-1</sup> a 92 ng mL<sup>-1</sup>)

Estatística	etoprofós	pirimifós	parationa	etiona
Comparação da inclinação das curvas				
$t_a$	2,982	3,011	5,094	15,42
$p$	< 0,01	< 0,01	< 0,001	< 0,001
$GL$	25	24	24	28
Comparação da interseção das curvas				
$t_b$	1,196	0,148	0,419	0,836
$p$	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
$GL$	25	24	24	28

$t_a$  = estatística  $t$  para contrastes entre inclinações,  $t_b$  = estatística  $t$  para contrastes entre interseções,  $p$  = significância,  $GL$  = graus de liberdade ( $n_s + n_m - 4$ ), sendo  $n_s$  número de pontos da curva em solvente e  $n_m$  número de pontos da curva em matriz.

Tabela 28 - Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de banana para clorfenvinfós e diclorvós (12,24 ng mL<sup>-1</sup> a 93,84 ng mL<sup>-1</sup>) e clorpirifós e dimetoato (12,12 ng mL<sup>-1</sup> a 92,92 ng mL<sup>-1</sup>)

Estatística	clorfenvinfós	diclorvós	clorpirifós	dimetoato
Comparação da inclinação das curvas				
$t_a$	4,491	13,33	1,730	7,705
$p$	< 0,001	< 0,001	>0,05	< 0,001
$GL$	26	26	27	24
Comparação da interseção das curvas				
$t_b$	0,181	2,631	0,420	1,097
$p$	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05
$GL$	26	26	27	24

$t_a$  = estatística  $t$  para contrastes entre inclinações,  $t_b$  = estatística  $t$  para contrastes entre interseções,  $p$  = significância,  $GL$  = graus de liberdade ( $n_s + n_m - 4$ ), sendo  $n_s$  número de pontos da curva em solvente e  $n_m$  número de pontos da curva em matriz.

Tabela 29 - Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de tomate para etoprofós, pirimifós-metílico, parationa-metílica e etiona (12 ng mL<sup>-1</sup> a 92 ng mL<sup>-1</sup>)

Estatística	etoprofós	pirimifós	parationa	etiona
Comparação da inclinação das curvas				
$t_a$	3,100	3,118	5,108	17,817
$p$	< 0,01	< 0,01	< 0,001	< 0,001
$GL$	28	26	26	26
Comparação da interseção das curvas				
$t_b$	0,085	1,127	0,747	1,245
$p$	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
$GL$	28	26	26	26

$t_a$  = estatística  $t$  para contrastes entre inclinações,  $t_b$  = estatística  $t$  para contrastes entre interseções,  $p$  = significância,  $GL$  = graus de liberdade ( $n_s + n_m - 4$ ), sendo  $n_s$  número de pontos da curva em solvente e  $n_m$  número de pontos da curva em matriz.

Tabela 30 - Comparações entre as inclinações e interseções das curvas dos analitos no solvente e na matriz de tomate para clorfenvinfós e diclorvós (12,24 ng mL<sup>-1</sup> a 93,84 ng mL<sup>-1</sup>) e clorpirifós e dimetoato (12,12 ng mL<sup>-1</sup> a 92,92 ng mL<sup>-1</sup>)

Estatística	clorfenvinfós	diclorvós	clorpirifós	dimetoato
Comparação da inclinação das curvas				
$t_a$	0,877	10,337	3,199	7,482
$p$	> 0,05	< 0,001	< 0,01	< 0,001
$GL$	27	24	26	27
Comparação da interseção das curvas				
$t_b$	0,646	2,752	1,400	1,458
$p$	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05
$GL$	27	24	26	27

$t_a$  = estatística  $t$  para contrastes entre inclinações,  $t_b$  = estatística  $t$  para contrastes entre interseções,  $p$  = significância,  $GL$  = graus de liberdade ( $n_s + n_m - 4$ ), sendo  $n_s$  número de pontos da curva em solvente e  $n_m$  número de pontos da curva em matriz.

Diante destes resultados, foi possível verificar que as curvas de solvente não fornecem as mesmas respostas que curvas com extrato de amostras contendo diferentes OF estudados, nas mesmas faixas de concentração, caracterizando efeito de matriz. Como o ensaio cromatográfico foi realizado com pool destes padrões, todos os OF e matrizes estudadas para ensaio de recuperação foram quantificados nas curvas com matriz.

Neste trabalho, o efeito de matriz foi avaliado por comparação das estimativas dos parâmetros das curvas de calibração obtidas por regressão linear. Segundo SOBOLEVA et al. (2000), a regressão linear não deve ser utilizada para avaliar o efeito matriz quando há um número pequeno de pontos de calibração ( $n < 10$ ), mas este tratamento é mais sensível que o teste de  $t$ , especialmente quando o erro padrão da diferença das médias das respostas é elevado.

Utilizando a técnica de calibração com adição do padrão para um método de multiresíduos por CL-EM JANSSON et al. (2004) observaram um efeito de matriz relativamente pequeno para diferentes matrizes, em níveis de adição de 0,01 a 0,5 mg kg<sup>-1</sup>. No presente estudo, o efeito de matriz foi variável, mas para a maioria dos conjuntos analito e matriz este efeito foi significativo. É importante observar que a medida do efeito de matriz durante a validação do método fornece apenas uma indicação preliminar deste parâmetro de desempenho e este deve ser reavaliado com uma certa frequência. AMBRUS (2000) afirma que o efeito de matriz varia de dia para dia durante o uso regular do método, dependendo das condições do sistema de cromatografia em fase gasosa, sendo que injetores *on-column* induzem menor efeito de matriz do que injetores *split/splitless*. Isto significa que não é possível testar somente uma vez o efeito de matriz e usar este resultado para cálculos futuros. Além disso, com base em dados para um analito em uma matriz específica não é possível prever o efeito de matriz de outros analitos na mesma matriz.

Foi observado por SCHENCK & LEHOTAY (2000) que o efeito de matriz é maior em OF que contêm amidas, sulfonas, e/ou ligações P=O como por ex. dimetoato, ometoato, fosmete, dicrotofós, monocrotofós, malaxona e acefato. Os agrotóxicos que têm múltiplos de P=O ou amidas, tais como dicrotofós, monocrotofós, e ometoato, foram afetados mais extremamente do que outros agrotóxicos com somente um único P=O ou amida. Fosmete e carbofentiona foram mais afetados devido às duas ligações =O. A quantidade do efeito relativo por grupo funcional pode ser observada comparando os resultados dos compostos com pequenas diferenças estruturais, tais como o dimetoato-ometoato, o parationa-paraoxona, e o malationa-malaoxona. Interessante, que terbufós e os pirazofós deram umas respostas mais elevadas na matriz em concentrações mais baixas

## 5.6 Recuperação e precisão

Os resultados de recuperação obtidos dos oito OF nas três matrizes estudadas foram analisados quanto à presença de outliers pelo teste de Grubbs. O número de outliers retirados estão apresentados na Tabela 31, não havendo presença de outliers para o dimetoato nas três matrizes estudadas.

Tabela 31 - Números de outliers retirado pelo teste de Grubbs nos resultados de recuperação obtidos dos organofosforados nas três matrizes estudadas.

Ingrediente ativo	Número de outliers em cada nível nominal de adição ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )								
	alface			banana			tomate		
	8	35	62	8	35	62	8	35	62
clorfenvinfós	-	3	-	2	-	-	2	2	-
clorpirifós	1	-	-	2	-	2	2	1	-
diclorvós	-	1	-	-	-	-	-	-	2
etiona	3	2	-	1	-	-	-	2	-
etoprofós	-	1	-	-	-	-	-	-	-
parationa	-	-	-	2	-	1	-	-	-
pirimifós	-	1	-	2	-	2	-	-	-

(-) : nenhum outlier retirado.

Os resíduos, obtidos pela diferença entre a de recuperação média e os valores individuais de recuperação obtidos em cada dia, para cada nível de concentração, apresentaram distribuição normal ( $p > 0,10$ ) e homoscedasticidade ( $p > 0,05$ ), permitindo a estimativa de desvios padrão relativos de repetitividade ( $\text{DPR}_r$ ) e desvios padrão relativos de reprodutibilidade parcial ( $\text{DPR}_R$ ) por análise de variância.

As médias de recuperação alcançadas para amostras de alface adicionadas entre 8 a 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  variaram entre 82,7 a 94,8 % para clorfenvinfós; 91,4 a 92,9 % para clorpirifós; 76,7 a 94,2 % para diclorvós; 95,7 a 104,0 % para dimetoato; 92,4 a 104,2 % para etiona; 86,7 a 94,2 % para etoprofós; 92,7 a 96,3 % para parationa-metílica e 92,5 a 95,2 % para pirimifós. Os  $\text{DPR}_r$  foram de 14,0 a 20,9 % para clorfenvinfós; de 6,2 a 9,7 % para clorpirifós; de 9,7 a 11,8 % para diclorvós; de 6,3 a 13,0 % para dimetoato; de 11,2 a 14,3 % para etiona; de 6,6 a 10,4 % para etoprofós; de 5,8 a 11,5 % para parationa e 5,3 a 10,2 % para pirimifós. Os valores de  $\text{DPR}_R$  estiveram entre 14,9 a 36,2 % para clorfenvinfós; 6,4 a 10,1 % para clorpirifós; 11,6 a 29,6 % para diclorvós; 7,3 a 13,0 % para dimetoato; 12,8 a 14,3 % para etiona; 7,5 a 17,6 % para etoprofós; 6,0 a 15,4 % para parationa e 5,7 a 12,0 % para pirimifós (Tabelas 32). Médias de recuperação aceitáveis foram atingidas na faixa de 8 a 62  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para todos os OF avaliados. Todavia,  $\text{DPR}_r$  acima de 14,7 % foram observados para clorfenvinfós e  $\text{DPR}_R$  acima de 22,0 para clorfenvinfós e diclorvós no nível 8  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Estes resultados sinalizaram exatidão e precisão do método validado na faixa de 8 a 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa e pirimifós e 35  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para clorfenvinfós e diclorvós, considerando os critérios de aceitabilidade determinados.

Tabela 32 - Médias de recuperação e desvios padrão relativo, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de alface adicionadas de resíduos de organofosforados em diferentes níveis de concentração

Ingrediente ativo	Nível nominal de adição								
	8 $\mu\text{g kg}^{-1}$			35 $\mu\text{g kg}^{-1}$			62 $\mu\text{g kg}^{-1}$		
	<i>MR</i>	<i>DPR<sub>r</sub></i>	<i>DPR<sub>R</sub></i>	<i>MR</i>	<i>DPR<sub>r</sub></i>	<i>DPR<sub>R</sub></i>	<i>MR</i>	<i>DPR<sub>r</sub></i>	<i>DPR<sub>R</sub></i>
clorfenvinfós	94,8	20,9	36,2	82,7	14,0	14,9	93,2	14,1	16,6
clorpirifós	92,1	9,4	10,1	91,4	9,7	9,8	92,9	6,2	6,4
diclorvós	76,7	11,8	29,6	94,2	9,7	11,6	86,1	14,0	14,1
dimetoato	104,0	6,5	9,5	95,7	13,0	13,0	97,6	6,3	7,3
etiona	104,2	12,8	12,8	96,1	14,3	14,3	92,4	11,2	13,1
etoprofós	86,7	10,4	17,6	94,2	7,2	7,5	92,9	6,6	7,8
parationa	92,7	11,5	15,4	94,0	8,9	9,3	96,3	5,8	6,0
pirimifós	92,5	10,2	12,0	95,2	8,5	8,7	94,3	5,3	5,7

*MR* = média de recuperação, *DPR<sub>r</sub>* = desvio padrão relativo de repetitividade, *DPR<sub>R</sub>* = desvio padrão relativo de reprodutibilidade parcial. Critérios de aceitabilidade para *MR*: 70 % a 110 % (para amostras adicionadas 12 ng mL<sup>-1</sup>), 80 % a 110 % (para amostras adicionadas 52 e 92 ng mL<sup>-1</sup>). Critério de aceitabilidade para *DPR<sub>r</sub>*: ≤ 14,7 %. Critério de aceitabilidade para *DPR<sub>R</sub>*: ≤ 22 %.

Para as amostras de banana as médias de recuperação alcançadas entre os níveis 8 a 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  variaram entre 89,5 a 94,3 % para clorfenvinfós; 87,9 a 95,5 % para clorpirifós; 93,9 a 109,3 % para diclorvós; 90,1 a 91,4 % para dimetoato; 94,8 a 97,9 % para etiona; 89,8 a 94,7 % para etoprofós; 89,1 a 92,1 % para parationa-metílica e 88,5 a 90,8 % para pirimifós. Os *DPR<sub>r</sub>* foram de 7,6 a 19,2 % para clorfenvinfós; de 7,4 a 10,0 % para clorpirifós; de 14,3 a 30,6 % para diclorvós; de 5,2 a 14,1 % para dimetoato; de 5,5 a 9,7 % para etiona; de 4,7 a 9,3 % para etoprofós; de 8,6 a 13,3 % para parationa e 7,8 a 11,5 % para pirimifós. Os valores de *DPR<sub>R</sub>* estiveram entre 14,7 a 19,2 % para clorfenvinfós; 10,7 a 13,1 % para clorpirifós; 33,6 a 42,1 % para diclorvós; 10,9 a 20,6 % para dimetoato; 9,3 a 21,4 % para etiona; 10,1 a 13,5 % para etoprofós; 12,4 a 19,4 % para parationa e 11,5 a 14,0 % para pirimifós (Tabelas 33). Médias de recuperação aceitáveis foram atingidas na faixa de 8 a 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para todos os OF avaliados. Entretanto, *DPR<sub>r</sub>* acima de 14,7 % foram observados para clorfenvinfós no nível 8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e para diclorvós no nível 8 e 40  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . *DPR<sub>R</sub>* acima de 22,0 % para diclorvós em todos os níveis. Estes resultados sinalizaram exatidão e precisão do método validado na faixa de 8 a 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa e pirimifós, 35  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para clorfenvinfós e em nenhum nível de diclorvós, considerando os critérios de aceitabilidade determinados.

Tabela 33 - Médias de recuperação e desvios padrão relativo, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de banana adicionadas de resíduos de agrotóxicos em diferentes níveis de concentração

Ingrediente ativo	Nível nominal de adição								
	8 $\mu\text{g kg}^{-1}$			35 $\mu\text{g kg}^{-1}$			62 $\mu\text{g kg}^{-1}$		
	<i>MR</i>	<i>DPR<sub>r</sub></i>	<i>DPR<sub>R</sub></i>	<i>MR</i>	<i>DPR<sub>r</sub></i>	<i>DPR<sub>R</sub></i>	<i>MR</i>	<i>DPR<sub>r</sub></i>	<i>DPR<sub>R</sub></i>
clorfenvinfós	89,5	19,2	19,2	94,3	12,7	14,7	90,3	7,6	17,4
clorpirifós	95,5	10,0	10,7	91,9	11,8	11,8	87,9	7,4	13,1
diclorvós	96,2	30,6	33,6	93,9	23,5	42,1	109,3	14,3	36,5
dimetoato	91,4	12,9	20,6	90,1	14,1	14,5	90,4	5,2	10,9
etiona	94,8	8,7	9,3	97,9	9,7	11,8	94,9	5,5	21,4
etoprofós	94,7	9,3	13,5	90,4	8,4	14,4	89,8	4,7	10,1
parationa	92,1	13,3	17,8	89,1	12,4	12,4	90,1	8,6	19,4
pirimifós	88,9	9,0	13,1	90,8	11,5	11,5	88,5	7,8	14,00

*MR* = média de recuperação, *DPR<sub>r</sub>* = desvio padrão relativo de repetitividade, *DPR<sub>R</sub>* = desvio padrão relativo de reprodutibilidade parcial. Critérios de aceitabilidade para *MR*: 70 % a 110 % (para amostras adicionadas 12 ng mL<sup>-1</sup>), 80 % a 110 % (para amostras adicionadas 52 e 92 ng mL<sup>-1</sup>). Critério de aceitabilidade para *DPR<sub>r</sub>*: ≤ 14,7 %. Critério de aceitabilidade para *DPR<sub>R</sub>*: ≤ 22 %.

Nas amostras de tomate as médias de recuperação alcançadas entre os níveis 8 a 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  variaram entre 81,7 a 84,3 % para clorfenvinfós; 85,1 a 86,5 % para clorpirifós; 40,5 a 86,7 % para diclorvós; 84,9 a 94,0 % para dimetoato; 81,0 a 88,4 % para etiona; 88,0 a 89,0 % para etoprofós; 86,4 a 92,5 % para parationa-metílica e 83,4 a 92,7 % para pirimifós. Os *DPR<sub>r</sub>* foram de 7,4 a 11,8 % para clorfenvinfós; de 11,4 a 12,9 % para clorpirifós; de 10,8 a 82,8 % para diclorvós; de 10,1 a 13,3 % para dimetoato; de 9,9 a 10,8 % para etiona; de 6,3 a 10,4 % para etoprofós; de 8,2 a 13,1 % para parationa e 8,8 a 12,9 % para pirimifós. Os valores de *DPR<sub>R</sub>* estiveram entre 13,7 a 19,7 % para clorfenvinfós; 12,9 a 19,3 % para clorpirifós; 33,8 a 87,4 % para diclorvós; 11,8 a 17,2 % para dimetoato; 10,3 a 20,7 % para etiona; 10,4 a 16,9 % para etoprofós; 10,3 a 17,7 % para parationa e 11,0 a 17,7 % para pirimifós (Tabelas 34). Médias de recuperação aceitáveis foram atingidas na faixa de 8 a 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para clorfenvinfós, clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa e pirimifós e 35 e 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para diclorvós. *DPR<sub>r</sub>* acima de 14,7 % foram observados para diclorvós no nível 8 e 35  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e *DPR<sub>R</sub>* acima de 22,0% para diclorvós em todos os níveis. Estes resultados sinalizaram exatidão e precisão do método validado na faixa de 8 a 62  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para clorfenvinfós, clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa e pirimifós e em nenhum nível de diclorvós, considerando os critérios de aceitabilidade determinados.



Tabela 34 - Médias de recuperação e desvios padrão relativo, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de tomate adicionadas de resíduos de agrotóxicos em diferentes níveis de concentração

Ingrediente ativo	Nível nominal de adição								
	8 µg kg <sup>-1</sup>			8 µg kg <sup>-1</sup>			8 µg kg <sup>-1</sup>		
	MR	DPR <sub>r</sub>	DPR <sub>R</sub>	MR	DPR <sub>r</sub>	DPR <sub>R</sub>	MR	DPR <sub>r</sub>	DPR <sub>R</sub>
clorfenvinfós	84,1	11,1	19,7	84,3	7,4	13,7	81,7	11,8	16,5
clorpirifós	85,1	12,8	19,3	89,5	11,4	14,7	86,5	12,9	12,9
diclorvós	40,5	82,8	87,4	86,7	31,6	33,8	81,0	10,8	40,4
dimetoato	93,3	13,3	17,2	94,0	10,1	11,8	84,9	12,4	14,7
etiona	81,0	9,9	20,7	88,4	10,8	16,5	84,5	10,2	10,3
etoprofós	88,1	6,3	16,9	88,0	13,1	13,8	89,0	10,4	10,4
parationa	87,5	8,2	17,7	92,5	11,5	13,1	86,4	10,3	10,3
pirimifós	83,4	8,8	17,4	92,7	12,9	16,2	87,5	11,0	11,0

MR = média de recuperação, DPR<sub>r</sub> = desvio padrão relativo de repetitividade, DPR<sub>R</sub> = desvio padrão relativo de reprodutibilidade parcial. Critérios de aceitabilidade para MR: 70 % a 110 % (para amostras adicionadas 12 ng mL<sup>-1</sup>), 80 % a 110 % (para amostras adicionadas 52 e 92 ng mL<sup>-1</sup>). Critério de aceitabilidade para DPR<sub>r</sub>: ≤ 14,7 %. Critério de aceitabilidade para DPR<sub>R</sub>: ≤ 22 %.

Como não houve precisão e exatidão do método para o OF diclorvós, as amostras que contêm o analito não puderam ser quantificadas. Entretanto, como afirmam Thompson et al. (2002), os resultados abaixo do LQ não são desprovidos de significado e podem se adequar ao propósito de uso do método. O diclorvós não é autorizado para a cultura de batata e de tomate e, portanto, não podem ser encontrados nestas culturas. Assim, a simples detecção deste inseticida será suficiente para considerar as amostras não-conformes.

A faixa da recuperação média encontrada neste estudo (76,7% a 104,2%) foi superior à obtida por GELSOMINO et al. (1997) para um método de multiresíduos para análise OF utilizando colunas *narrow-bore* com detectores de captura de elétrons. Esses autores encontraram recuperações em torno de 70 a 108% com níveis de adição de padrões de 40 a 100 µg kg<sup>-1</sup> para amostras de cenoura, melão e tomate. Porém, para clormefós foi encontrada uma recuperação de 51,5%. Recuperações entre 83 a 118% e DPR de 10 a 13% (n = 54) foram encontrados por KRISTENSON et al (2001) para a determinação de uma variedade de OF em laranjas, em níveis de concentração abaixo dos LMR. Médias de recuperação entre 70 e 116% foram obtidas para os níveis de adição de 0,01 e 0,1 mg kg<sup>-1</sup>, com valores associados de DPR ≤ 20%, para vinte OF em pêssego, pimentão e uva. (PATEL et al., 2004).

Trabalhando com outros analitos representativos, SIMPLÍCIO & VILAS BOAS (1999) encontraram faixas de recuperação semelhantes ao presente estudo. Para

concentrações entre 25 e 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , quantificando diazinona, fenitrotiona, fentiona, quinafós triazofós, fosadona e pirazofós em frutas e sucos de frutas esses autores encontraram médias de recuperação de 75,9% a 102,6% para sucos e 70% a 99% para frutas, mas para pirazofós a recuperação foi de 53%. Os DPR, para análises em triplicata, das amostras fortificadas com 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de cada OF não eram maiores que 8,7%.

Utilizando detector semelhante ao presente estudo, OLIVA et al, (2000) encontraram recuperação de 80 a 108% e desvios padrão relativos não maiores que 16%, para amostras de uva e vinho adicionadas de padrão, utilizando um método multiresíduos para análise de OF. E também BRITO et al (2002) obtiveram recuperações médias entre 75 a 104% e desvios padrões relativos entre 1,4 e 11,5% para a determinação do malationa, parationa-metílica e monocrotofós em amostras de água de coco adicionadas em dois níveis de concentração (0,01 e 12,0  $\text{mg kg}^{-1}$ ). Cada análise da recuperação foi repetida pelo menos cinco vezes.

## **5.7 Limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção**

O LD do método para as três matrizes estudadas foi estabelecido como 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa e pirimifós, visto que foram detectadas com médias de sinal/ruído  $\geq 3$  nas amostras adicionadas. Para clorfenvinfós e diclorvós foi definido um limite de detecção de 8  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Os valores de LD observados neste estudo foram superiores a 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  obtido por SIMPLÍCIO & BOA (1999) em pêras e suco de fruta na análise de diazinona, fenitrotiona, fentiona, quinafós, triazofós, fosadona e pirazofós. E também, MOL et al (2003) em análise de OF em amostras de repolho e uva encontraram LD entre 1 e 4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Entretanto, para a determinação de OF em laranjas, em níveis de concentração abaixo dos LMR na União Européia, KRISTENSON et al. (2001) encontraram LD variando de 4 a 90  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . BRITO et al, (2002) obtiveram LD entre 0,002 a 2,0  $\text{mg kg}^{-1}$  para a determinação do malationa, parationa-metílica e monocrotofós em amostras de água de coco utilizando detector termiônico específico.

O LQ, correspondente ao menor nível de concentração no quais os experimentos indicaram exatidão e precisão do método, foi de 8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa e pirimifós nas matrizes alface, banana e

tomate. O clorfenvinfós apresentou um limite de  $8 \mu\text{g kg}^{-1}$  para tomate,  $35 \mu\text{g kg}^{-1}$  para alface e  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  para banana. Entretanto, diclorvós apresentou um limite de  $35 \mu\text{g kg}^{-1}$  para alface e as matrizes banana e tomate não houve possibilidade de estabelecer o LQ, pois não houve exatidão e/ou precisão nos limites estudados.

Limites de quantificação semelhantes ao presente estudo foram obtidos por OLIVA et al., (2000) para um método de análise de OF em vinho utilizando o detector nitrogênio e fósforo. Os limites variaram 10 a  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , que estão abaixo dos LMR estabelecido pela legislação da União Européia, com exceção para metidationa e quinalfós que estiveram com LQ equivalentes aos LMR ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). E também, LAMBROPOULOU & ALBANIS (2003), em análises de diazinona, fenitrotona, fentiona, parationa-etílica, bromofós e etiona em amostras de morango e cereja, utilizando método de microextração em fase sólida e detecção por CG – EM, obtiveram LQ entre  $17,3$  a  $35,7 \mu\text{g kg}^{-1}$  com amostras adicionadas em níveis de concentração de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Um método utilizando o CL – EM para análise dos OF: acefato, metamidofós, monocrotofós, ometoato e vamidationa, em amostras de repolho e uva, foram encontrados LQ de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  em nível de adição de 10 e  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  (MOL et al, 2003).

Com base nos resultados dos testes de recuperação, NAKAZAWA et al (2004) encontraram limites de quantificação estimados em  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para 2,4-D, diclorvós e carbaryl e  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  para malationa, em um método simples e rápido para a análise simultânea dos 5 agrotóxicos em amostras de frutas cítricas, adicionadas em concentrações à metade do LMR estabelecidos no Japão, utilizando espectrometria de massas.

Os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  encontrados para os analitos estudados nas diferentes matrizes estão apresentados na Tabela 35. O LMR adotado no cálculo destes parâmetros foi o estabelecido na legislação (ANVISA, 2006c). Para pirimifós em alface e banana considerou-se um LMR de  $5 \text{mg kg}^{-1}$ . Para clorpirifós em banana, foi adotado o LMR de  $0,01 \text{mg kg}^{-1}$  e para dimetoato e etiona em tomate os valores de LMR utilizados foram de  $1,0 \text{mg kg}^{-1}$  e  $2,0 \text{mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Os demais OF pesquisados não são autorizados e, portanto, seu LMR foi considerado igual a zero para os cálculos de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ .

Tabela 35 - Valores de limites de decisão e capacidade de detecção

Ingrediente ativo	alface		banana		tomate	
	$CC\alpha$	$CC\beta$	$CC\alpha$	$CC\beta$	$CC\alpha$	$CC\beta$
	$(\mu\text{g kg}^{-1})$		$(\mu\text{g kg}^{-1})$		$(\mu\text{g kg}^{-1})$	
clorfenvinfós	20,0	31,8	28,1	43,1	16,2	27,1
clorpirifós	7,1	11,9	16,9	13,9	12,6	21,1
diclorvós	18,9	30,2	44,4	69,1	40,9	65,6
dimetoato	9,3	15,5	11,3	19,5	1100	1100
etiona	13,1	22,0	17,2	28,9	2100	2200
etoprofós	6,8	11,5	10,7	17,9	10,4	17,5
parationa	6,7	11,3	16,1	26,9	10,9	18,3
pirimifós	5100	5300	5200	5500	11,7	19,7

$CC\alpha$  = limite de decisão,  $CC\beta$  = capacidade de detecção.

Na literatura, são raros os artigos que tratam de resíduos de agrotóxicos que incluem o cálculo de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ , apesar da importância da determinação desses parâmetros (EUROPEAN COMMISSION, 2002; ANTIGNAC et al., 2003; VAN OVERMEIRE, 2004).

AMBRUS (2000) descreve o cálculo para dimetoato e clorotalonil em maçã e os valores encontrados foram de 15,7 e 38,1  $\mu\text{g}$  para  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ , respectivamente. Entretanto, o procedimento utilizado não se baseou em curvas de calibração, mas no emprego de amostras brancas. A forma de cálculo empregada é diferente da adotada no presente trabalho, o que dificulta uma análise comparativa.

## 5.8 Análise de resíduos de organofosforados em hortifrutícolas

Das 309 amostras analisadas, 57 apresentou resíduos de OF, o que significa 18,4 % do total. Sendo: 1 (10%) amostra de alface, 3 (50%) de batata, 1 (6,25%) de cenoura, 4 (28,6%) de jiló, 8 (13,6%) de morango, 2 (16,7%) de pepino, 4 (26,7%) de pimentão e 34 (30,6%) de tomate. Nas amostras de banana e chuchu os resíduos estavam abaixo do LD (Figura 21).

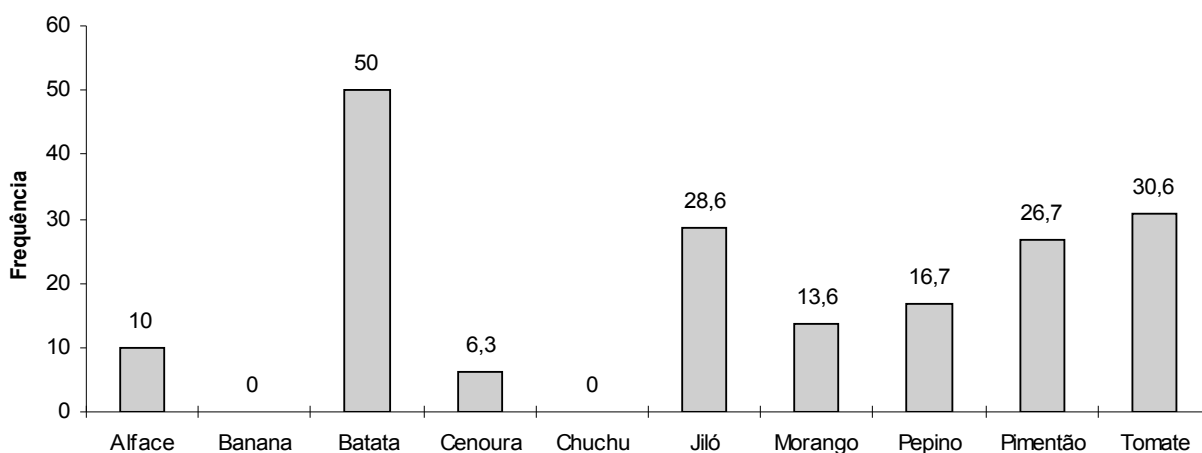


Figura 12 – Frequência de resíduos de organofosforados encontrados nas amostras de hortifrutícolas

Foram consideradas amostras em desacordo com a legislação vigente quando apresentaram presença de resíduos acima do LMR e resíduos de uso não autorizado para a cultura (ANVISA, 2006c).

Das amostras que apresentaram resíduos, 53 estavam em desacordo com a legislação vigente, representando 17,2% em relação ao total analisado. As amostras que apresentaram percentuais acima de 20% de resíduos em desacordo, em ordem decrescente, foram as culturas de tomate, jiló, e pimentão. Na avaliação dos resultados obtidos, resíduos de uso não autorizado foram identificados nas culturas de alface, cenoura, jiló, morango, pepino, pimentão e tomate e resíduos acima do LMR foram identificados nas amostras de tomate. Nas amostras de tomate, foram detectados resíduos de uso não autorizado e acima do LMR (Tabela 34).

Tabela 36 - Amostras com resíduos e em desacordo com a legislação

Amostra	Números de amostras			
	Total	Abaixo do LMR	> LMR	Não autorizados
Alface	10	-	-	1
Banana	52	-	-	-
Batata	6	3	-	-
Cenoura	16	-	-	1
Chuchu	14	-	-	-
Jiló	14	-	-	4
Morango	59	-	-	8
Pepino	12	-	-	2
Pimentão	15	-	-	4
Tomate	111	1	03	30
Total	309	4	03	50

LMR: Limite Máximo de Resíduo (ANVISA, 2006), (-): não encontrado

Entre as amostras analisadas, o ingrediente ativo encontrados em uma amostra de alface, foi acefato na concentração de  $0,54 \text{ mg kg}^{-1}$ , sendo este agrotóxico não autorizado para a cultura. Na amostra de batata das seis analisadas, três apresentaram resíduos de clorpirifós nas concentrações de:  $0,01$ ;  $0,02$  e  $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ , abaixo do limite permitido que é de  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ . Das 16 amostras analisadas de cenoura uma apresentou clorpirifós na concentração de  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ , sendo este não autorizado para a cultura,. A amostra de jiló, das 14 analisadas, uma apresentou clorpirifós na concentração de  $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ , duas metamidofós na concentração de  $0,02$  e  $0,18 \text{ mg kg}^{-1}$ , e uma acefato na concentração de  $0,18 \text{ mg kg}^{-1}$ , todos não autorizado para a cultura. O produto agrícola pepino das 12 analisadas, uma apresentou clorpirifós e outra acefato, ambos não autorizado para a cultura, na concentração de  $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ . Das 15 amostras de pimentões, três apresentaram metamidofós nas concentrações de:  $0,05$ ;  $0,02$  e  $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$  e uma apresentou acefato na concentração de  $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ , agrotóxicos não autorizado para a cultura.

Nas amostras de morangos os ingredientes ativos encontrados estão descritos na Figura 22, sendo todos não autorizados para a cultura. As concentrações de acefato foram de  $0,40$  e  $1,05 \text{ mg kg}^{-1}$ , de clorpirifós  $0,01$  e  $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ , de metamidofós  $0,02$ ;  $0,06$  e  $0,61 \text{ mg kg}^{-1}$  e parationa-metílca  $0,04$ ;  $0,06$  e  $0,19 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Em monitoramento prévio, realizado em Minas Gerais em amostras coletadas na CEASAMINAS, também foram encontrados resíduos de inseticidas organofosforados não autorizados para a cultura do morango. Em 2003, foram detectados Acefato em 4 amostras e Metamidofós em 5 amostras. No ano de 2004 Acefato, Clorpirifós, Dimetoato e Metamidofós foram detectados em 3, 1, 1 e 4 amostras, respectivamente (AMARAL & ALTOÉ, 2006). Das 371 amostras de morango coletadas em 5 províncias no sudeste da Polônia, 76,1% não apresentaram resíduos e 23,9% apresentaram resíduos com níveis abaixo do permitido (ROGOZINSKA et al. 2001). Na Turquia, resíduos dos inseticidas OF foram pesquisados em 32 amostras de morangos, 71,9% apresentaram resíduos e 53,1% excederam o LMR e os ingredientes ativos encontrados foram diazinona, metidationa, parationa e clorpirifós. Em 21 amostras apresentaram resíduos de diclorvós, sendo que 15 excederam o LMR (DURMUSOGLU, 2003). Deve-se notar que embora os resíduos de parationa e clorpirifós encontrados nas amostras de morango de Minas Gerais também tenham

sido detectados nas amostras de morando da Turquia, o tipo de infração foi diferente, uma vez que estes agrotóxicos não são proibidos na Turquia para esta cultura. E também que continua sendo encontrado OF não autorizados quando comparado os resultados de AMARAL & ALTOÉ, 2006.

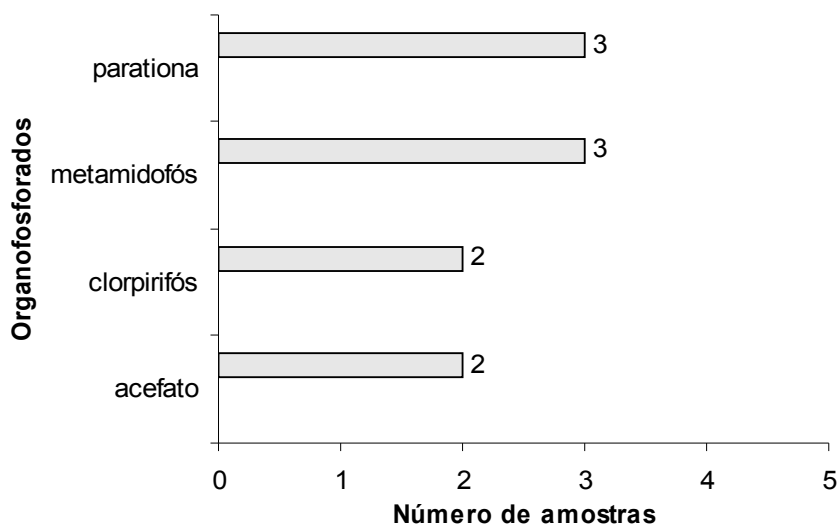


Figura 13 - Número de amostras de morango com de resíduos de organofosforados não autorizado para a cultura

Para a amostra de tomate os ingredientes ativos encontrados estão apresentados na Figura 23, com as faixas de concentrações variando de: 0,06 a 1,08 para acefato, sendo 0,5 mg kg<sup>-1</sup> o LMR, de 0,01 a 0,07 mg kg<sup>-1</sup> para clorpirifós, de 0,04 a 0,14 mg kg<sup>-1</sup> para metamidofós. A concentração de fentoato foi de 0,2 mg kg<sup>-1</sup> sendo que o LMR é de 0,1 mg kg<sup>-1</sup> e de profenofós foi de 0,14 mg kg<sup>-1</sup>, sendo 1,0 mg kg<sup>-1</sup> o LMR.

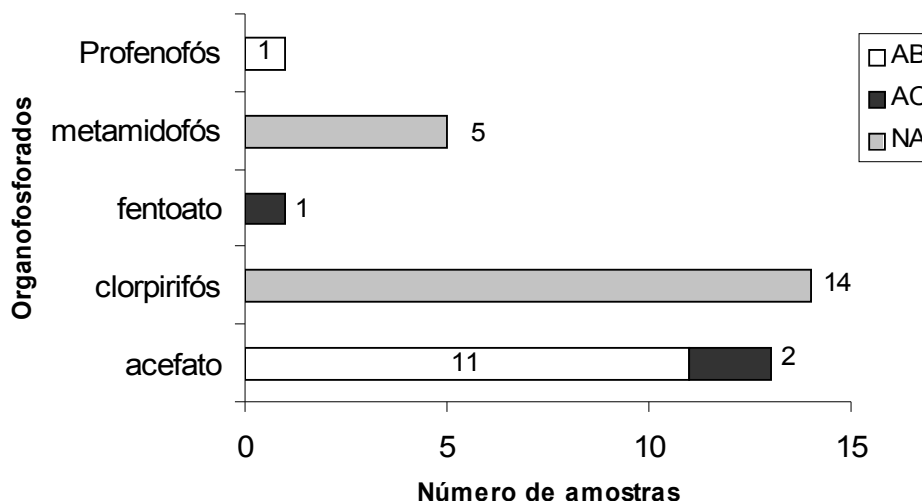


Figura 14. Número de amostras de tomate com resíduos de organofosforados  
 NA = produto não autorizado, AC = produto acima do permitido e AB = produto abaixo do permitido

Entre as infrações constatadas nas amostras coletadas para análise de OF, o maior número se deveu à presença de produtos não autorizados para as culturas. Das 309 amostras coletadas, 16,2% apresentaram resíduos de OF não autorizado para a cultura e 1,0% apresentaram limites acima do permitido.

Os resultados apresentados neste trabalho não diferem de outros estudos de monitoramento existentes no Brasil. No PARA, das amostras que estavam em desacordo com a legislação, 83,4% eram de agrotóxicos não autorizados para a cultura e 16,6% estavam com o LMR acima do permitido (ANVISA, 2006b). No monitoramento realizado em São Paulo em amostras coletadas no CEAGESP, 22% das amostras foram detectados resíduos de ingredientes ativos não registrados para a cultura e 1% das amostras apresentou resíduos acima dos LMR (GORENSTEIN, 2004). No estado do Paraná, em 2000, 31,62% apresentaram resíduos não autorizados para a cultura de morango. (SCUCATO et al., 2001).

É importante observar que as infrações cometidas no Brasil são diferentes das encontradas em outros países. No Brasil estas se devem a resíduos não autorizados para a cultura analisadas enquanto nos outros países por estarem acima do LMR e também número de infrações é menor. De 2125 amostras de produtos vegetais analisadas na Polônia, aproximadamente 0,9% excederam LMR (SADIO, 2003). Das 32 amostras de maçãs analisadas, na Turquia, 19,2% apresentaram resíduos com limites acima do permitido, sendo o malationa, azinfós metil, metidationa e clorpirifós os ingredientes ativos encontrados. (DURMUSOGLU, 2003). Amostras de alimentos



infantis, obtidos de supermercados em Denver, Filadélfia e em São Francisco, todos os níveis encontrados estavam abaixo do LMR (BRIGDES, 1995). Os analisados em amostras coletadas na China, os níveis médios do dimetoato e parationa nas frutas excederam os LMR permitidos pelo Ministério de Saúde da China (BAI et, 2005).

Devido aos efeitos toxicológicos provocados pelos agrotóxicos, faz-se necessário o acompanhamento e a quantificação desses produtos na água, solo, alimentos e atmosfera, como pressuposto para a rastreabilidade e proteção da saúde do homem e do meio ambiente (CODEX ALIMENTARIUS, 2007). Nesse sentido, os resultados do monitoramento apresentados neste trabalho buscam contribuir para a segurança alimentar no País e proteção de nosso ecossistema. Além disso, do ponto de vista econômico, o Brasil tem sido penalizado, em função da globalização dos mercados e do grau de exigência de alguns importantes ou potenciais países importadores, quando resíduos desses compostos são encontrados em alimentos. E também, o mercado interno, devido ao grau de informação atual, tem sido cada vez mais exigente, definindo os preços e a aceitação comercial dos produtos

## 6 CONCLUSÕES

O procedimento utilizado foi adequado para validação intralaboratorial do método de multiresíduos de OF. Os parâmetros de desempenho avaliados indicaram adequação para uso na análise de resíduos de OF em hortifrutícolas, atendendo aos limites regulamentados pelo ANVISA (2006).

A linearidade do método foi obtida na faixa de 12 a 92 ng mL<sup>-1</sup> para os oito OF estudados. Houve comprovação de efeito do dia nos estudos linearidade. Comprovou-se o efeito de matriz para os OF nas três culturas estudados, porém não houve evidencia de efeito de matriz para o dimetoato em alface, clorpirifós em banana e clorfenvinfós em tomate.

O método apresentou exatidão e precisão aceitáveis, na faixa do LQ, com exceção de diclorvós em que não houve precisão nos níveis de adição estudados para as matrizes banana e tomate.

Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 5,0 µg kg<sup>-1</sup> e 8,0 µg kg<sup>-1</sup> para clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa e pirimifós, enquanto LD para clorfenvinfós e diclorvós foi de 8,0 µg kg<sup>-1</sup>. Os limites de quantificação foram de 8,0; 35,0 e 40,0 µg kg<sup>-1</sup> para clorfenvinfós nas matrizes tomate, alface e banana, respectivamente, e de 35,0 µg kg<sup>-1</sup> para diclorvós em alface. Os limites de decisão variaram de 6,7 a 5100 µg kg<sup>-1</sup> e a capacidade de detecção de 11,3 a 5500 µg kg<sup>-1</sup>.

Das 309 amostras analisadas, 18,4% apresentaram resíduos de OF, sendo que 13,6% em desacordo com a legislação vigente. Entre as amostras em desacordo, 92,9% apresentaram resíduos de OF não autorizado para a cultura e 7,1% apresentaram limites acima do permitido. Entre as infrações constatadas nas amostras de produtos agrícolas coletadas em diferentes municípios do estado de Minas Gerais para análise de OF, o maior número se deveu à presença de produtos não autorizados para as culturas.

## 7 SUGESTÕES

- Aplicar o protocolo de validação utilizado neste trabalho para outras matrizes representativas, com aquelas com alto teor de gordura, frutas cítricas e grãos.
- Validar métodos de ensaio para outros grupos de agrotóxicos, tais como, os inseticidas piretróides, inseticidas organoclorados e fungicidas.
- Ampliar a abrangência da amostragem e dos grupos de agrotóxicos pesquisados nos estudos de ocorrência de resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). NBR ISSO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 2ª ed., 31p. 2005
- AGRIANUAL. Anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: SNT, 2001. p.194-200.
- ALBANIS, T.A.; LAMBROPOULOU. D.A. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography–mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries'. J. Chromatogr. A, v. 993, p. 197-203, 2003.
- ALMEIDA, W.F. Intoxicações profissionais por pesticidas, In MENDES, R.(Ed) Medicina do trabalho, doenças profissionais, São Paulo, 1980, p. 511-567.
- AMARAL, E.H.; ALTOÉ, I.M.F.F. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos no morango de Minas Gerais. In: Carvalho, S. P. (Cord.). Boletim do Morango, cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico. Belo Horizonte, p.137-142, 2006.
- AMBRUS, A. Worked example for validation of a multi-residue method. In: FAJGELP, A.; AMBRUS. A. Principles and practices of method validation. Workshop on the principles and practices of method validation, nov. 1999, Budapest, Hungary. Royal Society of Chemistry, n. 256, p. 157-175, 2000.
- ANDERSEN, J.H.; POULSEN, M.E. Results from the monitoring of pesticide residues in fruit and vegetables on the Danish market, 1998-99. Food Additives and Contaminants, v. 18, p. 906-931, 2001.
- ANTIGNAC, J.P.; LE BIZEC, B.; MONTEAU, F.; ANDRE, F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the "2002/657/EC" european decision: guideline and application. Anal. Chim. Acta, v. 483, p. 325-334, 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Sistema de Informação sobre Agrotóxicos - SIA, Módulo Pós-registro >. Acesso em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/sia.htm>>. Acesso em 12 agosto. 2006a.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Acesso em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>>. Acesso em 12 de agosto de 2006b.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografias de Produtos Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografia/index.htm>>. Acesso em 01 setembro 2006c.

AOAC. Peer Verified Methods Program. Manual on Policies and Procedures. AOAC International, Arlington, 1998, 35p

BAI, Y.; ZHOU, L.; WANG, J. Organophosphorus pesticide residues in market foods in Shaanxi area, China. Food Chemistry . Article in press (2005).

BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. *Biológico*, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002.

BOTITSI, H.; KORMALI, P.; KONTOU, S.; MOURKOJANNI, A.; TSIPI, D. Development and validation of a generic gas chromatographic method for the determination of organophosphorus pesticide residues in various sample extracts. In: FAJGELP, A.; AMBRUS, A. Principles and practices of method validation. Workshop on the principles and practices of method validation, nov. 1999, Budapest, Hungary. Royal Society of Chemistry, n. 256, p. 157-175, 2000.

BOWMAN, M.C. Analysis of organophosphorus pesticides. In: ANSON, M.H. Analysis of pesticides residues. Ed. A Wiley – Interscience Publication, v. 58, p.263 a 336, 1971.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei n. 7802 de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 jul. 1989, p. 11352-11415.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília, 1997.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC n. 347, de 16 de dezembro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 31 dez. 2002a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto n. 4074 de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989. Diário Oficial da União, Brasília, 8 jan. 2002b, p. 1-12.
- BRIGDES, J. Pesticides in baby food. *Environmental Health Perspectives Journal.*, v. 12, p.1082-1083, 1995.
- BRITO, N.M.; NAVICKIENE, S.; POLESE, L.; JARDIM, E.F.G; ABAKERLI, R.B.; RIBEIRO, M.L. Determination of pesticide residues in coconut water by liquid-liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. of Chromatogr. A*, v. 957, p. 201-209, 2002.
- BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochimica Acta*, Wien, v. 128, n. 1-2, p. 93-106, 1998.
- BURKE, S. Missing Values, Outliers, Robust Statistics & Non-parametric Methods. LC-GC Europe, january: 19-24, 2001.
- CAMPANHOLA, C.; RODRIGUES, G.S.; BETTIOL, W. Evolução, situação atual, projeção e perspectiva de sucesso de um programa de racionalização do uso de agrotóxicos no Brasil. In: RODRIGUES, G.S. Racionalización del uso de pesticidas en el Cono Sur. Montevideo: PROCISUR, 1998. p. 43-49.
- CAMPANHOLA, C., BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: Fórum Nacional de secretários da Agricultura, Ministério do Meio Ambiente, Programa de Defesa Ambiental Rural, Textos orientadores..., Belo Horizonte: MMA, p. 7-26, 2001.
- CEASAMINAS - Centrais de Abastecimento. Informações de Mercado. Disponível em; [http://www.ceasaminas.com.br/informacoes\\_mercado.asp](http://www.ceasaminas.com.br/informacoes_mercado.asp). Acesso em 13 de fev. de 2007.

- CFIA - Canadian Food Inspection Agency. The National Chemical Residue Monitoring Program (NCRMP). Disponível em <http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/microchem/ncrmpe.shtml>. Acesso em 10 jan. 2007
- CNPPA (Centro Nacional de Proteção da Produção Agrícola). Pesticide residues in plant products. Lisbon: Instituto de Protecção da Produção Agro-Alimentar, 1995, 54 p.
- CODEX ALIMENTARIUS. Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs. FAO Rome. CAC/GL 33-1999.
- CODEX ALIMENTARIUS. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis. FAO Rome. CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. The Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Disponível em [http://www.codexalimentarius.net/web/index\\_en.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp) Acesso em 07 de fev. de 2007
- CUADROS-RODRIGUEZ, L.; MUNOZ, J.A.; GONZÁLEZ, L.F.; GARCIA-AYUSO, L.E.; CASADO, A.G. A new approach to qualitative analysis of organophosphorus pesticide residues in cucumber using a double gas chromatographic system: GC-pulsed-flame photometry and retention time locking GC - mass spectrometry. *Talanta*, v. 60, p. 433-477, 2003.
- DURMUSOGLU, E. Market basket monitoring of some organophosphorus pesticides on apple and strawberry in IzmirProvince, Turkey. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, 54:1, 16-20; ref 20, 2003
- EURACHEM. The Fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics, 1998. 61p.
- EUROPEAN COMMISSION -EC. Commission 554 decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, 221/8.
- EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on residue analytical methods (doc. SANCO/825/00) rev. 17 March 2004 (Disponível em: [http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications\\_en.htm](http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications_en.htm)).

EUROPEAN COMMISSION. Regulation No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, 16.3.2005, Official Journal of the European Union L 70/1.

EUROPEAN COMMISSION. Quality control procedures for pesticide residue analysis (doc. N° SANCO/10232/2006) 24/March/2006 (Disponível em: [http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications\\_en.htm](http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications_en.htm)).

FUSSEL, R.J.; PATEL, k.; MACARTHUR, R.; GOODALL, D.M., KEELY, B.J. Method validation of resistive heating—gas chromatography with flame photometric detection for the rapid screening of organophosphorus pesticides in fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A*, v. 1046, p. 225-234, 2004.

GARCIA, E.G; ALMEIDA, W.F. Exposição de trabalhadores rurais aos agrotóxicos no Brasil. *Revista Brasileira Saúde Ocupacional*, v. 9, p. 7-11, 1991.

GELSOMINO, A.; PETROVICOVÁ, B.; TIBURTINI, S.; MAGNANI, E.; FELICI, M. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, v. 782, p. 105-122, 1997.

GORENSTEIN, O. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças frescas comercializadas na CEAGESP. In: 44º Congresso Brasileiro de Olericultura, Campo Grande – MS, julho de 2004.

GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, v. 11, p. 1-21, 1969.

GUEDES, R.N.C. Manejo Integrado para a proteção de grãos armazenados contra insetos. *Revista Brasileira de Armazenagem*, São Paulo, v. 16, p. 6-48, 1991.

HAIB, J.; HOFER, I.; RENAUD, J.M. Analysis of multiple pesticide residues in tobacco using pressurized liquid extraction, automated solid-phase extraction clean-up and gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC-MS). *J. Chromatogr. A*, v. 1020, p. 173-187, 2003.

HAJSLOVA, J.; ZROSTLÝKOVA, J.; GODULA, M.; MASTOVSKA, K. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection



- techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. *J. Chromatogr. A*, v. 937, p. 73-86, 2001.
- HENAO, S. COREY, O.G. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Programa de Salud Ambiental, Praguicidas inibidores de colinesterase, Organizacion Panamericana de Salud, (Série Vigilância, 11), 1991.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal. Chem.*, v. 54, p. 67A-76A, 1982.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure Appl. Chem.*, v. 67, p. 331-343, 1995.
- HUBER, L. Validation of Analytical Methods: Review and Strategy. Hewlett- Packard GmbH, Waldbronn. *LC/GC Magazine*, 1997-1, Version Feb. 21, 1998.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 35 p.
- JANSSON, C.; PIHLSTRÖM, T.; ÖSTERDAHL, B-G.; MARKIDES, K.E. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, v. 1023, p. 93-104, 2004.
- KRISTENSON, E.M.; HAVERKATE, E.G.J.; SLOTEN, C.J.; RAMOS, L.; VREULS, R.J.J.; BRINKMAN, U.A. Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A*, v. 917, p. 277-286, 2001.
- KUTTATHARMMAKUL, S.; MASSART, D.L.; SMEYERS-VERBEKE, J. Comparison of alternative measurement methods. *Anal. Chim. Acta*, v. 391, p. 203-225, 1999.
- LACORTE, S.; JEANTY, G.; MARTY, J-L.; BARCELÓ, D. Identification of fention and temephos and their transformation products in water by high-performance liquid chromatography with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, v. 777, p. 99-114, 1997.
- LAMBROPOULOU, D.A.; ALBANIS, T.A. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography–mass spectrometry for the rapid screening of

organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries. *J. of Chromatogr. A*, v. 993, p. 197–203, 2003.

LEHOTAY, S.J. AOAC International collaborative study on the determination of pesticide residues in nonfatty foods by supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. In: FAJGELP, A.; AMBRUS, A. Principles and practices of method validation. Workshop on the principles and practices of method validation, nov. 1999, Budapest, Hungary. Royal Society of Chemistry, n. 256, p. 89-99, 2000.

LUCCHESI, G. Agrotóxicos – Construção da legislação. Consultor legislativo da área XVI Saúde Pública, Sanitarismo. 10p. 2005. Disponível em [http://www2.camara.gov.br/publicações/esnottec/tema19/2005\\_13187.pdf](http://www2.camara.gov.br/publicações/esnottec/tema19/2005_13187.pdf). Acesso em 15 de janeiro de 2007.

LUCK, M.A.; FORBERG J.E.; MASUMOTO, H.T. Extraction and cleanup of organophosphorus, organonitrogen e organochlorine pesticides in procedure using flame photometric and electrolytic conductivity detectors. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 58, p.1020, 1975.

LUNA, A.J. Agrotóxicos: Responsabilidade de todos – Uma abordagem da questão dentro do paradigma do desenvolvimento sustentável. Disponível em: [http://www.prt6.gov.br/forum/downloads/artigo1\\_adeilson.doc](http://www.prt6.gov.br/forum/downloads/artigo1_adeilson.doc). Acesso em 20 out. 2006.

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

MAROTO, A.; BOQUÉ, R.; RIU, J.; RIUS, F.X. Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples. *Anal. Chim. Acta*, v. 446, p. 133-145, 2001.

MARSHALL, W.D. Analysis of Pesticides, Mycotoxin, and Drug residues in Foods. In: NIELSEN, S.S. Food analysis. 2<sup>nd</sup> Ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publisher, 1998. p. 305-329.

MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I. Toxicologia de Alimentos. São Paulo. Ed. Varela. 2000, p. 189-232.

- MOL, H.G.J.; DAM, R.C.J.; STEIJGER, O.M. Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent. *J. of Chromatogr A*, v. 1015, p. 119–127, 2003
- MULHOLLAND, M.; HIBBERT, D.B. Linearity and the limitations of least squares calibration. *J. of Chromatogr. A*, v. 762, p. 73-82, 1997.
- NAKAZAWA, H.; TAKAHASHI, N.; INOUE, K.; ITO, Y.; GOTO, T; KATO, K.; YOSHIMURA, Y.; OKA H. Rapid and simultaneous analysis of dichlorvos, malathion, carbaryl, and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid in citrus fruit by flow-injection ion spray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 64, p. 899–905, 2004.
- NETHERLANDS, MINISTRY OF PUBLIC HEALTH, WELFARE AND SPORT. Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, 6<sup>a</sup> Ed. Amsterdam: RIVM, 1996.
- MINAS GERAIS. Governo de Estado. Decreto nº 41.203 de 08 de agosto de 2000. Aprova o regulamento da lei nº 10.545, de 13 de dezembro de 1991, que dispõe sobre produção, comercialização e uso de agrotóxico e afins. Minas Gerais, Belo Horizonte, 08 agost. 2000.
- NATA (National Association of Testing Authorities - Australia). Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods. Sydney: NATA, 1997. 8 p.
- NOGUEIRA, N.D. Uso seguro de agrotóxicos. In: Carvalho, S.P. (Coord.). Boletim do Morango, cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico. Belo Horizonte, p. 107-114, 2006.
- NORMA, K.N.T.; PANTON, S.H.W. Supercritical fluid extraction and quantitative determination of organophosphorus pesticide residue in wheat and maize using gas chromatography with flame photometric and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, v. 907, p. 247-255, 2001.
- OLIVA, J.; BARBA, A.; VELA N.; MELENDRERAS, F.; NAVARRO, S. Multiresidue method for the rapid determination of organophosphorus insecticides in grapes, must and wine. *J. of Chromatogr. A*, v. 882, p. 213–220, 2000.

- OISHI, R.; FUTAGAMI, K.; NACAZAKI, C.; KATAOKA, Y.; SHUTO, H. Application of high-performance thin-layer chromatography for the detection of organophosphorus insecticides in human serum after acute poisoning. *J. Chromatogr. A.*, v. 704, p. 369-373, 1997.
- PACHECO, I.A.; Silva, M.H.C.; VIEIRA, R.C.; ISSA, S.A. Trabalhadores expostos a praguicidas no controle de vetores: dosagem de atividade colinesterásica como indicativo de intoxicação ocupacional coleta de dados e discussão, 1994. 47f. Monografia (Curso de Especialização em Saúde do trabalhador) – Escola de Saúde de Minas Gerais.
- PAGLIUCA, G.; GAZZOTTI, T.; ZIRONI, E; SICCA, P. Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection. *J. Chromatogr. A*, v. 1071, p. 67-70, 2005.
- PATEL, K.; FUSSELLA, R.J.; MACARTHURA, R. Method validation of resistive heating —gas chromatography with flame photometric detection for the rapid screening of organophosphorus pesticides in fruit and vegetables. *J. of Chromatogr. A*, v. 1046, p 225–234, 2004.
- PÉREZ-RUIZ, T.; MATÍNEZ-LOZANO, C.; TÓMAZ, V.; MARTÍN, J. High-performance liquid chromatographic assay of phosphate and organophosphorus pesticides using a post-column photochemical reaction and fluorimetric detection. *Anal. Chim. Acta*, v. 540, p. 383-391, 2005.
- PESTICIDE ANALYTICAL MANUAL (PAM). U. S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Plant and Dairy Foods and Beverages, 1994, v. 1, 3a Ed. ; Updated October, 1999.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova*, v.27, N.º 5, p. 771-780, 2004.
- RISSATO, S.R.; GALHIANE, M.S.; KNOOL, F.R.N.; APON, B.M. Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A*, v. 1048, p. 153-159, 2004.

- ROGOZINSKA, K.; RUPAR, J.; SZPYRKA, E. Occurrence of pesticide residues in strawberries of south eastern Poland in 1996-2000. *Pestycydy, Poland*, p. 3-4, 33-37, 3ref, 2001.
- SADIO, S. Dietary intake of pesticide residues by Polish consumers during 2001. *Journal of Plant protection Research, Rzeszow, Poland*, 43:1, 25-32; 8ref, 2003.
- SANTOS, V.M.R.; DONNICI, C.L.; COSTA, J.B.N.; CAIXEIRO, J.M.R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Quim. Nova*, v. 30, no. 1, p. 159-170, 2007
- SCHENCK, F.J; LEHOTAY, S.J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food?. *J. of Chromatogr. A*, v. 868, p. 51-61, 2000.
- SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). Dados do mercado. Disponível em <http://www.sindag.com.br>. Acesso em 15 de janeiro de 2007.
- SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas). Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1998. 73p.
- SIMPLÍCIO, A.L.; VILAS BOAS, L. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J. Chromatogr. A*, v. 833, p. 35-42, 1999.
- SNEDECOR G.W.; COCHRAN W.G. *Statistical methods*. 8 ed. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.
- SOARES, L.M.V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 60, n. 1, p. 79-84, 2001.
- SOBOLEVA, E.; RATHOR, N.; MAGETO, A.; AMBRUS, A. Estimation of significance of "matrix-induced" chromatographic effects. In: FAJGELP, A.; AMBRUS, A. *Principles and practices of method validation. Workshop on the principles and practices of method validation*, nov. 1999, Budapest, Hungary. Royal Society of Chemistry, n. 256, p. 139-156, 2000.

- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal. Chim. Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.
- SOUZA, S.V.C.; PINTO, C.T., JUNQUEIRA, R.G. In-house method validation: Application in arsenic analysis. *J. of Food Composition and Analysis*, v. 20, p. 241-247, 2007.
- SCUCATO, E.S.; STERTZ, S.C.; YOSHIYARA, A.C.P. Resíduos de agrotóxicos em hortifrutícolas. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 12, 2001, Maceió. Resumos ... Maceió: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2001. p. 255.
- STAJNBAHER, D.; ZUPANCIC-KRALJ, L. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography A.*, v. 1015, p. 185-198, 2003.
- TADEO, J.L., CASTRO, J.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C. Multiresidue analysis of insecticides in soil by gas chromatography with electron-capture detection and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 918, p. 371-380, 2001.
- THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, v. 125, p. 385-386, 2000.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, p. 835-855, 2002.
- TRAPÉ, A.Z., Efeitos Toxicológicos e Registro de Intoxicações por Agrotóxicos. In: Fórum Nacional de secretários da Agricultura, Ministério do Meio Ambiente, Programa de Defesa Ambiental Rural, Textos orientadores..., Belo Horizonte: MMA, 2001. p. 45-5
- USDA - United States Department of Agriculture . Pesticide Data Program (PDP). Disponível em <<http://www.ams.usda.gov/science/pdp>>. Acesso em 07 de fev. de 2007

- VAN LOCO, J.; BEERNAERT, H. In: Proceedings of European Food Chemistry, 12, 2003, Brugges, Belgium. Proceedings... Brugges: European Food Chemistry, 2003. p. 91-94.
- VAN OVERMEIRE, I.; VAN LOCO, J.; ROOS, P.; CARBONNELLE, S.; GOEYENS, L. Interpretation of CALUX results in view of the EU maximal TEQ level in milk. *Talanta*, v. 63, p. 1241-1247, 2004.
- VICENTE, M.C.M.; BAPTISTELLA, C.D.L.; COELHO, P.J.; JUNIOR A.L. Perfil do aplicador de agrotóxicos na agricultura paulista. *Informações Agronômicas*. v. 28, n. 11, p. 35-59, 1998.
- VESSMAN, J.; STEFAN, R.I.; STADEN, J.F.V.; DANZER, K.; LINDNER, W. ; BURNS, D.T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.*, v. 73, n. 8, p. 1381–1386, 2001.
- VIDAL, J.L.M.; ARREBOLA, F.J.; MATEU-SÁNCHEZ, M.; ÁLVAREZ-CASTELLÓN, F.J. Determination of 81 multiclass pesticides in fresh foodstuffs by a single injection analysis using gas chromatography-chemical ionization and electron ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, v. 484, p. 167-180, 2003.
- WILLETTS, P.; WOOD, R. A critique on available in-house method validation documentation. In: FAJGELP, A.; AMBRUS, A. Principles and practices of method validation. Workshop on the principles and practices of method validation, nov. 1999, Budapest, Hungary. Royal Society of Chemistry, n. 256, p. 253-295, 2000.
- YODEN; W.J.; STEINER, E.H.; *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*. AOAC, Washington, 1975, 88 p.
- ZROSTLÍKOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J.; CAJKA, T. Evaluation of two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in fruit. *J. Chromatogr. A*, v. 1019, p. 173-186, 2003.

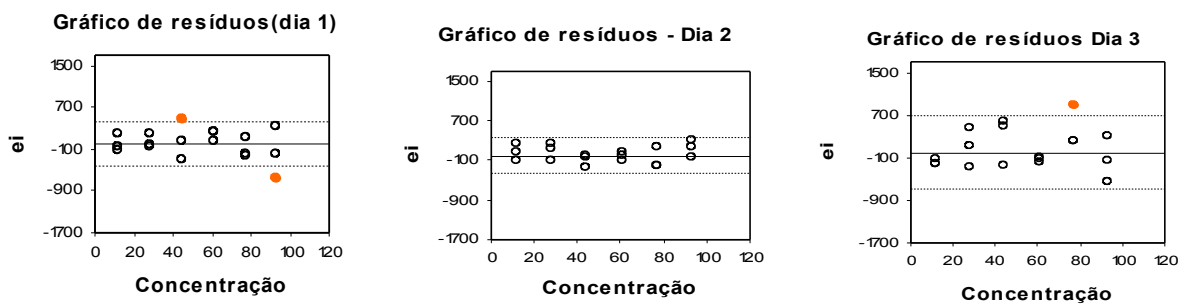
(109 referencias)

## APÊNDICES

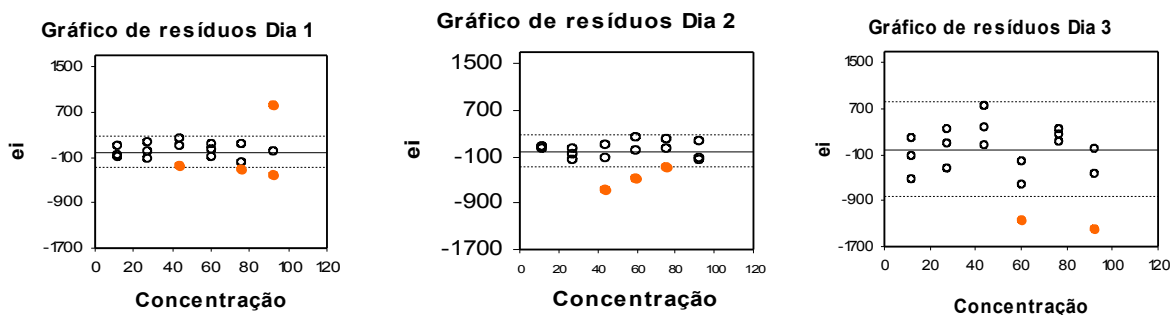


## APÊNDICES A - GRÁFICOS DOS RESÍDUOS DA REGRESSÃO DAS TRÊS CURVAS DE SOLVENTES COM INDICAÇÕES DOS RESPECTIVOS *OUTLIERS* DIAGNOSTICADOS PELO TESTE DE RESÍDUOS PADRONIZADOS DE JACKNIFE

### Clorfenvinfós



### Clorpirifós



### Diclorvós

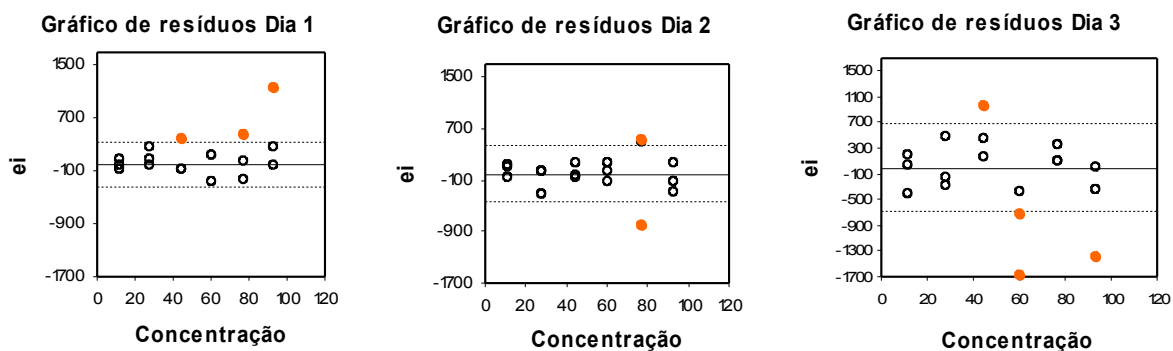


Gráfico de resíduos Dia 1

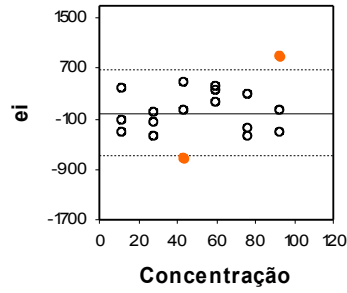
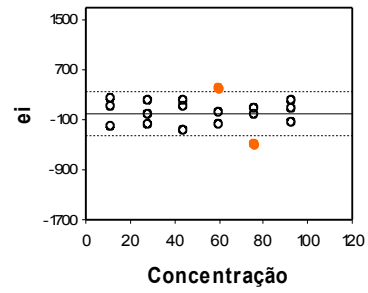
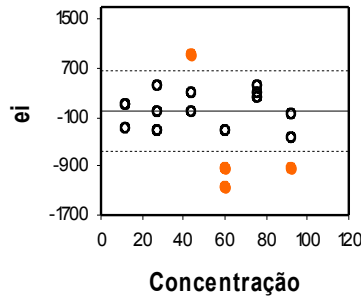


Gráfico de resíduos Dia 2



Dimetoato

Gráfico de resíduos dia 3



Etiona

Gráfico de resíduos Dia 1

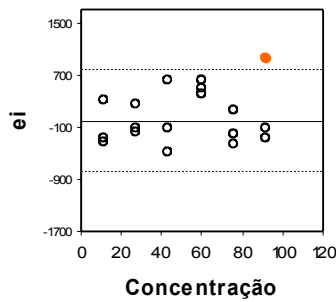


Gráfico de resíduos Dia 2

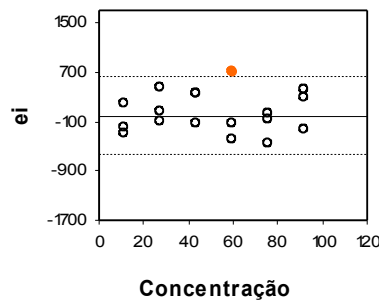
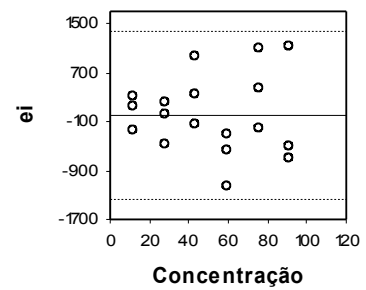


Gráfico de resíduos Dia 3



Etprofós

Gráfico de resíduos Dia 1

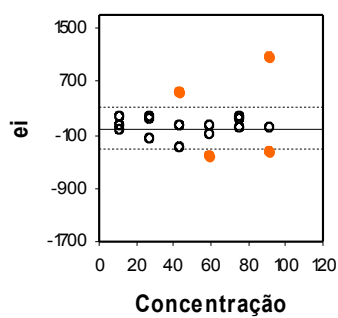


Gráfico de resíduos Dia 2

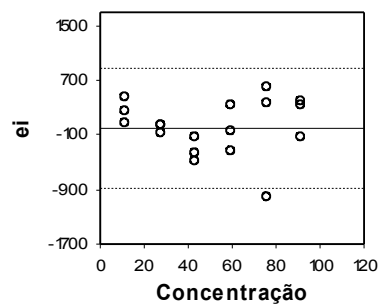
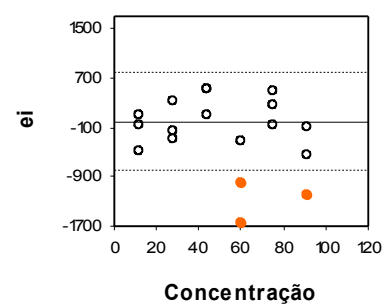


Gráfico de resíduos



Parationa-metflica

Gráfico de resíduos Dia 1

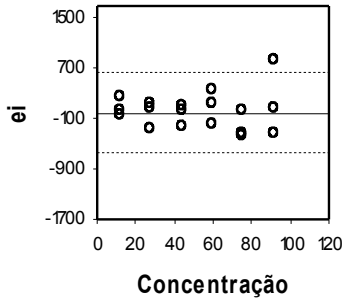


Gráfico de resíduos Dia 2

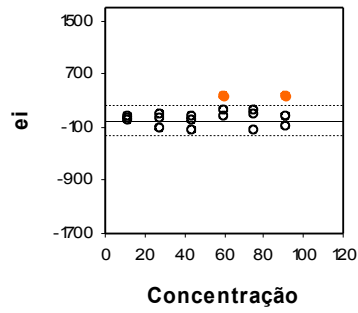
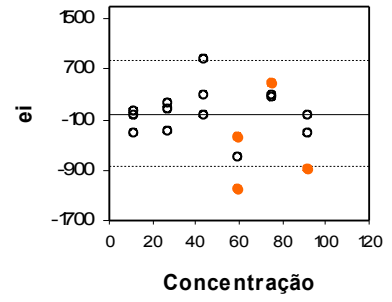


Gráfico de resíduos Dia 3



Pirimifós-metílico

Gráfico de resíduos Dia 1

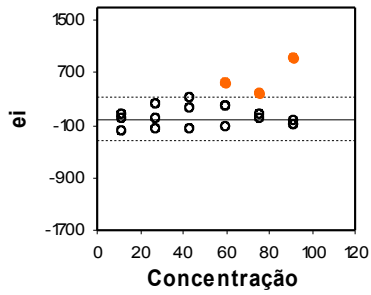


Gráfico de resíduos Dia 2

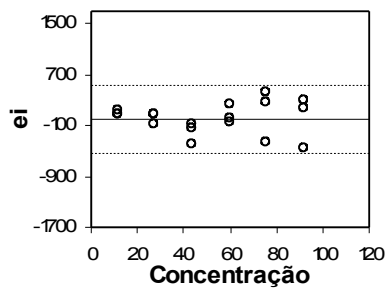
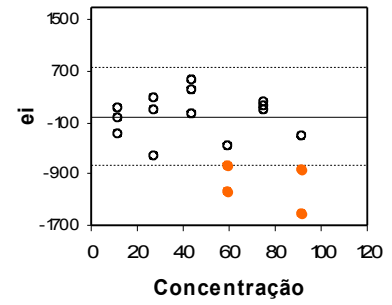
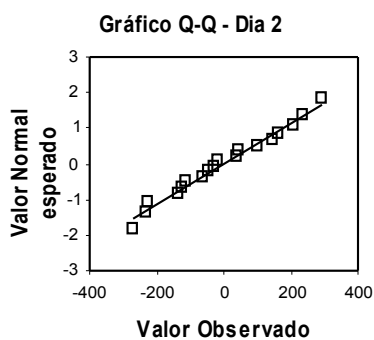
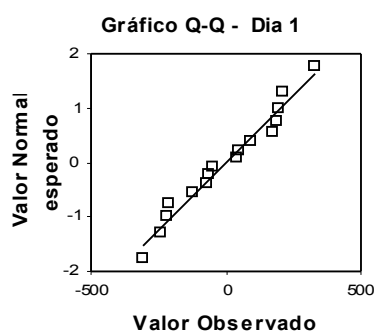


Gráfico de resíduos Dia 3

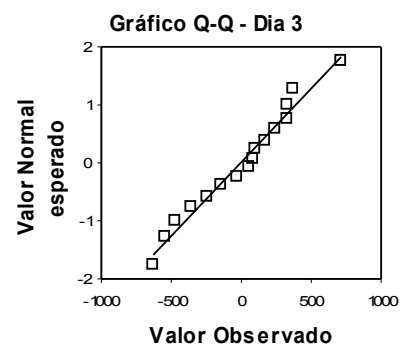
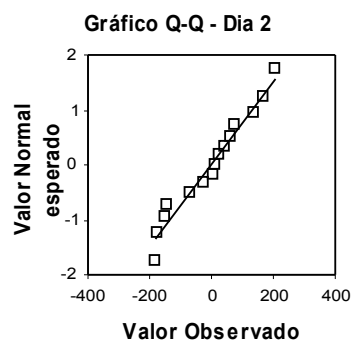
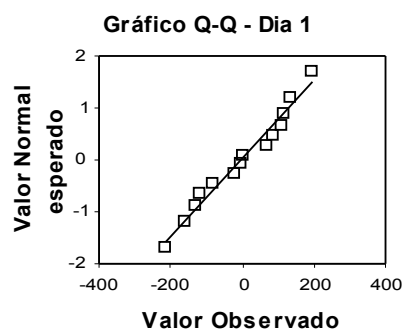


## APÊNDICES B – GRÁFICOS DA AVALIAÇÃO DA NORMALIDADE DOS RESÍDUOS PELO TESTE DE RYAN-JOINER DAS TRÊS CURVAS DE SOLVENTE.

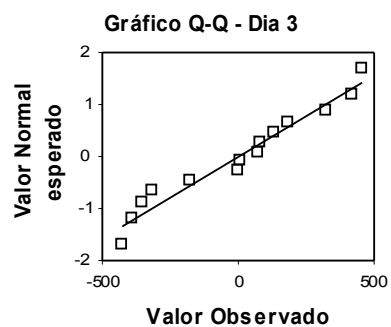
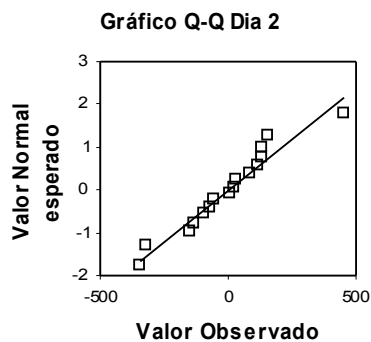
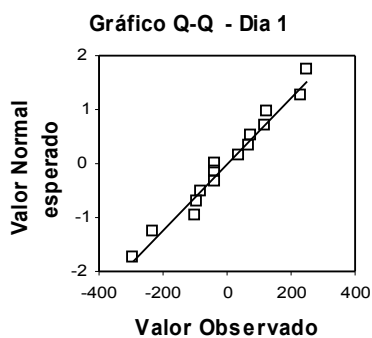
### Clorfenvinfós



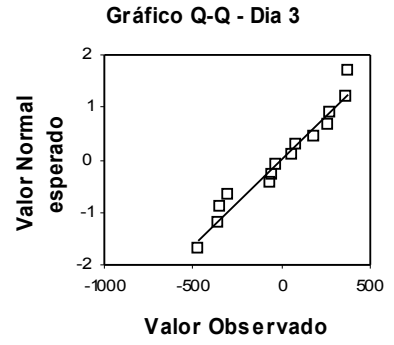
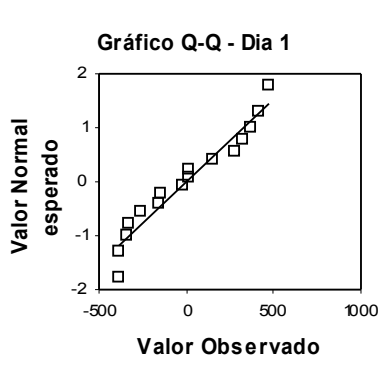
### Clorpirifós



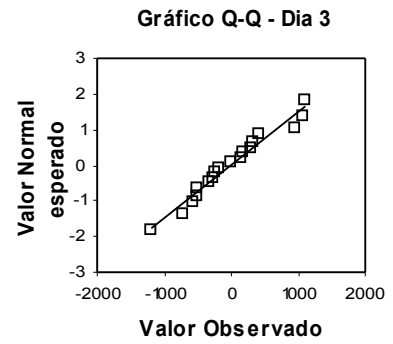
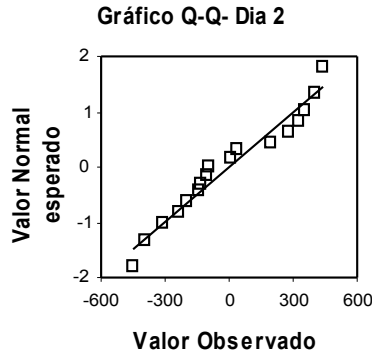
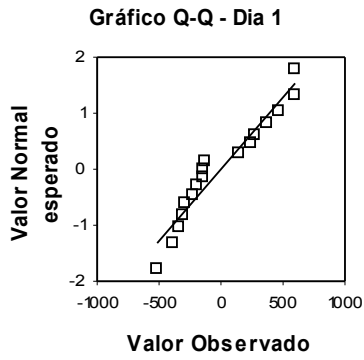
### Diclorvós



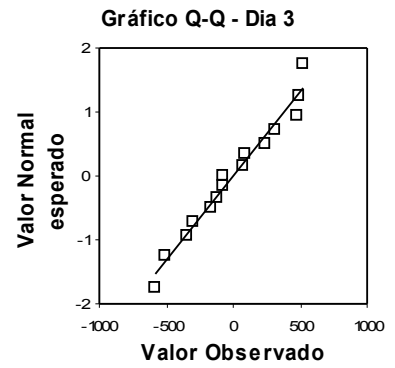
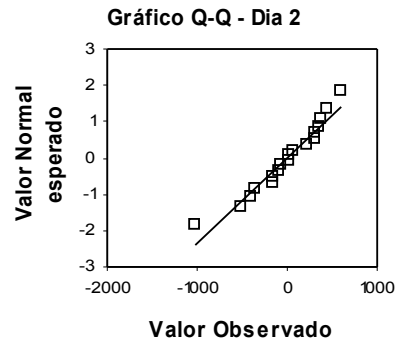
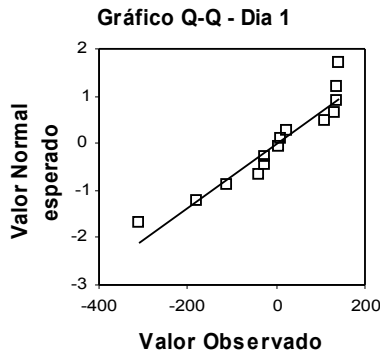
### Diimetoato



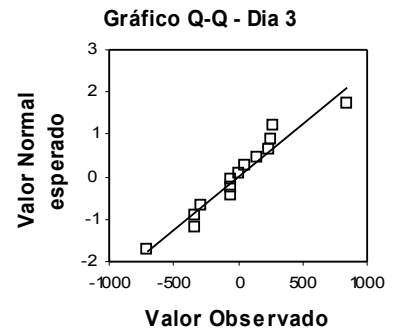
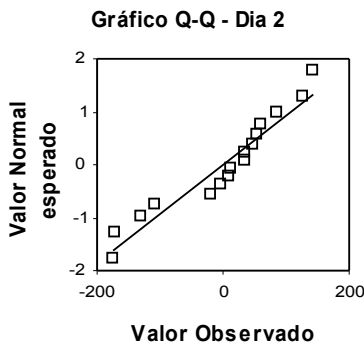
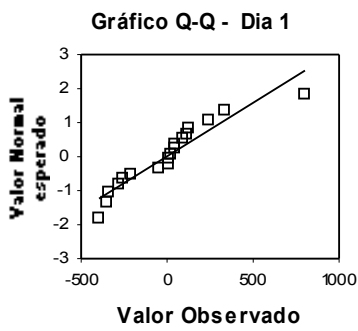
### Etiona



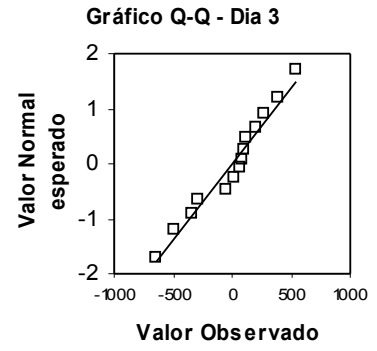
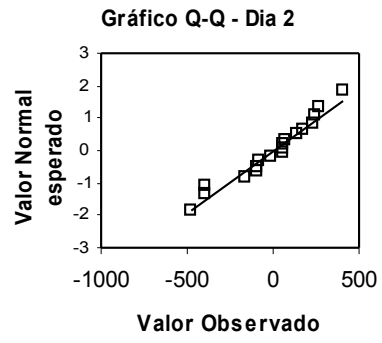
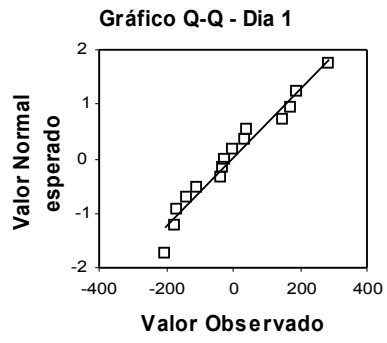
### Etoprofós



### Parationa-metflica

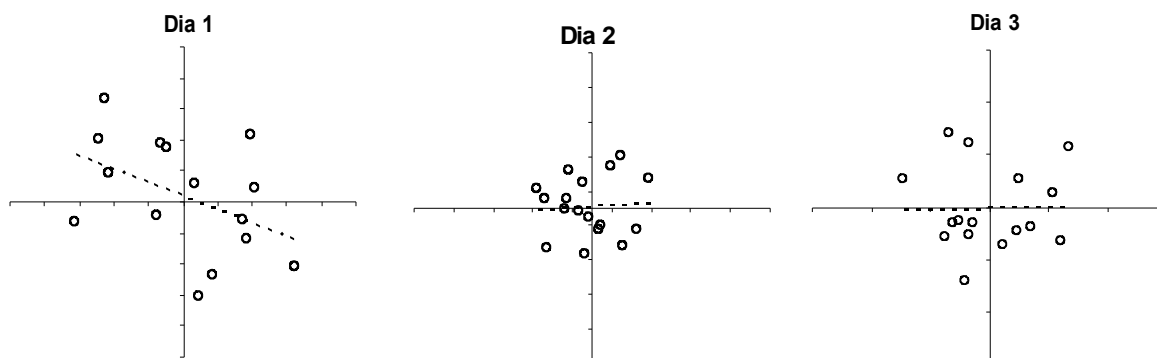


### Pirimifós-metflico

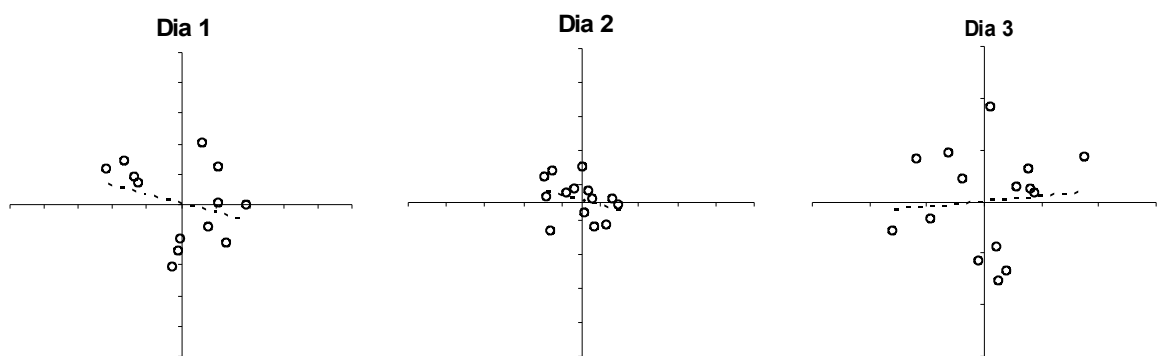


**APÊNDICES C – GRÁFICOS DA AVALIAÇÃO DE AUTOCORRELAÇÃO DOS RESÍDUOS PELO TESTE DURBIN-WATSON DAS TRÊS CURVAS DE SOLVENTE.**

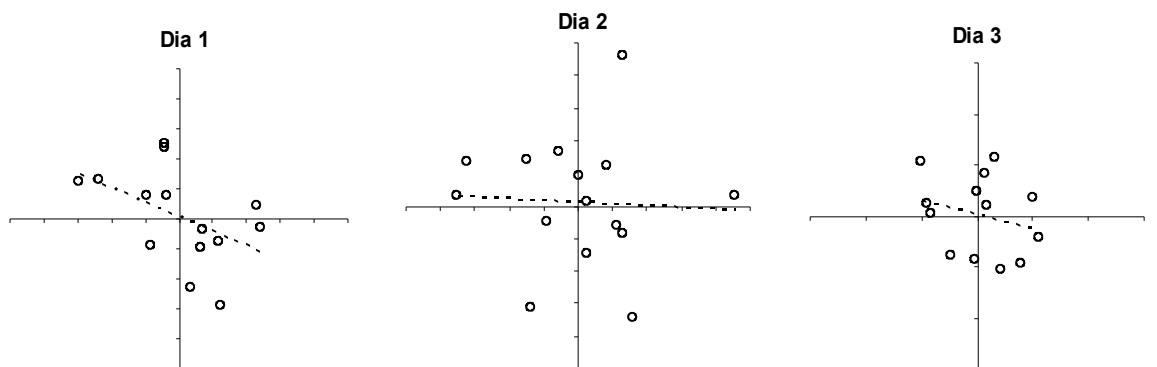
**Clorfenvinfós**



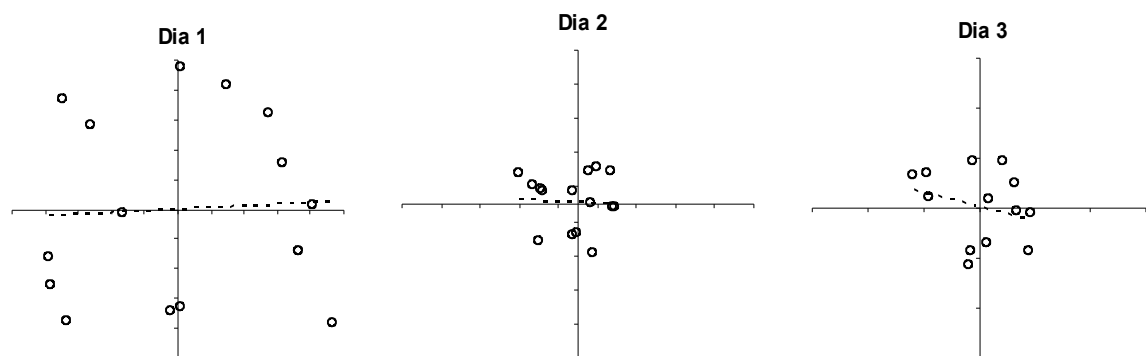
**Clorpirifós**



**Diclorvós**

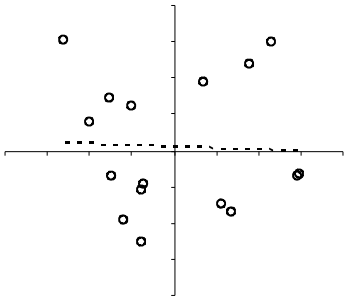


**Dimetoato**

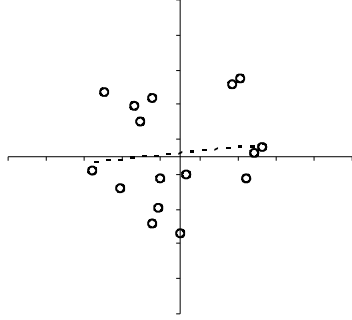


Etiona

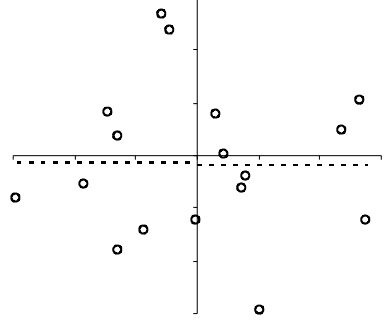
Dia 1



Dia 2

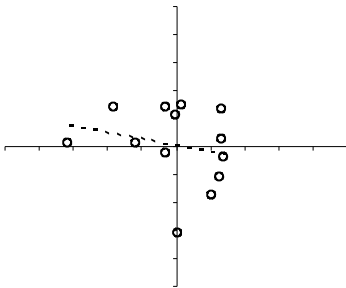


Dia 3

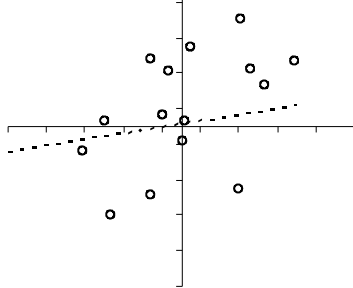


Etoprofós

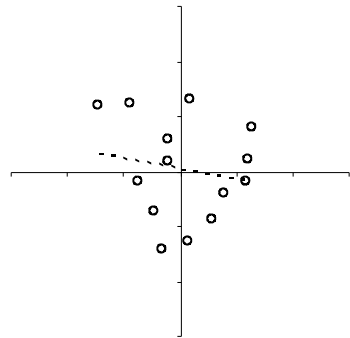
Dia 1



Dia 2

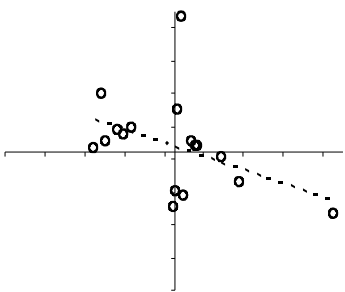


Dia 3

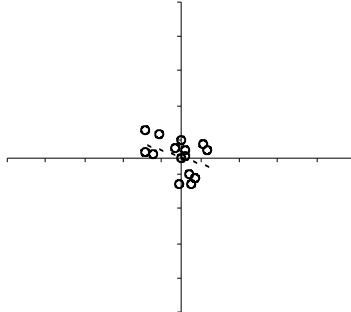


Parationa-metflica

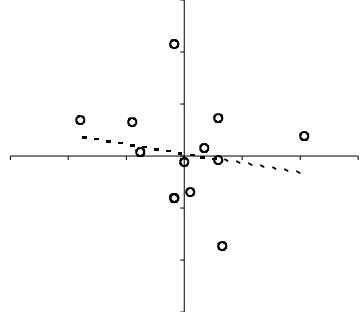
Dia 1



Dia 2

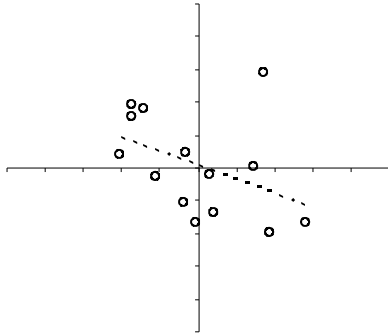


Dia 3

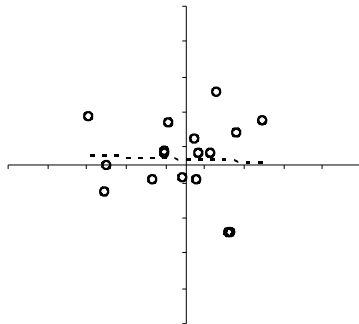


Pirimifós-metflico

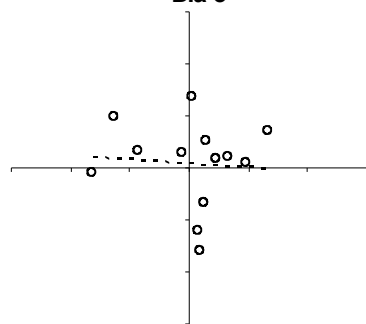
Dia 1



Dia 2



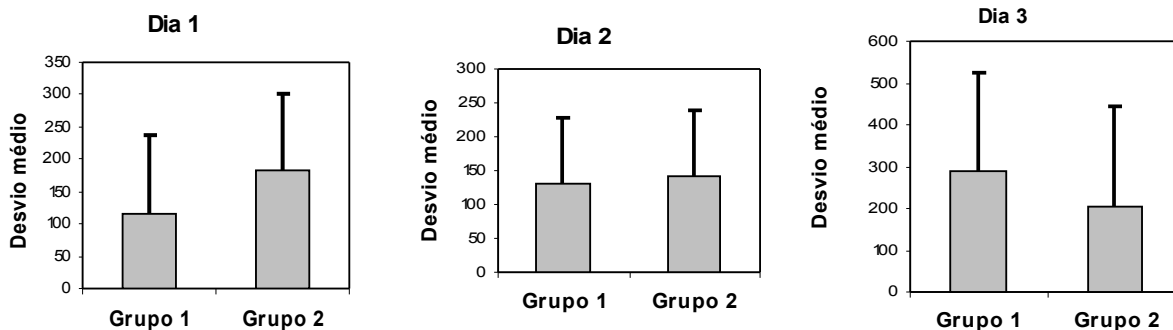
Dia 3



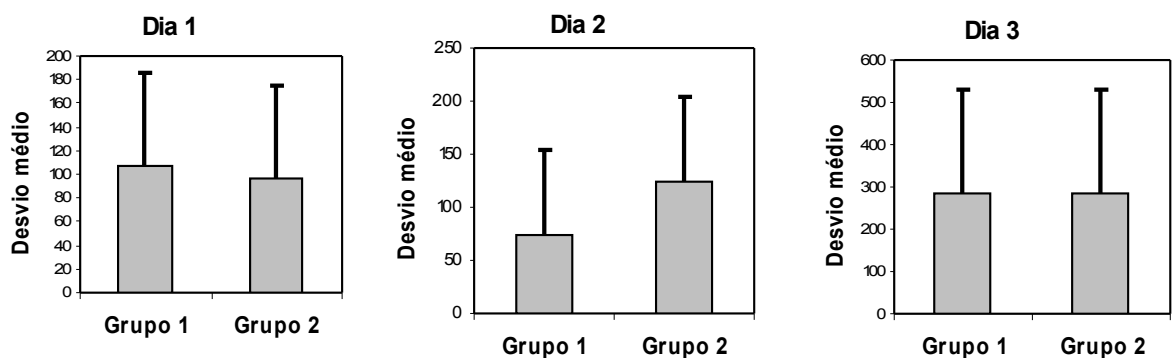


## APÊNDICES D – GRAFICOS DA AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DA VARIÂNCIA PELO TESTE DE LEVENE MODIFICADO DAS TRÊS CURVAS DE SOLVENTE.

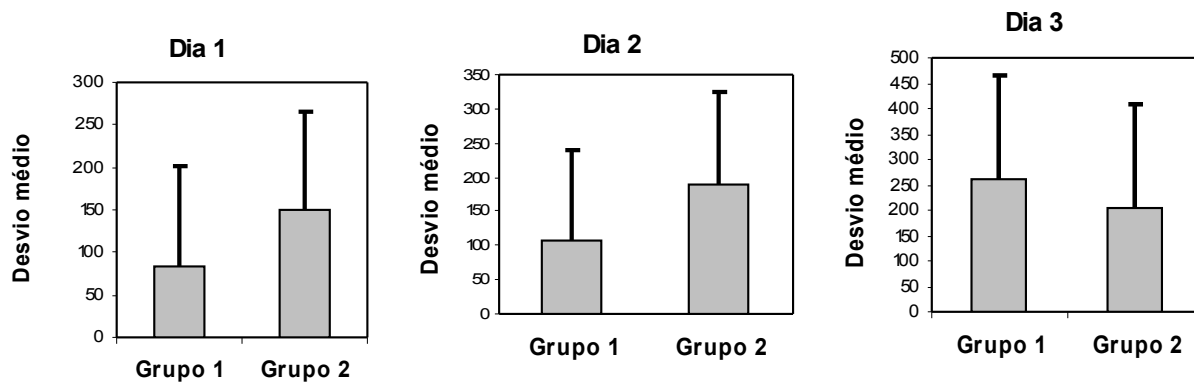
### Clorfenvinfós



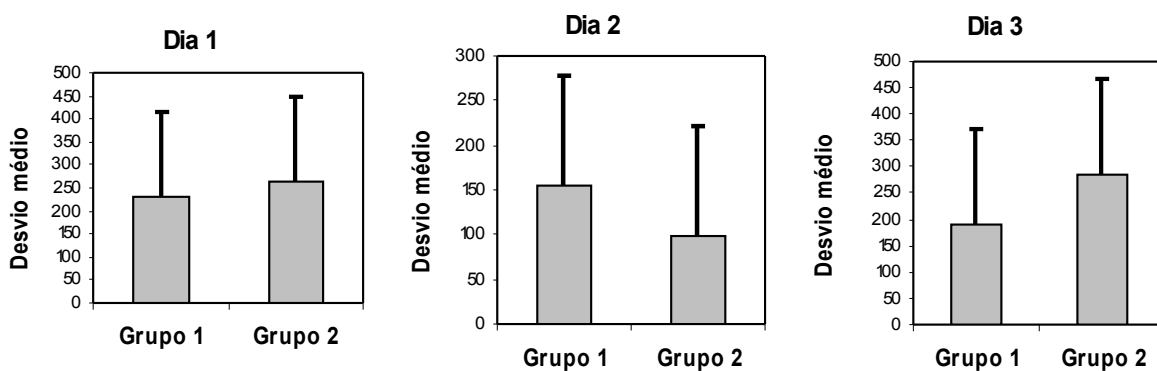
### Clorpirifós



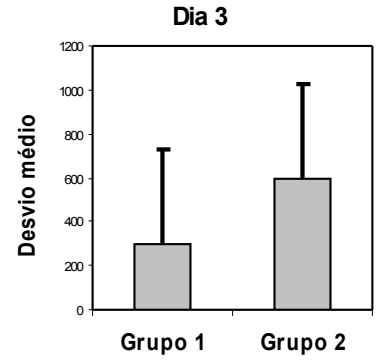
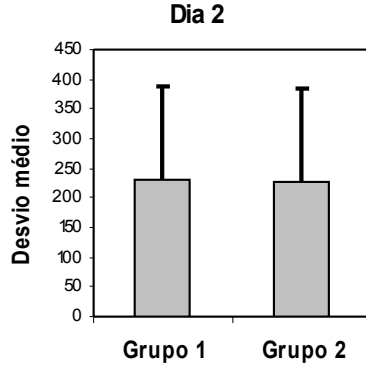
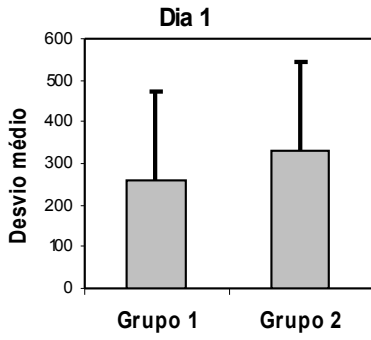
### Diclorvós



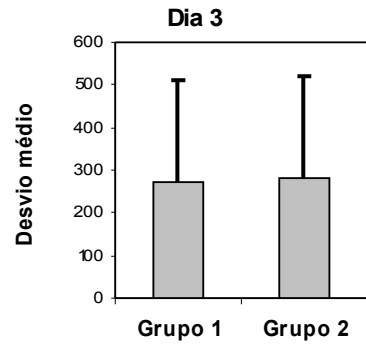
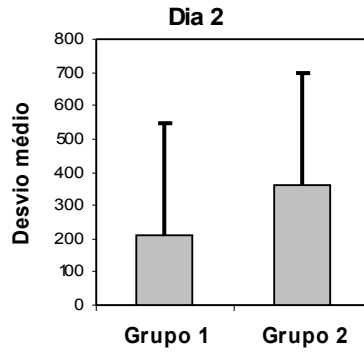
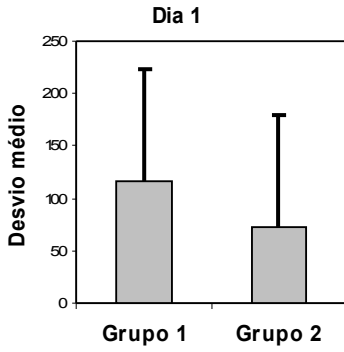
### Dimetoato



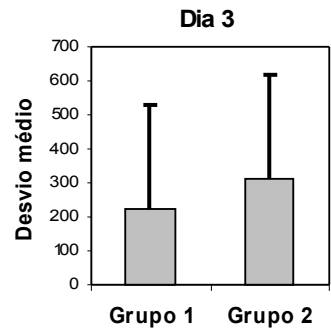
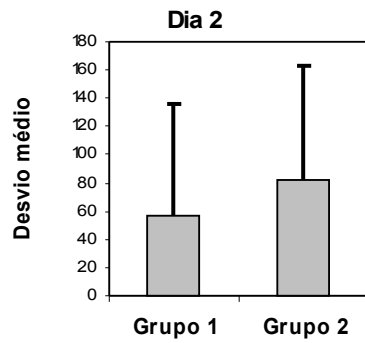
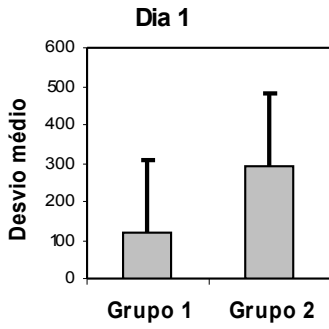
**Etiona**



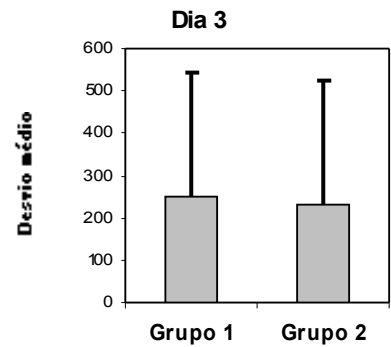
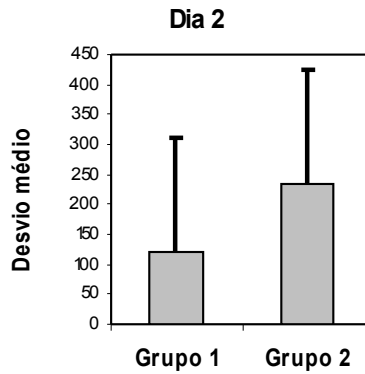
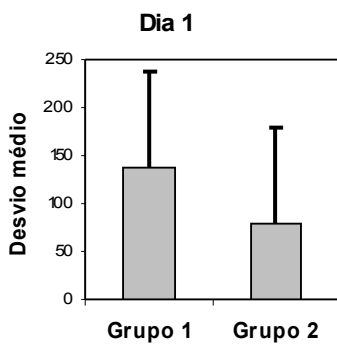
**Etopofós**



**Parationa-metflica**

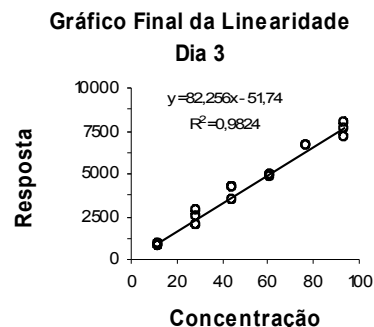
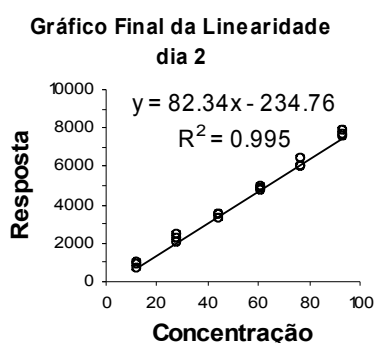
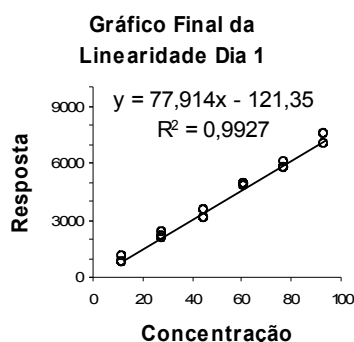


**Pirimifós-metflico**

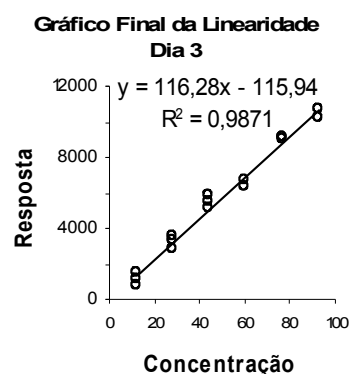
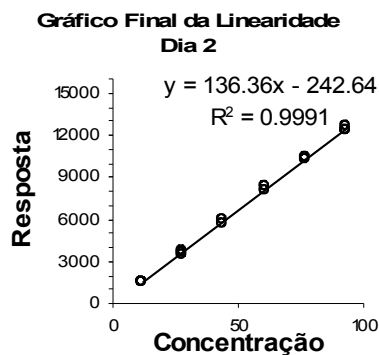
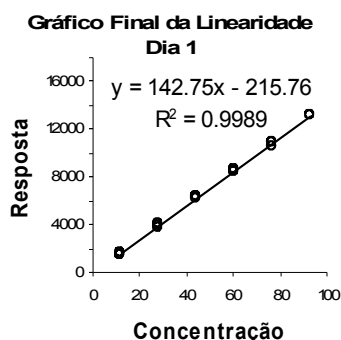


## APÊNDICES E – GRÁFICOS DA CURVAS DE REGRESSÃO LINEAR, APÓS A RETIRADA DOS OUTLIERS.

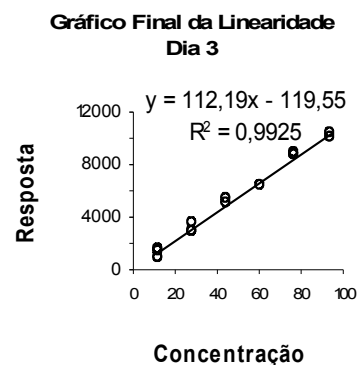
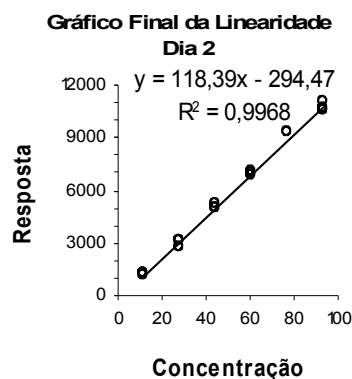
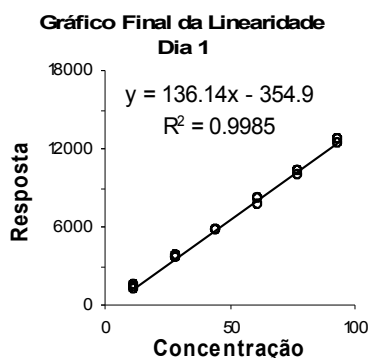
### Clorfenvinfós



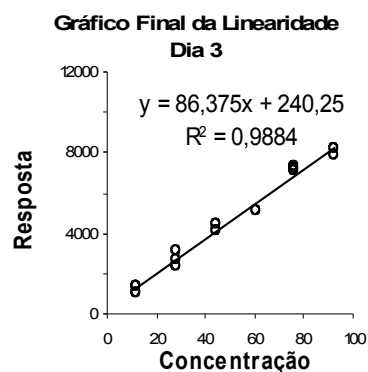
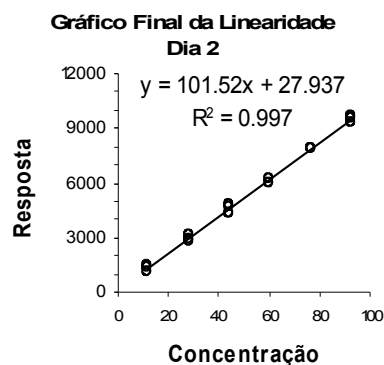
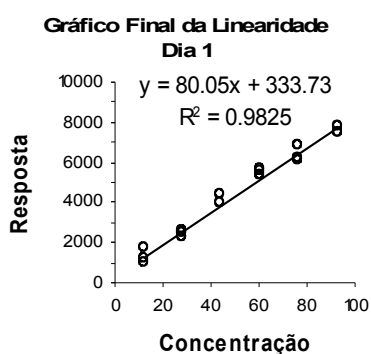
### Clorpirifós



### Diclorvós

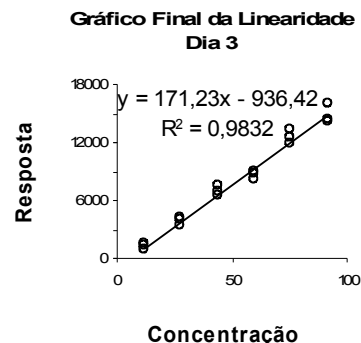
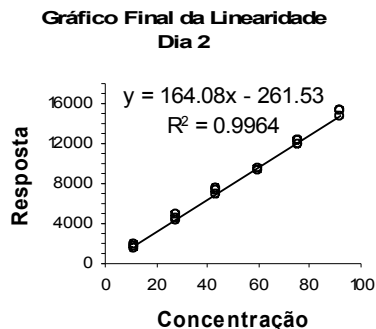
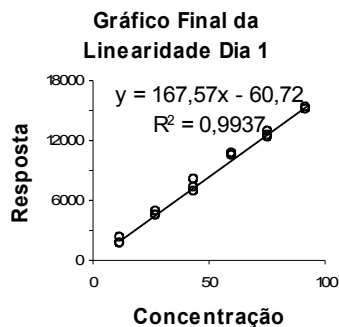


### Dimetoato

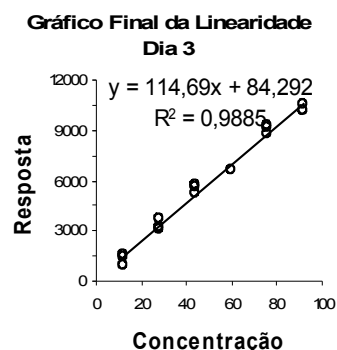
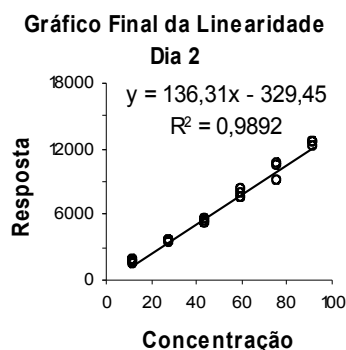
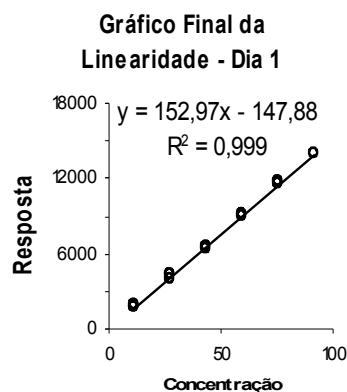


$y$  = resposta em área do pico,  $x$  = concentração em  $\text{ng mL}^{-1}$ ,  $R^2$  = coeficiente de determinação

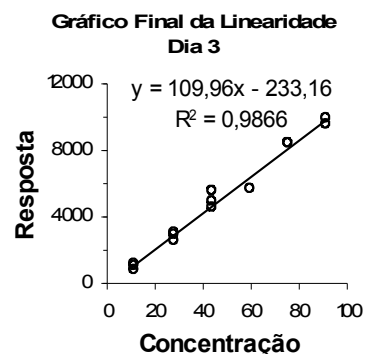
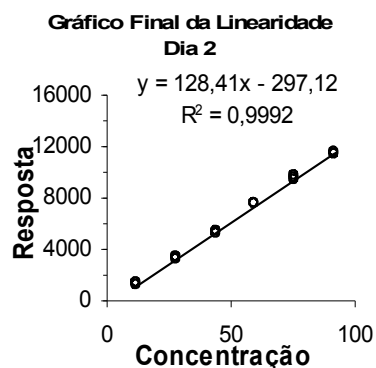
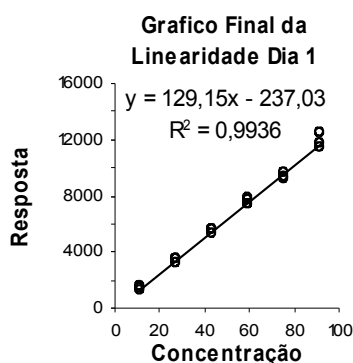
## Etiona



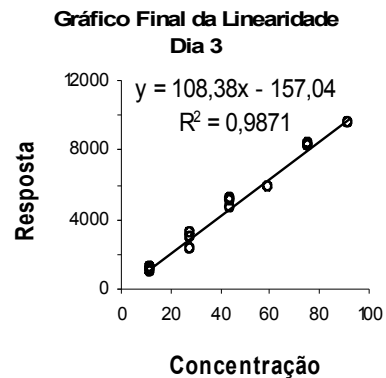
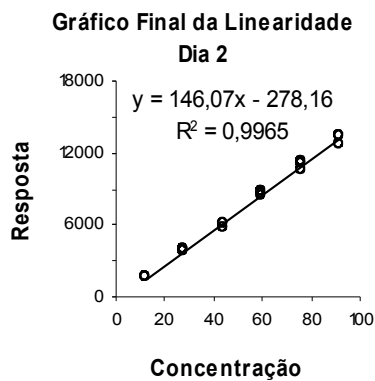
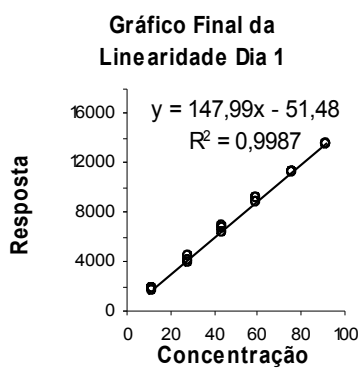
## Etoprofos



## Paration-metilica

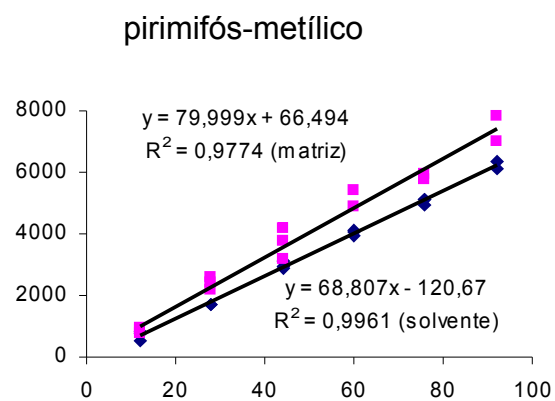
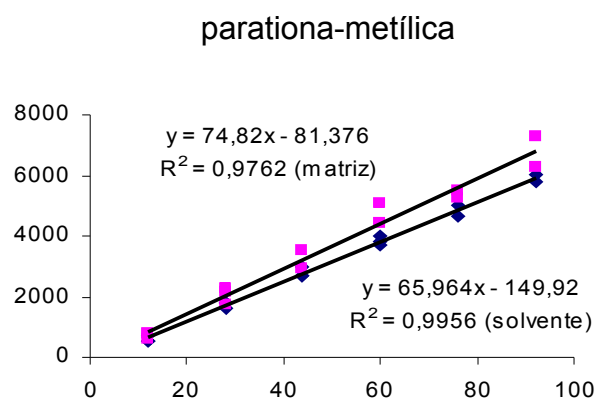
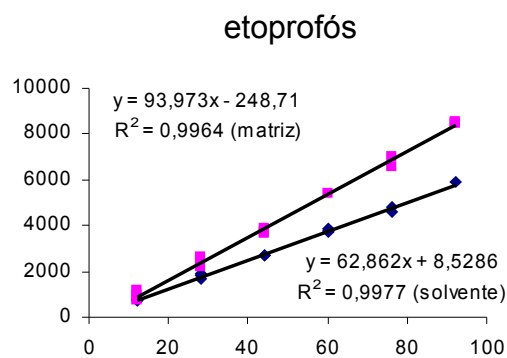
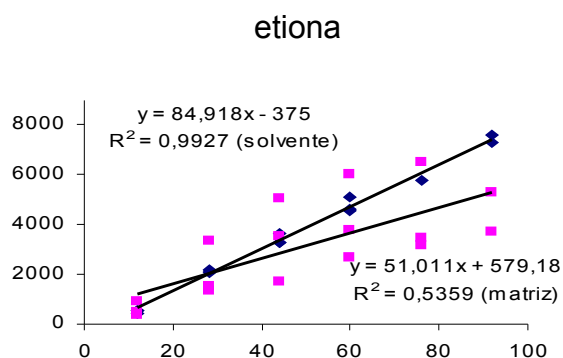
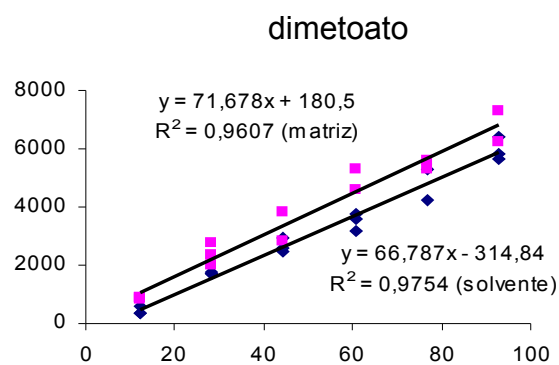
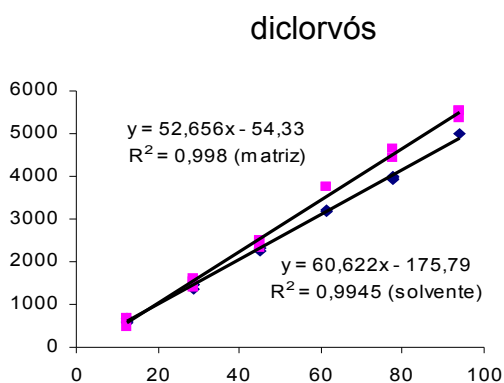
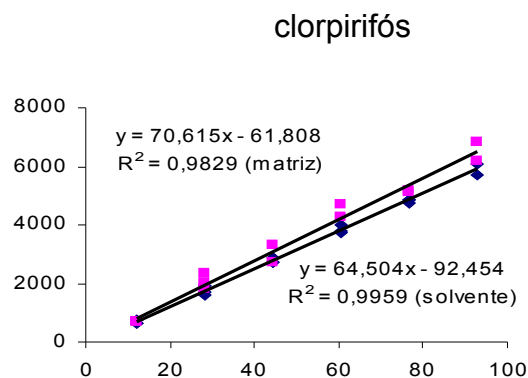
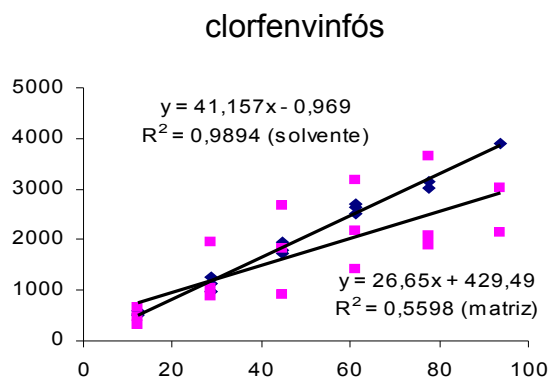


## Pirimifós-metílico

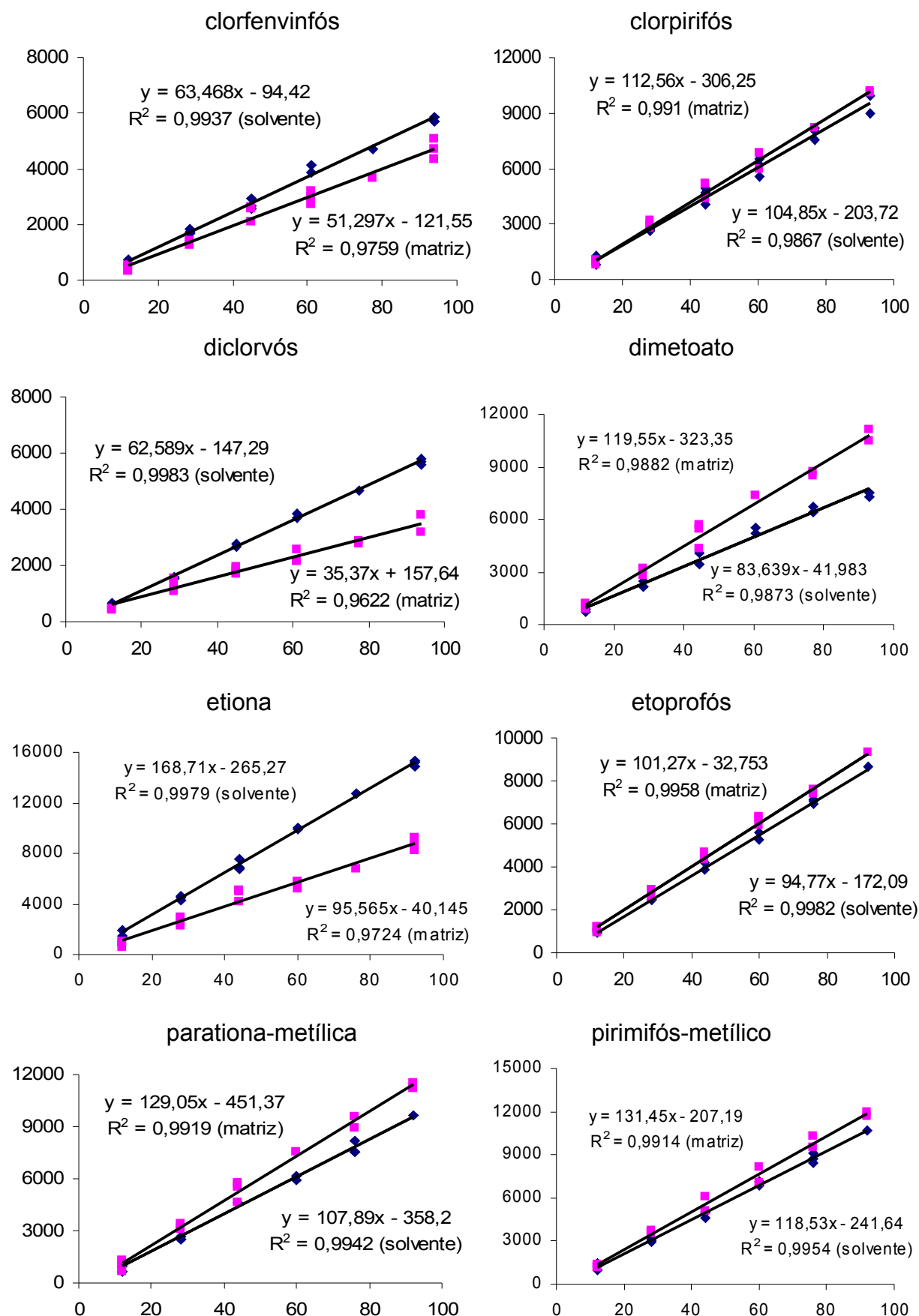


$y$  = resposta em área do pico,  $x$  = concentração em  $\text{ng mL}^{-1}$ ,  $R^2$  = coeficiente de determinação

## APÊNDICES F - GRÁFICOS DA CURVAS DE CALIBRAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE AGROTÓXICOS NO SOLVENTE E NA SOLUÇÃO MATRIZ DE ALFACE.



## APÊNDICES G - GRÁFICOS DA CURVAS DE CALIBRAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE AGROTÓXICOS NO SOLVENTE E NA SOLUÇÃO MATRIZ DE BANANA.



## APÊNDICES H - GRÁFICOS DA CURVAS DE CALIBRAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE AGROTÓXICOS NO SOLVENTE E NA SOLUÇÃO MATRIZ DE TOMATE

