

CURSO DE RESIDÊNCIA MULTIPROFISSIONAL EM SAÚDE NA ÁREA DE
VIGILÂNCIA SANITÁRIA COM ÊNFASE NA QUALIDADE DE PRODUTOS,
AMBIENTES E SERVIÇOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Shaiene Vieira Carmo

**IMPLEMENTAÇÃO, VALIDAÇÃO E ANÁLISE DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MATRIZ PIMENTÃO**

Rio de Janeiro

2015

Shaiene Vieira Carmo

**IMPLEMENTAÇÃO, VALIDAÇÃO E ANÁLISE DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MATRIZ PIMENTÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista

Preceptora: Lucia Helena Pinto Bastos

Tutora: Maria Helena W. Cardoso

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Carmo, Shaiene Vieira Carmo

Implementação, Validação e Análise de Resíduos de Agrotóxicos em matriz pimentão / Shaiene Vieira Carmo. Rio de Janeiro: INCQS /FIOCRUZ, 2015

79 p., il., tab.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista em Vigilância Sanitária)– Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz 2015.

Preceptora: Lúcia Helena Pinto Bastos. Tutora: Maria Helena Wohlers Cardoso.

1. Praguicidas. 2. Capsicum 3. Limite Máximo de Agrotóxico em Alimentos. 4. Estudos de Validação I. Título.

Shaiene Vieira Carmo

**IMPLEMENTAÇÃO, VALIDAÇÃO E ANÁLISE DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MATRIZ PIMENTÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista

Aprovado em 11 / 02 / 2015.

BANCA EXAMINADORA

Angélica Castanheira de Oliveira (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Silvana do Couto Jacob (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutora) - Preceptora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus por iluminar sempre meus caminhos.

A meus pais, Vera, Alexander e Valber, sobretudo à minha mãe que sempre me apoiou nos estudos, nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

A minha irmã Wanessa pela preocupação e apoio, não medindo esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

A meu noivo Paulo, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

A minha preceptora, Lucia, e a minha tutora, Helena, pela orientação, apoio e confiança.

A coordenadora do curso, Silvana, pelo convívio, paciência e compreensão.

A todos do Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do INCQS, que conviveram comigo momentos de dificuldades e alegrias durante esta jornada.

A grande companheira de profissão, Angélica, pela paciência, pelos conselhos e incentivos, sempre com uma simpatia contagiante.

Ao Thomas pela ajuda e suporte técnico nas avaliações CGAR-EM.

Aos fiscais da SubVisa que tive o prazer de trabalhar, e me ensinaram muito sobre a Vigilância Sanitária no Rio de Janeiro.

Aos companheiros de curso, pelos momentos de dificuldades que nos fizeram perder noites de sono, e dias de intensos estudos, com um único propósito de nos tornarmos excelentes profissionais. Não podendo esquecer (claro!!!!!!) das comemorações mensais, bolo da avó do Júlio, bolo de pão de queijo da Ana, entre outros, que nos fez engordar alguns quilinhos.

As amigas, Ana Victoria, Bianca, Cristiane, Júlia e Priscila, pela amizade que construímos, pelos momentos de fúria, de risadas, e que vão continuar presentes em minha vida.

A todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão desta etapa se tornasse possível.

Mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor, o melhor vai se instalar em nossa vida.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A agricultura é uma importante atividade econômica no Brasil, assim, com a justificativa de aumento da produtividade e da qualidade do alimento, o mercado brasileiro de agrotóxicos se tornou nos últimos anos o maior do mundo. No último relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos de Alimentos (PARA) divulgado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o pimentão lidera a lista dos alimentos mais contaminados por agrotóxicos, 91,8 % das amostras analisadas apresentaram alguma contaminação. O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma das hortaliças de maior consumo no Brasil, principalmente pela região nordeste e sudeste. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), São Paulo e Minas Gerais são os principais estados produtores e respondem por cerca de 35 % da produção nacional. Atualmente são permitidos pela legislação brasileira 38 agrotóxicos de 24 diferentes classes químicas para a cultura de pimentão. Considerando os riscos ambientais e a segurança alimentar é necessário desenvolver e validar métodos analíticos eficientes e seguros para a determinação de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. Esse trabalho consistiu na validação de um método analítico quantitativo para a determinação de resíduos de agrotóxicos em pimentão, usando método QuEChERS modificado com detecção por cromatografia gasosa acoplada a detector por micro captura de elétrons - CG- μ DCE - a fim de avaliar a contaminação desse produto na cidade do Rio de Janeiro. Na análise de amostras de pimentão comercializado na cidade do Rio de Janeiro, obteve-se 77,4 % das amostras insatisfatórias, mostrando que a situação desse produto não se modificou nesses últimos anos. Entretanto, considerando os resultados isentos de agrotóxicos obtidos nas amostras orgânicas, é possível produzir o produto sem a presença dessas substâncias. Sendo assim, as ações realizadas pelos programas de monitoramento devem ser reforçadas, para garantir ao consumidor uma alimentação segura e o acesso a rastreabilidade do produto.

Palavra-Chave: Agrotóxico. Pimentão. Validação. QuEChERS.

ABSTRACT

Agriculture is an important economic activity in Brazil, as well, on the grounds of increased productivity and food quality, the Brazilian market of pesticides has become in recent years the world's largest. In the latest report of the Program of Food Pesticide Residue Analysis (PARA) published by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), the pepper leads the list of foods most contaminated by pesticides, 91.8 % of samples showed some contamination. The pepper (*Capsicum annuum* L.) is one of the most consumed vegetables in Brazil, especially the northeast and southeast. According to the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), São Paulo and Minas Gerais are the main producing states with around 35 % of national production. Currently allowed by Brazilian law 38 pesticides of 24 different chemical classes for pepper culture. Considering the environmental risks and food safety is necessary to develop and validate analytical methods efficient and safe for the determination of pesticide residues in food. This work was the validation of an analytical method for the determination pesticide residues in peppers, using QuEChERS method modified with detection by gas chromatography micro electron capture detector - GC- μ ECD - to assess the contamination of product in the city of Rio de Janeiro. In the analysis of pepper samples marketed in the city of Rio de Janeiro, was obtained 77.4 % of unsatisfactory samples, showing that the state of the product has not changed in recent years. However, considering the results obtained without pesticides in organic samples, it is possible to produce the product without the presence of these substances. Thus, the actions taken by the monitoring programs should be strengthened in order to guarantee consumers a safe food and access to product traceability.

Key-words: Pesticides. Pepper. Validation. QuEChERS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma da extração pelo método QuEChERS modificado utilizado na validação	36
Figura 2 - Representação das 18 diferentes janelas de tempo programado para aquisição de dados no método UHPLC-ESI-MS/MS	44
Figura 3 - Cromatogramas do branco da polpa de pimentão e das misturas 1, 2 e 3 na concentração correspondente ao segundo ponto da curva analítica em matriz	52
Figura 4 - Representação dos íons de fenpropatrina na amostra de pimentão 2014-B, analisados por CGAR-EM (IE)	64
Figura 5 - Representação dos íons da SQRA acefato, analisados por UHPLC-ESI-MS/MS	67
Figura 6 - Representação dos íons do acefato na amostra de pimentão 2013-U, analisados por UHPLC-ESI-MS/MS	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agrotóxicos estudados no processo de validação com suas respectivas classes e LMR ¹	28
Tabela 2 - Equipamentos utilizados na validação	29
Tabela 3 - Solventes, reagentes e padrões utilizados na validação	30
Tabela 4 - Concentrações reais das soluções de fortificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	32
Tabela 5 - Concentrações reais das soluções da curva analítica	33
Tabela 6 - Agrotóxicos analisados nas amostras avaliadas por CG- μ DCE e UHPLC-ESI-MS/MS	41
Tabela 7 - Solventes e reagentes utilizados na análise no UHPLC-ESI-MS/MS ..	44
Tabela 8 - Concentrações reais das soluções da curva de calibração do CG- μ DCE	45
Tabela 9 - Concentrações reais das soluções da curva de calibração do UHPLC-ESI/MS/MS	46
Tabela 10 - Recuperação das diferentes fases empregadas na etapa de limpeza (%)	51
Tabela 11 - Avaliação da homogeneidade na variância dos resíduos da regressão da curva em solvente e no extrato orgânico	53
Tabela 12 - Avaliação da linearidade - significância da regressão e valores dos coeficientes de determinação - R^2	55
Tabela 13 - Avaliação do efeito matriz para as curvas analíticas em solvente e na matriz, com cinco pontos de concentração	57
Tabela 14 - Avaliação da relação S/N e valores dos LD e LQ do método calculados e confirmados	58
Tabela 15 - Taxa de recuperação e coeficiente de variação (%)	60
Tabela 16 - Resumo da validação do método	61
Tabela 17 - Monitoramento do método de confirmação do CGAR-EM (IE)	63

Tabela 18 - Avaliação de amostras de pimentão por CG- μ DCE no período de 2013 e 2014	65
Tabela 19 - Monitoramento do método de confirmação do UHPLC-ESI-MS/MS ..	66
Tabela 20 - Avaliação de amostras de pimentão por UHPLC-ESI-MS/MS no período de 2013 e 2014	69
Tabela 21 - Resultado final das amostras de pimentão avaliadas	70

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação
CG- μ DCE	Cromatografia gasosa com detector de micro captura de elétrons
CGAR-EM (IE)	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa do tipo quadrupolo por impacto de elétrons
CODEX	<i>Codex alimentarius</i>
CRC	Coordenação de Resíduos e Contaminantes
CV	Coefficiente de variação
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DOQ	Documento de caráter orientativo
DPR	Desvio padrão relativo
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IA	Ingrediente ativo
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
JMPR	<i>Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISSO	<i>International Organization for Standardization</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LMR	Limite máximo residual
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

ME	Monografia Excluída
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MS	Ministério da Saúde
NA	Não Autorizado para a cultura
NARA	Não Apresentou Resíduo de Agrotóxico
NBR	Norma Brasileira
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARA	Programa Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PIB	Produto Interno Bruto
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
POF	Pesquisa de orçamento familiar
POP	Procedimento operacional padrão
PSA	<i>Primary secondary amine</i>
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SANCO	<i>European Commission Health and Consumers</i>
SE	Solução estoque
SI	Solução intermediária
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i>
S/N	Razão sinal ruído
SQRA	Substância Química de Referência de Agrotóxico
t _R (min)	Tempo de retenção em minutos
UHPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo por eletronebulização
USA	<i>United States American</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 PROGRAMA DE MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS	16
1.2 PIMENTÃO NO BRASIL	18
1.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODO	19
1.3.1 Seletividade	20
1.3.2 Linearidade	21
1.3.3 Faixa de trabalho	21
1.3.4 Superposição de matriz com padronização externa	22
1.3.5 Precisão	22
1.3.6 Exatidão	23
1.3.7 Limite de Detecção	23
1.3.8 Limite de Quantificação	24
2 OBJETIVO	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 PARTE EXPERIMENTAL	28
3.1 VALIDAÇÃO DA MATRIZ PIMENTÃO NO CG- μ DCE	28
3.1.1 Amostras	28
3.1.2 Agrotóxicos avaliados	28
3.1.3 Equipamentos utilizados	29
3.1.4 Condições cromatográficas	30
3.1.5 Padrões e reagentes	30
3.1.6 Preparo das soluções analíticas	32
3.1.7 Método de ensaio	35
3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO	36
3.2.1 Seletividade	36
3.2.2 Linearidade, Faixa de trabalho e Efeito Matriz	37
3.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	38

3.2.4 Precisão (repetibilidade) e Exatidão (taxa de recuperação)	39
3.3 AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS	40
3.3.1 Amostras	40
3.3.2 Processamento das amostras	40
3.3.3 Agrotóxicos avaliados	40
3.3.4 Equipamentos utilizados	42
3.3.5 Condições cromatográficas	42
3.3.6 Padrões e reagentes	44
3.3.7 Preparo das soluções analíticas	44
3.3.8 Método de ensaio	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1 VALIDAÇÃO	51
4.1.1 Seletividade	52
4.1.2 Linearidade, Faixa de trabalho e Efeito Matriz	52
4.1.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	57
4.1.4 Precisão (repetibilidade) e Exatidão (taxa de recuperação)	59
4.2 AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS	63
4.2.1 Amostras	63
4.2.2 Avaliação no CG- μ DCE	63
4.2.3 Avaliação no UHPLC-ESI-MS/MS	65
5 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

A história da humanidade é marcada por uma quantidade significativa de prejuízos causados por pragas agrícolas. Para combater essas pragas e encontrar um novo equilíbrio ecológico, foi introduzido o uso de certos produtos químicos, cujos números e eficácia não pararam de aumentar (FLORES et al., 2004). Esses produtos são substâncias utilizadas na agricultura e na saúde pública, conhecidos como agrotóxicos, pesticidas, praguicidas, produtos fitossanitários, defensivos agrícolas, agroquímicos, desinfetantes, biocidas, entre outros (SCHIESARI, 2012).

A agricultura é uma importante atividade econômica, sendo responsável por cerca de 20 % do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, 41 % das exportações e cerca de 30 % da população economicamente ativa (MENTEN, 2014). Sendo assim, sob a justificativa do aumento da produtividade e da qualidade do alimento, nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93 %, enquanto o mercado brasileiro cresceu 190 %. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos (ABRASCO, 2012).

Em 2013 o mercado nacional de venda de agrotóxicos movimentou 326 mil toneladas de produtos técnicos, sendo 124 mil toneladas produzidas no país e 202 mil toneladas importadas (ABRASCO, 2012; IBAMA, 2014). Nesse mesmo ano o setor movimentou US\$ 10,5 bilhões, sendo considerado o ano de ouro para a agropecuária, que teve supersafra e preços de *commodities* em alta (FREITAS; SPITZ; OLIVEIRA, 2014).

Os agrotóxicos são legalmente definidos no Brasil como:

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 implantadas, e de outros ecossistemas e também 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).

Esses produtos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (grupo funcional) – organoclorados (presença de átomos de cloro), organofosforados (presença de átomos de fósforo), carbamatos (formado por sais ou ésteres de carbâmico), entre outros - e com o tipo de pragas alvo – algicidas (algas), fungicidas

(fungos), herbicidas (ervas daninhas), inseticidas (insetos), acaricidas (ácaros), entre outros. Estas diferentes estruturas distinguem segundo a forma de ação, absorção, biotransformação e eliminação (PICÓ; BLASCO; FONT, 2004).

Os produtos agrotóxicos são regulados no Brasil desde a promulgação do Decreto nº 24.114 de 14/04/1934, que estabeleceu as diretrizes e obrigações para a produção, importação, exportação, comercialização e uso no Brasil (BRASIL, 1934). O Decreto nº 4.074 de 04/01/2002 que regulamenta a Lei nº 7.802 de 11/07/1989 trouxe mudanças importantes na regulação do tema, como a inclusão do órgão responsável pelo setor de meio ambiente, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), no processo de avaliação e registro destes produtos no país. Além do IBAMA, o registro envolve o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que avalia questões agrônômicas, e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que avalia o impacto do uso dos agrotóxicos na saúde humana (BRASIL, 2002).

Atualmente mais de 434 ingredientes ativos (IA) distribuídos em mais de 2.400 formulações de agrotóxicos estão registrados no Ministério da Saúde (MS), MAPA e Ministério do Meio Ambiente (MMA) e são permitidos no Brasil de acordo com os critérios de uso e indicação estabelecidos em suas monografias. Porém, dos 50 mais utilizados nas lavouras de nosso país, 22 são proibidos na União Européia. Desde 2008 a ANVISA está em processo de revisão de 14 monografias, sendo algumas já proibidas como cihexamina (2009), triclofom (2010), endossulfam (2010) e metamidofós (2011). O fosmete (2010) e o acefato (2013) tiveram seus usos restringidos, apesar dos testes toxicológicos indicarem o banimento. O forato e parationa-metilica concluíram em 2012 a consulta pública de revisão, não havendo modificações. Os demais agrotóxicos lactofem, carbofurano, tiram, paraquate, glifosato, abamectina continuam em consulta pública (ANVISA, 2012, 2014, 2014a).

O controle de pragas, através do uso de diferentes IA, reduziu o índice de doenças para os homens e animais e proporcionou aumento na produção agrícola. Porém resíduos dessas substâncias podem permanecer no ambiente por longos períodos e causar impactos nocivos a diferentes ecossistemas. Essa contaminação têm sido alvo de constante preocupação no âmbito da saúde pública, exigindo dos diversos níveis de governo, investimento e organização para implementar programas de monitoramento e ações de controle de resíduos que possam eliminar ou diminuir

os riscos à saúde dos brasileiros quanto a presença destes resíduos no ar, água, solo e nos alimentos (JAVARONI et al., 1991; ANVISA, 2013).

De acordo com o Decreto nº 98.816 de 11/01/1990, resíduo de agrotóxico é definido como:

Uma substância ou mistura de substâncias remanescentes ou existentes em alimento ou no meio ambiente, decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive qualquer derivado específico, tais como, produtos de conversão ou degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas consideradas tóxicas e ambientalmente importantes (BRASIL, 1990).

Considerando que os agrotóxicos podem deixar resíduos em alimentos, houve a necessidade do estabelecimento de Limite Máximo Residual (LMR). O LMR é a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico, expresso em ppm ou mg kg^{-1} , que pode estar legalmente presente nos alimentos em decorrência da aplicação adequada numa fase específica desde sua produção até o consumo (BRASIL, 2002).

Os critérios para estabelecer o LMR de resíduos de agrotóxicos em alimentos estão relacionados a estudos supervisionados de campo, de acordo com as boas práticas agrícolas (JARDIM; CALDAS, 2009).

Internacionalmente, procedimentos de avaliação do risco são conduzidos pelos comitês científicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) - JMPR (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*), para subsidiar o estabelecimento de padrões alimentares pelo *Codex Alimentarius* (CODEX) (JARDIM; CALDAS, 2009).

No Brasil o MS através da ANVISA é responsável em estabelecer LMRs em alimentos seja de agrotóxicos, medicamentos veterinários, contaminantes e aditivos. No caso destes não estarem estabelecidos por esse Ministério, utiliza-se os internalizados no MERCOSUL (Mercado Comum do Sul), os recomendados pelo CODEX, os constantes nas Diretivas da União Européia e os utilizados pelo FDA/USA (*Food and Drug Administration/United States American*) (BASTOS, 2013).

1.1 PROGRAMA DE MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

Com o aumento no consumo de agrotóxicos as preocupações com os resíduos destas substâncias em alimentos ganham evidência e tornam-se cada vez mais frequentes. No Brasil várias iniciativas têm sido implementadas com o intuito de

garantir níveis seguros de resíduos de agrotóxicos para a população que consome alimentos provenientes de culturas tratadas com estas substâncias. Dentre essas, têm sido executados programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos nos produtos, garantindo alimentos seguros à população. Esses programas podem ser estaduais ou de abrangência nacional - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do MAPA e o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA (EMBRAPA, 2013).

O PNCRC/Vegetal é um programa anual, instituído pela Instrução Normativa SDA nº 42 de 31/12/2008, sob o comando da Coordenação de Resíduos e Contaminantes (CRC), órgão ligado diretamente à Secretaria de Defesa Agropecuária, e tem como função inspecionar e fiscalizar a qualidade dos produtos de origem vegetal produzidos em todo o território nacional, em relação à ocorrência de resíduos de agrotóxicos e contaminantes químicos e biológicos, além de investigar e controlar os produtos agropecuários provenientes de propriedades suspeitas de violações (BRASIL, 2008).

O PARA é um programa da ANVISA, vinculado ao MS, desde 2003 através da RDC nº 119/03, e tem como objetivo avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor. Suas atividades têm por objetivos principais a promoção da saúde através do consumo de alimentos de qualidade e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) secundárias à ingestão cotidiana de quantidades perigosas de agrotóxicos, que hoje são um problema mundial de saúde pública (ANVISA, 2011, 2013).

No último relatório do PARA divulgado pela ANVISA, o pimentão, o morango e o pepino lideram o ranking dos alimentos mais contaminados por agrotóxicos. Os dois problemas detectados na análise das amostras foram o teor de resíduos de agrotóxicos acima do LMR e uso de agrotóxicos não autorizados para as culturas. Para o pimentão, 91,8 % das amostras analisadas apresentaram problemas de contaminação (ANVISA, 2013).

Atualmente são permitidos pela legislação brasileira 38 agrotóxicos de 24 diferentes classes químicas para a cultura de pimentão: abamectina, acefato, acetato de 4,7,10-tridecatrienila, acetato de 4,7-tridecatrienila, azadiractina, azoxistrobina, clomazona, clorfenapir, clorotalonil, deltametrina, difenoconazol, ditiocarbamatos (mancozebe, metiram e propinebe), enxofre, estreptomicina, etiona,

11-hexadecenol, hidróxido de cobre, imidacloprido, iprodiona, iprovalicarbe, metconazol, metiocarbe, oxicleto de cobre, óxido cuproso, oxitetraciclina, piraclostrobina, piriproxifem, sulfato de cobre, tetradifona, tiabendazol, tiacloprido, tiametoxam, triclofom, trifluralina, 3,6,9-tricosatrieno e 1,4-dimetoxibenzeno (MAPA, 2014).

1.2 PIMENTÃO NO BRASIL

O pimentão pertence à família *Solanaceae* e ao gênero *Capsicum*, mesma família das batatas, tomates, jiló e berinjela e mesmo gênero das pimentas. Apresenta grande diversidade de colorações, formatos, tamanhos e pungência. As denominações mais comuns se referem a coloração do pimentão: verde, vermelho e amarelo, seguidos por laranja, creme e roxo. Podem ser consumidos pré-maduros ou maduros e possuem poucas calorais. São vegetais que dão ao prato um visual vibrante, sem deixar de lado seu papel como fonte de vitaminas C e A, e minerais como cálcio, magnésio fósforo, potássio e ferro (EMBRAPA, 2001; IBGE, 2011).

Cultivado no Brasil, o pimentão (*Capsicum annuum* L.) é caracterizado pela adaptação ao clima tropical sendo sensível à temperatura baixa e intolerante à geada. No Sudeste, o pimentão é normalmente cultivado de meados da primavera a meados do outono, podendo também ser cultivado no inverno em regiões de baixa altitude. Em ambiente protegido, é possível produzir o pimentão durante o ano todo (FONTES; DIAS; SILVA, 2005).

O pimentão está entre as dez hortaliças mais importantes cultivadas no Brasil, estando difundido principalmente nas regiões sudeste e centro-oeste. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), São Paulo e Minas Gerais são os principais estados produtores e respondem por cerca de 35 % da produção nacional, atingindo a marca de 248.767 toneladas no ano de 2006 (IBGE, 2006).

O consumo médio de pimentão no Brasil em 2008-2009, segundo a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) do IBGE, foi de 0,584 kg/habitante/ano. A região Nordeste esteve bem acima desta média, mantendo um consumo de 0,802 kg/habitante/ano. Em seguida a região sudeste com 0,539 kg/habitante/ano, sendo o Rio de Janeiro o estado de maior consumo, com 0,678 kg/habitante/ano, estando acima da média nacional (IBGE, 2010).

Considerando os riscos ambientais e a segurança alimentar, 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 necessária e de grande importância. Assim, o desenvolvimento de metodologias analíticas eficientes e seguras para a determinação de resíduos de agrotóxicos é essencial tanto no contexto de programas de monitoramento para proteção da saúde pública quanto para a eliminação de barreiras técnicas nas relações comerciais entre países (MUÑOZ et al., 2003).

Análises de resíduos de agrotóxicos são complexas, uma vez que essas substâncias possuem diferentes propriedades físico-químicas e podem ocorrer em concentrações extremamente baixas na presença de altas concentrações de interferentes, necessitando assim que sejam desenvolvidas e validadas metodologias analíticas capazes de atender a esse desafio (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011).

Um método analítico ideal deve ser capaz de analisar um grande número de agrotóxicos, sem interferência da matriz, de detectar e quantificar de forma inequívoca os analitos envolvidos, em baixos níveis de concentração, de forma precisa e com um pequeno número de medidas que proporcione economia de tempo.

1.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Normas nacionais e internacionais de sistemas de gestão da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido (BARROS, 2002). Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões equivocadas e a prejuízos irreparáveis. Então, para assegurar que um método analítico forneça informações confiáveis com interpretações corretas sobre a adequação de amostras deve passar por uma avaliação de competência denominada validação (RIBANI et al., 2004).

Várias definições de validação de métodos podem ser encontradas, sendo este um conceito em constante evolução e sob consideração contínua das agências reguladoras. Algumas definições podem ser destacadas:

- “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (BRASIL, 2003);
- “Confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos” (ABNT NBR ISO/IEC 17025, 2005);
- “Validação do método deve ser realizada para fornecer provas de que um método serve para o propósito para o qual está a ser utilizado” (SANCO, 2014).

No Brasil, a agência credenciadora é a ANVISA e a instituição que acredita a competência dos laboratórios de ensaios é o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução nº 899 de 29/05/2003 e o DOQ-CGCRE-008 de 04/07/2011 (BRASIL, 2003; INMETRO, 2011).

Os parâmetros analíticos recomendados pelo SANCO (*European Commission Health and Consumers*) - documento de orientação sobre o controle e validação dos procedimentos de qualidade analítica para análise de resíduos em alimentos - para validação de métodos são: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Mesmo que um método analítico já tenha sido objeto de um estudo de validação, o analista deve validá-lo em seu laboratório através da avaliação destes parâmetros de desempenho analítico (SANCO, 2014). Nesse estudo foram utilizados os parâmetros recomendados por esse documento.

1.3.1 Seletividade

A seletividade analítica representa a capacidade de avaliar de forma inequívoca o analito em estudo em misturas complexas, sem a interferência de outros componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade garante que a resposta encontrada seja exclusivamente da substância de interesse (VESSMAN et al., 2001).

A seletividade pode ser verificada através da avaliação de amostras branco verificando quaisquer interferências (sinais, picos, absorbância, entre outros) na região de eluição dos analitos em estudo (VESSMAN et al., 2001). Por exemplo, a

ausência de pico cromatográfico na região de eluição dos analitos em estudo indica que os componentes da matriz não interferem na quantificação do resíduo do agrotóxico quando analisado em condições diferentes, mas caso apareça pico interferente neste processo, avalia-se a possibilidade de confirmação da identidade do mesmo usando a espectrometria de massas ou outras técnicas apropriadas (RIBANI et al., 2004; INCQS, 2013).

1.3.2 Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico representa sua capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo, dentro de uma variação conhecida (RIBANI et al., 2004).

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada raramente é conhecida. Assim, uma relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse é determinada empiricamente, a partir do conjunto das medições experimentais (RIBANI et al., 2004).

Essa relação pode ser expressa por uma equação de reta obtida a partir de uma curva analítica, utilizando o método matemático conhecido como regressão linear, representado pela equação $y = a + bx$. A correlação entre os valores numéricos de x e de y é representada pelo coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (R^2), esses não devem ser usados isoladamente para avaliação da linearidade e sim para ajustes dos dados da curva (CUSTODIO; ANDRADE; AUGUSTO, 1997; INCQS, 2013).

1.3.3 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em estudo, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão, ou seja, a faixa de trabalho envolve as concentrações que serão utilizadas para a construção da curva analítica utilizada na quantificação do analito (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2011).

Em métodos de análise para resíduos, o SANCO recomenda que o nível mais baixo da curva analítica deve ser igual ou inferior ao LMR recomendado pelo órgão

regulador, ou seja, o LMR não deve ser menor do que o limite de quantificação (SANCO, 2014).

A quantificação da substância de interesse em uma validação pode ser obtida através de diversos métodos: padronização externa, padronização interna, superposição de matriz e adição padrão (RIBANI et al., 2004). Neste trabalho utilizou-se a superposição de matriz com padronização externa.

1.3.4 Superposição de matriz com padronização externa

Alguns agrotóxicos são sensíveis à presença de sítios ativos no sistema cromatográfico. Por essa razão, a análise de padrões em solvente puro pode resultar uma baixa resposta absoluta e baixa linearidade em diferentes concentrações. Na amostra real, no entanto, essa resposta cromatográfica pode ser melhorada, fato este atribuído à presença de materiais co-extraídos da matriz. Esses materiais podem se ligar aos sítios ativos do sistema cromatográfico, bloqueando-os. (HAJŠLOVÀ et al., 1998)

O método de superposição de matriz “*matrix-matched*” consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância, e construção da curva de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse (RIBANI et al., 2004; SANCO, 2014).

1.3.5 Precisão

A precisão de medição representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (INMETRO, 2011).

Este parâmetro pode ser avaliado através da repetibilidade, que representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetibilidade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado

sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo (BRASIL, 2003; INMETRO, 2011).

Para a repetibilidade, o SANCO recomenda no mínimo cinco repetições, para o cálculo da estimativa do Desvio Padrão Relativo (DPR), de no mínimo dois níveis de fortificação de dois á dez vezes a concentração similar do valor do LQ esperado. São aceitos DPR - também conhecido como coeficiente de variação (CV) - de até 20 %, dependendo da complexidade da amostra (SANCO, 2014).

1.3.6 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência estimado pelo processo analítico (INMETRO, 2011).

Os procedimentos mais utilizados para avaliação da exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI et al., 2004). Para esse trabalho foi realizado ensaios de recuperação para avaliação deste parâmetro na validação.

A recuperação é a relação existente entre a quantidade do analito a ser analisado, obtido após seguir o procedimento analítico completo, e a quantidade adicionada no início do procedimento, expressa em porcentagem (INCQS, 2013).

A recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o analito do composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método (RIBANI et al., 2004).

Para a verificação da recuperação, o SANCO recomenda no mínimo cinco repetições, de no mínimo dois níveis de fortificação de duas á dez vezes a concentração similar do valor do LQ esperado. São aceitos intervalos de recuperação entre 70 e 120 %, com DPR de até 20 % (SANCO, 2014).

1.3.7 Limite de Detecção

O LD representa a concentração mais baixa da substância em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um

determinado procedimento experimental (INMETRO, 2011). Esse pode ser calculado de diferentes maneiras: método visual, método relação sinal-ruído (S/N), método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004). Nesse trabalho utilizou-se o método relação S/N.

A relação S/N é determinada pela comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas da substância de interesse na matriz e um branco (matriz isenta da substância de interesse) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A razão S/N pode ser de 3:1 proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção (RIBANI et al., 2004; INCQS, 2013).

1.3.8 Limite de Quantificação

O LQ representa a menor concentração da substância em estudo que pode ser medida (quantificada), com precisão e exatidão, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2011).

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando uma razão S/N de 10:1 (RIBANI et al., 2004; INCQS, 2013).

O Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) possui 125 agrotóxicos validados na matriz pimentão pelo método de detecção por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo por eletronebulização - UHPLC-ESI-MS/MS - entretanto alguns agrotóxicos não são identificados através desta técnica.

Assim esse trabalho consistiu em implementar e validar um método analítico quantitativo para a determinação de resíduos agrotóxicos em pimentão por cromatografia gasosa acoplada à detector por micro captura de elétrons - CG- μ DCE - a fim de avaliar a contaminação desse produto na cidade do Rio de Janeiro.

O método de extração da amostra utilizado foi o QuEChERS (**Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe** – rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro), proposto em 2003 por Anastassiades e colaboradores (ANASTASSIADES et al., 2003), com modificações do procedimento original descritas na literatura (PRESTES et al., 2009).

O método QuEChERS modificado é composto por três etapas principais: uma etapa de extração, uma etapa de partição e também, uma etapa de limpeza. A extração é feita com acetonitrila acidificada com 1 % de ácido acético, que proporciona uma extração ampla de agrotóxicos com diferentes polaridades e uma extração com menor quantidade de co-extrativos lipofílicos como gorduras. Na etapa de partição ocorre a adição de sais para se obter o efeito “*salting-out*” que consiste na diminuição da solubilidade dos agrotóxicos em água bem como a diminuição de água na fase da acetonitrila. A etapa de limpeza consiste em uma extração em fase sólida dispersiva permitindo a limpeza e redução de água residual, sendo efetuadas de uma forma rápida e simultânea. Essa etapa é fundamental para diminuir interferências, efeito matriz e a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES et al., 2009).

A determinação de resíduos de agrotóxicos, nas mais diferentes matrizes, é tradicionalmente realizada utilizando-se técnicas cromatográficas, em função de sua capacidade de separação, identificação e quantificação dos analitos compostos através de detectores apropriados (GALLI et al., 2006).

A cromatografia gasosa é uma técnica bastante utilizada, pois possui um alto poder de resolução e detecção de substâncias em escala de nano a pictogramas. Uma limitação dessa técnica é demandar que a amostra seja volatilizável e termicamente estável (HOFF; ZONEN, 1999).

O detector μ DCE utilizado no desenvolvimento desse trabalho é um detector seletivo que contém fonte de ionização de partículas β , de baixa energia. Quando algum constituinte da amostra apresentar grupos de alta afinidade eletrônica, os elétrons livres gerados são capturados por esses componentes da amostra, com formação de íons carregados negativamente. O sinal gerado pelo detector é emitido devido à diminuição na corrente elétrica provocada pela captura de íons livres (HOLLER; SKOOG; CROUNCH, 2009).

Para as substâncias não voláteis, polares e termolábeis as análises cromatográficas são efetuadas pela cromatografia líquida. Atualmente a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS - *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*) tem se mostrado uma técnica muito potente, devido ao alto grau de seletividade e sensibilidade, fornecendo informações de massa molecular bem como estrutura do analito, ferramenta importante para identificação e confirmação da substância detectada (espectrometria de massas

sequencial), além de atingir concentrações em níveis de partes por bilhão e muitas vezes em partes por trilhão. Essa técnica consiste na ionização das moléculas anteriormente separadas, a fim de gerar fragmentos definidos como íons, carregados positivamente ou negativamente, que são detectados e quantificados (MALIK; BLASCO; PICÓ, 2010; LANÇAS, 2013).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi implementar e validar um método analítico quantitativo para a determinação de resíduos de agrotóxicos em pimentão e avaliação do produto comercializado na cidade do Rio de Janeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar método analítico quantitativo para a determinação de quarenta e nove resíduos de agrotóxicos na matriz pimentão, utilizando método de extração QuEChERS modificado com detecção por cromatografia gasosa acoplada a detector por micro captura de elétrons – CG- μ DCE;
- Analisar amostras de pimentão pelo método analítico validado - CG- μ DCE;
- Analisar amostras de pimentão pelo método analítico anteriormente validado pelo Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do INCQS - UHPLC-ESI-MS/MS;
- Avaliar o panorama do produto comercializado.

3 PARTE EXPERIMENTAL

As análises foram realizadas no Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do INCQS, acreditado junto ao INMETRO pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 (*International Organization for Standardization*).

O trabalho foi organizado em duas etapas: a primeira consistiu na validação da matriz pimentão no CG- μ DCE e a segunda na avaliação de resíduos de agrotóxicos nessa matriz por CG- μ DCE e UHPLC-ESI-MS/MS.

3.1 VALIDAÇÃO DA MATRIZ PIMENTÃO NO CG- μ DCE

3.1.1 Amostras

Aproximadamente 1,2 kg de pimentão foi adquirido no mercado local do município do Rio de Janeiro. Os pimentões foram cortados e triturados em liquidificador com copo de vidro e a polpa foi conservada em frascos devidamente identificados, no freezer sob congelamento entre -10 °C à -25 °C, até o momento de sua utilização.

3.1.2 Agrotóxicos avaliados

Foram selecionados quarenta e nove agrotóxicos, apresentados na Tabela 1, a fim de que esses fossem extraídos pelo método QuEChERS modificado e determinados por CG- μ DCE.

Tabela 1 - Agrotóxicos estudados no processo de validação com suas respectivas classes e LMR¹.

Agrotóxico	Classe	LMR (mg kg ⁻¹)	Agrotóxico	Classe	LMR (mg kg ⁻¹)
2,4'-DDD	organoclorado	ME	Dieldrin	organoclorado	ME
2,4'-DDE	organoclorado	ME	endossulfam sulfato	clorociclodieno	ME
2,4'-DDT	organoclorado	ME	Endrin	organoclorado	ME
4,4'-DDD	organoclorado	ME	Esfenvalerato	piretróide	NA
4,4'-DDE	organoclorado	ME	Fenpropatrina	piretróide	NA
4,4'-DDT	organoclorado	ME	Fenitrotiona	organofosforado	NA
α -endossulfam	clorociclodieno	ME	Fenvalerato	piretróide	NA

Tabela 1 - (Continuação) Agrotóxicos estudados no processo de validação com suas respectivas classes e LMR¹.

Agrotóxico	Classe	LMR (mg kg ⁻¹)	Agrotóxico	Classe	LMR (mg kg ⁻¹)
α -HCH	organoclorado	ME	Fipronil	pirazol	NA
Alacloro	cloroacetanilida	NA	Folpete	dicarboximida	NA
Aldrin	organoclorado	ME	Forato	organofosforado	NA
Azoxistrobina	estrobilurina	0,5	γ -HCH (Lindano)	organoclorado	ME
β -endossulfam	clorociclodieno	ME	HCB	organoclorado	ME
β -HCH	organoclorado	ME	Heptacloro	organoclorado	ME
Bifentrina	piretróide	NA	heptacloro-exo-epóxido	organoclorado	NA
Bioaletrina	piretróide	NA	lambda-cialotrina	piretróide	NA
Captana	dicarboximida	NA	Metidationa	organofosforado	NA
Carbofenotiona	organofosforado	ME	Metoxicloro	organoclorado	ME
Ciflutrina	piretróide	NA	Mirex	organoclorado	ME
Cipermetrina	piretróide	NA	Oxifluorfem	éter difenilico	NA
Clortalonil	isofalonitrila	5,0	Permetrina	piretróide	NA
Clorpirifós	organofosforado	NA	Procimidona	dicarboximida	NA
clorpirifós metil	organofosforado	ME	Tetradifona	clorodifenilsulfona	1,0
Deltametrina	piretróide	0,01	Trifluralina	dinitroanilina	0,05
s-HCH	organoclorado	ME	Vinclozolina	dicarboximida	ME
Dicofol	organoclorado	NA	-	-	-

¹ - Consulta de LMR no site da ANVISA em 14/01/2015;

NA - Monografia Não Autorizada para a cultura de pimentão;

ME - Monografia Excluída.

3.1.3 Equipamentos utilizados

Os equipamentos utilizados para preparo de reagente, padrões e amostras, bem como para determinação e quantificação dos resíduos de agrotóxicos, estão descritos na Tabela 2.

Todos os equipamentos utilizados estão de acordo com o padrão de qualidade exigido pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, apresentando suas calibrações, verificações e qualificações em dia, de acordo com o POP 65.1120.013 e o POP 65.3120.117 (INCQS, 2014a, 2014c).

Tabela 2 - Equipamentos utilizados na validação.

Equipamento	Balança analítica	Balança analítica	Centrífuga	Agitador	Unidade evaporadora	Cromatógrafo a gás com detector por micro captura de elétrons
Modelo	XP 205	AG245	TJ6	MS3 Digital	Reacti-Vap III n° 18785	HP7890
Fabricante	Mettler Toledo	Metler Toledo	Beckman	IKA	Pierce	© Agilent

3.1.4 Condições cromatográficas

Cromatógrafo a gás HP 7890 (Agilent Technologies), equipado com detector por micro captura de elétrons (Ni^{63}), sistema de injeção automático e estação de trabalho com o software *ChemStation*. Temperatura do injetor e detector de 230 °C e 300 °C, respectivamente. Coluna 5 % fenil metil siloxano de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme. Programação de temperatura do forno de 80 °C (0 min) @ 30 °C/min até 180 °C (8 min) @ 2 °C/min até 200 °C (5 min) @ 6 °C/min até 280 °C (15 min). Fluxo de gás carreador He (Hélio) de 1,2 mL min^{-1} , fluxo da purga do septo de 2,9 mL min^{-1} , fluxo total de 64,1 mL min^{-1} , fluxo de gás *make up* (Nitrogênio) de 60 mL min^{-1} , modo de injeção *splitless* com abertura da válvula de 0,75 min e volume de injeção de 1,0 μL . Tempo total de corrida de 60 min e integração pelo parâmetro de área de picos.

3.1.5 Padrões e reagentes

Os solventes, reagentes e padrões utilizados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Solventes, reagentes e padrões utilizados na validação.

Solvente/Reagente/Padrão	Fabricante	Lote	Grau de pureza do Padrão
Acetonitrila Lichrosolv	Merck	I550229	-
Ácido acético	Merck	K39438566	-
MgSO_4	Merck	K43535167	-
$\text{Na}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$	Tedia	MR28125A	-
Sorvente Bondesil-PSA 40 μm	Varian	1210207	-
Isooctano grau resíduos	Tedia	601234R	-
Acetato de Etila grau resíduos	Tedia	711268R	-
2,4'-DDD	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	12409	100,0%
2,4'-DDE	AccuStandard	010406KS-AC	100,0%
2,4'-DDT	AccuStandard	16939	98,6%
4,4'-DDD	AccuStandard	14557	97,5%
4,4'-DDE	AccuStandard	18472	100,0%
4,4'-DDT	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	71011	98,5%
alacoloro	AccuStandard	A7090077A	100,0%
aldrin	AccuStandard	072704A6-AC	99,7%
azoxistrobina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	90508	98,5%
bifentrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	624	99,5%

Tabela 3 - (Continuação) Solventes, reagentes e padrões utilizados na validação.

Solvente/Reagente/Padrão	Fabricante	Lote	Grau de pureza do Padrão
bioaletrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	610	96,5%
captana	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	71217	99,5%
carbofenotiona	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	71212	94,0%
ciflutrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	81128	94,5%
cipermetrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	70416	92,0%
clorotalonil	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	70917	98,5%
clorpirifós	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	10222	98,5%
clorpirifós metil	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	526	98,0%
deltametrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	71206	99,0%
dicofol	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	70723	98,8%
dieldrin	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	80905	99,0%
endossulfam sulfato	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	81205	98,5%
endrin	AccuStandard	050403JRAC	98,0%
esfenvalerato	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	80429	99,0%
fenitrotona	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	91028	98,0%
fenpropatrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	20124	99,0%
fenvalerato	AccuStandard	15030	98,9%
fipronil	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	80430	98,8%
folpete	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	91109	98,5%
forato	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	80109	94,5%
HCB	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	71211	99,5%
heptacloro	AccuStandard	990712 LB-1	99,6%
heptacloro-exo-epóxido	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	RM00308	99,0%
lambda-cialotrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	91109	98,0%
metidationa	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	71220	98,5%
metoxicloro	AccuStandard	22435	98,9%
mirex	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	80424	99,0%
oxifluorfem	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	91221	95,5%
permetrina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	80311	94,0%
procimidona	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	90424	99,5%
tetradifona	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	81205	98,5%
trifluralina	AccuStandard	19974	98,5%
vinclozolina	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	91005	99,0%
α -endossulfam	AccuStandard	092507KSAC	100,0%
α -HCH	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	90218	98,0%
β -endossulfam	AccuStandard	102005MT-AC	97,5%
β -HCH	AccuStandard	19825	98,1%
s-HCH	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	41021	98,5%
g-HCH (Lindano)	AccuStandard	S-969	99,3%

3.1.6 Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque (SE) de concentração nominal de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas pela dissolução do padrão sólido contendo, individualmente, $\pm 10 \text{ mg}$ de cada agrotóxico em diferentes solventes (isooctano e acetato de etila), considerando sua solubilidade e o grau de pureza. As soluções foram identificadas e armazenadas em frasco âmbar e estocadas no freezer ($-10 \text{ }^\circ\text{C}$ à $-25 \text{ }^\circ\text{C}$), até o momento de uso.

A partir dessas soluções foram preparadas em solvente isooctano soluções intermediárias (SI) de mistura de agrotóxicos em diferentes faixas de concentrações, a fim de serem utilizadas para fortificação e curva de calibração, conforme apresentado na Tabela 4 e Tabela 5. Todas as soluções foram preparadas de acordo com o POP 65.3120.096 (INCQS, 2014b).

Os agrotóxicos avaliados foram divididos em três misturas - 1, 2 e 3. A escolha dos agrotóxicos para compor cada mistura foi feita de modo a acomodar todos os analitos pesquisados sem sobreposição de tempo de retenção, possibilitando uma separação inequívoca de todas as substâncias avaliadas.

Tabela 4 - Concentrações reais das soluções de fortificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Agrotóxico	MISTURA 1		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3
	$0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$	$1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	$2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$
trifluralina	0,1683	0,8416	2,1040
HCB	0,1758	0,8792	2,1980
clorotalonil	0,3238	1,6192	4,0480
vinclozolina	0,1704	0,8520	2,1300
fenitrotiona	0,2080	1,0400	2,6000
dicofol	0,3587	1,7936	4,4840
captana	0,3370	1,6848	4,2120
folpete	0,3344	1,6720	4,1800
2,4'-DDE	0,1616	0,8080	2,0200
dieldrin	0,1610	0,8048	2,0120
b-endossulfam	0,1987	0,9936	2,4840
endrin	0,3395	1,6976	4,2440
endossulfam sulfato	0,1734	0,8672	2,1680
bifentrina	0,3296	1,6480	4,1200
tetradifona	0,1662	0,8312	2,0780
permetrina	0,3126	1,5632	3,9080
fenvalerato	0,3277	1,6384	4,0960
azoxistrobina	0,6430	3,2152	8,0380

Tabela 4 - (Continuação) Concentrações reais das soluções de fortificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

MISTURA 2			
Agrotóxico	Nível 1	Nível 2	Nível 3
	$0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$	$1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	$2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$
forato	0,3187	1,5936	3,9840
β -HCH	0,1338	0,6688	1,6720
δ -HCH	0,1595	0,7976	1,9940
alacloro	0,3286	1,6432	4,1080
clorpirifós	0,1648	0,8240	2,0600
hepta.-exo-epóxido	0,1613	0,8064	2,0160
bioaletrina	0,3104	1,5520	3,8800
metidationa	0,6499	3,2496	8,1240
α -endossulfam	0,1517	0,7584	1,8960
2,4'-DDD	0,1126	0,5632	1,4080
4,4'-DDD	0,1595	0,7976	1,9940
4,4'-DDT	0,1629	0,8144	2,0360
metoxicloro	0,1597	0,7984	1,9960
mirex	0,1749	0,8744	2,1860
ciflutrina	0,3498	1,7488	4,3720
esfenvalerato	0,3264	1,6320	4,0800
MISTURA 3			
Agrotóxico	Nível 1	Nível 2	Nível 3
	$0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$	$1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$	$2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$
α -HCH	0,3210	1,6048	4,0120
γ -HCH (Lindano)	0,1781	0,8906	2,2264
clorpirifós metil	0,1680	0,8400	2,1000
heptacloro	0,1342	0,6712	1,6780
aldrin	0,1136	0,5680	1,4200
fipronil	0,6411	3,2056	8,0140
procimidona	0,3552	1,7760	4,4400
4,4'-DDE	0,1744	0,8720	2,1800
oxifluorfem	0,3267	1,6336	4,0840
2,4'-DDT	0,1608	0,8040	2,0100
carbofenotiona	0,3328	1,6640	4,1600
fempropatrina	0,3392	1,6960	4,2400
lambda-cialotrina	0,3187	1,5936	3,9840
cipermetrina	0,3142	1,5712	3,9280
deltametrina	0,6424	3,2120	8,0300

Tabela 5 - Concentrações reais das soluções da curva analítica.

MISTURA 1						
Agrotóxicos	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6
	$0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,15 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$
Trifluralina	0,0042	0,0084	0,0421	0,0842	0,1683	0,2525
HCB	0,0044	0,0088	0,0440	0,0879	0,1758	0,2638
Clorotalonil	0,0081	0,0162	0,0810	0,1619	0,3238	0,4858
Vinclozolina	0,0043	0,0085	0,0426	0,0852	0,1704	0,2556
Fenitrotona	0,0052	0,0104	0,0520	0,1040	0,2080	0,3120
Dicofol	0,0090	0,0179	0,0897	0,1794	0,3587	0,5381
Captana	0,0084	0,0168	0,0842	0,1685	0,3370	0,5054
Folpete	0,0084	0,0167	0,0836	0,1672	0,3344	0,5016

Tabela 5 - (Continuação) Concentrações reais das soluções da curva analítica.

MISTURA 1						
Agrotóxicos	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6
	0,005 µg.ml ⁻¹	0,01 µg.ml ⁻¹	0,05 µg.ml ⁻¹	0,1 µg.ml ⁻¹	0,15 µg.ml ⁻¹	0,2 µg.ml ⁻¹
2,4'-DDE	0,0040	0,0081	0,0404	0,0808	0,1616	0,2424
dieldrin	0,0040	0,0080	0,0402	0,0805	0,1610	0,2414
beta-endossulfam	0,0050	0,0099	0,0497	0,0994	0,1987	0,2981
endrin	0,0085	0,0170	0,0849	0,1698	0,3395	0,5093
endossulfam sulfato	0,0043	0,0087	0,0434	0,0867	0,1734	0,2602
bifentrina	0,0082	0,0165	0,0824	0,1648	0,3296	0,4944
tetradifona	0,0042	0,0083	0,0416	0,0831	0,1662	0,2494
permetrina	0,0078	0,0156	0,0782	0,1563	0,3126	0,4690
fenvalerato	0,0082	0,0164	0,0819	0,1638	0,3277	0,4915
azoxistrobina	0,0161	0,0322	0,1608	0,3215	0,6430	0,9646
MISTURA 2						
Agrotóxicos	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6
	0,005 µg.ml ⁻¹	0,01 µg.ml ⁻¹	0,05 µg.ml ⁻¹	0,1 µg.ml ⁻¹	0,15 µg.ml ⁻¹	0,2 µg.ml ⁻¹
forato	0,0080	0,0159	0,0797	0,1594	0,3187	0,4781
beta-HCH	0,0033	0,0067	0,0334	0,0669	0,1338	0,2006
delta-HCH	0,0040	0,0080	0,0399	0,0798	0,1595	0,2393
alaclo	0,0082	0,0164	0,0822	0,1643	0,3286	0,4930
clorpirifós	0,0041	0,0082	0,0412	0,0824	0,1648	0,2472
hepta-exo-epóxido	0,0040	0,0081	0,0403	0,0806	0,1613	0,2419
bioaletrina	0,0078	0,0155	0,0776	0,1552	0,3104	0,4656
metidationa	0,0162	0,0325	0,1625	0,3250	0,6499	0,9749
alfa-endossulfam	0,0038	0,0076	0,0379	0,0758	0,1517	0,2275
2,4'-DDD	0,0028	0,0056	0,0282	0,0563	0,1126	0,1690
4,4'-DDD	0,0040	0,0080	0,0399	0,0798	0,1595	0,2393
4,4'-DDT	0,0041	0,0081	0,0407	0,0814	0,1629	0,2443
metoxicloro	0,0040	0,0080	0,0399	0,0798	0,1597	0,2395
mirex	0,0044	0,0087	0,0437	0,0874	0,1749	0,2623
ciflutrina	0,0087	0,0175	0,0874	0,1749	0,3498	0,5246
esfenvalerato	0,0082	0,0163	0,0816	0,1632	0,3264	0,4896
MISTURA 3						
Agrotóxicos	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6
	0,005 µg.ml ⁻¹	0,01 µg.ml ⁻¹	0,05 µg.ml ⁻¹	0,1 µg.ml ⁻¹	0,15 µg.ml ⁻¹	0,2 µg.ml ⁻¹
alfa-HCH	0,0080	0,0160	0,0802	0,1605	0,3210	0,4814
gama-HCH (Lindano)	0,0045	0,0089	0,0445	0,0891	0,1781	0,2672
clorpirifós metil	0,0042	0,0084	0,0420	0,0840	0,1680	0,2520
heptacloro	0,0034	0,0067	0,0336	0,0671	0,1342	0,2014
aldrin	0,0028	0,0057	0,0284	0,0568	0,1136	0,1704
fipronil	0,0160	0,0321	0,1603	0,3206	0,6411	0,9617
procimidona	0,0089	0,0178	0,0888	0,1776	0,3552	0,5328
4,4'-DDE	0,0044	0,0087	0,0436	0,0872	0,1744	0,2616
oxifluorfem	0,0082	0,0163	0,0817	0,1634	0,3267	0,4901
2,4'-DDT	0,0040	0,0080	0,0402	0,0804	0,1608	0,2412
carbofenotona	0,0083	0,0166	0,0832	0,1664	0,3328	0,4992
fempropatrina	0,0085	0,0170	0,0848	0,1696	0,3392	0,5088
lambda-cialotrina	0,0080	0,0159	0,0797	0,1594	0,3187	0,4781
cipermetrina	0,0079	0,0157	0,0786	0,1571	0,3142	0,4714
deltametrina	0,0161	0,0321	0,1606	0,3212	0,6424	0,9636

3.1.7 Método de ensaio

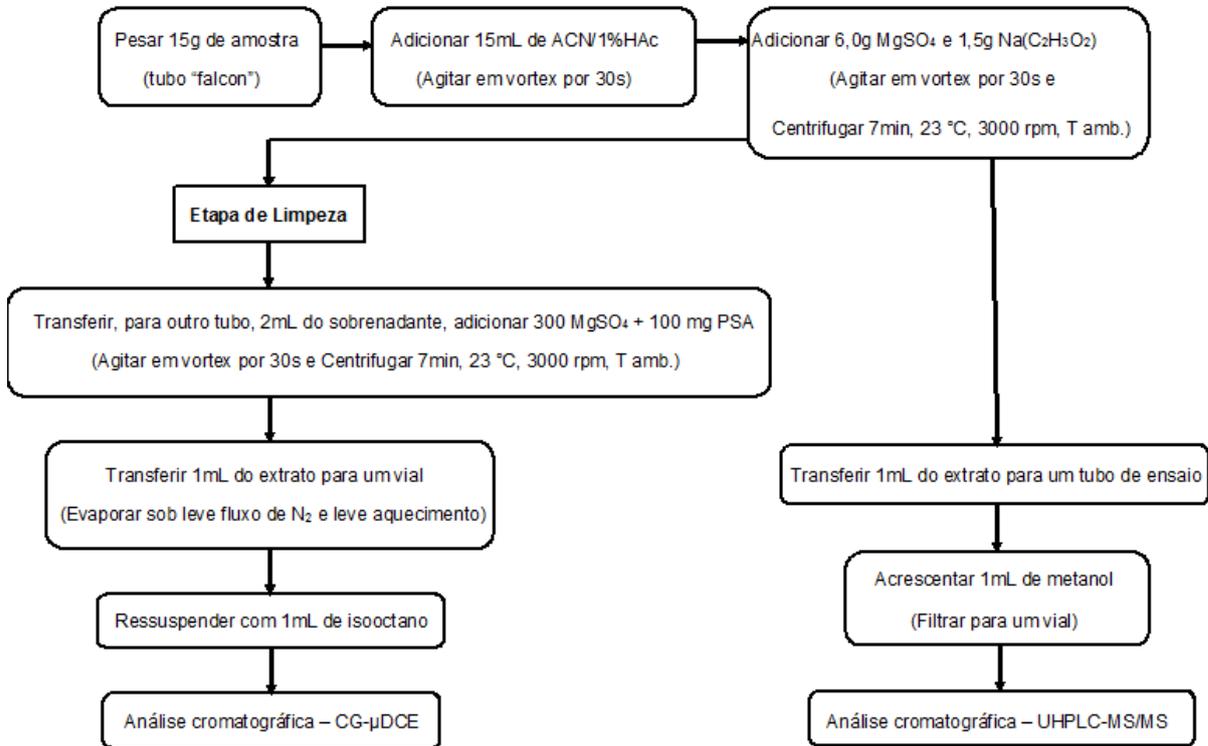
O método de extração multirresíduos utilizado neste estudo foi o método QuEChERS modificado.

Foi realizada a pesagem de ± 15 g de amostra (polpa de pimentão previamente processada) em um tubo de centrífuga de polipropileno – tipo “*falcon*” (capacidade 50,0 mL). Para a etapa de fortificação, foi adicionado 1,0 mL de solução de fortificação com concentração conhecida para cada um dos três níveis de cada mistura estudada (descrito na Tabela 4) à amostra processada. Agitou-se no vórtex por 30 s e aguardou-se 15 min. Em seguida, na etapa de extração, 15 mL de acetonitrila (ACN) contendo 1% de ácido acético (HAc) foram adicionados, seguido por agitação em vórtex por 30 s. Após, para a realização da etapa de partição, foram adicionados 6,0 g de sulfato de magnésio (MgSO_4) e 1,5 g de acetato de sódio (NaOAc), repetida a etapa de agitação e o tubo foi centrifugado a 3000 rpm durante 7 min. Para a etapa de purificação, uma alíquota de 2,0 mL do sobrenadante (extrato orgânico) foi retirada e transferida para um outro tubo de centrífuga de polipropileno (capacidade 15,0 mL) contendo 100,0 mg de amina primária-secundária (PSA - *primary secondary amine*) e 300,0 mg de MgSO_4 , seguido pelas etapas de agitação e centrifugação. Uma alíquota de 1,0 mL do extrato orgânico final foi retirada e transferida para um vial contendo uma pedra de *carborundum*, evaporado sob leve fluxo de nitrogênio (N_2) até a secura. Após, o extrato seco foi ressuspendido em 1,0 mL de isooctano para a análise cromatográfica, de acordo com as condições estabelecidas no item 3.1.4.

Um estudo prévio na etapa de limpeza foi realizado, a fim de avaliar a influência da etapa de purificação na exatidão do método. Assim na etapa de limpeza foram testadas, na mistura 1, quatro diferentes fases a serem utilizadas na extração em fase sólida dispersiva: MgSO_4/PSA , $\text{MgSO}_4/\text{PSA}/\text{C}_{18}$, $\text{MgSO}_4/\text{PSA}/\text{C}_{18}/\text{carvão ativo}$ e $\text{MgSO}_4/\text{PSA}/\text{carvão ativo}$.

Na Figura 1 encontra-se o fluxograma da extração pelo método QuEChERS modificado utilizado para essa validação.

Figura 1 - Fluxograma da extração pelo método QuEChERS modificado utilizado na validação.



3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os parâmetros avaliados na validação foram seletividade, linearidade, faixa de trabalho, efeito matriz, LD, LQ, precisão como repetibilidade e exatidão como recuperação. A avaliação de desempenho e critérios de aceitação dos resultados obtidos foram avaliados em função dos parâmetros estudados e critérios de aceitação definidos no CODEX e no SANCO.

3.2.1 Seletividade

A seletividade foi verificada a partir da análise do extrato orgânico da polpa de pimentão quanto à ausência de resíduos de agrotóxicos estudados identificados por CG-μDCE, que possam interferir na sua determinação, apresentando um resultado positivo com a ausência do agrotóxico (avaliação do branco).

Para a comprovação da seletividade do método - avaliação se a mesma poderia ser utilizada como a amostras branco - foram analisadas duas alíquotas da amostra de pimentão.

3.2.2 Linearidade, Faixa de trabalho e Efeito Matriz

Para avaliação desses parâmetros, foram construídas curvas analíticas em solvente isooctano e no extrato orgânico da polpa de pimentão. Para preparação da curva na matriz, 1 mL do extrato orgânico do branco da polpa de pimentão foi evaporado sob atmosfera de N₂ e após securo dissolvido em 1 mL da mistura de agrotóxico em solvente com concentração correspondente ao ponto da curva analítica. Esse procedimento foi realizado para os seis pontos da curva - três misturas estudadas - preparadas em solvente e matriz e injetadas duas vezes no CG-μDCE.

As concentrações referentes ao intervalo de trabalho estudado, utilizadas na curva analítica estão descritas na Tabela 5.

A linearidade da faixa de trabalho foi verificada através da leitura da curva analítica utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários de acordo com relação linear, verificando a existência de valores aberrantes, a homogeneidade na variância dos resíduos da regressão e a significância da regressão.

Para a determinação de valores aberrantes observados nas respostas representadas pelas áreas cromatográficas, foi realizado o teste de *Grubbs*, a partir da equação a seguir, para o nível de significância $p = 0,05$ (95% de confiança).

$$G_{\text{cal}} = \frac{(y_{ij} - \bar{y}_i)}{s_{ij}}$$

Onde: y_{ij} é o valor suspeito de ser aberrante;

\bar{y}_i é a média dos valores obtidos para uma determinada concentração i ;

s_{ij} é o desvio padrão dos valores obtido.

A avaliação da condição de homoscedasticidade dos resíduos foi realizada através do método de *Cochran*, representado pela seguinte equação:

$$C_{\text{cal}} = \frac{S^2_{\text{max}}}{\sum S^2}$$

Onde: S^2_{max} é a variância máxima;

$\sum S^2$ é o somatório das variâncias.

Após verificação da homogeneidade na variância dos resíduos da regressão na faixa de trabalho, verificou-se o ajuste dos valores obtidos pela equação a seguir, considerando um valor de $r \geq 0,98$ e $R^2 \geq 0,95$ que são aceitáveis nas análises de resíduos de agrotóxicos.

$$y = a + bx$$

Onde: **y** é a variável dependente que corresponde à resposta medida (ex: área do pico cromatográfico);

x é a variável independente que corresponde à concentração do analito contida nas amostras de calibração e fortificadas;

a é o coeficiente linear;

b é o coeficiente angular.

Para avaliação do efeito matriz, comparou-se o conjunto de áreas medidas das soluções da curva analítica preparada em solvente isooctano com as preparadas com o extrato branco da polpa de pimentão para cinco níveis de concentração – excluindo o menor ponto. Foram aplicados aos dados os testes *F* (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste *t* (*Student*) de comparação de médias, através do aplicativo Excel®.

3.2.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os LD e LQ do método foram calculados a partir da avaliação da relação da razão sinal/ruído (S/N) para cada agrotóxico avaliado, ou seja, o sinal produzido através da resposta de injeção de uma concentração conhecida do analito de interesse é 3 vezes maior para o LD e 10 vezes maior para o LQ, do que o sinal produzido pelo ruído da linha de base do sistema cromatográfico. As equações abaixo descrevem o cálculo da concentração equivalente a esses valores:

$$LD_{\text{calculado}} = \frac{LD_{\text{est.}} \times 3 \times s}{\bar{X}} \qquad LQ_{\text{calculado}} = \frac{LQ_{\text{est.}} \times 10 \times s}{\bar{X}}$$

Onde : **LD_{est}** é o limite de detecção estimado, concentração injetada;

LQ_{est} é o limite de quantificação estimado, concentração injetada;

S é o desvio padrão das leituras:

\bar{X} é a média das respostas.

Para calcular estes parâmetros, foram injetados seis vezes $1\mu\text{L}$ de uma amostra de pimentão fortificado com as misturas 1, 2 e 3, no nível 2 da faixa linear, contendo os 49 agrotóxicos na concentração nominal entre $0,01$ a $0,04\ \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2.4 Precisão (repetibilidade) e Exatidão (taxa de recuperação).

Para avaliação da precisão, foi realizado o estudo de repetibilidade, onde preparou-se amostras em cinco replicatas de polpa de pimentão fortificado com as três misturas de estudo nos 3 níveis diferentes de concentração e injetadas duas vezes cada. Na Tabela 4 são apresentadas as concentrações de fortificação das misturas bem como as concentrações pontuais utilizadas nesta etapa. O primeiro nível de fortificação - nível 1 (correspondente ao nível 2 da curva analítica) foi utilizado para confirmação do LQ do método calculado a partir dos valores observados através da relação S/N.

A repetibilidade foi expressa pela dispersão dos resultados entre todas as replicatas em cada nível de concentração estudada, o valor de DPR aceitável é de $\leq 20\%$ (SANCO, 2014).

$$\text{DPR ou CV (\%)} = \frac{(S_j * 100)}{y}$$

y

Onde: CV (%) é o coeficiente de variação para cada nível i de concentração;

S_j é o desvio padrão das leituras j no nível de concentração estudado;

y é a média dos resultados obtidos.

Para avaliação da exatidão, foi realizado o estudo de recuperação, que preparou-se amostras em cinco replicatas de polpa de pimentão fortificado com as três misturas de estudo em 3 níveis diferentes de concentração e injetadas duas vezes cada. Na Tabela 4 são apresentadas as concentrações de fortificação das

misturas bem como as concentrações pontuais utilizadas nesta etapa. O primeiro nível de fortificação - nível 1 (correspondente ao nível 2 da curva analítica) foi utilizado para confirmação do LQ do método calculado a partir dos valores observados através da relação S/N.

A taxa de recuperação foi calculada pela divisão entre a concentração média experimental com a concentração média teórica multiplicada por 100. A faixa de variação aceitável é de 70 – 120% (SANCO, 2014) para as concentrações estudadas e foi expressa para cada nível de concentração estudada.

$$\text{RECUPERAÇÃO} = \frac{\text{concentração experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

3.3 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.3.1 Amostras

Os pimentões utilizados para avaliação de resíduos de agrotóxicos pelo CG- μ DCE e UHPLC-ESI-MS/MS, foram adquiridos no mercado local do município do Rio de Janeiro.

3.3.2 Processamento das amostras

Os pimentões foram processados conforme descrito anteriormente no item 3.1.1.

3.3.3 Agrotóxicos avaliados

Foram avaliados 228 agrotóxicos pelas duas metodologias validadas no Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do INCQS, 47 por CG- μ DCE (39 validados para o pimentão) e 181 por UHPLC-ESI-MS/MS (125 validados para o pimentão). A Tabela 6 descreve os agrotóxicos avaliados, destacando em negrito as substâncias não validadas para a matriz pimentão, as quais sendo encontradas, serão abordadas qualitativamente.

Tabela 6 - Agrotóxicos analisados nas amostras avaliadas por CG- μ DCE e UHPLC-ESI-MS/MS.

Agrotóxico CG- μ DCE	Agrotóxico UHPLC-ESI-MS/MS	Agrotóxico UHPLC-ESI-MS/MS	Agrotóxico UHPLC-ESI-MS/MS	Agrotóxico UHPLC-ESI-MS/MS
2,4'-DDD	3-OH-Carbofurano	Difenoconazol	Halofenosídeo	Piridafentona
2,4'-DDE	Abamectina	Diflubenzuron	Hexaconazol	Pirifenox
2,4'-DDT	Acefato	Dimetoato	Hexitiazoxi	Pirimetanil
4,4'-DDD	Acetamiprido	Dimetomorfe	Imazalil	Primicarbe
4,4'-DDE	Aldicarbe	Dimoxistrobina	Imidacloprido	Primicarbe Desmetil
4,4'-DDT	Aldicarbe Sulfona	Diniconazol	Indoxacarbe	Pirimifós Etilico
Alacloro	Aldicarbe Sulfóxido	Dissulfotom	lprovalicarbe	Pirimifós Metílico
Aldrin	Ametrina	Diuron	Isoprotioloa	Piriproxifem
Bifentrina	Atrazina	DMSA	Isoxaflutol	Procloraz
Bioaletrina	Azaconazol	DMST	Isoxationa	Profenofós
Captana	Azametifós	Dodemorfe	Linurom	Propargito
Carbofenotona	Azinfós Etilico	Epoxiconazol	Malationa	Propiconazol
Ciflutrina	Azinfós Metílico	Espinosade	Mefenacete	Propizamida
Cipermetrina	Azoxistrobina	Espirodiclofen	Mefosfolan	Propoxur
Clorotalonil	Benalaxil	Espiroxamina	Mepanipirim	Quinalfós
Clorpirifós	Bitertanol	Etiofencarbe Sulfona	Mepronil	Tebuconazol
Clorpirifós Metil	Boscalida	Etiofencarbe Sulfóxido	Metalaxil	Tebufenosida
Deltametrina	Bromuconazol	Etiona	Metamidofós	Tebufenpirade
Dicofol	Bupirimato	Etiprole	Metconazol	Terbufós
Dieldrin	Buprofezina	Etirimol	Metidationa	Tetraconazol
Endossulfam Sulfato	Butocarboxim Sulfóxido	Etofenproxi	Metiocarbe	Tiabendazol
Endrin	Cadusafós	Etoprofós	Metiocarbe Sulfona	Tiacloprido
Esfenvalerato	Carbaril	Etrinfós	Metiocarbe Sulfóxido	Tiametoxam
Fempropatrina	Carbendazim	Famoxadona	Metobromuron	Tiobencarbe
Fenitrotrona	Carbofurano	Fenamidona	Metomil	Tiodicarbe
Fenvalerato	Carbossulfano	Fenamifós	Metoxifenosida	Tiofanato Metílico
Fipronil	Carpropamida	Fenarimol	Metoxuron	Tiofanox Sulfona
Folpete	Ciazofamida	Fenazaquina	Mevinfós	Tiofanox Sulfóxido
Forato	Cimoxanil	Fenbuconazol	Miclobutanil	Tolclofós Metílico
g-HCH (Lindano)	Ciproconazol	Fenhexamida	Monocrotofós	Tolifluanida
HCB	Ciprodinil	Fenoxicarbe	Monolinuron	Triadimefon
Heptacloro	Ciromazina	Fenpiroximato	Nitenpiran	Triadimenol
Lambda-Cialotrina	Clofentezina	Fenpropidina	Nuarimol	Triazofós
Metidationa	Clorbromuron	Fenpropimorfe	Ometoato	Triciclozol
Metoxicloro	Clorfenvinfós	Fentiona	Oxadixil	Triclorfon
Mirex	Clorpirifós	Fentiona Sulfóxido	Oxamil	Trifloxistrobina
Oxifluorfem	Clorpirifós Metílico	Fentoato	Oxamil Oxima	Triflumizol
Permetrina	Clotianidina	Fluazifope-p-butílico	Oxicarboxina	Triticonazol
Procimidona	Coumafós	Flufenacete	Paclobutrazol	Vamidotiona
s-HCH	Cresoxim Metílico	Flufenoxuron	Pencicuum	Zoxamida
Tetradifona	Demeton-S-Metílico	Fluquinconazol	Penconazol	-
Trifluralina	Desmedifan	Flusilasol	Picoxistrobina	-
Vinclozolina	Diazinona	Flutriafol	Pimetrozina	-

Tabela 6 - (Continuação) Agrotóxicos analisados nas amostras avaliadas por CG- μ DCE e UHPLC-ESI-MS/MS.

Agrotóxico CG- μ DCE	Agrotóxico UHPLC-ESI-MS/MS	Agrotóxico UHPLC-ESI-MS/MS	Agrotóxico UHPLC-ESI-MS/MS	Agrotóxico UHPLC-ESI-MS/MS
α -endossulfam	Diclofuanida	Fosalona	Piperonil Butóxido	-
α -HCH	Diclorvós	Fosfamidona	Piraclostrobina	-
β -endossulfam	Dicrotofós	Fosmete	Pirazofós	-
β -HCH	Dietofencarbe	Furatiocarbe	Piridaben	-

Em negrito - agrotóxicos que não foram validados.

3.3.4 Equipamentos utilizados

Os equipamentos utilizados para o preparo de reagente, padrões e amostras, foram os mesmos descritos no item 3.1.3. Para a determinação e quantificação dos resíduos de agrotóxicos, foram utilizados dois equipamentos:

- o CG- μ DCE - descrição no item 3.1.3;
- o CGAR-EM (IE) - utilizado na confirmação das substâncias encontradas - é um cromatógrafo a gás com detector por espectrometria de massas do tipo quadrupolo, cromatógrafo modelo 6890N e detector de massas 5973, fabricante Agilent. O equipamento está ligado à uma estação de trabalho com software *ChemStation*.
- o UHPLC-ESI-MS/MS - é um cromatógrafo líquido de ultra eficiência com detector por espectrometria de massas sequencial do tipo triploquadrupolo, modelo ACQUITY UPLC™ e fabricante Waters. O equipamento está ligado à uma estação de trabalho com software MassLynx™.

3.3.5 Condições cromatográficas

As condições para o CG- μ DCE foram descritas anteriormente no item 3.1.4.

O cromatógrafo a gás 6890N/5973 (Agilent), equipado com espectrômetro de massas, sistema de injeção automático e estação de trabalho com o software *ChemStation*; temperatura do injetor (modo *splitless*) 270 °C; coluna DB 17 ms; programação de temperatura do forno de 100 °C (1 min) @ 20 °C/min até 250 °C @ 5 °C/min até 300 °C (11,5 min); fluxo de gás carreador He (Hélio) de 1,0 mL min⁻¹. Temperatura da fonte de ionização por impacto de elétrons de 230°C e voltagem de

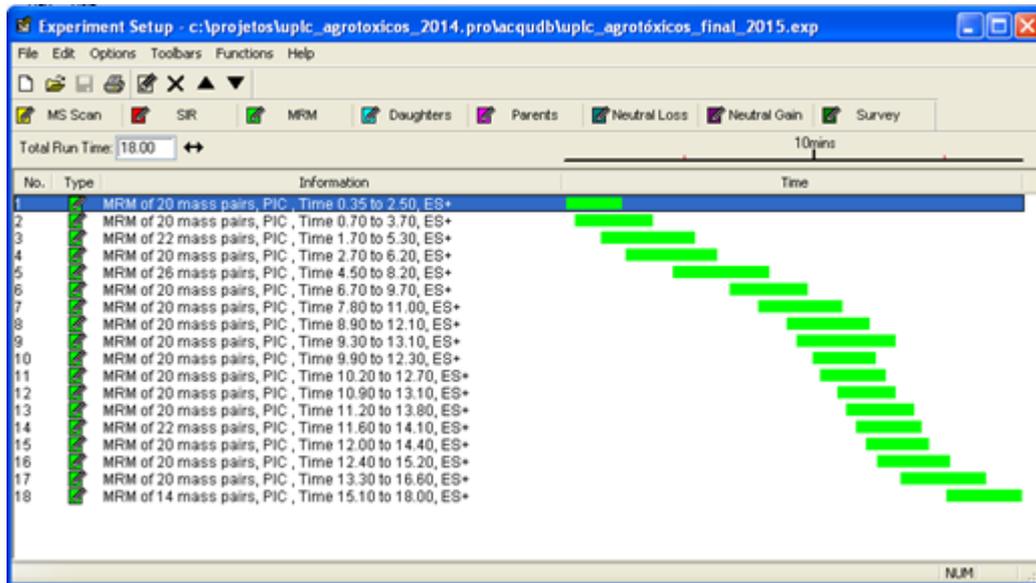
70 eV; temperatura do quadrupolo de 150°C. Monitoramento por modo de rastreamento de íons específicos (SIM).

Cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC™ (Waters), equipado com um sistema binário de bombas, injetor automático, degaseificador, forno para a coluna e detector de espectrometria de massas sequencial do tipo triploquadrupolo - Quattro Premier XE™, com uma fonte de ionização ESI - Z-Spray™, operando no modo positivo (ES⁺) e estação de trabalho MassLynx™ Versão 4.1. Coluna de separação cromatográfica de fase reversa UPLC™ BEH C₁₈ com 1,7 µm de tamanho de partícula esférica, 2,1 mm de diâmetro interno, 100 mm de comprimento e pré-coluna VanGuard™ BEH C₁₈ com 1,7 µm de tamanho de partícula esférica. Temperatura da coluna 35°C. Fase móvel A – 5 mmol L⁻¹ formato de amônio em água (10% metanol) mais 0,1% ácido fórmico e fase móvel B – metanol, com vazão de 0,3 mL min⁻¹. Volume de injeção de 5 µL. O gradiente de eluição utilizado foi: fase móvel A inicialmente com 82,5 % (v/v) e fase móvel B com 17,5 % (v/v) com 17 min de rampa linear até atingir fase móvel A 5,5 % (v/v) e fase móvel B 94,5 % (v/v), passando para a condição inicial em rampa linear por 3 min. Voltagem capilar 0,98 kV, temperatura da fonte de ionização do tipo electrospray (Z-Spray™) de 110°C e fluxo do gás do cone de 50 L h⁻¹ de nitrogênio. Temperatura de dessolvatação de 400°C, gás de dessolvatação nitrogênio ultra puro com fluxo de 800 L h⁻¹ e gás de colisão argônio com pressão de 3,1 x 10⁻³ mbar. Tempo total de corrida de 25 min.

As condições de operação do espectrômetro de massas foram otimizadas para modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), através da indicação dos íons precursores e íons fragmentos, e ajustados com a mistura para diferentes programas de gradiente. Os íons foram separados em 18 janelas de tempo contendo no máximo 26 transições por janela, por MRM e o íon de maior e menor abundância selecionados para a quantificação e confirmação, respectivamente.

Na Figura 2 está descrita a distribuição MRM em janelas de tempo baseada no tempo de retenção dos agrotóxicos avaliados.

Figura 2 - Representação das 18 diferentes janelas de tempo programado para aquisição de dados no método UHPLC-ESI-MS/MS.



Fonte: MassLynx 4.1 SCN627.

3.3.6 Padrões e reagentes

Foram utilizados os mesmos solventes e reagentes descritos na Tabela 3. Para a análise no UHPLC-ESI-MS/MS foram necessários mais solventes e reagentes, que estão apresentados na Tabela 7. Os padrões utilizados foram descritos na Tabela 6.

Tabela 7 - Solventes e reagentes utilizados na análise no UHPLC-ESI-MS/MS.

Solvente/Reagente	Fabricante	Lote
Ácido Fórmico	43008168137/027	Merck
Formato de Amônio	#0001386428	Fluka Analytical
Metanol	12110070	Tedia

3.3.7 Preparo das soluções analíticas

As soluções utilizadas para avaliação das amostras no CG- μ DCE e UHPLC-ESI-MS/MS foram preparadas conforme descrito no item 3.1.6, sendo as SI

preparadas somente para a curva de calibração, conforme apresentado na Tabela 8 e Tabela 9. A mistura feita para a análise no UHPLC-ESI-MS/MS foi preparada em metanol acidificado (0,02 % de ácido acético).

Tabela 8 - Concentrações reais das soluções da curva de calibração do CG- μ DCE.

MISTURA 1			
Agrotóxico	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
	0,01 - 0,04	0,07 - 0,3	0,2 - 0,9
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$
trifluralina	0,0102	0,0820	0,2459
HCB	0,0110	0,0879	0,2638
clorotalonil	0,0095	0,0758	0,2275
vinclozolina	0,0092	0,0732	0,2196
fenitrotona	0,0130	0,1040	0,3120
dicofol	0,0224	0,1794	0,5381
captana	0,0360	0,2878	0,8633
folpete	0,0218	0,1741	0,5222
2,4'-DDE	0,0104	0,0832	0,2496
dieldrin	0,0106	0,0851	0,2552
beta-endossulfam	0,0178	0,1424	0,4271
endrin	0,0212	0,1698	0,5093
endossulfam sulfato	0,0107	0,0859	0,2577
bifentrina	0,0208	0,1661	0,4982
tetradifona	0,0105	0,0841	0,2522
permetrina	0,0213	0,1707	0,5121
fenvalerato	0,0212	0,1693	0,5078
MISTURA 2			
Agrotóxico	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
	0,01 - 0,08	0,07 - 0,7	0,2 - 2,0
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$
forato	0,0839	0,6710	2,0129
beta-HCH	0,0084	0,0669	0,2006
delta-HCH	0,0108	0,0865	0,2594
alacoloro	0,0218	0,1741	0,5222
clorpirifós	0,0107	0,0856	0,2567
bioaletrina	0,0219	0,1749	0,5248
metidationa	0,0235	0,1878	0,5634
alfa-endossulfam	0,0167	0,1336	0,4008
2,4'-DDD	0,0172	0,1378	0,4133
4,4'-DDD	0,0203	0,1621	0,4862
4,4'-DDT	0,0097	0,0774	0,2323
metoxicloro	0,0103	0,0823	0,2469
mirex	0,0089	0,0715	0,2146
ciflutrina	0,0226	0,1812	0,5435
esfenvalerato	0,0206	0,1651	0,4954

Tabela 8 - (Continuação) Concentrações reais das soluções da curva de calibração do CG- μ DCE.

MISTURA 3			
Agrotóxico	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
	0,01 - 0,04	0,07 - 0,3	0,2 - 1,0
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$
alfa-HCH	0,0205	0,1640	0,4920
gama-HCH (Lindano)	0,0100	0,0804	0,2411
clorpirifós metil	0,0104	0,0830	0,2491
heptacloro	0,0084	0,0671	0,2014
aldrin	0,0101	0,0806	0,2417
fipronil	0,0419	0,3351	1,0054
procimidona	0,0215	0,1724	0,5171
4,4'-DDE	0,0107	0,0859	0,2578
oxifluorfem	0,0202	0,1616	0,4848
2,4'-DDT	0,0101	0,0806	0,2418
carbofenotiona	0,0102	0,0816	0,2448
fempropatrina	0,0212	0,1700	0,5099
lambda-cialotrina	0,0199	0,1594	0,4781
cipermetrina	0,0217	0,1733	0,5198
deltametrina	0,0208	0,1662	0,4987

Tabela 9 - Concentrações reais das soluções da curva de calibração do UHPLC-ESI-MS/MS.

Agrotóxico	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7
	0,004 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,016 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,032 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,064 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,096 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,128 $\mu\text{g mL}^{-1}$
3-OH-Carbofurano	0,0034	0,0068	0,0137	0,0274	0,0547	0,0821	0,1095
Abamectina	0,0043	0,0086	0,0172	0,0344	0,0688	0,1032	0,1377
Acefato	0,0048	0,0095	0,0191	0,0382	0,0763	0,1145	0,1528
Acetamiprido	0,0040	0,0080	0,0159	0,0318	0,0637	0,0955	0,1275
Aldicarbe	0,0041	0,0081	0,0162	0,0324	0,0648	0,0972	0,1297
Aldicarbe Sulfona	0,0040	0,0081	0,0161	0,0322	0,0645	0,0967	0,129
Aldicarbe Sulfóxido	0,0042	0,0084	0,0168	0,0337	0,0674	0,1010	0,1346
Ametrina	0,0044	0,0089	0,0178	0,0355	0,0710	0,1066	0,1419
Atrazina	0,0041	0,0082	0,0164	0,0327	0,0654	0,0982	0,1308
Azaconazol	0,0041	0,0082	0,0164	0,0329	0,0658	0,0986	0,1314
Azametifós	0,0041	0,0081	0,0162	0,0324	0,0648	0,0972	0,1295
Azinfós Etilico	0,0042	0,0084	0,0168	0,0335	0,0670	0,1006	0,1342
Azinfós Metílico	0,0035	0,0070	0,0140	0,0281	0,0562	0,0842	0,1124
Azoxistrobina	0,0035	0,0069	0,0138	0,0276	0,0552	0,0828	0,1105
Benalaxil	0,0050	0,0101	0,0202	0,0403	0,0806	0,1210	0,1612
Bitertanol	0,0040	0,0080	0,0159	0,0318	0,0637	0,0955	0,1272
Boscalida	0,0040	0,0080	0,0160	0,0320	0,0640	0,0960	0,128
Bromuconazol	0,0044	0,0088	0,0176	0,0351	0,0702	0,1054	0,1405
Bupirimato	0,0044	0,0087	0,0175	0,0350	0,0699	0,1049	0,14
Buprofezina	0,0041	0,0081	0,0162	0,0325	0,0650	0,0974	0,1298
Butocarboxim Sulfóxido	0,0040	0,0081	0,0161	0,0322	0,0645	0,0967	0,129
Cadusafós	0,0043	0,0086	0,0171	0,0342	0,0685	0,1027	0,1369
Carbaril	0,0042	0,0084	0,0168	0,0335	0,0670	0,1006	0,1341
Carbendazim	0,0046	0,0091	0,0182	0,0365	0,0730	0,1094	0,1459
Carbofurano	0,0040	0,0080	0,0159	0,0318	0,0637	0,0955	0,1273
Carbossulfano	0,0044	0,0088	0,0175	0,0350	0,0701	0,1051	0,1401
Carpropamida	0,0040	0,0080	0,0160	0,0321	0,0642	0,0962	0,1282

Tabela 9 - (Continuação) Concentrações reais das soluções da curva de calibração do UHPLC-ESI-MS/MS.

Agrotóxico	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7
	0,004 µg mL ⁻¹	0,008 µg mL ⁻¹	0,016 µg mL ⁻¹	0,032 µg mL ⁻¹	0,064 µg mL ⁻¹	0,096 µg mL ⁻¹	0,128 µg mL ⁻¹
Ciazofamida	0,0040	0,0080	0,0160	0,0319	0,0638	0,0958	0,1277
Cimoxanil	0,0041	0,0083	0,0166	0,0331	0,0662	0,0994	0,1323
Ciproconazol	0,0041	0,0081	0,0162	0,0325	0,0650	0,0974	0,1299
Ciprodinil	0,0041	0,0081	0,0162	0,0324	0,0648	0,0972	0,1296
Ciromazina	0,0051	0,0102	0,0204	0,0408	0,0816	0,1224	0,1632
Clofentezina	0,0040	0,0081	0,0161	0,0322	0,0645	0,0967	0,129
Clorbromuron	0,0042	0,0084	0,0168	0,0336	0,0672	0,1008	0,1344
Clorfenvinfós	0,0045	0,0090	0,0179	0,0358	0,0717	0,1075	0,1433
Clorpirifós	0,0042	0,0083	0,0167	0,0334	0,0667	0,1001	0,1334
Clorpirifós Metílico	0,0043	0,0087	0,0173	0,0346	0,0693	0,1039	0,1385
Clotianidina	0,0042	0,0084	0,0168	0,0337	0,0674	0,1010	0,1347
Coumafós	0,0043	0,0085	0,0170	0,0341	0,0682	0,1022	0,1364
Cresoxim Metílico	0,0042	0,0085	0,0169	0,0338	0,0677	0,1015	0,1355
Demeton-S-Metílico	0,0041	0,0082	0,0164	0,0328	0,0656	0,0984	0,1311
Desmedifan	0,0036	0,0072	0,0144	0,0288	0,0576	0,0864	0,1151
Diazinona	0,0053	0,0106	0,0211	0,0422	0,0845	0,1267	0,169
Diclofuanida	0,0043	0,0086	0,0171	0,0342	0,0685	0,1027	0,137
Diclorvós	0,0043	0,0086	0,0172	0,0343	0,0686	0,1030	0,1372
Dicrotofós	0,0044	0,0088	0,0175	0,0350	0,0701	0,1051	0,1403
Dietofencarbe	0,0041	0,0083	0,0165	0,0330	0,0661	0,0991	0,132
Difenoconazol	0,0044	0,0088	0,0176	0,0351	0,0702	0,1054	0,1404
Diflubenzuron	0,0043	0,0085	0,0170	0,0340	0,0680	0,1020	0,1361
Dimetoato	0,0043	0,0087	0,0173	0,0346	0,0693	0,1039	0,1384
Dimetomorfe	0,0040	0,0080	0,0160	0,0321	0,0642	0,0962	0,1283
Dimoxistrobina	0,0040	0,0080	0,0160	0,0320	0,0640	0,0960	0,1281
Diniconazol	0,0044	0,0088	0,0175	0,0350	0,0701	0,1051	0,14
Dissulfotom	0,0053	0,0106	0,0212	0,0423	0,0846	0,1270	0,1692
Diuron	0,0040	0,0080	0,0161	0,0322	0,0643	0,0965	0,1288
DMSA	0,0040	0,0080	0,0161	0,0322	0,0643	0,0965	0,1286
DMST	0,0044	0,0088	0,0176	0,0352	0,0704	0,1056	0,1407
Dodemorfe	0,0042	0,0084	0,0167	0,0334	0,0669	0,1003	0,1337
Epoxiconazol	0,0033	0,0065	0,0130	0,0260	0,0520	0,0780	0,1041
Espinosade	0,0035	0,0070	0,0139	0,0278	0,0557	0,0835	0,1114
Espirodiclofen	0,0041	0,0082	0,0164	0,0329	0,0658	0,0986	0,1315
Espiroxamina	0,0041	0,0081	0,0162	0,0324	0,0648	0,0972	0,1296
Etiofencarbe Sulfona	0,0042	0,0083	0,0166	0,0332	0,0664	0,0996	0,1328
Etiofencarbe Sulfóxido	0,0030	0,0060	0,0121	0,0242	0,0483	0,0725	0,0968
Etiona	0,0052	0,0105	0,0209	0,0418	0,0837	0,1255	0,1673
Etiprole	0,0044	0,0088	0,0176	0,0351	0,0702	0,1054	0,1404
Etirimol	0,0042	0,0085	0,0170	0,0339	0,0678	0,1018	0,1358
Etofenproxi	0,0043	0,0086	0,0173	0,0346	0,0691	0,1037	0,1382
Etoprofós	0,0039	0,0077	0,0155	0,0310	0,0619	0,0929	0,1239
Etrinós	0,0046	0,0093	0,0186	0,0371	0,0742	0,1114	0,1483
Famoxadona	0,0040	0,0080	0,0161	0,0322	0,0643	0,0965	0,1287
Fenamidona	0,0043	0,0086	0,0172	0,0344	0,0688	0,1032	0,1376
Fenamifós	0,0043	0,0086	0,0172	0,0345	0,0690	0,1034	0,1379
Fenarimol	0,0043	0,0085	0,0170	0,0341	0,0682	0,1022	0,1363
Fenazaquina	0,0041	0,0082	0,0164	0,0328	0,0656	0,0984	0,1312
Fenbuconazol	0,0040	0,0080	0,0160	0,0321	0,0642	0,0962	0,1282
Fenhexamida	0,0043	0,0086	0,0172	0,0344	0,0688	0,1032	0,1377

Tabela 9 - (Continuação) Concentrações reais das soluções da curva de calibração do UHPLC-ESI-MS/MS.

Agrotóxico	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7
	0,004 µg mL ⁻¹	0,008 µg mL ⁻¹	0,016 µg mL ⁻¹	0,032 µg mL ⁻¹	0,064 µg mL ⁻¹	0,096 µg mL ⁻¹	0,128 µg mL ⁻¹
Fenoxicarbe	0,0042	0,0083	0,0166	0,0333	0,0666	0,0998	0,1332
Fenpiroximato	0,0032	0,0064	0,0127	0,0254	0,0509	0,0763	0,1018
Fenpropidina	0,0042	0,0085	0,0170	0,0339	0,0678	0,1018	0,1356
Fenpropimorfe	0,0041	0,0081	0,0162	0,0324	0,0648	0,0972	0,1295
Fentiona	0,0040	0,0079	0,0158	0,0316	0,0632	0,0948	0,1265
Fentiona Sulfóxido	0,0040	0,0080	0,0161	0,0322	0,0643	0,0965	0,1287
Fentoato	0,0048	0,0096	0,0192	0,0383	0,0766	0,1150	0,1532
Fluazifope-p-butílico	0,0044	0,0088	0,0176	0,0352	0,0704	0,1056	0,1407
Flufenacete	0,0042	0,0083	0,0166	0,0333	0,0666	0,0998	0,1331
Flufenoxuron	0,0037	0,0073	0,0146	0,0293	0,0586	0,0878	0,117
Fluquinconazol	0,0042	0,0083	0,0167	0,0334	0,0667	0,1001	0,1334
Flusilasol	0,0036	0,0072	0,0145	0,0290	0,0579	0,0869	0,116
Flutriafol	0,0041	0,0081	0,0163	0,0326	0,0651	0,0977	0,1303
Fosalona	0,0043	0,0085	0,0170	0,0341	0,0682	0,1022	0,1364
Fosfamidona	0,0043	0,0085	0,0171	0,0342	0,0683	0,1025	0,1365
Fosmete	0,0042	0,0084	0,0169	0,0338	0,0675	0,1013	0,1352
Furatiocarbe	0,0043	0,0085	0,0170	0,0340	0,0680	0,1020	0,1361
Halofenosídeo	0,0040	0,0079	0,0158	0,0317	0,0634	0,0950	0,1268
Hexaconazol	0,0043	0,0085	0,0170	0,0340	0,0680	0,1020	0,136
Hexitiazoxi	0,0040	0,0081	0,0161	0,0322	0,0645	0,0967	0,1289
Imazalil	0,0042	0,0085	0,0169	0,0338	0,0677	0,1015	0,1352
Imidacloprido	0,0035	0,0071	0,0141	0,0282	0,0565	0,0847	0,113
Indoxacarbe	0,0042	0,0083	0,0166	0,0333	0,0666	0,0998	0,1331
lprovalicarbe	0,0042	0,0083	0,0167	0,0334	0,0667	0,1001	0,1335
Isoprotirolona	0,0043	0,0085	0,0170	0,0340	0,0680	0,1020	0,1358
Isoxaflutol	0,0042	0,0083	0,0167	0,0334	0,0667	0,1001	0,1336
Isoxationa	0,0041	0,0082	0,0165	0,0330	0,0659	0,0989	0,1317
Linurom	0,0040	0,0080	0,0161	0,0322	0,0643	0,0965	0,1286
Malationa	0,0040	0,0081	0,0161	0,0322	0,0645	0,0967	0,129
Mefenacete	0,0043	0,0086	0,0172	0,0343	0,0686	0,1030	0,1374
Mefosfolan	0,0050	0,0100	0,0200	0,0401	0,0802	0,1202	0,1602
Mepanipirim	0,0040	0,0079	0,0158	0,0317	0,0634	0,0950	0,1266
Mepronil	0,0041	0,0082	0,0164	0,0329	0,0658	0,0986	0,1314
Metalaxil	0,0034	0,0068	0,0137	0,0274	0,0547	0,0821	0,1096
Metamidofós	0,0044	0,0088	0,0176	0,0351	0,0702	0,1054	0,1405
Metconazol	0,0041	0,0083	0,0166	0,0331	0,0662	0,0994	0,1326
Metidationa	0,0040	0,0081	0,0161	0,0322	0,0645	0,0967	0,1289
Metiocarbe	0,0043	0,0087	0,0174	0,0347	0,0694	0,1042	0,139
Metiocarbe Sulfona	0,0042	0,0084	0,0169	0,0338	0,0675	0,1013	0,1351
Metiocarbe Sulfóxido	0,0041	0,0082	0,0165	0,0330	0,0659	0,0989	0,1319
Metobromuron	0,0042	0,0085	0,0170	0,0339	0,0678	0,1018	0,1357
Metomil	0,0043	0,0085	0,0170	0,0340	0,0680	0,1020	0,1361
Metoxifenosida	0,0043	0,0085	0,0170	0,0340	0,0680	0,1020	0,1359
Metoxuron	0,0040	0,0081	0,0162	0,0323	0,0646	0,0970	0,1292
Mevinfós	0,0037	0,0075	0,0150	0,0299	0,0598	0,0898	0,1195
Miclobutanil	0,0040	0,0080	0,0161	0,0322	0,0643	0,0965	0,1286
Monocrotofós	0,0053	0,0105	0,0210	0,0421	0,0842	0,1262	0,1682
Monolinuron	0,0041	0,0082	0,0164	0,0329	0,0658	0,0986	0,1315
Nitenpiran	0,0044	0,0088	0,0176	0,0353	0,0706	0,1058	0,1411
Nuarimol	0,0041	0,0081	0,0162	0,0325	0,0650	0,0974	0,13

Tabela 9 - (Continuação) Concentrações reais das soluções da curva de calibração do UHPLC-ESI-MS/MS.

Agrotóxico	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7
	0,004 µg mL ⁻¹	0,008 µg mL ⁻¹	0,016 µg mL ⁻¹	0,032 µg mL ⁻¹	0,064 µg mL ⁻¹	0,096 µg mL ⁻¹	0,128 µg mL ⁻¹
Ometoato	0,0043	0,0086	0,0173	0,0346	0,0691	0,1037	0,1382
Oxadixil	0,0041	0,0081	0,0162	0,0325	0,0650	0,0974	0,1298
Oxamil	0,0041	0,0082	0,0164	0,0328	0,0656	0,0984	0,1312
Oxamil Oxima	0,0034	0,0067	0,0134	0,0268	0,0536	0,0804	0,1072
Oxicarboxina	0,0043	0,0086	0,0172	0,0344	0,0688	0,1032	0,1377
Paclobutrazol	0,0043	0,0086	0,0172	0,0345	0,0690	0,1034	0,1379
Pencicurum	0,0041	0,0081	0,0163	0,0326	0,0651	0,0977	0,1303
Penconazol	0,0040	0,0080	0,0161	0,0322	0,0643	0,0965	0,1285
Picoxistrobina	0,0041	0,0082	0,0164	0,0329	0,0658	0,0986	0,1315
Pimetrozina	0,0042	0,0084	0,0169	0,0338	0,0675	0,1013	0,1351
Piperonil Butóxido	0,0041	0,0083	0,0165	0,0330	0,0661	0,0991	0,1323
Piraclostrobina	0,0041	0,0082	0,0164	0,0328	0,0656	0,0984	0,1312
Pirazofós	0,0043	0,0086	0,0172	0,0343	0,0686	0,1030	0,1372
Piridaben	0,0041	0,0082	0,0164	0,0327	0,0654	0,0982	0,131
Piridafentiona	0,0041	0,0082	0,0163	0,0326	0,0653	0,0979	0,1306
Prifenox	0,0041	0,0081	0,0162	0,0324	0,0648	0,0972	0,1296
Primetanil	0,0042	0,0083	0,0167	0,0334	0,0667	0,1001	0,1336
Primicarbe	0,0043	0,0086	0,0172	0,0344	0,0688	0,1032	0,1377
Primicarbe Desmetil	0,0031	0,0062	0,0123	0,0246	0,0493	0,0739	0,0987
Pirimifós Etilico	0,0044	0,0087	0,0174	0,0348	0,0696	0,1044	0,1391
Pirimifós Metílico	0,0044	0,0087	0,0174	0,0349	0,0698	0,1046	0,1395
Piriproxifem	0,0040	0,0081	0,0162	0,0323	0,0646	0,0970	0,1293
Procloraz	0,0043	0,0085	0,0170	0,0341	0,0682	0,1022	0,1362
Profenofós	0,0042	0,0083	0,0167	0,0334	0,0667	0,1001	0,1333
Propargito	0,0046	0,0092	0,0183	0,0366	0,0733	0,1099	0,1465
Propiconazol	0,0045	0,0090	0,0180	0,0361	0,0722	0,1082	0,1442
Propizamida	0,0040	0,0081	0,0162	0,0323	0,0646	0,0970	0,1294
Propoxur	0,0043	0,0085	0,0171	0,0342	0,0683	0,1025	0,1367
Quinalfós	0,0048	0,0097	0,0194	0,0387	0,0774	0,1162	0,1549
Tebuconazol	0,0041	0,0081	0,0163	0,0326	0,0651	0,0977	0,1301
Tebufenosida	0,0041	0,0082	0,0164	0,0327	0,0654	0,0982	0,1308
Tebufenpirade	0,0043	0,0086	0,0172	0,0345	0,0690	0,1034	0,1378
Terbufós	0,0047	0,0093	0,0186	0,0372	0,0744	0,1116	0,1486
Tetraconazol	0,0043	0,0086	0,0172	0,0344	0,0688	0,1032	0,1377
Tiabendazol	0,0041	0,0082	0,0164	0,0329	0,0658	0,0986	0,1315
Tiacloprido	0,0043	0,0086	0,0172	0,0345	0,0690	0,1034	0,138
Tiametoxam	0,0041	0,0083	0,0166	0,0331	0,0662	0,0994	0,1325
Tiobencarbe	0,0040	0,0081	0,0162	0,0323	0,0646	0,0970	0,1293
Tiodicarbe	0,0043	0,0087	0,0174	0,0347	0,0694	0,1042	0,1389
Tiofanato Metílico	0,0040	0,0080	0,0161	0,0322	0,0643	0,0965	0,1285
Tiofanox Sulfona	0,0043	0,0086	0,0172	0,0343	0,0686	0,1030	0,1372
Tiofanox Sulfóxido	0,0039	0,0079	0,0158	0,0315	0,0630	0,0946	0,1262
Tolclofós Metílico	0,0041	0,0081	0,0162	0,0325	0,0650	0,0974	0,1298
Tolifluanida	0,0043	0,0087	0,0173	0,0346	0,0693	0,1039	0,1387
Triadimefon	0,0042	0,0084	0,0169	0,0338	0,0675	0,1013	0,1351
Triadimenol	0,0042	0,0085	0,0169	0,0338	0,0677	0,1015	0,1353
Triazofós	0,0033	0,0067	0,0134	0,0267	0,0534	0,0802	0,1068
Triciclozol	0,0041	0,0082	0,0164	0,0328	0,0656	0,0984	0,1311
Triclorfon	0,0041	0,0082	0,0164	0,0327	0,0654	0,0982	0,1309
Trifloxistrobina	0,0041	0,0082	0,0164	0,0328	0,0656	0,0984	0,1313

Tabela 9 - (Continuação) Concentrações reais das soluções da curva de calibração do UHPLC-ESI-MS/MS.

Agrotóxico	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7
	0,004 µg mL ⁻¹	0,008 µg mL ⁻¹	0,016 µg mL ⁻¹	0,032 µg mL ⁻¹	0,064 µg mL ⁻¹	0,096 µg mL ⁻¹	0,128 µg mL ⁻¹
Triflumizol	0,0042	0,0083	0,0167	0,0334	0,0667	0,1001	0,1333
Triticonazol	0,0042	0,0083	0,0166	0,0333	0,0666	0,0998	0,1331
Vamidotona	0,0044	0,0087	0,0175	0,0350	0,0699	0,1049	0,1399
Zoxamida	0,0042	0,0084	0,0169	0,0338	0,0675	0,1013	0,1349

3.3.8 Método de ensaio

Foram pesados ± 15 g de amostra (polpa de pimentão previamente processada) em um tubo de centrifuga de polipropileno (capacidade 50,0 mL).

A etapa de extração e partição foram realizadas conforme descrito no item 3.1.7.

Para a análise das amostras em CG- μ DCE, foi necessária a etapa de purificação (conforme item 3.1.7) e submetidas a análise cromatográfica.

Para a análise das amostras em UHPLC-ESI-MS/MS, não foi necessária a etapa de purificação, foi feita somente uma diluição, onde uma alíquota de 1,0 mL do extrato orgânico foi retirada e transferida para um tubo de ensaio, no qual foi adicionado 1,0 mL de metanol, homogeneizado e filtrado em membrana 0,22 µm para um vial e encaminhado para a análise cromatográfica.

As condições cromatográficas estabelecidas para os equipamentos utilizados estão de acordo com o descrito nos itens 3.1.4 e 3.3.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VALIDAÇÃO

Para o estudo realizado antes da validação, mistura 1, que testou quatro diferentes fases sólidas dispersivas na etapa de limpeza para avaliação da influência na exatidão do método, a mistura de fases que apresentou melhor resultado foi a $MgSO_4/PSA$, sendo utilizada nesta etapa para a validação. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos deste estudo preliminar.

Tabela 10 – Recuperação das diferentes fases empregadas na etapa de limpeza (%).

Agrotóxicos	$MgSO_4 + PSA$		$MgSO_4 + PSA + C_{18}$		$MgSO_4 + PSA + C_{18} +$ carvão		$MgSO_4 + PSA +$ carvão	
	curva solvente	curva matriz	curva solvente	curva matriz	curva solvente	curva matriz	curva solvente	curva matriz
Trifluralina	99	96	97	94	61	59	49	47
HCB	93	88	79	75	1	1	1	1
Clorotalonil	138	95	148	103	-	-	-	-
Vinclozolina	117	101	115	99	74	63	63	54
Fenitrotiona	135	99	135	99	42	31	33	24
Dicofol	102	93	72	66	28	26	31	28
Captana	76	65	82	70	16	14	17	14
Folpete	123	70	133	76	12	7	8	5
2,4'-DDE	103	98	103	97	51	48	44	41
Dieldrin	85	101	86	102	72	85	66	78
b-endossulfam	92	101	94	104	72	80	70	77
Endrin	97	99	98	100	68	69	62	63
endossulfan sulfato	100	102	103	105	87	89	87	89
Bifentrina	111	101	116	105	26	23	21	19
Tetradifona	133	105	139	110	14	11	12	9
Permetrina	137	99	143	103	7	5	5	4
Fenvalerato	153	109	160	115	7	5	5	3
Azoxistrobina	165	127	174	134	40	31	31	24

A condição de homoscedasticidade dos resíduos foi confirmada para 48 agrotóxicos na utilização da curva em matriz contendo cinco pontos (nível de concentração 2 ao 6) exceto para o **metoxicloro** que apresentou esta condição na curva com quatro pontos (nível de concentração 3 ao 6). Alguns agrotóxicos apresentaram a condição de homoscedasticidade na curva em solvente também para 5 ou 6 pontos. A Tabela 11 demonstra esta condição para as curvas avaliadas.

Tabela 11 - Avaliação da homogeneidade na variância dos resíduos da regressão da curva em solvente e no extrato orgânico.

MISTURA 1				
Agrotóxicos	curva em solvente 6 pontos	curva em matriz 6 pontos	curva em solvente 5 pontos	curva em matriz 5 pontos
trifluralina	homocedástico	heterocedástico	homocedástico	homocedástico
HCB	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
clorotalonil	homocedástico	heterocedástico	homocedástico	homocedástico
vinclozolina	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
fenitrotiona	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
dicofol	heterocedástico	homocedástico	heterocedástico	homocedástico
captana	heterocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
folpete	heterocedástico	homocedástico	heterocedástico	homocedástico
2,4'-DDE	heterocedástico	homocedástico	heterocedástico	homocedástico
dieldrin	heterocedástico	homocedástico	heterocedástico	homocedástico
b-endossulfam	heterocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
endrin	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
endossulfam sulfato	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
bifentrina	heterocedástico	homocedástico	heterocedástico	homocedástico
tetradifona	heterocedástico	homocedástico	heterocedástico	homocedástico
permetrina	homocedástico	heterocedástico	homocedástico	homocedástico
fenvalerato	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
azoxistrobina	heterocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
MISTURA 2				
Agrotóxicos	curva em solvente 6 pontos	curva em matriz 6 pontos	curva em solvente 5 pontos	curva em matriz 5 pontos
forato	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
b-HCH	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
d-HCH	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
alacoloro	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
clorpirifós	heterocedástico	homocedástico	heterocedástico	homocedástico
hepta.-exo-epóxido	heterocedástico	homocedástico	heterocedástico	homocedástico
bioaletrina	heterocedástico	homocedástico	heterocedástico	homocedástico
metidationa	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico

Tabela 11 - (Continuação) Avaliação da homogeneidade na variância dos resíduos da regressão da curva em solvente e no extrato orgânico.

MISTURA 2				
Agrotóxicos	curva em solvente 6 pontos	curva em matriz 6 pontos	curva em solvente 5 pontos	curva em matriz 5 pontos
a-endossulfam	heterocedástico	homocedástico	heterocedástico	homocedástico
2,4'-DDD	heterocedástico	homocedástico	heterocedástico	homocedástico
4,4'-DDD	heterocedástico	heterocedástico	heterocedástico	homocedástico
4,4'-DDT	-	heterocedástico	-	homocedástico
mirex	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
ciflutrina	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
esfenvalerato	homocedástico	homocedástico	homocedástico	homocedástico
Agrotóxicos	curva em solvente 4 pontos	curva em matriz 4 pontos		
4,4'-DDT	homocedástico	homocedástico		
metoxicloro	homocedástico	homocedástico		
MISTURA 3				
Agrotóxicos	curva em solvente 6 pontos	curva em matriz 6 pontos	curva em solvente 5 pontos	curva em matriz 5 pontos
a-HCH	heterocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
g-HCH (Lindano)	heterocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
clorpirifós metil	homocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
heptacloro	homocedástico	heterocedástico	homocedástico	Homocedástico
aldrin	homocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
fipronil	homocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
procimidona	homocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
4,4'-DDE	homocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
oxifluorfem	heterocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
2,4'-DDT	-	-	homocedástico	Homocedástico
carbofenotiona	homocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
fenpropatrina	homocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
lambda-cialotrina	homocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
cipermetrina	homocedástico	homocedástico	homocedástico	Homocedástico
deltametrina	heterocedástico	heterocedástico	homocedástico	Homocedástico

As curvas analíticas preparadas em solvente isooctano e no extrato orgânico da polpa de pimentão mostraram-se linear – regressão significativa, na faixa de concentração estudada para todos os 49 agrotóxicos estudados apresentando na maioria dos casos coeficientes de determinação (R^2) maiores ou iguais a 0,95. Considerando a avaliação da curva preparada em matriz com cinco pontos apenas a **captana** e **4,4'-DDT** apresentaram o valor de R^2 abaixo de 0,95.

Na Tabela 12 são apresentados os valores dos coeficientes de determinação - R^2 encontrados bem como se a regressão foi significativa ou não.

Tabela 12 - Avaliação da linearidade - significância da regressão e valores dos coeficientes de determinação - R^2 .

MISTURA 1								
Agrotóxicos	curva em solvente 6 pontos	Regressão	curva em matriz 6 pontos	Regressão	curva em solvente 5 pontos	Regressão	curva em matriz 5 pontos	Regressão
Trifluralina	0,9989		0,9977		0,9991		0,9980	
HCB	0,9985		0,9998		0,9983		0,9998	
clorotalonil	0,9892		0,9995		0,9874		0,9995	
vinclozolina	0,9959		0,9992		0,9951		0,9992	
fenitrotiona	0,9957		0,9981		0,9946		0,9983	
Dicofol	0,9611		0,9979		0,9518		0,9974	
Captana	0,9470		0,9022		0,9521		0,9166	
Folpete	0,9426	significativa	0,9883	significativa	0,9474	significativa	0,9866	significativa
2,4'-DDE	0,9953		0,9995		0,9942		0,9995	
Dieldrin	0,9998		0,9996		0,9998		0,9995	
β -endossulfam	0,9993		0,9996		0,9991		0,9995	
Endrin	0,9995		0,9991		0,9994		0,9989	
endossulfam sulfato	0,9994		0,9994		0,9993		0,9993	
Bifentrina	0,9976		0,9977		0,9970		0,9976	
Tetradifona	0,9951		0,9984		0,9941		0,9983	
Permetrina	0,9979		0,9944		0,9975		0,9940	
Fenvalerato	0,9961		0,9958		0,9955		0,9951	
azoxistrobina	0,9875	0,9954	0,9868	0,9945				
MISTURA 2								
Agrotóxicos	curva em solvente 6 pontos	Regressão	curva em matriz 6 pontos	Regressão	curva em solvente 5 pontos	Regressão	curva em matriz 5 pontos	Regressão
Forato	0,9995		0,9958		0,9993		0,9952	
β -HCH	0,9880		0,9988		0,9883		0,9987	
δ -HCH	0,9882		0,9996		0,9888		0,9995	
Alacloro	0,9995		0,9972		0,9995		0,9976	
Clorpirifós	0,9991	significativa	0,9978	significativa	0,9988	significativa	0,9979	significativa
heptacloro-exo-epóxido	0,9976		0,9998		0,9975		0,9998	
Bioletrina	0,9975		0,9998		0,9974		0,9998	
metidationa	0,9805		0,9998		0,9821		0,9997	
α -endossulfam	0,9985		0,9999		0,9983		0,9999	
2,4'-DDD	0,9969		0,9999		0,9968		0,9999	
4,4'-DDD	0,9913		0,9999		0,9914		0,9999	
4,4'-DDT	-		0,8340		-		0,9185	

Tabela 12 - (Continuação) Avaliação da linearidade - significância da regressão, e dos valores dos coeficientes de determinação - R^2 .

MISTURA 2								
Agrotóxicos	curva em solvente 6 pontos	Regressão	curva em matriz 6 pontos	Regressão	curva em solvente 5 pontos	Regressão	curva em matriz 5 pontos	Regressão
Mirex	0,9954		0,9992		0,9949		0,9992	
ciflutrina	0,9823	significativa	0,9997	significativa	0,9825	significativa	0,9996	significativa
esfenvalerato	0,9719		0,9912		0,9720		0,9891	
Agrotóxicos	curva em solvente 4 pontos	Regressão	curva em matriz 4 pontos	Regressão				
4,4'-DDT	0,9442	significativa	0,8759	significativa				
metoxicloro	0,9518		0,9419					
MISTURA 3								
Agrotóxicos	curva em solvente 6 pontos	Regressão	curva em matriz 6 pontos	Regressão	curva em solvente 5 pontos	Regressão	curva em matriz 5 pontos	Regressão
α -HCH	0,9986		0,9989		0,9988		0,9988	
γ -HCH(Lindano)	0,9953		0,9965		0,9958		0,9962	
clorpirifós metil	0,9997		0,9993		0,9996		0,9993	
Heptacloro	0,9941		0,9968		0,9943		0,9966	
Aldrin	0,9675		0,9356		0,9998		0,9995	
Fipronil	0,9998		0,9996		0,9998		0,9995	
procimidona	0,9817	significativa	0,9971	significativa	0,9827	significativa	0,9975	significativa
4,4'-DDE	0,9999		0,9995		0,9999		0,9994	
Oxifluorfem	0,9994		0,9997		0,9992		0,9996	
2,4'-DDT	-		-		0,9876		0,9516	
carbofenotiona	0,9998		0,9990		0,9999		0,9989	
fenproprina	0,9986		0,9996		0,9983		0,9995	
lambda-cialotrina	0,9989		0,9991		0,9989		0,9990	
cipermetrina	0,9955		0,9995		0,9947		0,9994	
deltametrina	0,9973		0,9994		0,9973		0,9992	

O efeito da matriz avaliado pelo modelo proposto, foi observado para quatro agrotóxicos em questão – **captana**, **bioaletrina**, **esfenvalerato** e **2,4'-DDT**. Assim a curva analítica a ser utilizada para avaliação de 45 agrotóxicos, dentre os 49 objetos de estudo, em polpa de pimentão pode ser construída no solvente ou na matriz.

A Tabela 13 apresenta a avaliação de significância na comparação dos resultados obtidos pelas áreas medidas para as curvas em solvente e na matriz.

Tabela 13 - Avaliação do efeito matriz para as curvas analíticas em solvente e na matriz, com cinco pontos de concentração.

MISTURA 1		MISTURA 2		MISTURA 3	
Agrotóxicos	efeito matriz	Agrotóxicos	efeito matriz	Agrotóxicos	efeito matriz
Trifluralina	não significativa	forato	não significativa	a-HCH	não significativa
HCB	não significativa	b-HCH	não significativa	g-HCH	não significativa
Clorotalonil	não significativa	d-HCH	não significativa	clorpirifós metil	não significativa
Vinclozolina	não significativa	alacloro	não significativa	heptacloro	não significativa
Fenitrotiona	não significativa	clorpirifós	não significativa	aldrin	não significativa
Dicofol	não significativa	hepta-exo-epóxido	não significativa	fipronil	não significativa
Captana	significante	bioaletrina	Significante	procimidona	não significativa
Folpete	não significativa	metidationa	não significativa	4,4'-DDE	não significativa
2,4'-DDE	não significativa	a-endossulfam	não significativa	oxifluorfem	não significativa
Dieldrin	não significativa	2,4'-DDD	não significativa	2,4'-DDT	significante
b-endossulfam	não significativa	4,4'-DDD	não significativa	carbofenotiona	não significativa
Endrin	não significativa	4,4'-DDT*	não significativa	fenpropratrina	não significativa
endossulfam sulfato	não significativa	metoxicloro*	não significativa	lambdacialotrina	não significativa
Bifentrina	não significativa	mirex	não significativa	cipermetrina	não significativa
Tetradifona	não significativa	ciflutrina	não significativa	deltametrina	não significativa
Permetrina	não significativa	esfenvalerato	Significante		
Fenvalerato	não significativa	*4 pontos			
azoxistrobina	não significativa				

4.1.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os valores de LD e LQ do método calculados, como apresentado na Tabela 14, estão de acordo com a rotina do laboratório no que se refere ao equipamento CG/ μ DCE e estão abaixo dos LMRs (consulta de LMR na página da ANVISA em 28/02/2013, período da validação) estabelecidos pela ANVISA para as substâncias trifluralina (LMR = 0,05 mg kg⁻¹), clorotalonil (LMR = 5,0 mg kg⁻¹), tetradifona (LMR = 1,0 mg kg⁻¹) e azoxistrobina (LMR = 0,5 mg kg⁻¹). Para a **deltametrina** (LMR = 0,01 mg kg⁻¹) o valor do LQ do método calculado e testado está acima do LMR.

Embora os valores das razões S/N produzidas terem sido superiores a 3 - com exceção da **captana**, **folpete**, **4,4'-DDT**, **2,4'-DDT** e **metoxicloro** - como observa-se na Tabela 14, decidiu-se manter a concentração nominal de 0,003 a 0,02 μ g mL⁻¹ como base para cálculos do parâmetro limite de detecção do método e de 0,01 a 0,03 μ g mL⁻¹ para limite de quantificação do método que corresponde ao nível testado de fortificação.

Tabela 14 - Avaliação da relação S/N e valores dos LD e LQ do método calculados e confirmados.

MISTURA 1					
Agrotóxicos	média relação 3:1 S/N	valores calculados		valores confirmados	
		LD mg kg ⁻¹	LQ mg kg ⁻¹	LD mg kg ⁻¹	LQ mg kg ⁻¹
Trifluralina	8,9	0,001	0,003	0,004	0,01
HCB	15,63	0,001	0,003	0,004	0,01
Clorotalonil	15,7	0,003	0,009	0,008	0,02
Vinclozolina	8,28	0,001	0,002	0,004	0,01
Fenitrotiona	7,63	0,001	0,003	0,005	0,01
Dicofol	9,57	0,004	0,013	0,008	0,02
Captana	1,01	0,006	0,022	0,008	0,02
Folpete	2,83	0,004	0,015	0,008	0,02
2,4'-DDE	30,68	0,001	0,002	0,004	0,01
Dieldrin	33,68	0,000	0,001	0,004	0,01
β-endossulfam	27,45	0,001	0,002	0,004	0,01
Endrin	8,03	0,002	0,005	0,008	0,02
endossulfam sulfato	28,72	0,001	0,004	0,004	0,01
Bifentrina	23,45	0,002	0,007	0,008	0,02
Tetradifona	23,33	0,002	0,007	0,004	0,01
Permetrina	3,1	0,004	0,014	0,008	0,02
Fenvalerato	9,42	0,004	0,013	0,008	0,02
Azoxistrobina	12,58	0,009	0,029	0,020	0,03
MISTURA 2					
Agrotóxicos	média relação 3:1 S/N	valores calculados		valores confirmados	
		LD mg kg ⁻¹	LQ mg kg ⁻¹	LD mg kg ⁻¹	LQ mg kg ⁻¹
Forato	4,17	0,0100	0,0333	0,008	0,02
β-HCH	18,65	0,0004	0,0012	0,003	0,01
δ-HCH	12,28	0,0005	0,0016	0,003	0,01
Alacloro	4,77	0,0003	0,0009	0,008	0,02
Clorpirifós	24,60	0,0002	0,0007	0,004	0,01
hepta.-exo-epóxido	36,58	0,0001	0,0004	0,004	0,01
Bioaletrina	19,95	0,0002	0,0008	0,008	0,02
Metidationa	24,7	0,0047	0,0155	0,016	0,03
α-endossulfam	34,72	0,0004	0,0013	0,004	0,01
2,4'-DDD	11,3	0,0002	0,0006	0,003	0,01
4,4'-DDD	7,95	0,0005	0,0016	0,004	0,01
4,4'-DDT	0,51	0,0042	0,0140	0,004	0,01
Metoxicloro	-	-	-	0,004	0,01
Mirex	12,93	0,0019	0,0062	0,004	0,01
ciflutrina	4,73	0,0016	0,0054	0,009	0,02
Esfenvalerato	12,07	0,0025	0,0082	0,008	0,02
MISTURA 3					
Agrotóxicos	média relação 3:1 S/N	valores calculados		valores confirmados	
		LD mg kg ⁻¹	LQ mg kg ⁻¹	LD mg kg ⁻¹	LQ mg kg ⁻¹
α-HCH	24,33	0,0011	0,0036	0,008	0,02
γ-HCH(Lindano)	21,58	0,0010	0,0033	0,004	0,01
clorpirifós metil	18,23	0,0004	0,0013	0,004	0,01
Heptacloro	6,73	0,0014	0,0047	0,003	0,01
Aldrin	55,02	0,0002	0,0006	0,003	0,01
Fipronil	34,90	0,0017	0,0055	0,016	0,03

Tabela 14 - (Continuação) Avaliação da relação S/N e valores dos LD e LQ do método calculados e confirmados.

Agrotóxicos	média relação 3:1 S/N	MISTURA 3			
		valores calculados		valores confirmados	
		LD mg kg ⁻¹	LQ mg kg ⁻¹	LD mg kg ⁻¹	LQ mg kg ⁻¹
Procimidona	5,50	0,0009	0,0030	0,009	0,02
4,4'-DDE	7,58	0,0005	0,0018	0,004	0,01
Oxifluorfem	25,47	0,0008	0,0027	0,008	0,02
2,4'-DDT	0,31	0,0127	0,0425	0,004	0,01
Carbofenotiona	22,5	0,0014	0,0047	0,008	0,02
Fempropatrina	17,18	0,0014	0,0047	0,008	0,02
lambda-cialotrina	32	0,0015	0,0051	0,008	0,02
Cipermetrina	3,65	0,0010	0,0035	0,008	0,02
Deltametrina	4,85	0,0045	0,0150	0,016	0,03

4.1.4 Precisão (repetibilidade) e Exatidão (taxa de recuperação)

De acordo com os critérios estabelecidos para resíduos de agrotóxicos por organismos internacionais, os valores de CV % calculados estão dentro do aceitável ≤ 20 %, exceto para **captana** (solvente), **forato** (solvente e matriz), **metoxicloro** (solvente e matriz) e **4,4'-DDT** (matriz).

Para a maioria dos agrotóxicos estudados através da curva em matriz a taxa de recuperação está de acordo com as indicadas pela legislação para resíduos de agrotóxicos. Entretanto, pode-se observar que essas taxas se apresentaram fora da faixa determinada (70 a 120 %) para: **HCB**, **clorotalonil**, **dicofol**, **azoxistrobina**, **forato**, **4,4'-DDT**, **metoxicloro** e **2,4'-DDT** nos níveis estudados.

Na Tabela 15 pode-se observar a taxa de recuperação, os desvios padrão e os coeficientes de variação calculados para cada agrotóxico.

Tabela 15 - Taxa de recuperação e coeficiente de variação (%).

MISTURA 1												
Agrotóxicos	Em solvente						Em matriz					
	Recuperação - %			CV - %			Recuperação - %			CV - %		
	Média			nível 1	nível 2	nível 3	Média			nível 1	nível 2	nível 3
	nível 1	nível 2	nível 3				nível 1	nível 2	nível 3			
Trifluralina	90	84	103	6	5	12	87	81	102	6	5	12
HCB	82	71	86	8	12	6	79	64	82	8	11	6
Clorotalonil	81	45	64	9	12	7	56	39	68	9	11	7
Vinclozolina	126	115	120	1	2	1	98	98	99	1	2	1
Fenitrotiona	191	128	140	2	2	1	90	93	98	3	2	1
Dicofol	109	125	96	15	11	11	48	87	71	15	11	10
Captana	80	5	1	22	0	35	100	102	105	18	4	6
Folpete	674	74	24	4	4	8	118	115	119	4	4	9
2,4'-DDE	104	100	106	2	13	1	91	91	96	2	1	1
Dieldrin	96	95	93	2	3	2	96	101	100	1	2	2
b-endossulfam	92	92	90	1	3	2	96	101	100	1	3	2
Endrin	122	82	75	3	2	3	116	91	89	3	3	3
endossulfam sulfato	100	90	86	1	2	3	91	96	95	1	2	2
Bifentrina	119	109	114	2	2	3	100	100	101	2	2	2
Tetradifona	149	125	124	4	2	3	93	94	95	3	2	3
Permetrina	180	132	150	5	3	20	90	99	101	5	4	4
Fenvalerato	194	166	166	3	3	6	94	98	94	3	3	6
Azoxistrobina	735	303	221	3	5	5	184	121	99	3	5	5

MISTURA 2												
Agrotóxicos	Em solvente						Em matriz					
	Recuperação - %			CV - %			Recuperação - %			CV - %		
	Média			nível 1	nível 2	nível 3	Média			nível 1	nível 2	nível 3
	nível 1	nível 2	nível 3				nível 1	nível 2	nível 3			
Forato	67	80	75	21	19	5	54	76	69	21	19	5
b-HCH	687	207	132	7	6	3	110	119	98	7	6	3
d-HCH	215	155	141	5	3	4	108	104	104	5	3	4
Alacloro	140	122	113	3	1	3	101	113	109	3	1	3
Clorpirifós	136	122	112	2	2	3	102	111	105	1	2	3
hepta.-exo-epóxido	114	107	102	1	2	3	99	104	102	1	2	3
Bioaletrina	161	130	121	2	2	3	101	110	108	2	2	3
Metidationa	915	400	332	4	3	10	112	111	110	4	3	3
a-endossulfam	105	104	101	1	2	3	96	106	105	1	2	3
2,4'-DDD	141	114	106	2	2	4	101	106	105	2	3	4
4,4'-DDD	150	124	115	2	2	4	95	102	103	2	2	4
4,4'-DDT	-	87	28	-	0	11	78	128	84	22	0	10
Metoxicloro	-	22	33	-	22	8	-	53	80	-	22	8
Mirex	99	90	80	6	2	4	94	102	97	5	2	3
ciflutrina	0	237	207	-	4	4	107	108	111	4	3	2
Esfenvalerato	912	382	326	4	8	2	118	118	106	5	6	2

Tabela 15 - (Continuação) Taxa de recuperação e coeficiente de variação (%).

MISTURA 3												
Agrotóxicos	Em solvente						Em matriz					
	Recuperação - %			CV - %			Recuperação - %			CV - %		
	Média			nível 1	nível 2	nível 3	Média			nível 1	nível 2	nível 3
	nível 1	nível 2	nível 3				nível 1	nível 2	nível 3			
a-HCH	98	80	80	10	1	4	83	85	88	10	1	4
g-HCH (Lindano)	108	73	68	9	4	2	77	77	77	9	4	3
clorpirifós metil	149	131	124	9	2	2	95	98	98	9	2	1
Heptacloro	86	62	56	10	3	4	70	71	71	11	3	4
Aldrin	88	84	87	10	2	2	88	88	92	10	2	2
Fipronil	157	123	104	9	3	20	107	99	89	9	3	20
Procimidona	59	67	71	8	4	1	95	104	104	8	4	2
4,4'-DDE	87	15	84	9	3	3	87	91	105	8	3	3
Oxifluorfem	113	99	97	12	4	2	95	98	99	8	4	2
2,4'-DDT	241	54	16	11	14	16	125	199	81	11	14	15
Carbofenotiona	116	101	100	8	4	2	90	92	95	8	4	2
Fem propatrina	121	104	100	9	3	2	93	99	99	9	2	2
lambda-cialotrina	129	113	104	11	2	1	95	93	94	11	2	1
Cipermetrina	196	161	131	10	2	2	90	99	98	10	2	2
Deltametrina	218	182	150	7	5	2	96	91	87	7	5	2

A Tabela 16 descreve um resumo dos critérios utilizados e resultados obtidos na validação do método.

Tabela 16 - Resumo da validação do método.

Parâmetro avaliado	Estatística	Critério de aceitação	Resultado
Seletividade - avaliação branco da matriz	-	Sem interferente	Interferente no tempo de retenção da azoxistrobina
Linearidade - faixa de trabalho (6 concentrações no intervalo de 0,003 a 1,0 µg.mL ⁻¹) - efeito matriz (curva em solvente e matriz)	$y = bx + a$ Homogeneidade da variância – teste de Cochran Significância da regressão - teste F (ANOVA) Teste F (Snedecor) e teste t (Student)	$R^2 \geq 0,95$ $r \geq 0,98$ $t_{calc} < t_{tab}(bicaudal) =$ matriz não afeta o ensaio	Curva 5 conc. em matriz homocedasticidade confirmada para 48 agrotóxicos, exceto metoxicloro Captana e 4,4'-DDT com $R^2 < 0,95$ Regressão significativa para todos Efeito matriz observado para captana, bioaletrina, esfenvalerato e 2,4'-DDT
Limite de detecção	Relação sinal/ruído 3	$\leq LMR$	0,004 a 0,016 µg.mL ⁻¹

Tabela 16 - (Continuação) Resumo da validação do método.

Parâmetro avaliado		Estatística	Critério de aceitação	Resultado
Limite de quantificação		Relação sinal/ruído 10	\leq LMR	0,01 a 0,03, exceção deltametrina LMR < LQ
Precisão	- repetibilidade 3 níveis	$CV (\%) = (S * 100) /$	$CV \leq 20 \%$	$CV \geq 20 \%$ para captana, forato, metoxicloro e 4,4'-DDT
Exatidão	- recuperação 5 replicatas	$Rec (\%) = \frac{conc. \text{exp} * 100}{conc. \text{teórica}}$	70 – 120 %	Insatisfatório para HCB, clorotalonil, dicofol, azoxistrobina, forato, 4,4'-DDT, 2,4'-DDT e metoxicloro

Diante dos resultados obtidos no processo de validação, o método proposto foi validado para: **2,4'-DDD, 2,4'-DDE, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, α -endossulfam, α -HCH, alacloro, aldrin, β -endossulfam, β -HCH, bifentrina, bioaletrina, carbofenotona, ciflutrina, cipermetrina, clorpirifós, clorpirifós metil, σ -HCH, dieldrin, endossulfam sulfato, endrin, esfenvalerato, fenpropatrina, fenitrotiona, fenvalerato, fipronil, folpete, γ -HCH (Lindano), heptacloro, heptacloro-exo-epóxido, lambda-cialotrina, metidationa, mirex, oxifluorfem, permetrina, procimidona, tetradifona, trifluralina e vinclozolina.**

4.2 AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS

4.2.1 Amostras

Em 2013 foram analisadas 26 amostras de pimentão, sendo 22 da agricultura convencional e 4 orgânica, e em 2014 foram 5 amostras convencionais.

4.2.2 Avaliação no CG- μ DCE

Durante um período de 2013, 20 amostras não foram avaliadas por CG- μ DCE, pois o método estava em fase de desenvolvimento e validação. Após este período, todas as amostras adquiridas foram analisadas por esta metodologia.

Para a identificação dos resíduos encontrados nas amostras, foram utilizados os seguintes critérios: o tempo de retenção obtido nas amostras em relação ao tempo de retenção das SQRAs (Substâncias Químicas de Referência de Agrotóxicos) e a intensidade relativa da área dos picos detectados na amostra avaliada e na SQRA.

Para a confirmação das substâncias encontradas, todas foram avaliadas por CGAR-EM (IE) (cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas do tipo quadrupolo por impacto de elétrons). Nesse método foram monitoradas duas transições específicas (íon precursor \rightarrow íon fragmento) para cada substância analisada.

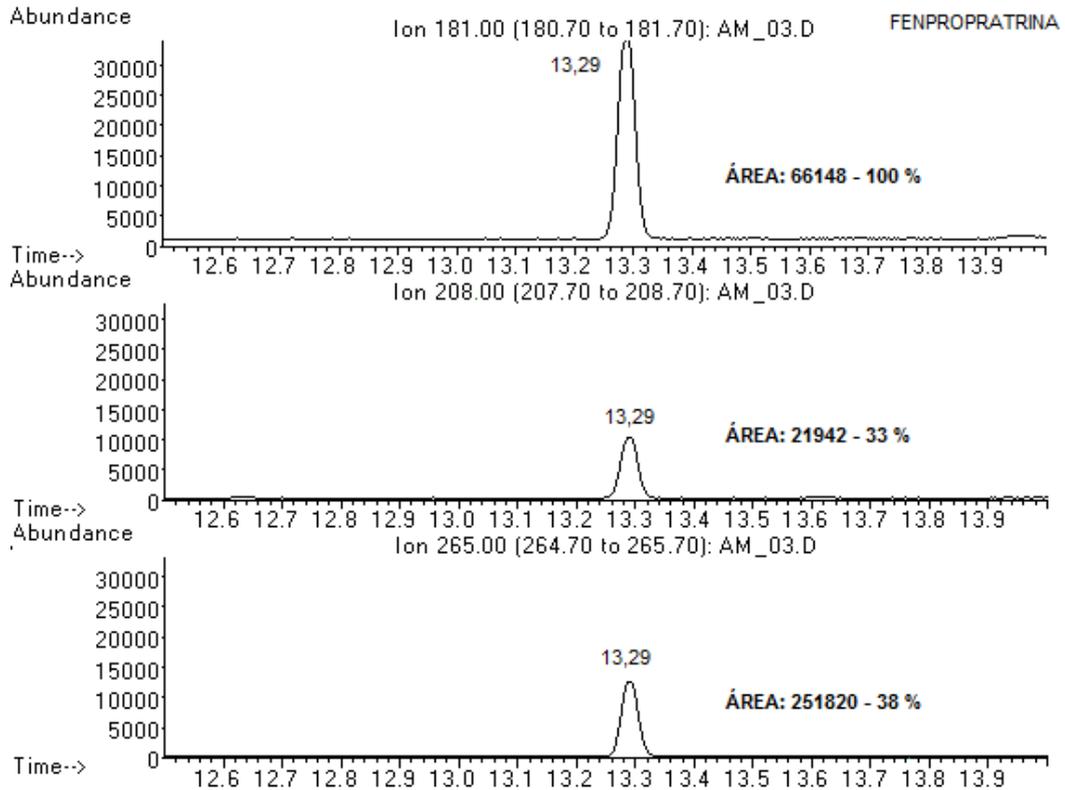
Os agrotóxicos para os quais foram utilizados os métodos de confirmação do CGAR-EM (IE), bem como seus respectivos íon precursor e fragmentos e t_R (min) encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17 - Monitoramento do método de confirmação do CGAR-EM (IE).

AGROTÓXICO	ÍON PRECUSOR	ÍON FRAGMENTOS	t_R (min)
Clofenapir	59,00	137,00; 247,00	10,93
Fenopropratrina	181,00	208,00; 265,00	13,29
Lambda-cialotrina	181,00	197,00; 208,00	13,74

Na Figura 4 encontra-se um exemplo da avaliação da fenpropratrina na amostra de pimentão “2014-B” com a representação dos íons avaliados no método para confirmação para este agrotóxico.

Figura 4 - Representação dos íons de fenpropratrina na amostra de pimentão 2014-B, analisados por CGAR-EM (IE).



Fonte: *ChemStation*.

As transições monitoradas (Tabela 17) pelo método para a fenpropratrina, estão apresentadas na Figura 4, na qual observa-se a presença das duas transições específicas monitoradas na amostra de pimentão “2014-B”, atendendo o critério do tempo de retenção e do perfil das transições.

A Tabela 18 apresenta o resultado obtido das amostras analisadas no período de 2013 e 2014, avaliadas por CG- μ DCE.

Tabela 18 - Avaliação de amostras de pimentão por CG- μ DCE no período de 2013 e 2014.

AMOSTRAS CONVENCIONAIS	RESÍDUO DE AGROTÓXICO
2013-U	NARA
2013-V	Azoxistrobina
2014-A	NARA
2014-B	Fenpropatrina ³
2014-C	Clorfenapir
2014-D	Clorfenapir
2014-E	Clorfenapir, fenpropratrina ³ , lambda-cialotrina ³
AMOSTRAS ORGÂNICAS	RESÍDUO DE AGROTÓXICO
2013-A	NARA
2013-B	NARA
2013-C	NARA
2013-D	NARA

NARA - Não Apresentou Resíduo de Agrotóxico, dentre as substâncias analisadas; 1 - < LQ; 2 - ME - Monografia Excluída; 3 - NA - Monografia Não Autorizada para a cultura de pimentão.

Os resultados obtidos pela metodologia de CG- μ DCE, inicialmente são qualitativos, pois não houve tempo suficiente para a quantificação dos mesmos pelo método validado neste trabalho.

4.2.3 Avaliação no UHPLC-ESI-MS/MS

Para a identificação dos resíduos encontrados nas amostras, foram utilizados os mesmos critérios descritos anteriormente no item 4.2.2.

Para a confirmação das substâncias encontradas, todas foram novamente avaliadas por um método específico de UHPLC-ESI-MS/MS. Nesse método foram monitoradas, no mínimo, mais duas transições (íon precursor \rightarrow íon fragmento) além das anteriormente avaliadas, para cada substância analisada.

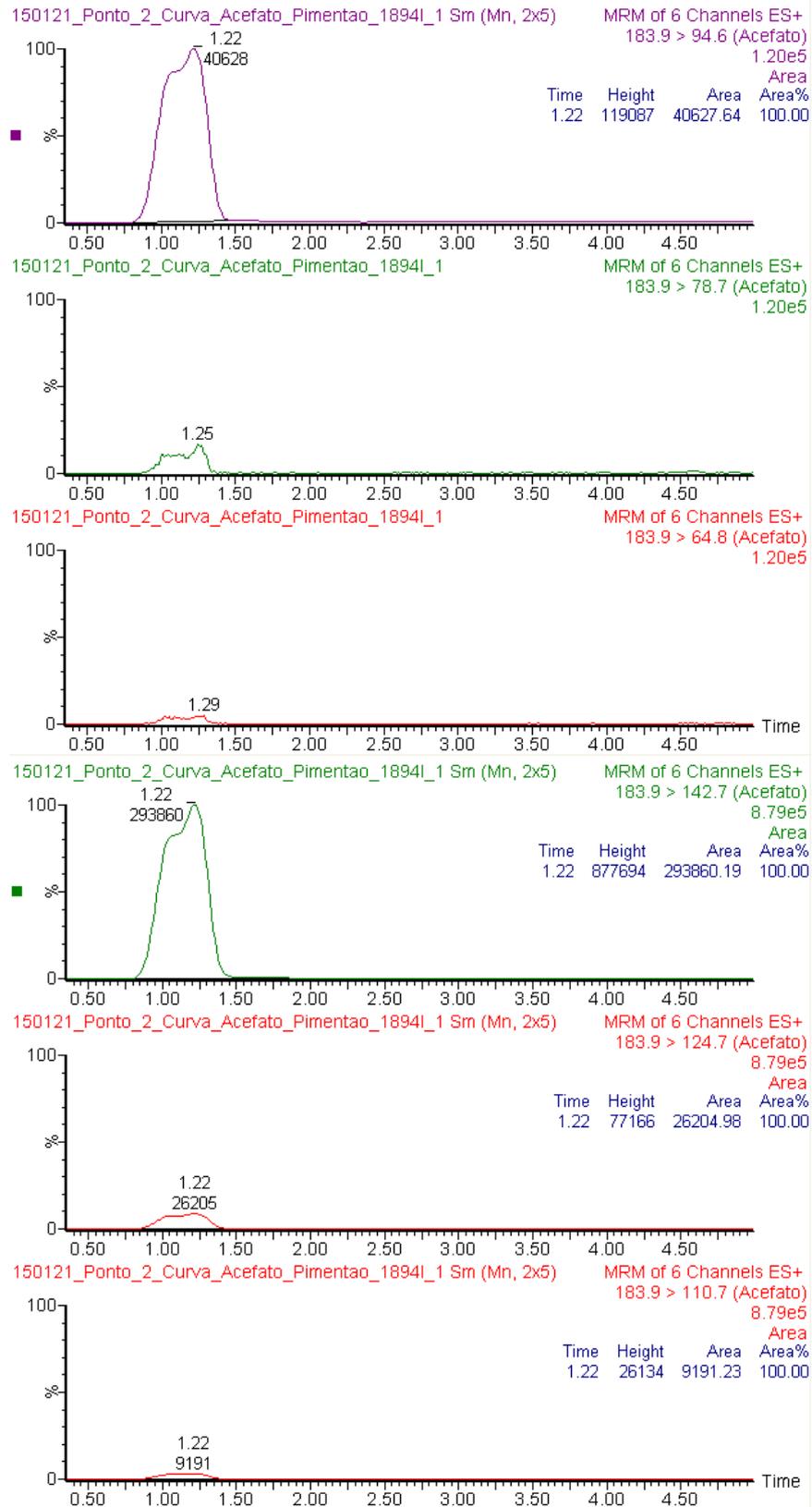
Os agrotóxicos para os quais foram utilizados os métodos de confirmação do UHPLC-ESI-MS/MS, bem como seus respectivos íon precursor e fragmentos e t_R (min) encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19 - Monitoramento do método de confirmação do UHPLC-ESI-MS/MS.

AGROTÓXICO	ÍON PRECUSOR	ÍON FRAGMENTOS	t_R (min)
Acefato	183,9	142,7; 124,7; 110,7; 94,6; 78,7; 64,8	1,22
Carbendazin	191,8	159,8; 131,7; 116,5; 105,8; 64,9; 58,9	2,21
Carbofurano	222,0	164,9; 136,9; 122,8; 90,0; 77,0; 55,1	6,62
Carbosulfano	381,2	364,2; 195,3; 133,0; 88,7	16,57
Clotianidina	249,8	168,7; 131,7; 112,8; 110,2; 95,8; 85,8; 70,9	2,98
Metalaxil	280,0	248,0; 220,0; 191,9; 158,9; 144,9; 104,8	8,74
Metamidofós	141,8	124,7; 109,7; 93,8; 78,8; 63,9	1,14
Metomil	162,9	121,8; 105,8; 87,8; 72,9; 64,9; 58,0	1,9

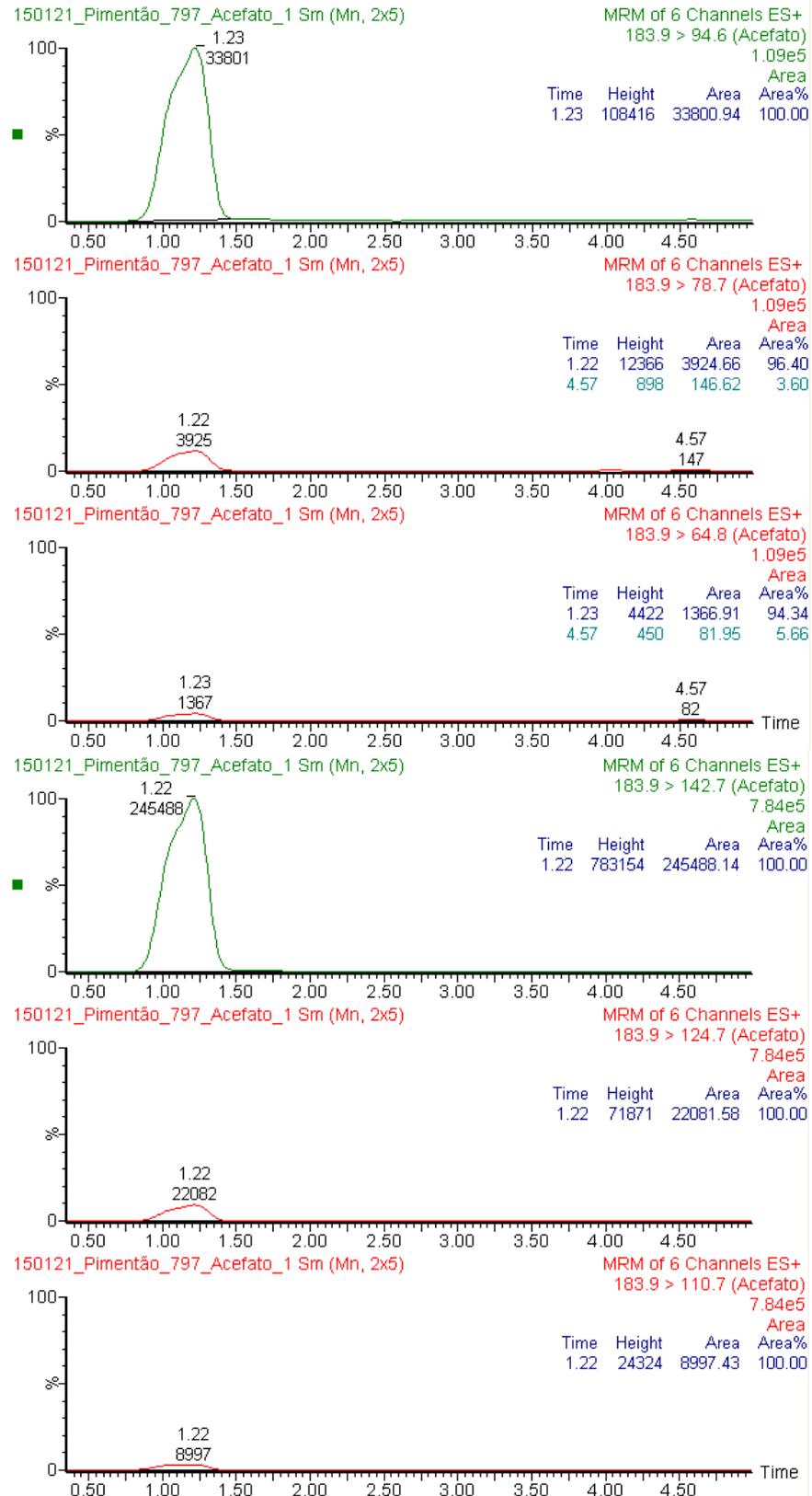
Como exemplo, na Figura 5 encontra-se a representação da SQRA acefato, e na Figura 6 encontra-se a avaliação do acefato na amostra de pimentão “2013-U” com a representação de todos os íons avaliados no método específico para este agrotóxico.

Figura 5 - Representação dos íons da SQRA acefato, analisados por UHPLC-ESI-MS/MS.



Fonte: MassLynx 4.1 SCN627.

Figura 6 - Representação dos íons do acefato na amostra de pimentão 2013-U, analisados por UHPLC-ESI-MS/MS.



Fonte: MassLynx 4.1 SCN627.

As transições monitoradas (Tabela 19) pelo método específico para o acefato, estão apresentadas nas Figuras 5 e 6, nas quais pode-se observar a presença das seis transições monitoradas para a amostra de pimentão “2013-U” e seu respectivo SQRA. Além disso, foi atendido o critério do tempo de retenção e do perfil das transições, garantindo a confirmação inequívoca da substância. Do mesmo modo, foram confirmadas todas as demais substâncias encontradas nas amostras analisadas.

A Tabela 20 apresenta o resultado obtido das amostras analisadas no período de 2013 e 2014 no Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do INCQS, avaliadas por UHPLC-ESI-MS/MS.

Tabela 20 - Avaliação de amostras de pimentão por UHPLC-ESI-MS/MS no período de 2013 e 2014.

AMOSTRAS CONVENCIONAIS	RESÍDUO DE AGROTÓXICO
2013-A	Acefato ³ , imidacloprido, metamidofós ²
2013-B	Acefato ³ , acetamiprido ³ , carbendazim ³ , imidacloprido, metamidofós ²
2013-C	Acefato, clorpirifós ³ , imidacloprido, metamidofós ²
2013-D	Azoxistrobina, imidacloprido, piriproxifem, tiametoxam
2013-E	Fenpiroximato ³ , tiametoxam
2013-F	Carbendazim ³
2013-G	Acefato, metamidofós ² , tiametoxam
2013-H	Acefato, metamidofós ²
2013-I	Azoxistrobina, tiametoxam
2013-J	Acefato, metamidofós ²
2013-L	Azoxistrobina, carbofurano ³ , carbosulfano ³ , imidacloprido
2013-K	Acefato, fenpiroximato ³ , imidacloprido, metamidofós ²
2013-M	NARA
2013-N	NARA
2013-O	Acefato, metamidofós ²
2013-P	Carbendazim ³
2013-Q	Acefato, carbendazim ³ , dimetomorfe ³ , metamidofós ²
2013-R	Acefato ³ , acetamiprido ³ , azoxistrobina, carbendazim ³ , clotinidina ³ , dimetoato ³ , imidacloprido, metamidofós ² , tiabendazol, tiametoxam
2013-S	Acefato ³ , imidacloprido, metamidofós ²
2013-T	Acefato ³ , azoxistrobina, clotinidina ³ , metamidofós ² , tiametoxam
2013-U	Acefato ³ , difenoconazol ¹ , imidacloprido ¹
2013-V	Azoxistrobina ¹ , difenoconazol ¹ , piraclostrobina ¹

Tabela 20 - (Continuação) Avaliação de amostras de pimentão por UHPLC-ESI-MS/MS no período de 2013 e 2014.

AMOSTRAS CONVENCIONAIS	RESÍDUO DE AGROTÓXICO
2014-A	Carbendazim ³
2014-B	Acefato ³ , azoxistrobina ¹ , difenoconazol ¹ , imidacloprido, metamidofós ² , piraclostrobina, tiametoxam ¹
2014-C	Acefato ³ , azoxistrobina, carbendazim ³ , clotianidina ³ , difenoconazol, metamidofós ² , piraclostrobina ¹ , tiametoxam
2014-D	Azoxistrobina ¹ , dimetomorfe ¹ , piraclostrobina
2014-E	Azoxistrobina ¹ , carbofurano ³ , carbosulfano ³ , clotianidina ³ , difenoconazol, piraclostrobina, piriproxifem ¹ , tiametoxam ¹

AMOSTRAS ORGÂNICAS	RESÍDUO DE AGROTÓXICO
2013-A	NARA
2013-B	Metomil ³
2013-C	Acefato ³ , metalaxil ³ , metamidofós ² , quinalfós ² , tiametoxam
2013-D	Carbendazim ³ , metoxifenoazida ³ , propargito ³ , tebuconazol, tiametoxam, triazofós ³

NARA - Não Apresentou Resíduo de Agrotóxico, dentre as substâncias analisadas; 1 - < LQ; 2 - ME - Monografia Excluída; 3 - NA - Monografia Não Autorizada para a cultura de pimentão.

Para uma melhor discussão a Tabela 21 apresenta um resumo dos resultados obtidos, mostrando a quantidade de resíduos de agrotóxicos encontrados nas 31 amostras analisadas e o resultado final considerando a condição legal no Brasil de cada substância encontrada.

Tabela 21 - Resultado final das amostras de pimentão avaliadas.

AMOSTRAS CONVENCIONAIS	RESÍDUO DE AGROTÓXICO	SATISFATÓRIO	INSATISFATÓRIO
2013-A	3 (1 NA, 1 ME)		X
2013-B	5 (3 NA, 1 ME)		X
2013-C	4 (1 NA, 1 ME)		X
2013-D	4	X	
2013-E	2 (1 NA)		X
2013-F	1 NA		X
2013-G	3 (1 ME)		X
2013-H	2 (1 ME)		X
2013-I	2	X	
2013-J	2 (1 ME)		X
2013-L	4 (2 NA)		X

Tabela 21 - (Continuação) Resultado final das amostras de pimentão avaliadas.

AMOSTRAS CONVENCIONAIS	RESÍDUO DE AGROTÓXICO	SATISFATÓRIO	INSATISFATÓRIO
2013-K	4 (1 NA, 1 ME)		X
2013-M	NARA	X	
2013-N	NARA	X	
2013-O	2 (1 ME)		X
2013-P	1 NA		X
2013-Q	4 (2 NA, 1 ME)		X
2013-R	10 (5 NA, 1 ME)		X
2013-S	3 (1 NA, 1 ME)		X
2013-T	5 (2 NA, 1 ME)		X
2013-U	3 (1 NA, 2 < LQ)		X
2013-V	4 (3 < LQ)	X	
2014-A	1 NA		X
2014-B	8 (2 NA, 1 ME, 3 < LQ)		X
2014-C	9 (3 NA, 1 ME, 1 < LQ)		X
2014-D	4 (2 < LQ)	X	
2014-E	11 (5 NA, 3 < LQ)		X
AMOSTRAS ORGÂNICAS	RESÍDUO DE AGROTÓXICO	SATISFATÓRIO	INSATISFATÓRIO
2013-A	NARA	X	
2013-B	1 NA		X
2013-C	5 (2 NA, 2 ME)		X
2013-D	6 (4 NA)		X

NARA - Não Apresentou Resíduo de Agrotóxico, dentre as substâncias analisadas; NA - Monografia Não Autorizada para a cultura de pimentão; ME - Monografia Excluída;

Das amostras de pimentão analisadas pelo laboratório, 77,4 % foram consideradas insatisfatórias, sendo 29,0 % apresentando resíduos de produtos não autorizados para essa cultura, 12,9 % com resíduos de produtos não autorizados no Brasil (monografias excluídas) e 35,5 % combinando resíduos de produtos não autorizados para o pimentão e não autorizados no Brasil.

As amostras consideradas satisfatórias foram 22,6 %, entretanto 12,9 % apresentaram de dois a quatro produtos autorizados abaixo do LMR e 9,7 % não apresentaram qualquer resíduo de agrotóxico, dentre as substâncias analisadas. É importante observar que embora as amostras sejam consideradas satisfatórias, essas apresentaram diferentes resíduos o que é uma questão de discussão quanto a qualidade do produto que está sendo consumido.

Quanto ao tipo de agricultura, o perfil se manteve para as amostras analisadas, tendo sido obtido um percentual de 77,8 % de amostras insatisfatórias e

22,2 % consideradas satisfatórias para a agricultura convencional, e 75 % de amostras insatisfatórias e 25 % satisfatória para agricultura orgânica.

Dentre os 77,4 % das amostras insatisfatórias 64,5 % apresentaram resíduo de produtos não autorizados para a cultura de pimentão, ressaltando um problema já identificado anteriormente em outros programas. Esse resultado pode ser explicado por um dos diversos fatores que compõem a realidade da agricultura brasileira, onde produtores de pequenas culturas utilizam agrotóxicos não autorizados em razão do número reduzido de produtos registrados para a cultura, ocasionado pela falta de interesse das empresas que desenvolvem/formulam os agrotóxicos em registrar a substância para culturas em que o retorno será menor que o investimento para o registro.

Nas amostras com resíduos de substâncias não autorizadas no Brasil (monografias excluídas), a presença desses produtos pode se dar pelo contrabando do ingrediente ativo/produto formulado, venda ilegal de agrotóxicos banidos no Brasil, ou até mesmo utilização de estoques antigos de agrotóxicos banidos.

Para as amostras orgânicas, as quais deveriam ser isentas de resíduos de agrotóxicos e apresentaram resultado insatisfatório, verificou-se a necessidade da criação de programas de monitoramento para esses produtos, para garantir o direito do consumidor em adquirir produtos com qualidade previamente assegurada.

5 CONCLUSÃO

O método proposto foi validado na matriz pimentão para 39 agrotóxicos, atendendo os critérios estabelecidos para resíduos de agrotóxicos por organismos internacionais e pela legislação nacional, aumentando para 164 agrotóxicos validados nessa matriz no Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do INCQS.

Conclui-se então que a situação do pimentão não se modificou nesses últimos anos, apesar dos esforços voltados para essa cultura. Entretanto, considerando os resultados isentos de agrotóxicos obtidos nas amostras orgânicas, é possível produzir o produto sem a presença dessas substâncias. Assim, as ações realizadas pelos programas de monitoramento, bem como as ações educativas ressaltando a necessidades das boas práticas agrícolas, devem ser reforçadas para garantir ao consumidor o acesso a um alimento seguro.

REFERÊNCIAS

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. **Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

ABRASCO. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde**. Rio de Janeiro, 2012. 101 f.

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

ANVISA. **Relatório de atividades de 2010 – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Brasília, 05 dez. 2011. 26 f.

ANVISA; UFPR. **Seminário de mercado de agrotóxico e regulação**. Brasília, 11 abr. 2012.

ANVISA. **Relatório de atividades de 2011 e 2012 – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Brasília, 29 out. 2013. 44 f.

ANVISA. **Monografias de Agrotóxicos**. Brasília, [2014]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>>. Acesso em: 08 jan. 2015.

ANVISA. **Reavaliações de Agrotóxicos**. Brasília, [2014a]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Reavaliacoes+de+Agrotoxicos/W+Reavaliacao+de+Agrotoxicos++Resolucao+RDC+n+10+2008>>. Acesso em: 08 jan. 2015.

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

BASTOS, L. H. P. **Resíduos de agrotóxicos em amostras de leite: uma avaliação visando à vigilância sanitária**. 2013. 269 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

BRASIL. Presidência da República – Casa Civil. Decreto nº 24.114, de 14 de abril de 1934. Publicado no **Diário Oficial da União, Brasília, DF**, 28 de Maio de 1934. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/D24114.htm>. Acesso em: 01 jun. 2013.

BRASIL. Presidência da República – Casa Civil. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Publicado no **Diário Oficial da União, Brasília, DF**, 12 de Julho de 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 01 jun. 2013.

BRASIL. Presidência da República – Casa Civil. Decreto nº 98.816, de 11 de janeiro de 1990. Publicado no **Diário Oficial da União, Brasília, DF**, 12 de Janeiro de 1990. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/Antigos/D98816.htm>. Acesso em: 01 jun. 2013.

BRASIL. Presidência da República – Casa Civil. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Publicado no **Diário Oficial da União, Brasília, DF**, 08 de Janeiro de 2002. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 01 jun. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Publicado no **Diário Oficial da União, Brasília, DF**, 02 de Junho de 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 09 jan 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 42 de 31 de dezembro de 2008. Publicado no **Diário Oficial da União, Brasília, DF**, 05 de Janeiro de 2009. Disponível em: <<file:///G:/Resid%C3%Aancia%20INCQS/TCC/introdu%C3%A7%C3%A3o/in%2042%202008%20d0%20mapa.html>>. Acesso em: 09 jan. 2015.

CODEX, Alimentarius Commission. **Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis - CAC/GL 40-1993**. Rev.01. Rome: FAO/WHO Joint Publications, 2003. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/378/cxg_040e.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2012.

CUSTODIO, R.; DE ANDRADE, J. C.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. **Química Nova**. Campinas, v. 20, n. 219, p. 219-225, 1997.

DG-SANCO, European Commission. **Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed - Document nº SANCO/12571/2013**. Europa, 01 Jan. 2014. 48 f.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Capsicum pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília, [2001]. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/capsicum/especies.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Análise das Violações encontradas em Alimentos nos Programas Nacionais de Monitoramento de Agrotóxicos**. São Paulo, jun. 2013. 19 f.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ E. L. R. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, Minas Gerais, v. 7, n. 2, p. 111-124, jul.-dez. 2004.

FONTES, P. C. R.; DIAS, E. N.; SILVA, D. J. H. Dinâmica do crescimento, distribuição de matéria seca na planta e produção de pimentão em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 94-99, jan.-mar. 2005.

FREITAS A.; SPITZ C.; OLIVEIRA E. Brasil fiscaliza agrotóxico só em 13 alimentos, enquanto EUA e Europa analisam 300: País é o maior consumidor das substâncias do mundo. Segundo Anvisa, tendência é que monitoramento fique mais abrangente. **O Globo**, Rio de Janeiro e Brasília, 30 jan. 2014 atualizado em 11 fev. 2014. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/economia/defesa-do-consumidor/brasil-fiscaliza-agrotoxico-so-em-13-alimentos-enquanto-eua-europa-analisam-300-11446519>> Acesso em: 14 jan. 2015.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A., MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

HAJŠLOVÁ, J.; HOLADOVÁ, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNÝ, M. Matriz-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, n. 2, p. 283-295, 1998.

HOFF, G. R.; ZONEN, P. Trace analysis of pesticides by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, Holanda, v. 843, p. 301–322, 1999.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUNCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009. 1056 f.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. **Produção, Importação, Exportação e Vendas de Ingredientes Ativos 2013**. Atualização em 15 set. 2014. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>> Acesso em: 08 jan. 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário de 2006**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <http://ftp.ibge.gov.br/Censos/Censo_Agropecuario_2006/Segunda_Apuracao/tabelas_pdf/tab_2_6.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – Aquisição alimentar domiciliar *per capita***. Rio de Janeiro, 2010. 282 f.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – Tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011. 351 f.

INCQS. Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde. **POP 65.3120.082: Parâmetros Estatísticos para Validação de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**. Rev. 06. Rio de Janeiro, 2013. 31 f. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS. Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde. **POP 65.1120.013: Utilização e verificação de balanças**. Rev. 10. Rio de Janeiro, 2014a. 10 f. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS. Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde. **POP 65.3120.096: Especificação, manuseio, armazenamento, preparo e registro de material de referência de agrotóxicos**. Rev. 07. Rio de Janeiro, 2014b. 09 f. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INCQS. Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde. **POP 65.3120.117: Qualificação operacional de instrumentos de cromatografia em fase**. Rev. 06. Rio de Janeiro, 2014c. 15 f. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos - DOQ-CGCRE-008**. Rev. 04, jul 2011. 19 f.

JARDIM, O, N. A.; CALDAS, D.,E. Exposição humana a substâncias Químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química nova**, Brasília, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 27 jul. 2009.

JAVARONI, R. C. A.; TALAMONI, J.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O.; LUCHINI, L. C. Estudo da degradação de lindano em solução aquosa através da radiação gama. **Química Nova**, São Paulo, v. 14, n. 4, p. 237-239, 1991.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2013.

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

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório Consolidado de Ingredientes Ativos**. Brasília, [2014]. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 08 jan. 2015.

MENTEN, J.O. PIB Brasil: mais uma vez, o agro salvando a lavoura. **CCAS - Conselho Científico para Agricultura Sustentável**, São Paulo, 15 jul. 2014. Disponível em: <<http://www.agriculturasustentavel.org.br/artigos/pib-brasil-mais-uma-vez--o-agro-salvando-a-lavoura>> Acesso: 15 jan. 2015.

MUNÓZ, J. A.; GONZÁLEZ, L. F.; GARCIA-AYUSO, L. E.; CASADO, A. G.; CUADROS-RODRIGUEZ, L. 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**, Espanha, v. 60, p. 433-77, 2003.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, Espanha, v. 23, p. 45-85, 2004.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 1620-1634, 28 jul. 2009.

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

SCHIESARI, L. **Defensivos agrícolas: Como evitar danos à saúde e ao meio ambiente**. Série Boas Práticas nº 8. Amazônia: IPAM - Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia, [2012]. 14 f. Disponível em: <http://www.ifc.org/wps/wcm/connect/4a761f00437b4db7b3afbb869243d457/IPAM_Del15+_Agrochemical+booklet.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 16 jan. 2015.

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.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, Polônia, v. 125, n. 3, p. 803-812, 01 abr. 2011.