



Daniela Roditi Lachter

Implementação e validação de método analítico para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos provenientes do Estado do Rio de Janeiro por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas tandem.

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Carlos German Massone

Coorientadora: Profa. Adriana Haddad Nudi

Rio de Janeiro

Setembro de 2017

Daniela Roditi Lachter

Implementação e validação de método analítico para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos provenientes do Estado do Rio de Janeiro por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas tandem.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Carlos German Massone

Orientador

Departamento de Química-PUC-Rio

Profa. Adriana Haddad Nudi

Coorientadora

Departamento de Química-PUC-Rio

Dra. Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso

INCQS/Fiocruz

Dr. Arthur de Lemos Scofield

Departamento de Química-PUC-Rio

Prof. Márcio da Silveira Carvalho

Coordenador Setorial do Centro

Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 19 de setembro de 2017

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

Daniela Roditi Lachter

Graduada em Engenharia Química pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio) em 2011.

Ficha Catalográfica

Lachter, Daniela Roditi

Implementação e validação de método analítico para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos provenientes do Estado do Rio de Janeiro por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas tandem/ Daniela Roditi Lachter; orientador: Carlos German Masson; coorientador: Adriana Haddad Nudi. – 2017.

136f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2017.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Agrotóxicos. 3. GC-MS-MS 4. Piretróides. 5. Triazinas. I. Massone, Carlos German. II. Adriana Haddad Nudi. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

Para meu marido, meus pais, irmão e amigos.

Agradecimentos

Ao Departamento de Química da PUC-Rio, onde me graduei e sempre tive total apoio de seus funcionários e infraestrutura.

À Fátima, secretária do departamento, por todo o apoio e amizade ao longo dessa jornada.

À minha coorientadora Adriana, por toda a sua confiança em me colocar nesse projeto, além da amizade, companheirismo e parceria nessa etapa tão importante da minha vida.

Ao meu orientador Carlos German Massone, por toda orientação e apoio ao longo do trabalho.

À professora Angela Wagener pelo apoio ao longo do trabalho.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Química que contribuíram para minha formação.

À Maria Helena e Lucia Helena, e toda a sua equipe, do INCQS/Fiocruz.

A todos os amigos do LABMAM: Letícia Luz, Letícia Lazzari, Milena, Giulia, Giovana, Ivy, Livia, Ricardo, Arthur Scofield, Lilian, Laura e Carol Arab.

Agradeço também a todos os amigos da pós, em especial à amiga Glaucia Olivatto por toda a parceria e amizade.

À minha amiga da vida, Flavia Gabel, por sempre me dar força e me motivar durante toda essa trajetória.

Agradeço muito a minha família, principalmente aos meus pais e meu irmão, por todo o incentivo, amor, apoio e ajuda nos momentos em que mais precisei.

Ao meu marido, Eduardo, sem palavras para o companheirismo, parceria e paciência, principalmente nos momentos em que precisei estar ausente.

Dedicação especial à minha mãe, Elizabeth, que sempre foi a minha referência e minha maior inspiração profissional, por depositar tanto amor e competência em seu trabalho. Dedico toda a minha trajetória como química de laboratório a ela e agradeço imensamente por me dar força nos momentos em que precisei e por dividir comigo suas experiências e ensinamentos.

Agradeço à Agência de Fomento CAPES, CNPq e à PUC-Rio pelo auxílio financeiro ao longo do trabalho.

A todos, muito obrigada!

Resumo

Lachter, Daniela Roditi; Massone, Carlos German; Nudi, Adriana Haddad. **Implementação e validação de método analítico para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos provenientes do Estado do Rio de Janeiro por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas tandem.** Rio de Janeiro, 2017. 136p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O presente trabalho envolve a implementação e validação de metodologia analítica para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos provenientes do Estado do Rio de Janeiro, cujos resultados servirão para um aumento de informações de um banco de dados sobre os mesmos, bem como para o aprimoramento do sistema nacional de saúde e promoção da saúde da população. Foram analisados os agrotóxicos das classes nitrogenados e piretróides. As amostras foram coletadas no CEASA da cidade do Rio de Janeiro, uma vez que este é o principal centro distribuidor de frutas e hortaliças da cidade. As culturas escolhidas para análise foram maçã, manga, morango, pepino e tomate de mesa. Após a otimização das condições cromatográficas, metodologia de extração e validação da metodologia pelos parâmetros de curva analítica e linearidade, seletividade (efeito matriz), repetibilidade, recuperação, homocedasticidade e limite de detecção do método, as amostras foram coletadas e analisadas no período de novembro de 2016 a fevereiro de 2017. A análise foi baseada no método QuEChERS e quantificação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas tandem, no modo de Monitoramento de Múltiplas Reações. Obteve-se um método de curta duração, inferior a vinte minutos, capaz de quantificar 41 agrotóxicos com dois monitoramentos precursor-produto para cada um dos analitos, apresentando as seguintes vantagens: rápido, econômico, fácil, efetivo, robusto e seguro. O LDM variou de 1,34 a 10,22 ng g⁻¹. A concentração de agrotóxicos das amostras esteve abaixo desses valores para a maioria (78% dos casos) dos 41 agrotóxicos analisados. Para as culturas de tomate e pepino, os agrotóxicos quantificados estiveram próximos aos seus respectivos limites de detecção. Para a

manga, observaram-se alguns picos de maior concentração para o propargito e lambda-cialotrina. O primeiro de uso não autorizado pela ANVISA e o segundo, embora presente, abaixo do limite estabelecido por esta agência. As culturas de maçã e morango apresentaram a maior contaminação por agrotóxicos (38 e 44% acima do LDM, respectivamente), muitos não autorizados pela ANVISA. Por ser um centro de grande distribuição de alimentos, a CEASA é suprida por diferentes fornecedores, sendo assim a variabilidade das fontes de alimentos coletados é muito grande e, portanto, a continuidade desta sistemática de avaliação torna-se necessária.

Palavras-chave

Piretróides; triazinas; agrotóxicos; GC/MS/MS, QuEChERS.

Abstract

Lachter, Daniela Roditi. Massone, Carlos German (Advisor). Nudi, Adriana Haddad (Co-Advisor). **Development and validation of a method for pesticide analysis in food produce from the state of Rio de Janeiro using gas chromatography with tandem mass spectrometry.** Rio de Janeiro, 2017. 136p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The present work regards the implementation and validation of a method for analysis of pesticide residues in produce from the state of Rio de Janeiro for the improvement of the national health system. Pyrethroids and triazines class pesticides were analyzed for this research. The samples were collected at CEASA in the city of Rio de Janeiro, since it is the main fruit and vegetable distribution center in the city. The produce chosen for the analyses were apple, mango, strawberry, cucumber and tomato. After optimization of the chromatographic conditions, extraction methodology and evaluation of the parameters linearity, selectivity (matrix effect), repeatability, recovery, homocedasticity and limits of detection of the method, the samples were collected, from November 2016 to February 2017. The QuEChERS method was used for the extraction of pesticide residues and the PSA method was used for the purification of extracts, both in triplicates. The extracts were analyzed by gas chromatography with tandem mass spectrometry in Selected Reaction Monitoring mode (Multiple Reaction Monitoring). A short run method was achieved for the determination of 41 pesticides with two precursor-product for each analyte. The analytical method showed several advantages - quick, cheap, easy, effective, rugged and safe. The detection limits were 1,34 ng/g and 10,22 ng/g. The majority of the pesticides analysed (78%) were below this result. For tomato and cucumber, the only quantified compounds were close to their respective detection limits. For the analysis of mango pesticides, some peaks of higher concentration for propargite and lambda-cyhalothrin were observed. The first one is not authorized by ANVISA and the second, although present, was found below the limit established by this agency. The apple and strawberry crops showed the highest contamination by pesticides (38

and 444%, respectively), many of which were not authorized by ANVISA. CEASA is a large food distribution center, so it is supplied by different distributors. The variability of the sources of food collected is very large. A more representative study on the quality of food would require a higher number of samples with a higher frequency of sampling.

Keywords

Pyrethroids; triazines; agrottoxics; GC/MS.

Sumário

1 Introdução	20
2 Objetivos	23
2.1. Objetivos gerais	23
2.2. Objetivos específicos	23
3 Revisão bibliográfica	24
3.1. Agrotóxicos: conceitos e histórico	24
3.2 Classificação dos agrotóxicos	26
3.2.1. Conforme o organismo alvo	26
3.2.2. Conforme a toxicidade	27
3.2.3. Conforme a estrutura química	28
3.2.4. Conforme a classe química	28
3.3. Contexto da indústria de agrotóxicos no Brasil	33
3.4. Contexto atual dos agrotóxicos no estado do Rio de Janeiro	37
3.5. Efeitos do uso de pesticidas à saúde humana	40
3.6. Uso de agrotóxicos em maçã, manga, morango, pepino e tomate	42
3.7. Metodologias analíticas para extração de resíduos de agrotóxicos	49
3.7.1. Técnica de extração de resíduos de agrotóxicos	51
3.7.2. Análise por GC-MS-MS	53
4. Materiais e métodos	55
4.1. Vidrarias	55
4.2. Equipamentos e acessórios	55
4.3. Reagentes e solventes	56
4.4. Implementação do método analítico	56
4.4.1. Preparo da curva analítica	69
4.4.2. Condições cromatográficas	69
4.5. Tratamento das amostras	71
4.5.1. Coleta das amostras	71
4.5.2. Processamento, homogeneização e conservação das amostras	72
4.5.3. Metodologia de extração dos agrotóxicos: quechers	72
4.5.4. Análise por GC-MS-MS	75
4.6. Parâmetros analíticos selecionados para validação do método	75

5. Resultados e discussão	83
5.1. Otimização do sistema gc-ms-ms: parâmetros cromatográficos	83
5.2. Parâmetros de validação	85
5.2.1. Curva analítica e linearidade	85
5.2.2. Seletividade/efeito matriz	87
5.2.3. Repetibilidade	94
5.2.4. Recuperação	95
5.2.5. Homocedasticidade	97
5.2.6. Limite de detecção do método	100
5.3. Monitoramento das amostras de frutos	101
6. Conclusões	123
7. Referência bibliográficas	125

Lista de figuras

Figura 1: Comercialização anual de agrotóxicos e afins, por área plantada no Brasil – 2000/2012. Fonte: IBGE, 2015.	21
Figura 2: Classificação toxicológica utilizada em rótulo dos agrotóxicos. Fonte: Karam <i>et al.</i> , 2014.	27
Figura 3: Estrutura química de alguns pesticidas organonitrogenados. Fonte: Biziuk <i>et al.</i> , 2013.	30
Figura 4: Estrutura química do aldicarb. Fonte: Sigma-Aldrich	30
Figura 5: Estrutura química de piretróides sintéticos. Fonte: Vieira <i>et al.</i> , 2007.	32
Figura 6: Estrutura química dos agrotóxicos piretróides permetrina (1), cipermetrina (2) e deltametrina (3).	33
Figura 7: Distribuição das amostras analisadas segundo a presença ou ausência de resíduos de agrotóxicos e o tipo de irregularidade. Fonte: ANVISA, 2015.	36
Figura 8: Municípios do Estado do Rio de Janeiro que mais notificaram intoxicações por agrotóxicos. Fonte: Ministério da Saúde, 2015.	38
Figura 9: Ranking dos alimentos em relação à quantidade de resíduos de agrotóxicos no ano de 2011. Fonte: Hypeness, 2011.	43
Figura 10: Amostra de maçã	46
Figura 11: Amostra de manga	46
Figura 12: Amostra de morango	47
Figura 13: Amostra de pepino	48
Figura 14: Amostra de tomate	48
Figura 15: Monitoramento dos íons massa/carga 94 e 110 (íon produto) provenientes da fragmentação do íon m/z 200 (precursor) para a análise do agrotóxico atrazina (Modificado de Lin <i>et al.</i> , 2007)	54
Figura 16: Figura esquemática de um triploquadrupolo. Fonte: Schreiber, 2010.	54
Figura 17: Etapas de tratamento das amostras de alimentos	71
Figura 18: Ceasa do Rio de Janeiro	72
Figura 19: Diagrama do método QuEChERS modificado	73
Figura 20: Divisão da fase orgânica e aquosa após a etapa de centrifugação	74

Figura 21: Perfil de pico para deltametrina para a concentração de 5ng ml ⁻¹ .	84
Figura 22: Otimização do Monitoramento de Reação Múltiplas com íon precursor / produto e janela de aquisição.	84
Figura 23: Linearidade dos compostos atrazina, pirimetanil, terbutilazina, viclozolina, MGK-264 e transflutrina.	86
Figura 24: Distribuição do percentual de recuperação das amostras analisadas	96
Figura 25: Avaliação da homocedasticidade e demais critérios de validação para a curva de baixa concentração da atrazina.	98
Figura 26: Avaliação da homocedasticidade e demais critérios de validação para a curva de baixa concentração da viclozolina.	99
Figura 27: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em ng g ⁻¹ , para a cultura de maçã entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. Meses na mesma escala.	102
Figura 28: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em ng g ⁻¹ , para a cultura de maçã entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. Meses em diferentes escalas.	103
Figura 29: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg ⁻¹ , para a cultura de manga entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. Meses na mesma escala.	105
Figura 30: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg ⁻¹ , para a cultura de manga entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. Meses em diferentes escalas.	106
Figura 31: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg ⁻¹ , para a cultura de morango entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. Meses na mesma escala.	108
Figura 32: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg ⁻¹ , para a cultura de morango entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. Meses em diferentes escalas.	109
Figura 33: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg ⁻¹ , para a cultura de pepino entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. Meses em diferentes escalas.	111
Figura 34: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg ⁻¹ , para a cultura de pepino entre	

novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses em diferentes escalas.** 112

Figura 35: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg^{-1} , para a cultura de tomate entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses em diferentes escalas.** 114

Figura 36: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg^{-1} , para a cultura de tomate entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses em diferentes escalas.** 115

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação de pesticidas em relação a sua aplicação	26
Tabela 2. Classificação de pesticidas de acordo com a toxicidade	27
Tabela 3. Classificação de pesticidas de acordo com a estrutura química	28
Tabela 4. Classificação de pesticidas de acordo com a classe química	28
Tabela 5. Características de pesticidas organonitrogenados	31
Tabela 6. Taxa de consumo de agrotóxicos e área plantada – Rio de Janeiro, 2007 a 2012.	37
Tabela 7. Limites máximos de resíduos autorizados para os agrotóxicos em estudo	44
Tabela 8. Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho	58
Tabela 9. Condições cromatográficas GC Ultra	70
Tabela 10. Parâmetros do TSQ Quantum XLS	70
Tabela 11. Teste F para avaliação de efeito matriz da atrazina em amostra de tomate	87
Tabela 12. Teste t para avaliação de efeito matriz da atrazina em amostra de tomate	87
Tabela 13. Teste F para avaliação de efeito matriz da terbutilazina em amostra de tomate	88
Tabela 14. Teste t para avaliação de efeito matriz da terbutilazina em amostra de tomate	88
Tabela 15. Teste F para avaliação de efeito matriz da fluzilazole em amostra de tomate	88
Tabela 16. Teste t para avaliação de efeito matriz da fluzilazole em amostra de tomate	89
Tabela 17. Teste F para avaliação de efeito matriz da atrazina em amostra de manga	90
Tabela 18. Teste t para avaliação de efeito matriz da atrazina em amostra de manga	90
Tabela 19. Teste F para avaliação de efeito matriz da terbutilazina em amostra de manga	91

Tabela 20. Teste t para avaliação de efeito matriz da terbutilazina em amostra de manga	91
Tabela 21. Teste F para avaliação de efeito matriz de fluzilazole em amostra de manga	91
Tabela 22. Teste t para avaliação de efeito matriz da fluzilazole em amostra de manga	92
Tabela 23. Resultados de repetibilidade para atrazina, pirimetanil, teflutrina, triadimefon, MGK-264, cipermetrina e bioaletrina	94
Tabela 24. Resultados para teste de recuperação para implementação do método	95
Tabela 25. Valores encontrados para o limite de detecção do método	100
Tabela 26. Concentrações máximas permitidas pela ANVISA em diferentes culturas e a concentração máxima reportada neste estudo	117
Tabela 27. Percentual encontrado de cada composto abaixo do LDM	122

Lista de abreviaturas e siglas

AGEITEC	Agência Embrapa de Informação Tecnológica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEASA	Centrais Estaduais de Abastecimento
CV	Coeficiente de Variação
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DIC	Collision – Induced Dissociation
DRfA	Dose de Referência Aguda
EI	Ionização Por Impacto de Elétrons
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA US	United States Environmental Protection Agency
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GARP	Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
GC-MS-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas Tandem
IA	Ingrediente Ativo
IBAMA	Ministério Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICH	International Conference on Harmonization
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IDMT	Ingestão Diária Máxima Teórica
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LABMAM	Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais
LD₅₀	Dose Letal Mediana
LDM	Limite de Detecção do Método
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MMQO	Método Mínimos Quadrados Ordinários
NA	Não Autorizado
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PSA	Amina Primária e Secundária

QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe multiresidue extraction method
SIM	Modo Monitoramento Íon Seleccionado
SPE	Extração em Fase Sólida

1

Introdução

A cidade do Rio de Janeiro tem recebido muitos eventos de grande porte, com o consequente aumento de turistas que visitam a cidade. A perspectiva da existência de serviços adequados é determinante no processo de escolha do destino por parte do turista. Um destes se refere à alimentação que no Brasil é a atividade com maior participação (40,94%) em relação ao valor da produção do turismo. Logo, o serviço de alimentação precisa ser continuamente configurado de maneira a satisfazer as expectativas dos turistas por qualidade e segurança dos alimentos oferecidos (Cribb, 2009).

As frutas e hortaliças que chegam ao Rio de Janeiro provêm tipicamente de propriedades familiares fluminenses, que trabalham em regime de monocultura, e são distribuídos na CEASA. Muitas destas culturas são particularmente dependentes de agrotóxicos e ainda não existem condições adequadas para controlar a exposição aos agrotóxicos dos produtos ali comercializados.

De acordo com a legislação vigente (Lei 7802/89 e Decretos 988116/90 e 4074/2002) os pesticidas são considerados agrotóxicos e são definidos como uma substância ou uma mistura de substâncias capazes de repelir, inibir, prevenir qualquer tipo de peste (Lara e Batista, 1992). Cabe ressaltar que o termo peste refere-se a quaisquer formas de vida animal, tais como pragas, insetos, ácaros, fungos, nematóides, bactérias e roedores, ou de vida vegetal, como, por exemplo, ervas daninhas indesejáveis e prejudiciais a agricultura, pecuária e seus produtos.

No Brasil, o consumo de agrotóxicos tem sido superior a 300 mil toneladas, sendo que, enquanto a área agrícola cresceu 78% a partir da década de 60, a quantidade de ingrediente-ativo consumida de agrotóxico aumentou 700% no mesmo período (Spadotto *et al.*, 2004). O seu uso

indiscriminado pode oferecer riscos à saúde humana assim como contaminar águas subterrâneas e superficiais, solos e atmosfera e, por conseguinte, acarretar um desequilíbrio ao ecossistema. A Figura 1 mostra o consumo anual de agrotóxicos no período de 2000 a 2012.

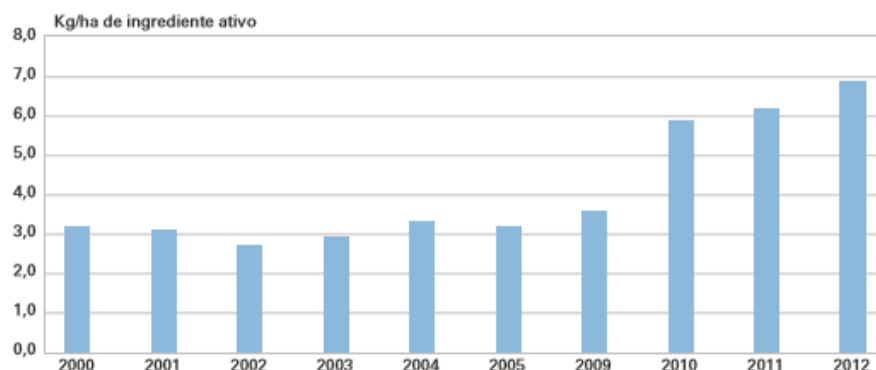


Figura 1: Comercialização anual de agrotóxicos e afins, por área plantada no Brasil – 2000/2012. Fonte: IBGE, 2015.

Dentro do grupo dos agrotóxicos nitrogenados, encontram-se, principalmente, os carbamatos e triazinas. Nesse estudo, foram avaliados agrotóxicos da classe das triazinas, derivados nitrogenados heterocíclicos, que são herbicidas químicos utilizados para o controle de ervas daninhas, devido à sua capacidade de inibir a fotossíntese. Os piretróides são, atualmente, os inseticidas mais utilizados, pois apresentam baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental e são necessárias baixas quantidades para exercerem sua ação (Santos *et. al.*, 2007). São derivados sintéticos da piretrina, ésteres tóxicos isolados das flores da espécie *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas (Santos *et al.*, 2007).

O método a ser utilizado para a extração de resíduos de agrotóxicos será o QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rudge and safe*) - método multirresíduos no qual, em uma só análise são determinados vários compostos (AOAC, 2007). O processo de extração dos agrotóxicos é caracterizado por uma fase inicial de extração com acetonitrila acidificada, seguida de partição com a adição dos sais sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e acetato de sódio ($Na(C_2H_3O_2)$), que facilitam a retirada de substâncias polares da matriz. A etapa seguinte consiste no *clean up*, que visa a limpeza

de interferentes das amostras, onde será utilizado o sorvente bondesil PSA. A quantificação será feita por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo (GC-MS-MS), através da ionização por impacto de elétrons (EI). O método mostra-se sensível e seletivo, conseguindo detectar os agrotóxicos em nível traço, além de determinar um grande número de agrotóxicos sem uma única análise.

2 Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente estudo visa implementar e validar metodologia para a extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos produzidos no Estado do Rio de Janeiro, com detecção e quantificação desses compostos em sistema GC-MS-MS, aumentando e aprimorando o banco de dados sobre agrotóxicos nos mesmos.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Implementar e validar o método analítico QuEChERS para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos, de maneira a otimizá-lo em relação ao tempo e simplicidade de execução;
- ✓ Aplicar a etapa de *clean up* nos extratos com o adsorvente PSA;
- ✓ Validar a metodologia analítica segundo os parâmetros de curva analítica de linearidade, seletividade (efeito matriz), repetibilidade, recuperação, homocedasticidade e limite de detecção do método;
- ✓ Implementar metodologia analítica para a determinação e quantificação de agrotóxicos em alimentos em GC-MS-MS;
- ✓ Aplicar a metodologia em amostras de tomate, pepino, maçã, manga e morango coletadas no CEASA do Rio de Janeiro;
- ✓ Disponibilizar informações sobre a presença de agrotóxicos em alimentos, direcionada para diferentes atores sociais do setor visando também a promoção da saúde da população.

3

Revisão Bibliográfica

3.1.

Agrotóxicos: conceitos e histórico

O uso de agrotóxicos na agricultura é relatado desde o século XI, onde há registros da utilização de compostos sulfurados, derivados de arsênio (século XVII), cloreto de mercúrio (século XVIII) e sais de cobre (século XIX) (Nunes e Ribeiro, 1999). Por outro lado, a utilização de compostos orgânicos com propriedades pesticidas era reduzida à aplicação de inseticidas naturais, como a nicotina (século XVII), a rotenona (derivado das raízes de legumes) ou o *pyretrum* (extraído da flor do crisântemo), estes utilizados na segunda metade do século XIX (Nunes e Ribeiro, 1999).

A utilização de agrotóxicos popularizou-se na década de 40 durante a Segunda Guerra Mundial. O DDT foi o primeiro pesticida a ser largamente utilizado durante a guerra para o combate de mosquitos vetores de doenças como malária e tifo. Barato e eficaz em curto prazo, suas propriedades inseticidas foram descobertas em 1939 pelo químico suíço Paul Hermann Müller (Porto e Soares, 2012).

Após a Segunda Guerra Mundial, muitos agrotóxicos passaram a ser utilizados em larga escala nos Estados Unidos e Europa. Muitos deles serviram de arma química nas guerras da Coreia e do Vietnã, conhecidos como “agente laranja”, desfolhante que afetou milhares de soldados e civis, além de ter contaminado rios, mares e seres vivos presentes nos ambientes em que foi jogado (Lucchesi, 2005).

A expansão da população mundial tem exigido uma maior demanda por alimentos e matérias-primas, o que tem estimulado o desenvolvimento tecnológico nos segmentos de biotecnologias, agronegócios, alimentos, entre outros. Entretanto, o aumento da produção agrícola está associado a

impactos negativos sobre a saúde e o meio ambiente (Porto e Soares, 2012).

No Brasil, a Lei Federal nº. 7.802 de 11.07.89, alterada pela Lei nº. 9.974 de 06.06.2000, regulamentada pelo Decreto nº. 4.074 de 04.01.2002, atualmente modificado pelos Decretos nº. 5.981 de 06.12.2006 e nº. 5.549 de 29.09.2005, define agrotóxicos e afins como: “produtos ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Além de atingirem os organismos alvo, os agrotóxicos entram em contato com as águas de drenagem das terras agrícolas, com a permeação através dos solos e com os efluentes provenientes de instalações que utilizam agrotóxicos, causando impactos negativos ao meio ambiente e ao ser humano, além de desequilíbrio ecológico (Biziuk *et al.*, 1996; Younes e Galal-Gorchev, 2000; Dores e De-Lamonica-Freire, 2001).

Os agrotóxicos compreendem uma grande variedade de compostos químicos, com diferentes estruturas químicas e, conseqüentemente, diferenças em relação à toxicidade, persistência, biotransformação e eliminação (Younes e Galal-Gorchev, 2000) e podem ser classificados conforme o organismo alvo, a toxicidade, a estrutura química e a classe química.

Os nitrogenados são mundialmente utilizados em função do seu baixo custo, pronta disponibilidade, eficácia, capacidade de combater uma grande quantidade de pragas e por serem menos estáveis no meio ambiente do que os compostos organoclorados (Tankiewicz *et al.*, 2010). Já os piretróides têm sido os inseticidas mais utilizados atualmente, pois apresentam baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental, são

efetivos contra um largo espectro de insetos e são necessárias baixas quantidades para exercerem sua ação (Santos *et al.*, 2007).

3.2 Classificação dos agrotóxicos

3.2.1. Conforme o organismo alvo

A classificação dos agrotóxicos de acordo com a sua aplicação é apresentada na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Classificação de pesticidas em relação a sua aplicação

Classe	Subclasse	Aplicação
Zoocidas – agentes de combate a pestes animais	Inseticidas	Destruição de inseticidas
	Alfícidas	
	Acaricidas	Destruição de pulgões
	Atrativos	Destruição de ácaros
	Bactericidas	Para atrair pestes
	Larvicidas	Destruição de bactérias
	Limacidas	Destruição de larvas
	Moluscicidas	Para matar lesmas
	Nematicidas	Para matar caracóis
	Ovicidas	Para matar nematoides
		Destruição de ovos de insetos e ácaros
	Repelentes	Para repelir insetos
	Rodenticidas	Para combater roedores
Fungicidas		Para combater fungos
Herbicidas		Para combater plantas invasoras (ervas daninhas)
Reguladores de crescimento vegetal - estimulantes ou inibidores de processo de vida das plantas	Desflorantes	Para remoção de excessos de flores
	Desfoliantes	Para remoção de excessos de folhas
	Dessecantes	Para secar plantas

Sinergéticos		Para potencializar a ação de outras substâncias.
--------------	--	--

Fonte: Biziuk *et al.*, 2013.

3.2.2. Conforme a toxicidade

A classificação dos agrotóxicos em relação a sua toxicidade é baseada na LD₅₀ oral das formulações líquidas e sólidas, por mg kg⁻¹ de peso, conforme a Tabela 2. Os produtos são classificados e rotulados segundo a Figura 2 em extremamente tóxico, altamente tóxico, medicamente tóxico e pouco tóxico.

Tabela 2: Classificação de pesticidas de acordo com a toxicidade

Toxicidade	LD ₅₀
I - Extremamente tóxico	≤ 25
II - Altamente tóxico	$25 \leq LD_{50} \leq 200$
III - Medicamente tóxico	$200 \leq LD_{50} \leq 2000$
IV - Pouco tóxico	> 2000

Fonte: Biziuk *et al.*, 2013.

CLASSE TOXICOLÓGICA	
	I EXTREMAMENTE TÓXICO
	II ALTAMENTE TÓXICO
	III MEDIAMENTE TÓXICO
	IV POUCO TÓXICO

Figura 2: Classificação toxicológica utilizada em rótulo dos agrotóxicos. Fonte: Karam *et al.*, 2014.

3.2.3. Conforme a estrutura química

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química, conforme mostrado na Tabela 3: Classificação de pesticidas de acordo com a estrutura química

Classe	Exemplo
Pesticidas inorgânicos	Arsênicos ou fluoretos, herbicidas inorgânicos
Pesticidas orgânicos	Organoclorados e organofosforados, carbamatos

Fonte: Biziuk *et al.*, 2013.

3.2.4. Conforme a classe química

Outra forma de classificar os pesticidas é de acordo com a sua classe química, conforme mostrado na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Classificação de pesticidas de acordo com a classe química

Classe	Exemplo
Organoclorados	DDT, endosulfan, metoxicloro
Organofosforados	Malationa, diclorvos,
Carbamatos e seus derivados	Aldicarbe, aminocarbe, furatiocarbe
Derivados do ácido fenoxicarboxílico	2,4-D, MCPA, dicamba
Triazinas e seus derivados	Atrazina, simazina, anilazina

Fonte: Biziuk *et al.*, 2013.

Os organoclorados foram os primeiros pesticidas a serem introduzidos na agricultura e nos controles das pestes. São compostos orgânicos que contém carbono, hidrogênio e cloro em sua estrutura química. Apresentam como principais características: baixa volatilidade, elevada estabilidade química e lipossolubilidade, lentas taxas de degradação e de biotransformação, persistindo no meio ambiente por longo tempo (Biziuk *et al.*, 2013).

Em função da sua alta estabilidade (de até 30 anos), eles ainda se mantêm presentes por muito tempo no meio ambiente e podem ser transportados pelo ar ou pela água por grandes distâncias e, por isso, têm sido substituídos pelos pesticidas organonitrogenados e organofosforados (Biziuk *et al.*, 2013).

Os organofosforados derivam do ácido fosfórico, tiofosfórico ou ditiofosfórico e incluem todos os compostos orgânicos que contenham átomos de carbono e fósforo em sua estrutura. Assim como os organoclorados, os organofosforados são altamente tóxicos e lipossolúveis, entretanto, decompõem-se dentro de dias ou semanas e, por isso, são raramente encontrados na cadeia alimentar (da Silva, 2015). São utilizados como acaricidas, fungicidas, inseticidas e nematocidas.

De amplo uso, os compostos chamados de organonitrogenados são aqueles que possuem nitrogênio em sua estrutura química. Entretanto, esses agrotóxicos são conhecidos por suas classificações químicas e estão relacionados, principalmente, aos carbamatos, triazinas e suas derivações (Figura 3).

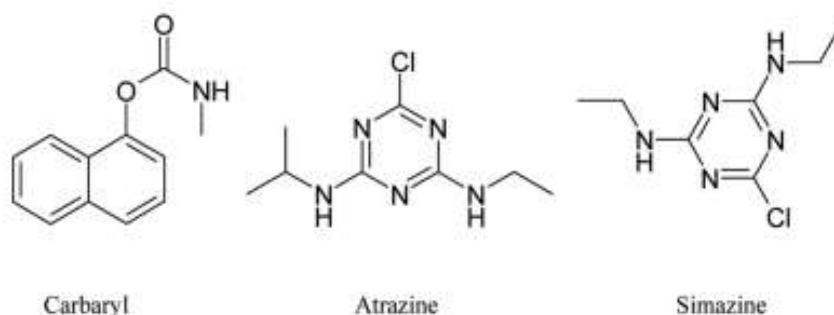


Figura 3: Estrutura química de alguns pesticidas organonitrogenados. Fonte: Biziuk *et al.*, 2013.

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico e não são persistentes no meio ambiente (da Silva, 2015). São utilizados como inseticidas, principalmente em insetos que são resistentes a compostos organofosforados. Irregularmente utilizado, o carbamato aldicarb, mostrado na Figura 4 é comercializado ilegalmente com o nome de chumbinho.

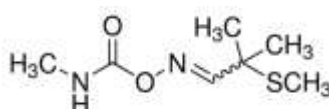


Figura 4: Estrutura química do aldicarb. Fonte: Sigma-Aldrich

As triazinas estão dentre as classes de herbicidas mais utilizadas no mundo, principalmente no controle seletivo de ervas daninhas (Duarte *et al.*, 2016) e são derivadas nitrogenadas heterocíclicas, em que o anel é composto de átomos de nitrogênio e de carbono alternadamente. A descoberta das moléculas deste grupo químico ocorreu no início da década de 1950 pela empresa Geigy Química, de origem suíça, e seu uso comercial teve início na década de 60 (Kussumi, 2004).

A atrazina é uma das triazinas mais comuns e é um contaminante potencial em virtude das suas características químicas, como: hidrólise lenta, solubilidade em água de moderada a baixa e alta solubilidade em solventes orgânicos. As atrazinas (Figura 3) são derivados simétricos clorados da triazina, que é o produto da polimerização do cloro de cianogênio na presença de cloreto de alumínio anidro como catalisador (Kussumi, 2004).

A Tabela 5 apresenta as características dos pesticidas organonitrogenados.

Tabela 5: Características de pesticidas organonitrogenados

Classe química	Características
Carbamatos	Principalmente ésteres de ácidos carbâmico; decompõem rapidamente no solo; pouco solúvel em água; melhor solúvel em solventes orgânicos; utilizados mundialmente para o combate a insetos, fungos e ervas daninhas, e também como reguladores de crescimento de plantas.
Triazinas	Utilizadas no combate a ervas daninhas e no controle de crescimento milho, soja, grãos e outros cultivos. Estáveis no solo. Uma das triazinas é a atrazina, 90% das quais é aplicada nas culturas de milho.

Fonte: Tankiewicz *et al.*, 2010.

Os piretróides são os derivados sintéticos das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas. As piretrinas foram utilizadas como inseticidas durante muitos anos, devido a sua ação sob uma vasta variedade de insetos e à baixa toxicidade em mamíferos. Entretanto, as piretrinas naturais apresentam grande instabilidade à luz solar e ao ar, o que diminui a sua eficácia no controle de pragas da agricultura e de outros insetos (Santos *et al.*, 2007).

Na década de 70, houve o início do uso dos piretróides sintéticos na agricultura, após mudança estrutural introduzida nas piretrinas para modificar a estrutura química com o intuito de se obter substâncias com

maior estabilidade e potencial inseticida (Santos *et.al.*, 2007) (Figura 5). A inclusão de átomos de nitrogênio, enxofre e átomos de halogênios às piretrinas solucionou os problemas de estabilidade relacionados às substâncias naturais, enquanto manteve relativamente baixa a toxicidade aguda em mamíferos (Soderlund, 2002).

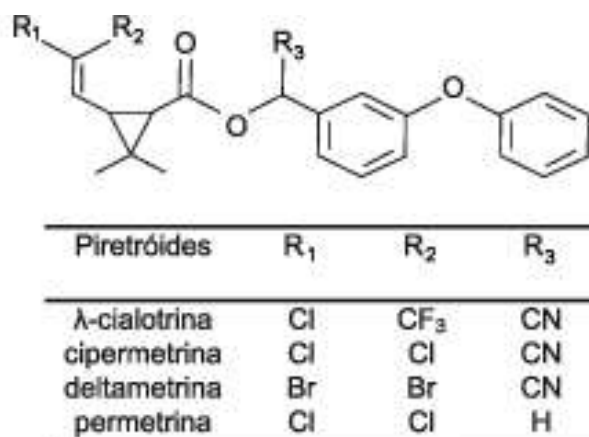


Figura 5: Estrutura química de piretróides sintéticos. Fonte: Vieira *et al.*, 2007.

Em virtude das vantagens de seu uso, os piretróides tornaram-se um sucesso e tiveram seu uso aumentado e ampliado para outros fins, além da agricultura, levando, conseqüentemente, à exposição de organismos não alvos aos seus efeitos tóxicos (Santos *et al.*, 2007).

Como exemplo de piretróides utilizados no controle de insetos das lavouras, podem ser citadas as substâncias deltametrina, permetrina e cipermetrina, mostradas na Figura 6 (Grisolia, 2005). A deltametrina é o piretróide mais tóxico para vertebrados dentro de todos os conhecidos até o momento. Esse agrotóxico foi obtido do isolamento de apenas um isômero (o mais ativo, D-cis). Normalmente, os piretróides são usados como misturas de dois ou mais isômeros e, por isso, diferenças nas estruturas químicas são importantes para a sua toxicidade (Santos *et al.*, 2007).

A nova tendência para o futuro está na utilização de novos agrotóxicos, chamados neonicotinóides, que começaram a ser utilizados em substituição aos piretróides, organofosforados e carbamatos, uma vez que as pragas estão cada vez mais resistentes a esses compostos (Tankiewicz *et al.*, 2010). Outra nova tendência é o uso de biopesticidas, que incluem substâncias naturais derivadas de animais, plantas, bactérias e minerais,

utilizadas para o controle de pragas, além de substâncias produzidas a partir de plantas geneticamente modificadas (EPA, 2017).

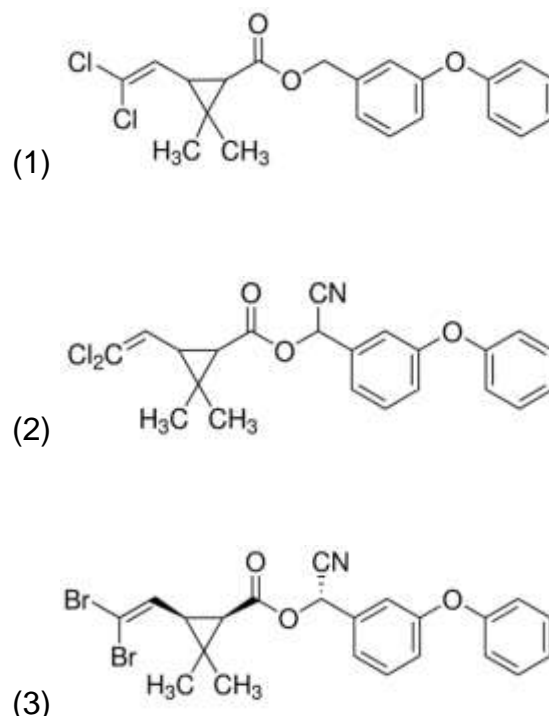


Figura 6: Estrutura química dos agrotóxicos piretróides permetrina (1), cipermetrina (2) e deltametrina (3).

3.3.

Contexto da indústria de agrotóxicos no Brasil

No Brasil, a disseminação do uso de agrotóxicos foi ampliada em meados da década de 1940 e consolidada nos anos seguintes, a partir do alinhamento das políticas públicas às premissas da “Revolução Verde”, no final da década de 60. A “Revolução Verde” se refere à disseminação de novas práticas visando o aumento na produção agrícola a partir da década de 1950 nos Estados Unidos e Europa e em outros países nas décadas seguintes.

O aumento das vendas dos agrotóxicos se deveu a uma política oficial de incentivo reforçada, em 1975, pelo lançamento do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA). O aumento da tecnologia e renda dos agricultores também contribuiu para esse aumento (Paschoal,

1979; Porto e Soares, 2012). A partir de então, o mercado de agrotóxicos mostra-se em crescimento significativo, expandindo-se, em média, 10% ao ano, de forma que se manteve entre 1970 e 2007 entre os seis maiores consumidores do mundo (Tavella *et.al.*, 2011).

Como resultado, obteve-se o avanço na modernização da agricultura brasileira, privilegiando a introdução de pacotes tecnológicos e maquinários, a isenção de impostos sobre produtos importados, bem como o incentivo ao uso de defensivos agrícolas para intensificar não só o rendimento dos cultivos como também gerar condições ambientais favoráveis ao extermínio das pragas (Agra e Santos 2001; Matos e Pessoa, 2011; Porto e Soares, 2012).

A partir de 1992, com o acontecimento do Fórum Internacional Rio-92, novas abordagens em relação a contaminação no meio rural foram realizadas, com a intensificação de novos estudos por diversas instituições de pesquisa. Porém, a análise dos resultados obtidos após os 20 anos decorridos daquele fórum indica que os avanços em pesquisa nesta área foram modestos, caracterizados, principalmente, por estudos regionalizados ou pontuais (Karam *et al.*, 2014). Somado a isso, o consumo de agrotóxicos no Brasil aumentou de forma expressiva, e em 2008 o Brasil assumiu o posto de maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo (Karam *et al.*, 2014).

O Decreto nº 7.802, de 04 de janeiro de 2002, estabelece que o sistema de registro de agrotóxicos no Brasil é designado aos seguintes órgãos: ANVISA, vinculada ao Ministério da Saúde; IBAMA, vinculado ao Ministério do Meio Ambiente; e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

O crescente uso de agrotóxicos na produção agrícola e a presença de resíduos acima dos níveis autorizados nos alimentos têm sido alvos de preocupação no âmbito da saúde pública, exigindo, das diversas esferas de governo investimento e organização para implementar ações de controle do uso dessas substâncias (ANVISA, 2014). A ANVISA é o órgão federal responsável pela avaliação toxicológica para fins de registro de agrotóxicos e pela reavaliação de produtos já registrados.

Com o objetivo de estruturar um serviço para avaliar e promover a qualidade dos alimentos em relação ao uso de agrotóxicos foi criado em 2001 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) em Alimentos da ANVISA. Dessa forma, o PARA se constituiu como um dos principais indicadores do uso irregular de agrotóxicos em alimentos adquiridos no mercado varejista e consumido pela população e contribui para a segurança alimentar, visando prevenir intoxicações agudas ou crônicas que podem resultar da exposição indevida aos agrotóxicos. Os níveis de resíduos de agrotóxicos são avaliados em relação aos LMR estabelecidos pela ANVISA.

Dados dos últimos programas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos sugerem uma melhora na quantidade de resíduos de agrotóxicos encontrados nos alimentos avaliados nos últimos anos.

Os resultados do PARA 2012 (ANVISA, 2014) indicam que 25% das amostras analisadas foram consideradas insatisfatórias, onde 1,9% das amostras continham agrotóxicos em níveis acima do LMR, 21% continham agrotóxicos não autorizados (NA) para a cultura e 1,9% do total continham resíduos acima do LMR e NA simultaneamente (PARA, 2012).

Já no período de 2013 a 2015, 19,7% das amostras avaliadas foram consideradas insatisfatórias, sendo que 16,7% apresentaram resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura, conforme Figura 7 (ANVISA, 2015). Pode-se observar que houve uma melhora na qualidade das amostras analisadas em relação aos resíduos de agrotóxicos, porém, houve um pequeno aumento em relação a quantidade de amostras consideradas insatisfatórias.

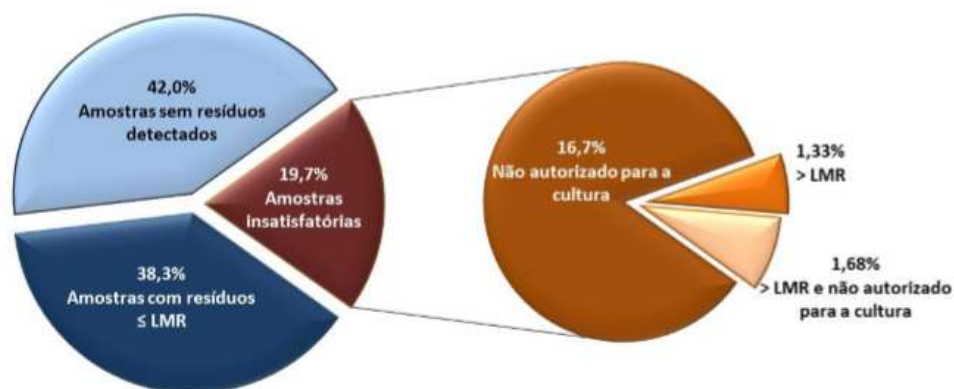


Figura 7: Distribuição das amostras analisadas segundo a presença ou ausência de resíduos de agrotóxicos e o tipo de irregularidade. Fonte: ANVISA, 2015.

Uma extensa lista de agrotóxicos utilizados na agricultura brasileira é proibida pela União Europeia (EU) e Estados Unidos. São permitidos para uso nas lavouras brasileiras 434 ingredientes ativos de agrotóxicos. Entre os 50 mais utilizados, 22 são proibidos em países europeus (Gomes e Kokay, 2015). No Brasil, a região sudeste é a que apresenta maior comercialização de agrotóxicos e afins (IBGE, 2015).

A ANVISA avalia e classifica toxicologicamente os agrotóxicos, seus componentes e afins. Os resultados desses estudos são utilizados para estabelecer a classificação toxicológica dos produtos e para calcular o parâmetro de segurança que consiste na IDA de cada ingrediente ativo.

Para avaliar o impacto da exposição, antes de autorizar o uso de um ingrediente ativo para uma cultura agrícola, é feito o cálculo da Ingestão Diária Máxima Teórica, segundo a equação abaixo, definida pelo quociente: somatório dos produtos do consumo médio *per capita* diário de cada alimento e o respectivo LMR/peso corpóreo.

$$IDMT = \frac{\sum(LMR \times \text{consumo do alimento})}{\text{Peso corpóreo}}$$

Quando a IDMT não ultrapassa a IDA, os LMR estabelecidos para um agrotóxico nas várias culturas são considerados seguros para a saúde do consumidor.

Cabe a ANVISA e aos demais órgãos competentes reavaliar o registro de agrotóxicos quando surgirem novas informações que indiquem

a necessidade de uma revisão das suas condições de uso. Entre os ingredientes ativos banidos no país em decorrência de processos de reavaliação citam-se benomil, heptacloro, monocrotofós, lindano, pentaclorofenol, triclofom, cihexatina, endossulfam e metamidofós, e outros como acefato, captana, folpete, carbendazim, clorpirifós, metaldeído e fosmete (ANVISA, 2014).

Em função de ser um país com ampla área rural e clima favorável, o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de produtos agrícolas no mundo e, como consequência, é um grande consumidor de agrotóxicos (Bastos *et al.*, 2012). A frota agrícola brasileira cresceu 44% desde 2008 (Araújo, 2017), com o Mato Grosso liderando o ranking de frotas, seguido por Rio Grande do Sul e São Paulo.

3.4.

Contexto atual dos agrotóxicos no Estado do Rio de Janeiro

Em 2012, o PARA publicado pela ANVISA (2014) indicou que o percentual de amostras de alimentos insatisfatórias para consumo no Rio de Janeiro foi de 37,5%. Além disso, o relatório “Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos no Estado do Rio de Janeiro”, divulgado em 2015 pelo Ministério da Saúde, mostra que o Rio de Janeiro ocupa o décimo lugar no *ranking* de estados que mais consomem agrotóxicos no país. Segundo a publicação, entre 2009 e 2010, o consumo estadual passou de 3,40 kg/ha para 125,08 kg/ha, enquanto a área plantada se manteve na ordem de 200 mil hectares, conforme mostrado na Tabela 6. A média nacional para o mesmo período foi de 15,84 kg/ha.

Tabela 6: Taxa de consumo de agrotóxicos e área plantada – Rio de Janeiro, 2007 a 2012.

RIO DE JANEIRO	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Área plantada (hectare)	219.874	222.319	219.074	235.067	192.515	208.847
Taxa de consumo de agrotóxico (kg/ha)	4,01	2,97	3,40	125,08	183,31	151,01

Fonte: Ministério da Saúde, 2015.

Esses dados sugerem preocupação em relação a qualidade dos alimentos consumidos pela população fluminense e a necessidade de estudos que façam essa avaliação. Além disso, O Rio de Janeiro se tornou, nos últimos anos, uma referência como cidade realizadora de grandes eventos. Diversos eventos esportivos, religiosos e culturais de relevância nacional ocorreram na cidade, tais como a Jornada Mundial da Juventude, Rock in Rio, Copa do mundo de 2014 e as Olimpíadas de 2016. Somam-se a estes eventos festas tradicionais como o Ano Novo e o Carnaval.

Como consequência do fluxo maior de turistas ocorre uma maior demanda por alimentos de qualidade para atender ao aumento temporário da população da cidade. As frutas e hortaliças que chegam ao Rio de Janeiro provêm tipicamente de propriedades familiares fluminenses, que trabalham em regime de monocultura, e são distribuídos na CEASA. Muitas destas culturas são particularmente dependentes de agrotóxicos e infelizmente, segundo o presidente da CEASA, não existem condições adequadas para controlar a exposição aos agrotóxicos dos produtos ali comercializados.

Entre as notificações de consumo e intoxicações por agrotóxicos registradas no Estado do Rio de Janeiro, destacam-se as cidades Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes e Nova Iguaçu (Figura 8).

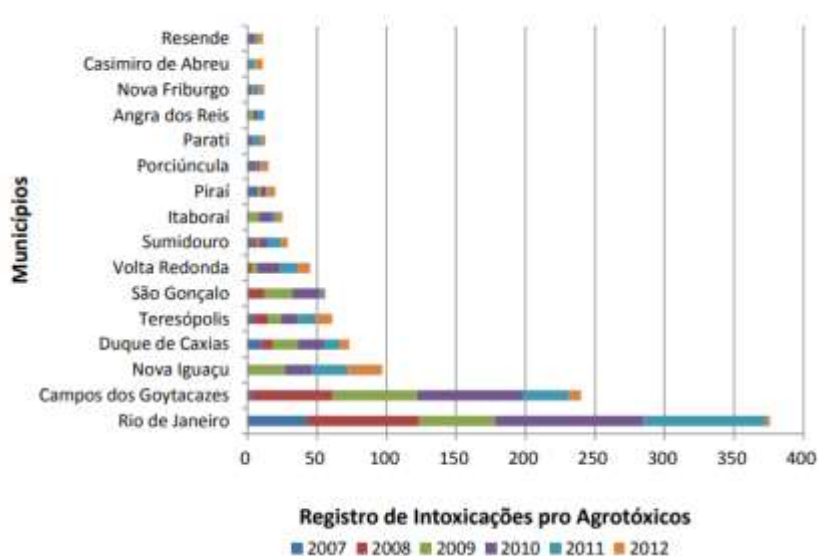


Figura 8: Municípios do Estado do Rio de Janeiro que mais notificaram intoxicações por agrotóxicos. Fonte: Ministério da Saúde, 2015.

Com o objetivo de obter um diagnóstico mais próximo da realidade sobre a presença e contaminação do solo e da água por nitratos (N-NO_3^-), a Embrapa publicou um estudo para identificar e avaliar o cenário de uso e presença de agrotóxicos e fertilizantes nitrogenados no Brasil. O estudo, intitulado “Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de Origem Agrícola no Brasil: Cenário 1992/2011” e publicado em 2014, indica situação de alerta no estado do Rio de Janeiro.

O estudo mostra que na região serrana do Rio de Janeiro, onde as atividades agrícolas estão concentradas, há a “presença constante de situações de risco de contaminação ambiental por agrotóxicos”. Compostos organoclorados como o DDT, BHC e lindano ainda são usados na região serrana do estado, principalmente em olerícolas, contrariando a legislação atual relativa do uso de agrotóxicos (Peres e Moreira, 2007; Karam, 2014).

No município de Paty do Alferes, a atividade olerícola intensiva tem favorecido a contaminação da água por agrotóxicos, tanto superficial quanto subterrânea, como mostram estudos na região que detectaram contaminação por organofosforados e carbamatos nas águas em áreas cultivadas com tomate (Veiga *et al.*, 2005).

Dois estudos também foram realizados em Nova Friburgo. Um detectou que a presença de agrotóxicos no ambiente, em especial nos rios, impacta a fauna local, enquanto outro encontrou concentrações de agrotóxicos em valores até oito vezes acima do limite permitido pela legislação brasileira, em áreas onde a atividade agrícola era mais intensiva – com as lavouras chegando até às margens do rio (Karam, 2014).

Um estudo realizado em Cidade dos Meninos, Duque de Caxias, teve como objetivo avaliar o desempenho cognitivo de crianças e adolescentes residentes em área contaminada com agrotóxicosorganoclorados e os fatores associados à exposição. A contaminação ocorreu em função de uma fábrica para produção de agrotóxicosque foi desativada na década de 60, deixando pesticidas abandonados nas suas instalações e proximidades. Esses agrotóxicosforam identificados no solo, águas subterrâneas e alimentos produzidos no local (Campos *et al.*, 2015).

3.5.

Efeitos do uso de pesticidas à saúde humana

Em função de não atingirem apenas seus organismos alvo, os agrotóxicos tornam-se prejudiciais à saúde humana, uma vez que podem entrar no corpo humano através da pele, do sistema respiratório, do sistema digestivo (ingestão acidental) ou através do consumo de um alimento contaminado com agrotóxicos. O impacto à saúde humana pode ocorrer tanto através do trabalhador que manuseia esses compostos, quanto através do consumidor.

A contaminação por agrotóxicos pode ocorrer durante sua fabricação, no momento da aplicação e na ingestão de um produto contaminado. Os efeitos sobre a saúde podem ser de dois tipos: 1) efeitos agudos, ou aqueles resultantes da exposição a concentrações de um ou mais agentes tóxicos capazes de causarem dano efetivo aparente em um período de 24 horas; 2) efeitos crônicos, ou aqueles resultantes de uma exposição continuada a doses relativamente baixas de um ou mais produtos (Peres, 2007). A exposição crônica está associada a pequenas doses ingeridas durante períodos de tempo longos (Araújo, 2000).

Os sintomas da intoxicação aguda estão relacionados a fraquezas, vômitos, náuseas, diarreias, irritações das conjuntivas e dores de cabeça. Já os sintomas referentes a intoxicação crônica estão relacionados a efeitos neurológicos, efeitos sobre o sistema imunológico, cânceres, alergias respiratórias, lesões renais e hepáticas, entre outros.

Os inseticidas organonitrogenados atuam no organismo humano inibindo um grupo de enzimas denominadas colinesterases, que atuam na degradação da acetilcolina, um neurotransmissor responsável pela transmissão dos impulsos no sistema nervoso (central e periférico). Em função disso, alguns distúrbios como contrações musculares involuntárias, convulsões e outras neuropatias podem ocorrer (Biziuk *et al.*, 1996; Peres, 2007).

Uma avaliação para compreensão dos riscos advindos da exposição a resíduos de agrotóxicos pela dieta demanda a comparação da exposição

estimada com os parâmetros de referência toxicológicos agudo (DRfA) e crônico (IDA). Quando a exposição por ingestão de resíduo de agrotóxico exceder tais parâmetros, pode ocorrer risco à saúde (ANVISA, 2015). DRfA refere-se a dose de referência aguda, que é a quantidade estimada do resíduo de agrotóxico presente nos alimentos que pode ser ingerida durante um período de até 24 horas sem causar efeitos adversos à saúde (expressa em mg kg^{-1} peso corpóreo). IDA refere-se à ingestão diária aceitável para agrotóxicos monitorados, como exposto acima.

De uma maneira geral, a ingestão de resíduos de agrotóxicos através de alimentos sempre esteve associada ao risco do desenvolvimento de efeitos crônicos à saúde, porém, a FAO começou a avaliar a possibilidade de pequenas quantidades de resíduos causarem afeitos agudos aos consumidores (FAO, 1994), de acordo com a toxicidade do agrotóxico, de sua concentração no alimento e da quantidade de alimento consumida, por peso corpóreo, de uma vez ou ao longo do dia (ANVISA, 2015).

A maior exposição humana à atrazina está associada à sua produção e seu uso na agricultura. A exposição de baixo nível pode ocorrer através da contaminação de água potável. A atrazina é facilmente absorvida pelo trato gastrointestinal, mas não é bem absorvido pela pele, e é rapidamente eliminada. Em ratos, a meia-vida é de cerca 1,3 dias e 95% da dose é eliminada dentro de 7 dias. A maior concentração de atrazina e / ou seus metabólitos é encontrada nos glóbulos vermelhos, aos quais as atrazinas se ligam efetivamente. As desalquilações nas posições C-4 e C-6 da molécula de atrazina são as principais reações de degradação metabólica (WHO, 1990).

As toxicidades agudas por via oral e dérmica da atrazina para a maioria das espécies de mamíferos são baixas. A ação teratogênica em ratos, camundongos ou coelhos também é baixa. Efeitos tóxicos, incluindo os oculares, cardíacos, hematológicos e hepáticos foram observados em ratos após administração de longo prazo (WHO, 1990).

A exposição aos piretróides pela população ocorre, principalmente, via resíduos presentes nos alimentos. A ingestão ou inalação de produto comercial pode ser observada após o uso de inseticidas no interior de domicílios ou durante a aplicação do produto nas lavouras. Porém, como os piretróides tem como característica a baixa volatilidade, eles não são detectados nas residências. Na lavoura, a exposição por inalação ocorre devido a ausência de equipamentos de proteção individual ou seu uso inadequado, o que expõe os trabalhadores (Santos *et al.*, 2007).

Em geral, piretróides são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal após a administração oral e pelo trato respiratório através da inalação de pó ou spray, em contrapartida, a absorção dérmica é baixa. Estudos em ratos mostrou que pelo menos 96% da dose oral de fenotrina foi excretada após 6 dias (Santos *et al.*, 2007).

A toxicidade dos piretróides está relacionada à sua estrutura química e podem ser estruturalmente divididos nos grupos que não tem ou tem a presença de um grupo ciano (CN) na porção fenoxibenzil. Os primeiros agem principalmente nos nervos periféricos, causando nos testes em ratos tremores no corpo, comportamento agressivo, hiperexcitabilidade e convulsões. Os segundos estão relacionados por agirem no sistema nervoso central, cujos sintomas incluem hipersensibilidade, salivação abundante, agitação nas mãos e patas, tremores periódicos, entre outros. (Nasuti *et al.*, 2003; Latuszynska *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2007)

3.6.

Uso de agrotóxicos em maçã, manga, morango, pepino e tomate

Amostras de maçã, manga, morango, pepino e tomate são historicamente conhecidos por constar no *ranking* de alimentos com maior número de agrotóxicos, conforme mostrado no levantamento feito pela ANVISA em 2011 (Figura 9), onde é reportado que esses alimentos estão entre os dezoito que mais apresentaram resíduos de agrotóxicos em suas análises. A Tabela 7 mostra os limites máximos de resíduos autorizados

para os 41 agrotóxicos em estudo para cada uma das amostras avaliadas, segundo a ANVISA (2015).

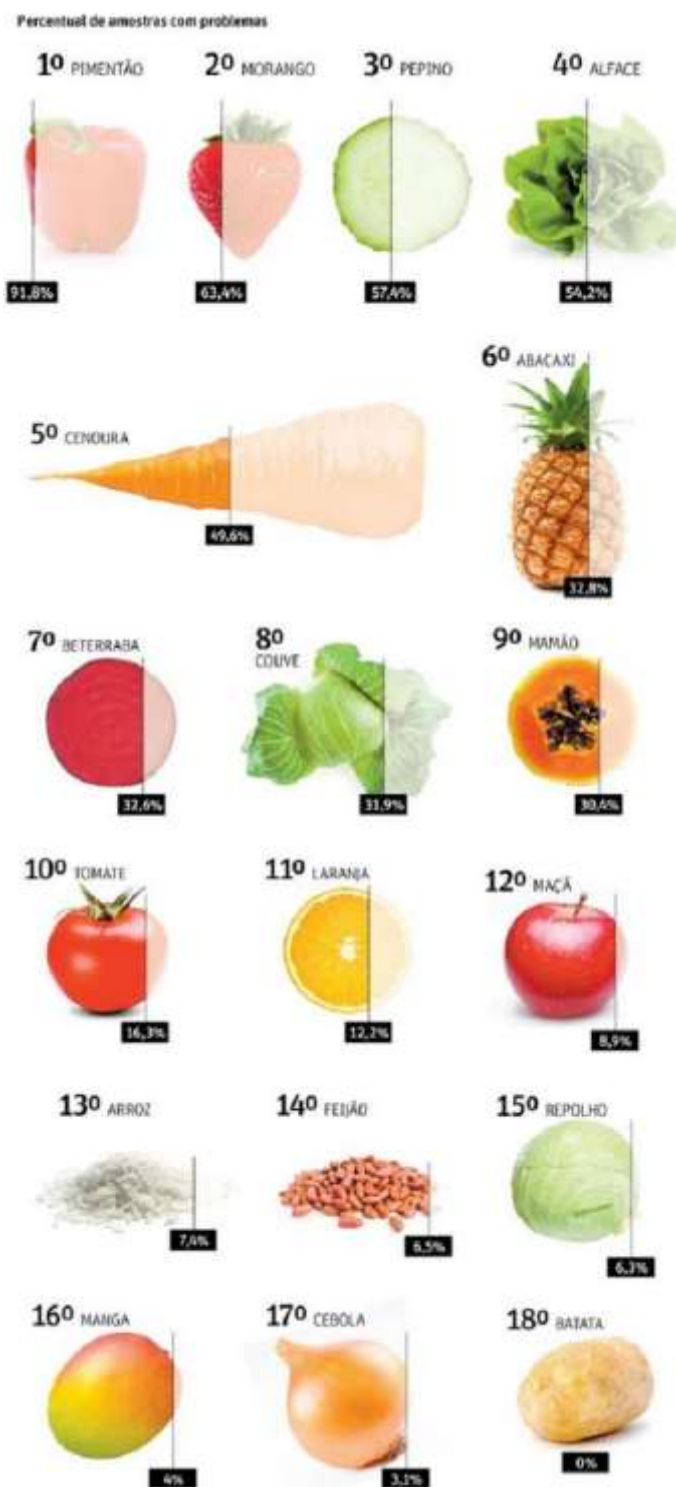


Figura 9: *Ranking* dos alimentos em relação à quantidade de resíduos de agrotóxicos no ano de 2011. Fonte: Hypeness, 2011.

Tabela 7: Limites máximos de resíduos autorizados para os agrotóxicos em estudo

IAs/Culturas/LMR (mg kg ⁻¹) ANVISA					
	Maçã	Manga	Morango	Pepino	Tomate de mesa
Antraquinona	NA	NA	NA	NA	NA
Atrazina	NA	NA	NA	NA	NA
Bifentrina	NA	0,10	NA	0,02	0,02
Bioaletrina	NA	NA	NA	NA	NA
Bupirimate	NA	NA	NA	NA	NA
Ciflutrina	NA	NA	NA	NA	0,02
Cipermetrina	NA	NA	NA	0,05	0,10
Ciprodinil	1,00	NA	NA	NA	0,50
Clorfenapir	NA	NA	2,00	NA	0,20
Deltametrina	0,02	NA	NA	0,03	0,03
Etofemproxi	0,50	0,30	NA	NA	0,50
Fenarimol	0,05	NA	NA	0,05	NA
Fenotrina	NA	NA	NA	NA	NA
Fenvalerato	NA	NA	NA	NA	NA
Fipronil	NA	NA	NA	NA	NA
Flucitrinato	NA	NA	NA	NA	NA
Fludioxinol	NA	NA	NA	NA	NA
Fluridona	NA	NA	NA	NA	NA
Flusilazole	NA	NA	NA	NA	NA
Flutriafol	NA	NA	NA	NA	0,10
Hexazinona	NA	NA	NA	NA	NA
Lambda-cialotrina	NA	0,10	0,50	0,01	0,05
Lenacil	NA	NA	NA	NA	NA
MGK.264	NA	NA	NA	NA	NA
Miclobutanil	0,10	NA	NA	NA	NA
Paclobutrazol	NA	0,02	NA	NA	NA
Penconazol	NA	NA	NA	NA	NA
Permetrina	NA	NA	NA	NA	0,30
Pirimetanil	1,00	NA	1,00	NA	1,00
Piriproxifem	0,01	NA	NA	0,05	0,10
Procimidona	2,00	NA	3,00	NA	2,00

Tabela 7: Limites máximos de resíduos autorizados para os agrotóxicos em estudo

	IAs/Culturas/LMR (mg kg ⁻¹) ANVISA				
	Maçã	Manga	Morango	Pepino	Tomate de mesa
Propargito	1,00	NA	0,50	NA	2,00
Tau.Fenvalinate	NA	NA	NA	NA	NA
Tebuconazol	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30
Teflutrina	NA	NA	NA	NA	NA
Terbutilazina	NA	NA	NA	NA	NA
Tetrametrina	NA	NA	NA	NA	NA
Translutrina	NA	NA	NA	NA	NA
Triadimefom	0,20	NA	NA	NA	NA
Triflumizol	0,05	0,10	NA	0,10	NA
Vinclozolina	NA	NA	NA	NA	NA

Fonte: ANVISA, 2015.

É importante ressaltar que os alimentos para os quais se identificou um percentual de resíduos detectados não autorizados acima de 40% estão relacionados a culturas que carecem de atenção por parte do Estado e das empresas atuantes. Dessas amostras, observa-se que se encontram em destaque a manga, o pepino e o morango com 53%, 55% e 65%, respectivamente, de agrotóxicos detectados como não autorizados (ANVISA, 2015).

▪ Maçã

A maçã (Figura 10) é um dos tipos de frutas mais cultivadas no mundo, com mais de 7.500 espécies e variedades e é uma das frutas mais completas sob o ponto de vista nutricional (Jardim *et al.*, 2009; Klanovicz, 2010).



Figura 10: Amostra de maçã

Até a década de 70, praticamente toda a maçã consumida em território nacional era importada. O aumento da produção permitiu ao Brasil substituir gradativamente as importações na década de 80 e início da década de 90, tornando-se autossuficiente na produção (Klanovicz, 2010).

Em função do consumo elevado de maçãs, observa-se que estudos com essas frutas vêm merecendo atenção especial, principalmente, devido aos benefícios e, ao mesmo tempo, aos riscos que a ingestão destas contendo resíduos de agrotóxicos pode causar à saúde humana (Jardim *et al.*, 2009).

Nesse estudo, foi avaliada a espécie maçã gala.

▪ Manga

A manga (Figura 11) é reconhecida como o fruto fresco mais consumido em todo o mundo (Embrapa, 2010). A expansão da mangicultura no Brasil ocorreu, inicialmente, no Estado de São Paulo, de onde foram difundidas as novas variedades para o restante do país, e nos polos de agricultura irrigada do Nordeste (Embrapa, 2010).



Figura 11: Amostra de manga

A região Nordeste destaca-se no cenário nacional como grande produtora de manga para exportação e o pólo de agricultura irrigada Petrolina-PE/Juazeiro-BA, no Submédio do Vale do São Francisco, destaca-se como um dos maiores produtores da manga destinada ao

mercado externo e responsável por 93% das exportações brasileiras (Menezes e Barbosa, 2005).

A tradicional variedade *Tommy Atkins*, avaliada nesse estudo, é, atualmente, a mais cultivada nas propriedades localizadas no Vale do São Francisco, ocupando aproximadamente 95% da área total dos pomares destinados à cultura (Menezes e Barbosa, 2005).

▪ Morango

O morango (Figura 12) vem se destacando na lista dos alimentos mais contaminados por resíduos de agrotóxicos no Brasil o que gera preocupação, uma vez que esse é um fruto consumido por crianças e adultos, principalmente, *in natura*, além de ser bastante usado pelas indústrias e restaurantes na produção de doces (Oshita e Jardim, 2015).



Figura 12: Amostra de morango

Desde a década de 90, a produção nacional de morango aumenta em média 6,3% ao ano (Resende, 2008).

Na cultura do morango é grande a incidência de doenças e pragas que atingem as várias fases do ciclo da cultura, desde a muda recém-plantada até os frutos na fase final de produção. Para tentar contornar esses problemas e amenizar os prejuízos, utilizam-se agrotóxicos e, por isso, torna-se necessário um controle rigoroso, que é realizado por meio do monitoramento de resíduos de agrotóxicos (Oshita e Jardim, 2012).

▪ Pepino

O pepino (Figura 13) tem grande importância na comercialização de hortaliças, sendo muito consumido em todo o Brasil (Godoy *et al.*, 2009) e

está entre as culturas abrangidas pelo programa do governo brasileiro que monitora a qualidade dos alimentos no mercado varejista quanto à presença de resíduos de agrotóxicos e afins (Neto e Gonçalves, 2016).



Figura 13: Amostra de pepino

▪ Tomate

O tomate (Figura 14) é a espécie do grupo das hortaliças com maior volume de produção no Brasil. São comercializadas, anualmente, cerca de 3,77 milhões de toneladas, das quais 82% estão concentradas nos Estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e Rio de Janeiro (Agrianual 2009; Filho *et al.*, 2009; Moura-Andrade *et al.*, 2010). O Brasil é o principal produtor de tomate da América do Sul, seguido pelo Chile e pela Argentina (Moura-Andrade *et al.*, 2010).



Figura 14: Amostra de tomate

3.7. Metodologias analíticas para extração de resíduos de agrotóxicos

A escolha do método de uma análise química para identificação e quantificação de compostos desconhecidos depende de diversos fatores, tais como: capacidade do método, tempo de análise, custos, recuperação, sensibilidade, seletividade, exatidão, precisão, linearidade, limites de detecção, dentre outros (Strelau, 2013). Os métodos empregados para análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos devem ser capazes de detectar níveis muito baixos e também fornecer evidências inequívocas da confirmação da identidade dos resíduos analisados. Além disso, métodos multirresíduos devem ser capazes de extrair um alto número de substâncias de matrizes complexas e de eliminar grande quantidade de interferentes.

A análise de resíduos de agrotóxicos é de extrema importância, não apenas por representar instrumento de proteção à saúde humana, como também por estar relacionada a fatores econômicos. Estima-se que no mundo, cerca de 200.000 amostras de alimentos sejam analisadas anualmente para resíduos de agrotóxicos com diversos propósitos (Lehotay *et al.*, 2010).

A quantificação de resíduos de agrotóxicos, em diversos meios e matrizes, é tradicionalmente realizada usando-se técnicas cromatográficas (Kussumi, 2007), em função da facilidade para efetuar separações, identificar, quantificar e confirmar as espécies presentes na amostra, por meio de detectores específicos.

Durante os anos 1990, sistemas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas passaram a ser implementados, devido ao desenvolvimento de vários sistemas comerciais de GC-MS que operavam, principalmente, no modo SIM (Vieira *et al.*, 2007; Prestes *et al.*, 2013). Mais

recentemente, o modo SIM foi substituído por espectrometria de massas em série (*tandem massa spectrometry*, MS/MS). Entre os analisadores de massas normalmente empregados na determinação de resíduos de agrotóxicos, destaca-se o triplo quadrupolo (QqQ) como o mais amplamente utilizado, devido à facilidade de manuseio, tamanho reduzido e custo relativamente baixo (Chiaradia *et al.*, 2008; Caldas *et al.*, 2011; Prestes *et al.*, 2013).

Equipamentos modernos de cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas têm mostrado resultados de altas sensibilidade e seletividade para resíduos de agrotóxicos, sendo capazes de analisar em níveis traços de ppb e ppt, em diferentes matrizes e compostos.

Diversos estudos sobre métodos multirresíduos de agrotóxicos têm sido descritos na literatura. Lacassie *et al.* (1998) descreveu o uso da mistura de acetona - diclorometano – hexano na proporção (50:20:30) para a extração de agrotóxicos em maçãs. Ortelli *et al.* (2004) utilizaram em matriz de frutas, como morango e maçã, e de vegetais, como pepino, o solvente acetato de etila. Pang *et al.* (2006) estudaram o método multiresíduo para a determinação de pesticidas dos grupos organoclorados, organofosforados, carbamatos, triazinas, piretróides e outros, em tecidos animais, utilizando a mistura de solventes ciclohexano e acetato de etila (1:1) para a extração.

Leandro *et al.* (2007) relatou a extração de agrotóxicos em tomate e maçã a partir da mistura de acetonitrila e ácido acético. Teló *et al.* (2017) detectaram resíduos de cipermetrina em amostras de casca arroz por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons, utilizando o QuEChERS como método de extração.

Métodos cromatográficos como a cromatografia líquida (CL) ou a cromatografia gasosa (CG) têm sido empregados para a determinação de piretróides em diferentes matrizes (Feo, 2010). Entretanto a cromatografia líquida apresenta menor nível de detecção. Existem poucos trabalhos na literatura sobre a aplicação de CG-MS/MS para a determinação de piretróides e triazinas em matrizes complexas como em alimentos. Os

detectores MS/MS apresentam uma alta seletividade e menor limite de detecção quando comparados aos detectores tradicionais.

Recentemente foi relatado o uso da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tandem para a análise de piretróides em alimentos para bebê (Petrarca, 2017). Os autores encontraram recuperação de 75-120%.

3.7.1.

Técnica de extração de resíduos de agrotóxicos

Anastassiades *et al.* (2003) introduziram um procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos e contaminantes denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). Como vantagens, esse método é rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro e foi desenvolvido para ser aplicado na extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal (Anastassiades *et al.*, 2003; Prestes *et al.*, 2013).

O método QuEChERS envolve as etapas de extração (agitação manual ou mecânica da amostra) com acetonitrila (na proporção 1:1), partição com a adição de sais para promover o efeito *salting out*, o tamponamento do pH do meio, além da remoção de água, e limpeza do extrato. A extração em tubo fechado possui as vantagens de possibilitar a extração em campo e evitar a necessidade de lavagem do homogeneizador entre as extrações (Prestes *et al.*, 2013).

A utilização do solvente acetonitrila permite a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades e, quando acidificada, favorece a extração de substâncias que apresentam problemas de estabilidade em meio básico. Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente, uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, não dilui o extrato e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa (Bastos *et al.*, 2012; Prestes *et al.*, 2013). O uso da acetonitrila, entretanto, não é adequado para análises em cromatografia a gás, devido a sua grande

expansão de volume durante a vaporização, o que pode vir a interferir nos detectores seletivos e favorecer a degradação de alguns agrotóxicos (Bastos *et al.*, 2012). Por isso, na etapa final da extração, se faz necessária uma etapa de substituição por um solvente adequado à cromatografia a gás.

No método QuEChERS, a escolha do MgSO_4 ocorreu devido à maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais e sua hidratação é uma reação exotérmica que aquece a amostra entre 40 e 45 °C, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (Bastos *et al.*, 2012; Prestes *et al.*, 2013).

Schenck *et al.* (2002), comparou a eficácia de sulfato de sódio e sulfato de magnésio como agentes secantes e concluiu que o sulfato de sódio foi um agente de secagem relativamente ineficaz, removendo pouca ou nenhuma água residual do solvente orgânico. O sulfato de magnésio provou ser um agente de secagem muito mais efetivo.

A etapa de *clean up* é fundamental para o sucesso das análises. Orso *et al.* (2014) comparou diversas metodologias para esta etapa, como técnicas SPE com diferentes cartuchos contendo C18, florisil, sílica e PSA, sendo a combinação de MgSO_4 e PSA o melhor resultado. Prestes *et al.* (2009) e Carmo *et al.* (2016) também indicam a mistura de MgSO_4 e PSA como a mais eficiente para a etapa de *clean up*, quando comparada a outras metodologias. Esta etapa deve sempre preceder as análises, pois durante a extração, são obtidos não apenas os analitos alvo, como também interferentes, que podem distorcer o resultado final da análise.

Esse método foi oficializado em 2007 pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AOAC, 2007), sendo também oficializado pelo European Committee for Standardization.

3.7.2. Análise por GC-MS-MS

A análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas tandem utiliza dois estágios de espectrometria de massas para separar os íons, ao invés de apenas um analisador de massas. O primeiro é usado para isolar o íon de interesse e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este íon e os que foram gerados a partir da sua decomposição induzida. É amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez que possui maior sensibilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter (Chiaradia *et al.*, 2008).

O triplo quadrupolo é constituído por três quadrupolos em série. Neste caso, o segundo quadrupolo é utilizado como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo, geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (DIC). Este segundo quadrupolo também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo (Figura 16).

Nesta análise cada agrotóxico analisado possui diferentes íons precursores e íons produtos, formados com diferentes energias de colisão. Esta técnica permite a quantificação mesmo em misturas complexas e segue o protocolo de confirmação de cada composto com dois monitoramentos precursor-produto, exigido pela norma Europeia EN15662.

Embora pareça uma técnica simples pelo curto tempo de análise, sua implementação é bastante complexa tendo em vista a otimização da fragmentação dupla de cada composto e adequação das condições do método. A Figura 15 apresenta um dos possíveis padrões de fragmentação utilizados na análise de Atrazina.

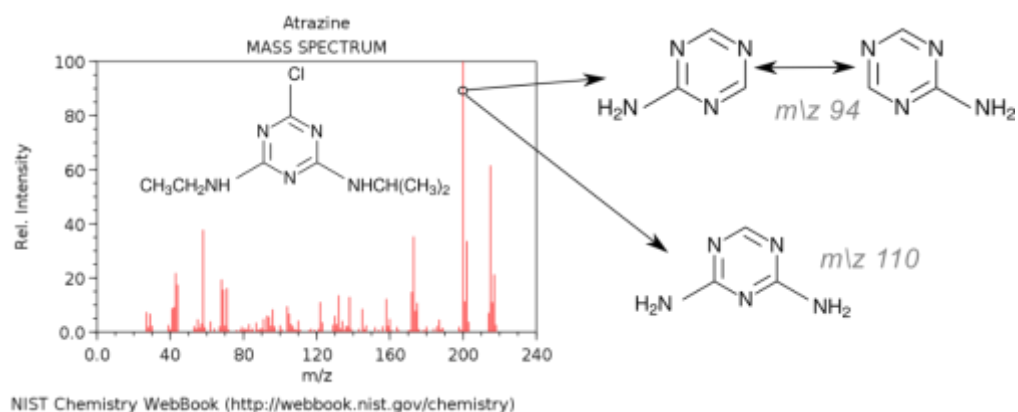


Figura 15: Monitoramento dos íons massa/carga 94 e 110 (íon produto) provenientes da fragmentação do íon m/z 200 (precursor) para a análise do agrotóxico atrazina (Modificado de Lin *et al.*, 2007)

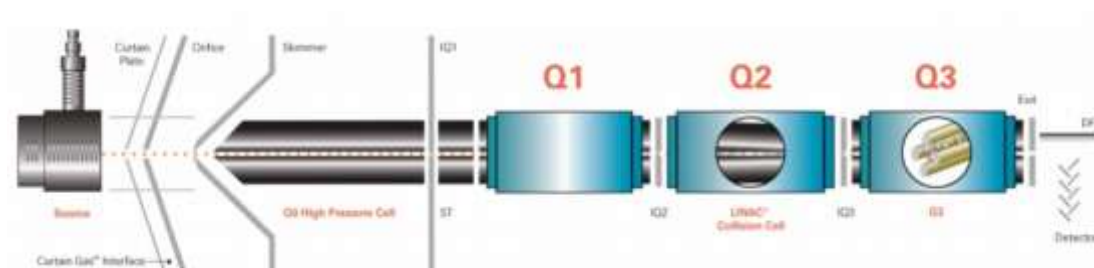


Figura 16: Figura esquemática de um triploquadrupolo. Fonte: Schreiber, 2010.

4. Materiais e Métodos

4.1. Vidrarias

As vidrarias utilizadas no presente estudo foram: proveta graduada; bécher; pipetas; balões volumétricos; tubos Falcon.

Os seguintes procedimentos de limpeza foram aplicados:

- Vidrarias aferidas: descontaminação com dicloro metano, lavagem em água da torneira com Extrans alcalino, enxágue com água da torneira e água destilada.

4.2. Equipamentos e acessórios

Os equipamentos e acessórios utilizados nos estudos foram:

- Balança analítica AT 261 DeltaRange da Mettler Toledo;
- Centrífuga;
- Cromatógrafo a gás Trace GC Ultra da Thermo Scientific acoplado a um espectrômetro de massas TSQ Quantum XLS da Thermo Scientific;
- Evaporador Reacti-Therm III da Thermo Scientific;
- Forno Mufla da Quimis;
- Seringas de 50 µL, 100 µL e 2000 µL.
- Tubos de centrífuga;
- Ultrassom;

4.3. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes grau p.a. utilizados foram:

- Acetato de sódio (> 99% Sigma Aldrich);
- Acetonitrila (Macron);
- Ácido acético glacial p.a (Merck);
- Diclorometano (Merck; Macron);
- Extrans Alcalino 2%;
- Sorvente BONDESIL-PSA 40 mm (Varian).
- Sulfato de magnésio anidro (\geq 99% Sigma Aldrich);

4.4. Implementação do método analítico

A implementação do método consistiu em identificar os tempos de retenção e a relação massa/carga de dois *mix* de padrões (Restek) contendo um total de 41 agrotóxicos, avaliar a recuperação e eficiência das extrações para a validação da metodologia e posterior aplicação e análise em amostras de alimentos.

A técnica utilizada foi a análise multirresíduo baseada no método QuEChERS empregando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas tandem (GC-MS-MS). Os padrões dos agrotóxicos analisados foram obtidos da Restek USA (*GC Multiresidue Pesticide Standard #5* e *#6*) em ampolas de 1 mL com concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em tolueno. O trabalho foi realizado com um GC-MS-MS, pela sensibilidade da técnica, eficiência de separação cromatográfica, por gerar resultados confiáveis de quantificação e detecção dos compostos em nível traço e a possibilidade de determinação de um grande número de agrotóxicos em uma única análise.

Foi utilizado diclorometano para o preparo das soluções. Como padrão interno, utilizou-se para a otimização do método analítico o AceD₁₀ com concentração de 20 µg mL⁻¹ e como *surrogate*, para controle de recuperação, o p-terfenil-D₁₄ com concentração de 20 µg mL⁻¹. O método de padronização interna consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida do composto chamado padrão interno. Através da razão de áreas (área da substância/área do padrão interno que tem concentração constante) obtidas no cromatograma, tem-se a concentração da substância na amostra. Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, ter tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz e não fazer parte da amostra (Ribani *et al.*, 2004). O *surrogate*, também chamado de composto substituto, é definido como um composto puro adicionado ao material em análise, no qual o comportamento químico e físico é representativo da substância de interesse na forma nativa (Ribani *et al.*, 2004). As fórmulas químicas do AceD₁₀ e do p-terfenil-D₁₄ são mostradas na Tabela 8.

Foi preparada solução padrão contendo todos os compostos na concentração de 1000 µg L⁻¹ e injetadas no GC-MS/MS no modo de detecção *full scan*, no Q1, com varredura de 50 a 550 m/z. O mesmo procedimento foi adotado no Q3, variando a energia de colisão. Esta etapa tornou-se necessária para otimizar alguns padrões de quantificação de íon precursor/produto de difícil acesso na literatura.

A análise foi realizada no modo Monitoramento Seletivo de Reação, também conhecido como Monitoramento de Múltiplas Reações. Nesta análise cada agrotóxico analisado possui diferentes íons precursores e íons produtos, formados com diferentes energias de colisão. Esta técnica permite a quantificação mesmo em misturas complexas e segue o protocolo de confirmação de cada composto com dois monitoramentos precursor-produto, exigido pela norma europeia EN15662.

Os objetivos principais dessa etapa do trabalho foram: a) implementação de um método rápido, de fácil execução e de baixo custo,

que possa ser utilizado como ferramenta para monitoramento de agrotóxicos em alimentos; b) avaliação da eficiência de extração utilizando o método QuEChERS; c) identificação e quantificação de agrotóxicos nos alimentos estudados.

A Tabela 8 apresenta os nomes, as fórmulas moleculares, os íons precursores e produtos e a energia de colisão dos compostos estudados.

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho


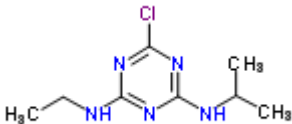
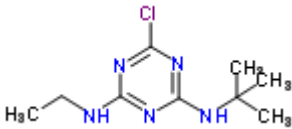
Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
Ace-d10 	164.14	160	30
	164.14	162	20
Atrazina 	215.09	173.08	10
	215.09	200.09	10
Terbutilazina 	230.2	68	10
	230.2	174	15
Pirimetanil	198.11	118.07	35

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho


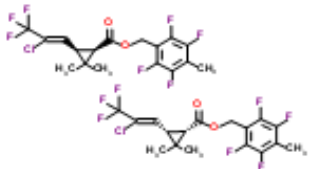
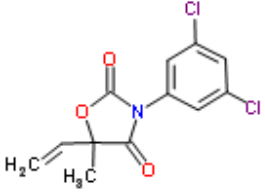
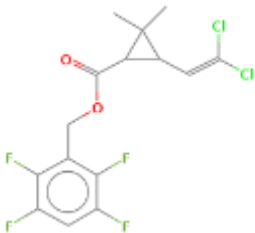
Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
	198.11	183.1	15
Teflutrina	177.02	127.02	20
	197.03	141.02	15
Vinclozolin	284.97	212	15
	286.97	214	15
Transflutrina	335	143	50
	335	163	10
Propargito	135.06	107.05	15

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho

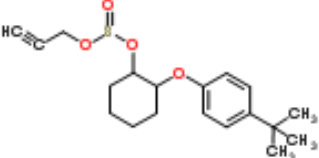
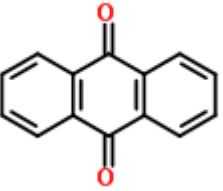
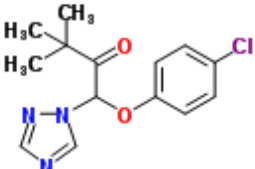
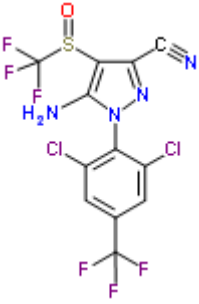
Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
	173.08	105.05	12
Antraquinona 	180	152	15
	203	180	20
Triadimefon 	208.07	111.04	25
	208.07	181.06	10
Fipronil 	419.94	350.95	15
	421.94	352.95	15
Ciprodinil	224.13	208.12	20

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho


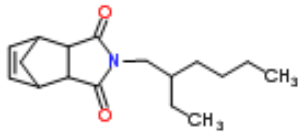
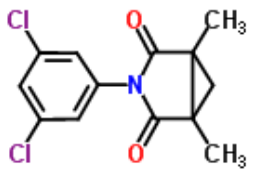
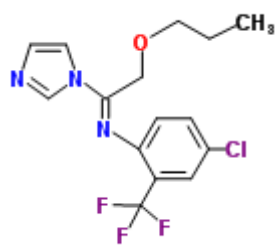
Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
	225.13	210.12	10
MGK 264	164.1	80.1	15
	164.1	98.1	15
Procimidona	283.1	68.1	10
	283.1	96	24
Triflumizol	179	144	15
	206	179	20
Penconazol	248.06	157.04	25

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho

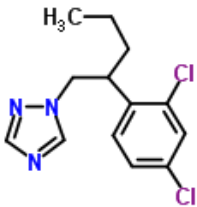
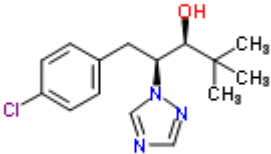
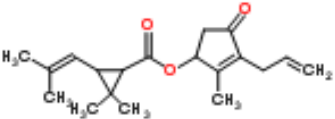
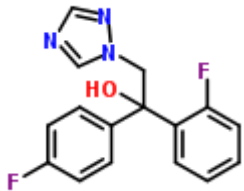
Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
	248.06	189.1	15
Paclobutrazol 	236.1	125.06	15
	236.1	167.07	15
Bioalentrina 	168	123	10
	168	153	10
Flutriafol 	123.04	75.03	15
	219.07	123.04	15

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho

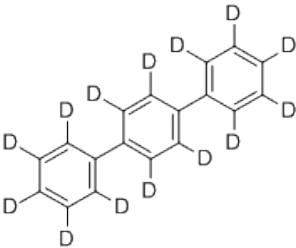
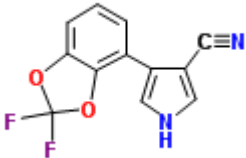
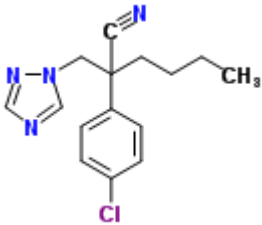
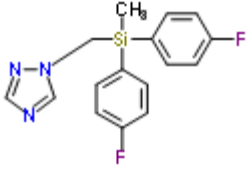
Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
p-Terphenyl-d14 	244	122	12
	244	243	22
Fludioxonil 	248.04	154.02	20
	248.04	182.03	15
Miclobutanil 	179.1	125	16
	179.1	152	8
Flusilazol 	233.07	152.05	20
	233.07	165.05	20

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho

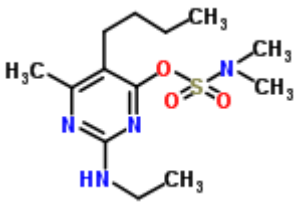
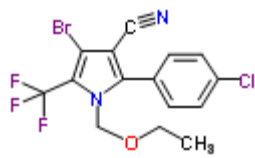
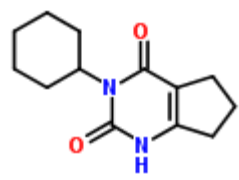
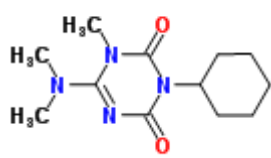
Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
Bupirinato 	273.14	193.1	10
	316.16	208.1	10
Clorfenapir 	246.98	226.98	20
	246.98	228.98	20
Lenacil 	153.09	82.05	15
	153.09	136.08	15
Hexazinona 	171	71	18
	171	85	15

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho

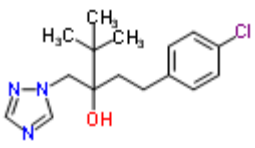
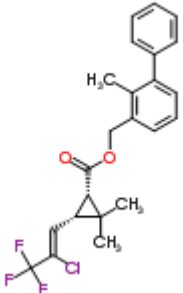
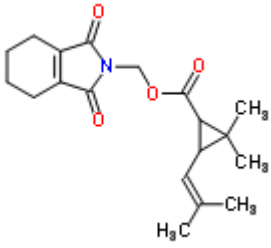
Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
Tebuconazol 	250.12	125.06	20
	252.12	127.06	20
Bifentrina 	181	165	35
	181	166	15
Tetrametrina 	164.1	107.1	15
	164.1	135.1	10
Fenotrin	183.1	153.1	15

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho

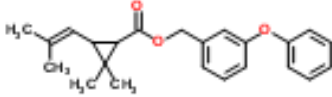
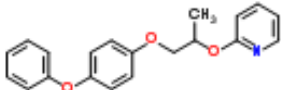
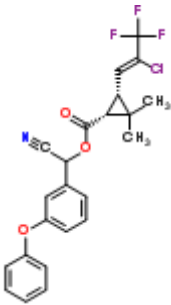
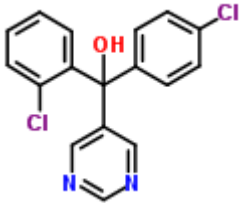
Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
	183.1	163.1	15
Piriproxifem 	136.1	78	20
	136.1	96	14
Lambda-Cialotrina 	181.04	152.03	23
	197.04	141.03	15
Fenarimol 	139.01	111.01	15
	251.03	139.01	15
Permetrina	183.1	153	18

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho

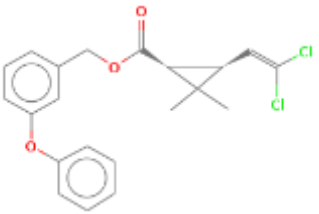
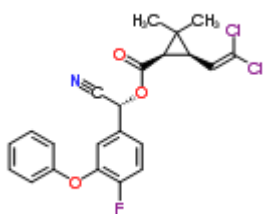
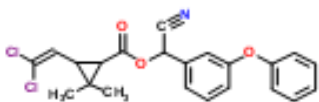
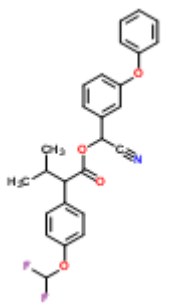
Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
	183.1	168.1	15
Ciflutrina 	163	91	15
	163	127	5
Cipermetrina 	181.1	127.1	30
	181.1	152.1	25
Flucitrinate 	199.07	107.04	22
	199.07	157.06	10
Etofenprox	163.1	107.1	10

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho

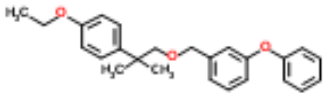
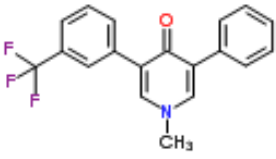
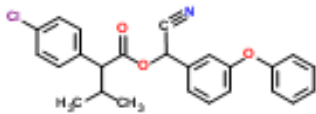
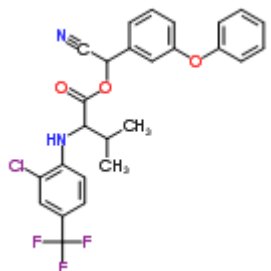
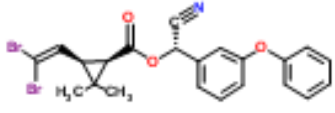
Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
	163.1	135.1	10
Fluridona 	328.1	189.1	40
	328.1	259	30
Fenvalerate 	167.05	125.04	10
	419.13	225.07	10
Tau-Fenvalinate 	250.06	200.05	20
	252.06	200.5	20

Tabela 8: Fórmula química e relação massa/carga dos padrões de agrotóxicos analisados no presente trabalho

Nome	Precursor	Produto	Energia de Colisão
Deltametrina 	252.93	171.95	10
	252.93	173.95	10

4.4.1. Preparo da curva analítica

A concentração inicial dos padrões era de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em tolueno. A partir dessas soluções, foram preparadas soluções estoque de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em diclorometano – uma para os compostos nitrogenados e uma para os piretróides.

Foram preparadas nove soluções de concentração 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5 e 2 ng mL^{-1} , sendo acondicionadas em frascos de 10 mL, protegidos contra luminosidade com papel laminado (para evitar fotooxidação) e armazenados em geladeira. Todas as soluções foram fortificadas com 25 μL de padrão interno. Adicionou-se solução de *surrogate* nas soluções de 200, 100, 50, 20 e 10 ng mL^{-1} .

4.4.2. Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas. A aquisição dos dados foi feita com o *software* *Thermo Xcalibur* e biblioteca NIST 2.0. As condições cromatográficas são

apresentadas na Tabela 9 e as condições espectrométricas são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 9: Condições cromatográficas GC Ultra

Gás carreador	He, fluxo constante 1 mL/min
Injetor	PTV (<i>programmable temperature vaporizer</i>)
PTV programação da temperatura	80°C, 1.33 min, 210°C a 30°C/s, 310°C a 20°C/s por 7 min.
Tipo de coluna	DB-5MS (20 m x 0,18 mm x 0,18 µm)
Programação do forno	80°C por 1,33 min 30°C min ⁻¹ até 210°C 20°C min ⁻¹ até 310 °C por 7 min
Linha de transferência GC-EM	280°C

Tabela 10: Parâmetros do TSQ Quantum XLS

Temperatura da fonte	260°C
Corrente de emissão	25 µA
Modo de ionização	EI, 70 eV
Resolução do massas	Q1, Q3 a 0.7 Da (FWHM)
Gás de colisão	Argônio, 1.5 mTorr
Tempo do ciclo	0.30 s
Modo de aquisição	MSR

4.5. Tratamento das amostras

A metodologia utilizada no tratamento das amostras compreende as etapas de coleta, processamento e preservação, bem como os métodos de extração e de dosagem dos agrotóxicos. Os procedimentos feitos no tratamento das amostras dos alimentos podem ser visualizados na Figura 17.

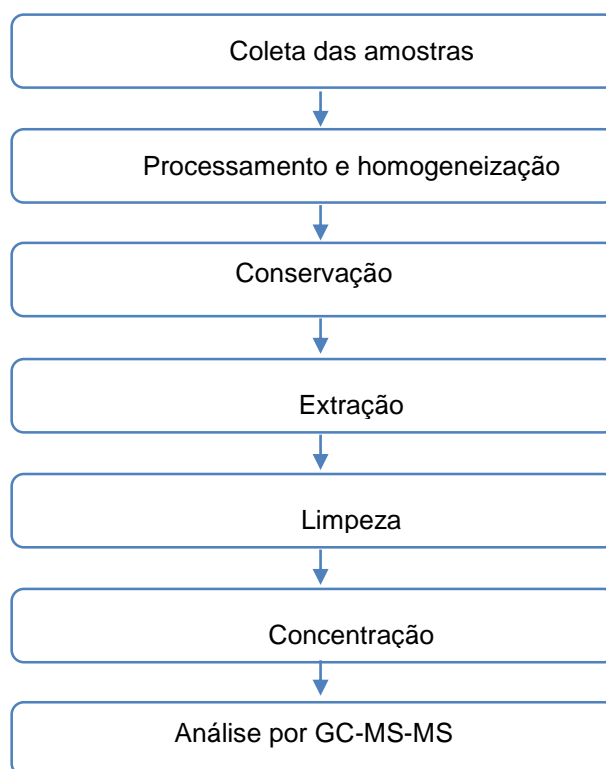


Figura 17: Etapas de tratamento das amostras de alimentos

4.5.1. Coleta das amostras

Para ter uma boa amostragem dos frutos consumidos na capital fluminense, os mesmos foram coletados no atacadista de hortifrutigranjeiros Nipo Brasileira Frutas e Legumes, localizada no CEASA-RJ (Figura 18), centro de distribuição de alimentos do Rio de Janeiro, no período de novembro de 2016 a fevereiro de 2017, totalizando quatro

campanhas de cinco espécies: tomate italiano, pepino, morango, manga Tommy Atkins e maçã gala.



Figura 18: Ceasa do Rio de Janeiro

4.5.2.

Processamento, homogeneização e conservação das amostras

As amostras foram coletadas e processadas nos mesmos dias. O processamento e homogeneização das mesmas consistiram em triturar um quilograma de cada um dos alimentos em liquidificador de copo de vidro, previamente descontaminado, por 5 minutos, seguidos por pesagem de 15,0 g de cada um em tubos falcon de 50 mL e condicionamento em freezer a -18°C até o momento das extrações.

4.5.3.

Metodologia de extração dos agrotóxicos: QuEChERS

A Figura 19 mostra o diagrama do método QuEChERS modificado (Anastassiades *et.al.*, 2003; Prestes *et al.*, 2009) empregado na determinação de resíduos de agrotóxicos nas matrizes estudadas.

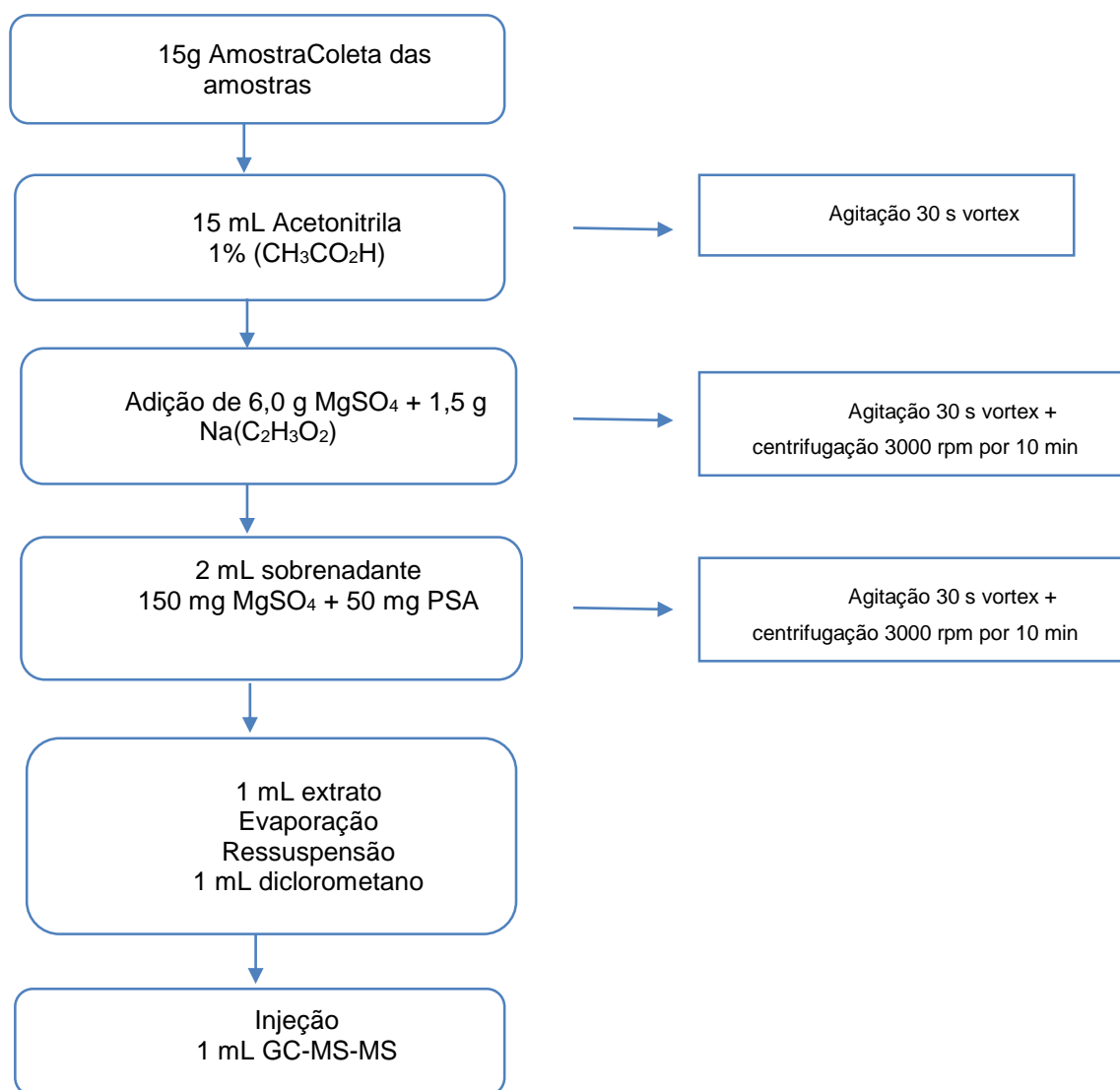


Figura 19: Diagrama do método QuEChERS modificado

A extração tem início com a adição de 15 mL de acetonitrila (1% ácido acético) nas alíquotas de 15,0 g de cada amostra subrogada, e agitação em vortex. Em seguida, é realizada uma etapa de partição com a adição de 6,0 g de sulfato de magnésio (MgSO_4) e 1,5 g de acetato de sódio ($\text{Na}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$), seguida de agitação em vortex e centrifugação a 3.000 rpm a 25°C por 10 min (Figura 20).



Figura 20: Divisão da fase orgânica e aquosa após a etapa de centrifugação

Após essa etapa, retira-se 2 mL de sobrenadante para outro tubo de centrífuga para, em seguida, ser submetido a etapa de *clean-up*, que utiliza 150 mg MgSO_4 e 50 mg do sorvente PSA, seguido de agitação em *vórtex* e centrifugação a 3.000 rpm a 25°C por 10 min. O PSA é um sorvente amina primária-secundária (*primary secondary amine*, PSA) que possui estrutura bidentada com um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Em função disso, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito grande (Prestes *et.al.*, 2009). O sorvente retém as interferências da matriz e após a agitação por *vórtex* e centrifugação, o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (Prestes *et.al.*, 2009). Um *clean-up* eficiente garante uma maior vida útil para os insersores, bem como para as colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico (Shimelis *et.al.*, 2007).

Após a centrifugação, 1 mL de sobrenadante é retirado e transferido para *vial* de 2 mL para passar pelo processo de troca de solvente através de evaporador. O solvente utilizado para análise foi o diclorometano.

4.5.4. Análise por GC-MS-MS

As amostras foram analisadas segundo as condições cromatográficas estabelecidas no item 4.4.2. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.6. Parâmetros analíticos selecionados para validação do método

A validação do método para análise dos 41 agrotóxicos por GC-MS-MS foi conduzida segundo algumas indicações citadas em literaturas científicas (Eurachem, 1998; ANVISA, 2003; Codex, 2003; INMETRO, 2016; Miller e Miller, 2010; Ribani *et al.*, 2004). Isto foi feito através do cumprimento de alguns critérios de desempenho que são expressos em termos de parâmetros estatísticos de linearidade, seletividade/efeito de matriz, repetitibilidade, recuperação, homocedasticidade e limite de detecção do método (LDM).

- **Curva analítica e linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações das substâncias em avaliação, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 1995).

O procedimento experimental para assegurar a linearidade do método é a construção da curva analítica, que deve ser realizada com, no mínimo, 5 pontos (Ribani *et al.*, 2004; Miller e Miller, 2010). Os coeficientes angular (a) e linear (b) da curva e o coeficiente de correlação (r) devem ser estimados a partir do método matemático de regressão linear. O coeficiente de determinação permite avaliação do ajuste da curva, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de dados experimentais e

menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2016) um valor acima de 0,90. A linearidade da faixa de trabalho para o método de ensaio foi verificada através da curva analítica, utilizando o MMQO. A relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida (Ribani *et.al.*, 2004; Miller e Miller, 2010).

A linearidade do método em questão foi avaliada a partir da construção de curvas analíticas com nove pontos de concentração do padrão: 1000, 500, 200, 100, 50, 20 10, 5 e 2 ng mL⁻¹. Para a avaliação dos resultados, as curvas foram divididas em alta (de 50 a 1000 ng mL⁻¹) e baixa (de 2 a 100 ng mL⁻¹).

▪ Seletividade / efeito de matriz

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar de forma confiável as medidas na presença de interferentes. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, assim como outros compostos com propriedades similares que podem estar presentes na amostra. Dessa forma, a seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (Thompson *et al.*, 2002; Ribani *et.al.*, 2004).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão). Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utilizando isso como uma indicação da presença do composto puro (Thompson *et al.*, 2002; Ribani *et.al.*, 2004).

Nesse estudo, a seletividade foi avaliada a partir da comparação entre a curva analítica com e sem a presença da matriz. Resultados similares para ambas as curvas indicam que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse e que o método é seletivo.

Para essa avaliação, foram injetadas seis vezes um ponto intermediário da curva padrão, em triplicata, após processo de extração na matriz orgânica (isenta de resíduos de agrotóxicos) e foi aplicada a seguinte estatística.

Estatística para avaliação:

O teste F (Snedecor) foi utilizado para avaliar a homogeneidade das variâncias e o teste t (Student) para comparação das médias. Para a avaliação do efeito da matriz, foram comparados os valores de F calculado e de F tabelado, e de t calculado e de t tabelado.

Se $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, então as variâncias são consideradas iguais e a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do método na faixa em estudo. O cálculo é feito com base nos desvios-padrão agrupados e igualdade das médias testadas com a distribuição t de Student (test), conforme abaixo.

As seguintes equações para o cálculo da média, desvio padrão e variância foram aplicadas:

$$\text{Média: } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n},$$

$$\text{Desvio padrão: } s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}},$$

$$\text{Variância: } s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1},$$

onde:

x_i = número de cada valor;

n = quantidade de amostras

Para a avaliação do teste F, a seguinte equação foi utilizada:

$$F_{calculado} = \frac{s_1^2}{s_2^2},$$

onde:

S_1 = maior variância

S_2 = menor variância

$F_{tabelado}$: ($n_1 - 1$) no numerador e ($n_2 - 1$) no denominador, 95%.

$$\text{Teste t: } t_{calculado} = \frac{(\overline{x_1} - \overline{x_2})}{s_{agrupado} \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

$$\text{Desvio-padrão agrupados: } s_{agrupado} = \frac{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

A quantidade de graus de liberdade a ser usado é $n_1 + n_2 - 2$.

Fonte: FIOCRUZ, 2016.

Se $F_{calculado} > F_{tabelado}$, então as variâncias não são consideradas iguais e a matriz tem efeito importante sobre a precisão do método na faixa em estudo. As seguintes equações foram utilizadas para a avaliação estatística.

Teste t:

$$t_{calculado} = \frac{(\overline{x_1} - \overline{x_2})}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Cálculo dos graus de liberdade para $t_{tabelado}$:

$$v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 + 1}}$$

Se $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, então a matriz não afeta o ensaio e as médias são estatisticamente iguais. Se $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$, a matriz não tem efeito estatisticamente significativo sobre o resultado.

Caso seja observado o efeito da matriz, a construção da curva para a quantificação das amostras sofrerá todo o processo de extração descrito na Figura 18, nas matrizes isentas de quaisquer resíduos de agrotóxicos (amostras orgânicas), com ressuspensão das amostras nos mesmos pontos da curva padrão.

▪ Precisão / Repetibilidade

A precisão avalia o grau de concordância entre os resultados obtidos de análises individuais em uma amostra homogênea e pode ser expressa pela repetibilidade (dependente da concentração do analito), através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Ribani *et al.*, 2004).

Para a repetibilidade, o INMETRO (2016) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A ICH (1995) e ANVISA (2003) sugerem que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (Ribani *et al.*, 2004).

A avaliação da repetibilidade do método envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações. Nesse trabalho, o analito foi adicionado em concentração intermediária da curva analítica (100 ng mL^{-1}) ao branco da amostra para oito amostras.

A seguinte equação foi utilizada para avaliação estatística:

$$CV = \frac{100 \times \text{desvio padrão das medidas}}{\text{valor médio das medidas}},$$

Onde:

CV: coeficiente de variação (%)

Como critério de aceitação, $CV \leq 20\%$ (SANTE/11945/2015).

▪ **Recuperação**

Está relacionada ao grau de concordância entre o valor medido e o verdadeiro ou de referência. Os processos mais utilizados são materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão.

Quando a amostra certificada não está disponível, pode-se adicionar (fortificar) a matriz com uma quantidade conhecida do padrão analítico de interesse, avaliando-se a recuperação do processo. A informação da recuperação pode ser estimada com a adição de um composto substituto, também chamado de *surrogate*, que é utilizado como controle de qualidade e definido como um composto adicionado à amostra antes do início da extração, no qual o comportamento químico e físico é representativo da substância de interesse na forma nativa (Ribani *et.al.*, 2004). Nesse trabalho, a avaliação da recuperação do processo de extração foi feita com a adição do *surrogate* p-terfenil-D14. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70% a 120% (SANTE/11945/2015) com precisão de até $\pm 20\%$.

▪ **Homocedasticidade**

A avaliação da homogeneidade na variância dos resíduos da regressão é feita pelo modelo estatístico teste de Cochran. Esse modelo permite avaliar o comportamento homocedástico dos resíduos decorrentes

dos ajustes da curva analítica obtida através do método dos mínimos quadrados (Cardoso *et al.*, 2010; Ribani *et al.*, 2004).

Para aplicar o teste de Cochran, a seguinte equação foi utilizada:

$$C = \frac{s^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2},$$

onde:

k: representa o número de níveis do fator;

s: representa a variância amostral

n: representa o número de medidas em cada nível do fator.

A verificação da homocedasticidade se dá através da comparação das variâncias e é considerado aceito se $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$.

A avaliação da curva analítica pelo MMQO foi feita através de uma planilha desenvolvida em Microsoft Excel® para cada composto estudado. A planilha fornece em uma única página a análise do gráfico x-y (curva analítica construída com 6 níveis), o gráfico dos resíduos da regressão (observação dos valores discrepantes) e a variância dos resíduos (avaliação da homocedasticidade pelo teste de Cochran). Os dados lançados na planilha correspondem aos valores das variáveis x e y, ou seja, as concentrações da curva analítica e as respostas obtidas.

▪ Limite de detecção do método (LDM)

Nesse trabalho, o limite mínimo de detecção foi definido segundo o método da EPA (EPA, 2016), que preconiza a menor concentração em que a substância em análise pode ser detectada com 99% de confiança.

A partir de um determinado nível do intervalo da curva, deve-se processar um mínimo de sete amostras e sete brancos seguindo todas as etapas do método de extração. As amostras devem ser preparadas em, pelo menos, duas datas diferentes. A preparação e análise devem ser feitas

no mesmo dia. Nesse trabalho, o LDM foi definido a partir do processamento de 8 amostras e de 8 brancos.

O LDM das amostras (LDM_a) é calculado segundo a equação abaixo.

$$LDM_a = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} S_s,$$

onde:

LDM_a = limite de detecção do método baseado nas amostras;

$t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} S_s$ = o valor de t de Student apropriado para 99% t estatístico e um desvio padrão estimado com n-1 graus de liberdade.

Se nenhum dos brancos apresentarem um resultado numérico para um analito individual, o LDM_b não se aplica. Um resultado numérico está relacionado tanto a resultados positivos quanto a negativos, mas não a “NF” (*not found*), geralmente observado quando um pico não está presente na análise cromatográfica.

Se algum dos brancos apresentar um resultado numérico, o MDL_b será igual ao maior resultado de método para branco. Se todos os brancos para um analito individual gerar resultados numéricos, o MDL_b será avaliado segundo a equação:

$$MDL_b = \bar{X} + t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} S_b,$$

onde:

MDL_s = limite de detecção do método baseado nos brancos;

\bar{X} : resultado do método branco

$t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} S_s$ = o valor de t de Student apropriado para 99% t estatístico e um desvio padrão estimado com n-1 graus de liberdade.

S_b : desvio padrão das amostras replicatas de branco;

O valor de MDL inicial é definido como o maior entre o MDL_s e o MDL_b .

5. Resultados e discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados referentes a todos os parâmetros analisados para validação da metodologia, bem como resultados obtidos da aplicação da metodologia para análise das amostras de alimentos. Os limites de detecção do método variaram de 1,34 a 10,22 ng g⁻¹ e a concentração de agrotóxicos das amostras esteve abaixo desses valores para a maioria (78% dos casos) dos 41 compostos analisados

5.1. Otimização do sistema GC-MS-MS: parâmetros cromatográficos

As análises foram realizadas em equipamento GC-MS-MS triploquadrupolo da Thermo e, dentre os padrões certificados disponíveis, os escolhidos para as análises foram os que mais abrangiam compostos avaliados pela ANVISA. Dentro dos limites de referência estabelecidos pela mesma, as culturas que mais se destacam, no sentido de apresentarem um grande número de compostos monitorados são a maçã, a manga, o morango o pepino e o tomate. Além disso, também foi levado em consideração serem alimentos muito utilizados pela população brasileira.

Foi preparada solução padrão contendo todos os compostos na concentração de 1000 µg L⁻¹, e injetada no GC-MS/MS no modo de detecção *full scan* no Q1, com varredura de 50 a 550 m/z. O mesmo procedimento foi adotado no Q3 variando a energia de colisão. Esta etapa tornou-se necessária para otimizar alguns padrões de quantificação de íon precursor/produto.

A análise dura menos de 20 minutos para quantificar 41 compostos. A Figura 21 mostra o perfil típico obtido para a deltametrina na concentração de 5 ng mL⁻¹, para exemplificar os perfis obtidos para os compostos em estudo e a alta sensibilidade do método. A Figura 22

apresenta o tempo de retenção e janela de aquisição de cada composto analisado. O tratamento dos dados obtidos foi feito por integração manual.

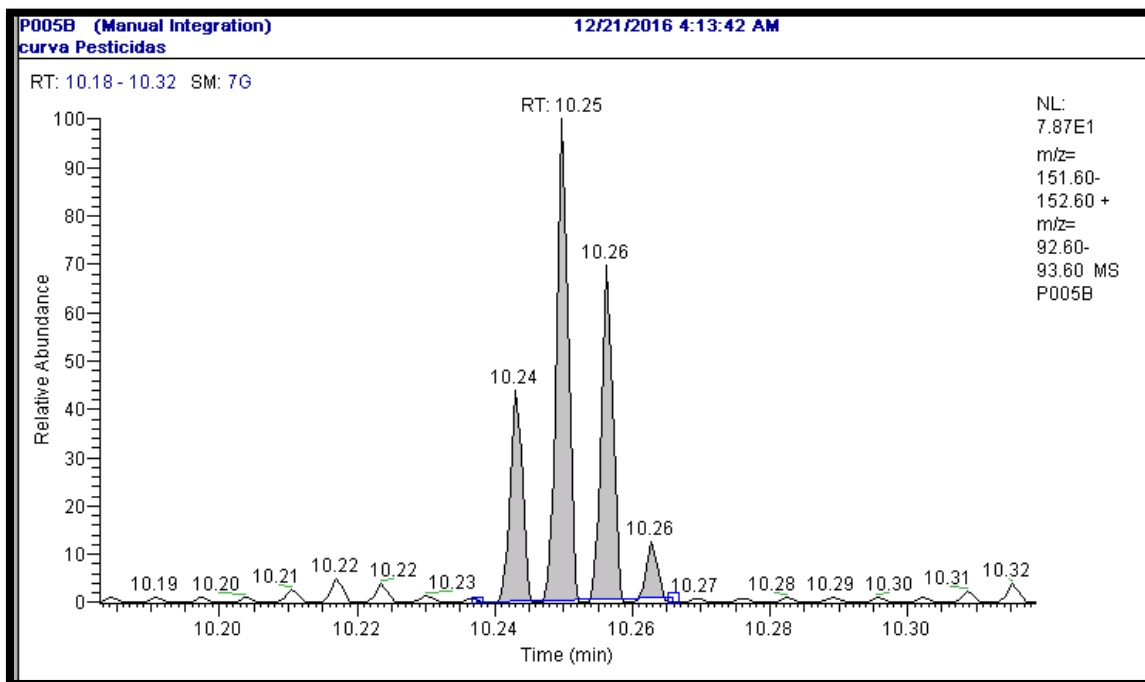


Figura 21: Perfil de pico para deltametrina para a concentração de 5ng ml⁻¹.

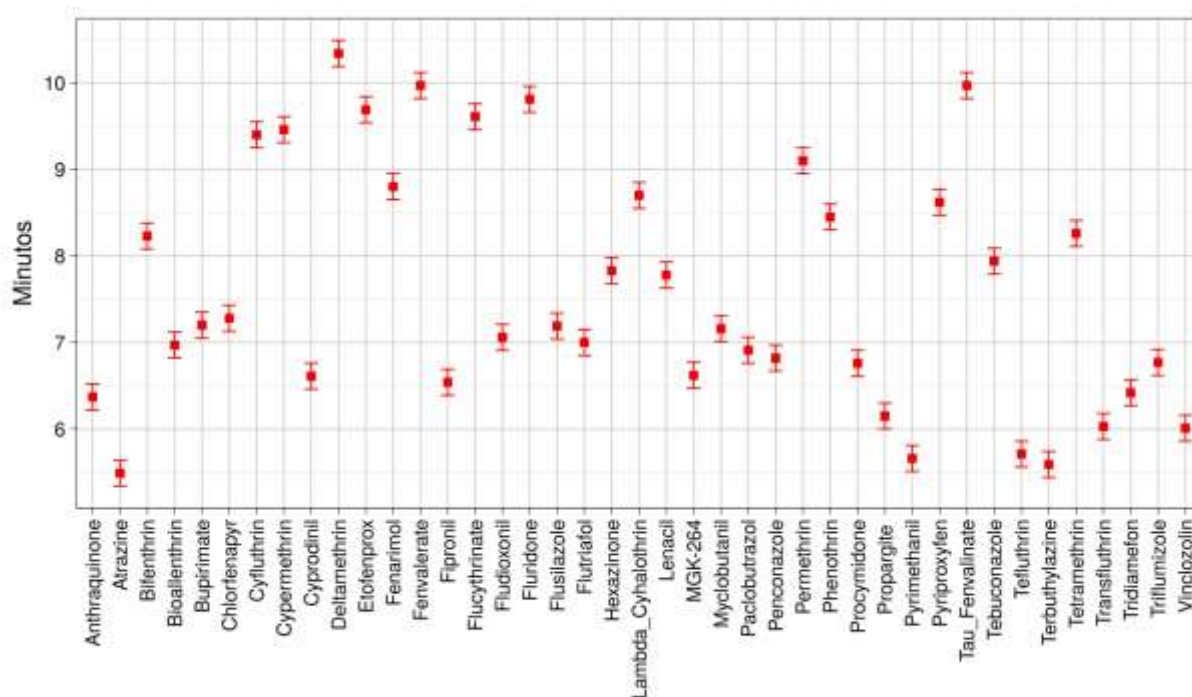


Figura 22: Otimização do Monitoramento de Reação Múltiplas com íon precursor / produto e janela de aquisição.

5.2. Parâmetros de validação

5.2.1. Curva analítica e linearidade

Foi analisada a linearidade para 82 curvas de calibração, derivada de 41 compostos avaliados em curva de alta e baixa.

A média para o coeficiente de determinação (R^2) para todos os compostos estudados foi de 0,99, \pm 0,002, mostrando que os resultados de linearidade obtidos para cada composto estão dentro do intervalo permitido considerado adequado para as análises (INMETRO, 2016; ANVISA, 2014). A obtenção dos cromatogramas, equações das retas e coeficientes de determinação foi processada automaticamente pelo software XCalibur.

Na Figura 23 é apresentado, como exemplo, o comportamento de linearidade obtido para os compostos atrazina, pirimetanil, terbutilazina, viclozolina, MGK-264 e transflutrina. Cabe ressaltar que para a quantificação de todos os compostos analisados a curva foi dividida em duas partes: (1) curva de baixa concentração, de 2 a 100 ng mL⁻¹, e; (2) curva de alta concentração, de 50 a 1000 ng mL⁻¹. Para as duas curvas os critérios para validação da linearidade do método foram adequados.

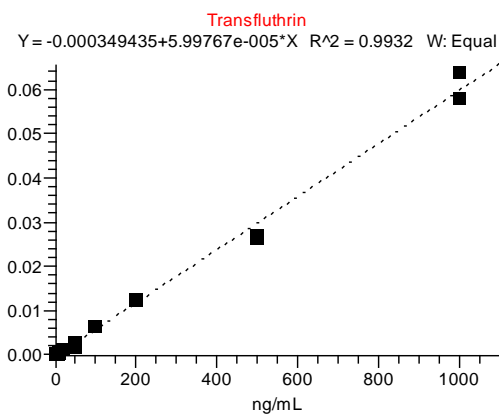
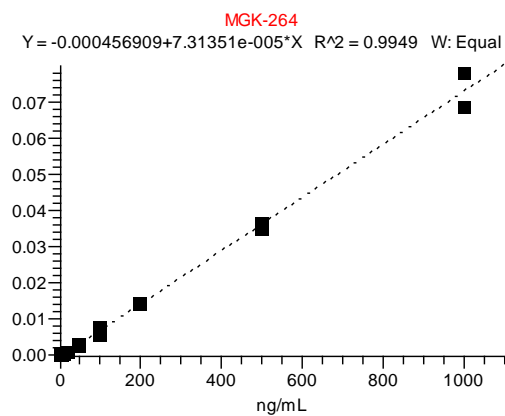
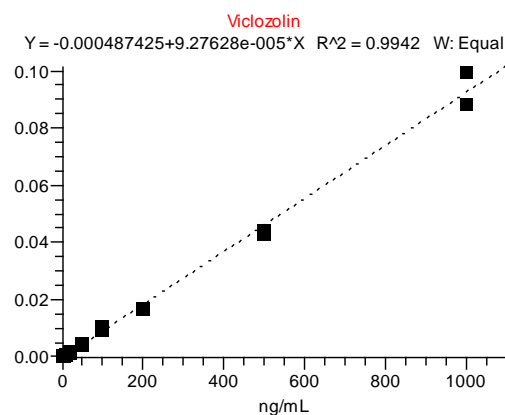
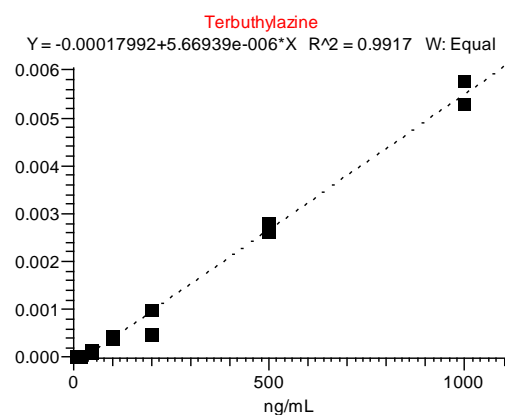
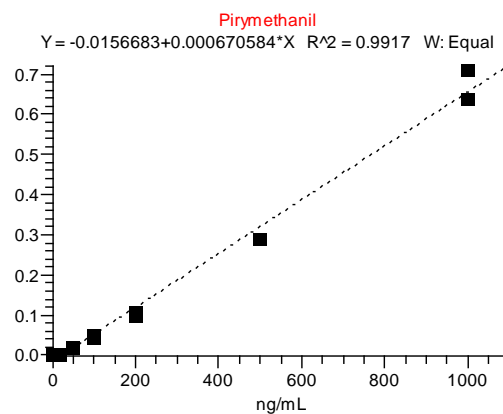
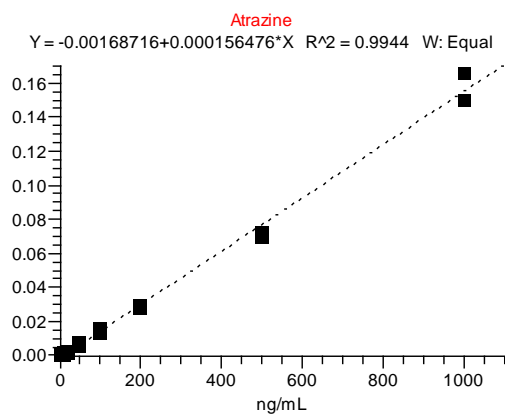


Figura 23: Linearidade dos compostos atrazina, pirimetanil, terbutilazina, viclozolina, MGK-264 e transflutrina.

5.2.2. Seletividade/Efeito Matriz

Foram injetados seis vezes o ponto de 50 ng mL⁻¹ da curva padrão, em triplicata de injeção, após processo de extração na matriz orgânica (isenta de resíduos de agrotóxicos).

Os resultados em amostra de tomate para o teste F e para o teste t são mostrados nas tabelas abaixo (Tabela 11, Tabela 12, Tabela 13, Tabela 14, Tabela 15 e Tabela 16) para atrazina, terbutilazina e fluzilazole, respectivamente, como exemplo de estudo do comportamento de estatístico. A mesma avaliação foi aplicada para todos os 41 compostos estudados.

Tabela 11: Teste F para avaliação de efeito matriz da atrazina em amostra de tomate

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
<i>Mean</i>	93,17	89,75
<i>Variance</i>	44,93	23,86
<i>Observations</i>	18,00	18,00
<i>Df</i>	17,00	17,00
<i>F</i>	1,88	-
<i>P(F<=f) one-tail</i>	0,10	-
<i>F Critical one-tail</i>	2,27	-

Tabela 12: Teste t para avaliação de efeito matriz da atrazina em amostra de tomate

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
<i>Mean</i>	93,17	89,75
<i>Variance</i>	44,93	23,86
<i>Observations</i>	18,00	18,00
<i>Pooled Variance</i>	34,39	-
<i>Hypothesized Mean Difference</i>	0,05	-
<i>Df</i>	34,00	-
<i>t Stat</i>	1,72	-
<i>P(T<=t) one-tail</i>	0,05	-
<i>t Critical one-tail</i>	1,69	-
<i>P(T<=t) two-tail</i>	0,09	-
<i>t Critical two-tail</i>	2,03	-

Tabela 13: Teste F para avaliação de efeito matriz da terbutilazina em amostra de tomate

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
<i>Mean</i>	103,63	115,53
<i>Variance</i>	766,65	309,49
<i>Observations</i>	18,00	18,00
<i>Df</i>	17,00	17,00
<i>F</i>	2,48	-
<i>P(F<=f) one-tail</i>	0,03	-
<i>F Critical one-tail</i>	2,27	-

Tabela 14: Teste t para avaliação de efeito matriz da terbutilazina em amostra de tomate

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
<i>Mean</i>	103,63	115,53
<i>Variance</i>	766,65	309,49
<i>Observations</i>	18,00	18,00
<i>Pooled Variance</i>	538,07	-
<i>Hypothesized Mean Difference</i>	0,05	-
<i>Df</i>	34,00	-
<i>t Stat</i>	-1,55	-
<i>P(T<=t) one-tail</i>	0,07	-
<i>t Critical one-tail</i>	1,69	-
<i>P(T<=t) two-tail</i>	0,13	-
<i>t Critical two-tail</i>	2,03	-

Tabela 15: Teste F para avaliação de efeito matriz da fluzilazole em amostra de tomate

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
<i>Mean</i>	166,85	144,19
<i>Variance</i>	62,16	93,91
<i>Observations</i>	18,00	18,00
<i>df</i>	17,00	17,00
<i>F</i>	0,66	-
<i>P(F<=f) one-tail</i>	0,20	-
<i>F Critical one-tail</i>	0,440162	-

Tabela 16: Teste t para avaliação de efeito matriz da fluzilazole em amostra de tomate

	Variable 1	Variable 2
Mean	166,85	144,19
Variance	62,16	93,91
Observations	18,00	18,00
Pooled Variance	78,03	-
Hypothesized Mean Difference	0,05	-
df	34,00	-
t Stat	7,68	-
P(T<=t) one-tail	0,00	-
t Critical one-tail	1,69	-
P(T<=t) two-tail	0,00	-
t Critical two-tail	2,032245	-

Os resultados para a atrazina mostram que $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ e $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, mostrando que a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do método na faixa em estudo e que as médias são estatisticamente iguais, e a matriz não afeta o ensaio.

Os resultados para a terbutilazina mostram que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ e $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, mostrando que as variâncias não são consideradas iguais, logo a matriz tem efeito importante sobre a precisão do método na faixa em estudo, e que as médias são estatisticamente iguais, logo a matriz não afeta o ensaio.

Os resultados para o fluzilazole mostram que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ e $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$, mostrando que as variâncias não são consideradas iguais, logo a matriz tem efeito importante sobre a precisão do método na faixa em estudo, e que as médias não são estatisticamente iguais, logo a matriz tem efeito estatisticamente significativo sobre o resultado.

As matrizes de tomate apresentaram interferências significativas para alguns compostos e, por ser uma análise multirresíduo, o comportamento dos analitos se diferenciam entre si. Conforme mostrado nos resultados acima, parte dos 41 compostos analisados apresentaram similaridades e parte não. A opção foi trabalhar os dados obtidos para tomate e pepino nas suas respectivas curvas construídas nas matrizes. A curva com a matriz do tomate foi utilizada também para a avaliação do

pepino, uma vez que ambos pertencem à mesma classe de alimentos (Codex, 2016).

A partir da observação do efeito da matriz, a construção da curva para a quantificação das amostras de tomate e pepino sofreu todo o processo de extração descrito na Figura 19, na matriz de tomate orgânico, isenta de quaisquer resíduos de agrotóxicos, com ressuspensão das amostras nos mesmos pontos da curva padrão.

As tabelas abaixo (Tabela 17, Tabela 18, Tabela 19, Tabela 20, Tabela 21 e Tabela 22) apresentam os resultados para o teste F e teste t para atrazina e para a terbutilazina em amostra de manga. A mesma avaliação foi aplicada para todos os 41 compostos estudados.

Tabela 17: Teste F para avaliação de efeito matriz da atrazina em amostra de manga

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
<i>Mean</i>	93,17	126,36
<i>Variance</i>	44,93	1132,09
<i>Observations</i>	18,00	9,00
<i>Df</i>	17,00	8,00
<i>F</i>	0,04	
<i>P(F<=f) one-tail</i>	0,00	
<i>F Critical one-tail</i>	0,39	

Tabela 18: Teste t para avaliação de efeito matriz da atrazina em amostra de manga

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
<i>Mean</i>	93,17	126,36
<i>Variance</i>	44,93	1132,09
<i>Observations</i>	18,00	9,00
<i>Pooled Variance</i>	392,82	
<i>Hypothesized Mean Difference</i>	0,05	
<i>Df</i>	25,00	
<i>t Stat</i>	-4,11	
<i>P(T<=t) one-tail</i>	0,00	
<i>t Critical one-tail</i>	1,71	
<i>P(T<=t) two-tail</i>	0,00	
<i>t Critical two-tail</i>	2,06	

Tabela 19: Teste F para avaliação de efeito matriz da terbutilazina em amostra de manga

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
<i>Mean</i>	95,66	170,81
<i>Variance</i>	748,40	1261,23
<i>Observations</i>	18,00	9,00
<i>Df</i>	17,00	8,00
<i>F</i>	0,59	
<i>P(F<=f) one-tail</i>	0,17	
<i>F Critical one-tail</i>	0,39	

Tabela 20: Teste t para avaliação de efeito matriz da terbutilazina em amostra de manga

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
<i>Mean</i>	95,66	170,81
<i>Variance</i>	748,40	1261,23
<i>Observations</i>	18,00	9,00
<i>Pooled Variance</i>	912,51	
<i>Hypothesized Mean Difference</i>	0,05	
<i>Df</i>	25,00	
<i>t Stat</i>	-6,10	
<i>P(T<=t) one-tail</i>	0,00	
<i>t Critical one-tail</i>	1,71	
<i>P(T<=t) two-tail</i>	0,00	
<i>t Critical two-tail</i>	2,06	

Tabela 21: Teste F para avaliação de efeito matriz de fluzilazole em amostra de manga

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
<i>Mean</i>	166,8476	283,3809
<i>Variance</i>	62,15716	7976,089
<i>Observations</i>	18	9
<i>df</i>	17	8
<i>F</i>	0,007793	
<i>P(F<=f) one-tail</i>	1,16E-13	
<i>F Critical one-tail</i>	0,392472	

Tabela 22: Teste t para avaliação de efeito matriz da fluzilazole em amostra de manga

	Variable 1	Variable 2
Mean	166,8476	283,3809
Variance	62,15716	7976,089
Observations	18	9
Pooled Variance	2594,615	
Hypothesized Mean Difference	0,05	
df	25	
t Stat	-5,60629	
P(T<=t) one-tail	3,92E-06	
t Critical one-tail	1,708141	
P(T<=t) two-tail	7,83E-06	
t Critical two-tail	2,059539	

Os resultados para a atrazina mostram que $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ e $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, mostrando que a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do método na faixa em estudo e que as médias são estatisticamente iguais, logo a matriz não afeta o ensaio.

Os resultados para a terbutilazina mostram que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ e $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, mostrando que as variâncias não são consideradas iguais, logo a matriz tem efeito importante sobre a precisão do método na faixa em estudo, e que as médias são estatisticamente iguais, logo a matriz não afeta o ensaio.

Os resultados para o fluzilazole mostram que $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ e $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, mostrando que a matriz não tem efeito importante sobre a precisão do método na faixa em estudo e que as médias são estatisticamente iguais, logo a matriz não afeta o ensaio.

As matrizes de manga apresentaram interferências significativas para alguns compostos e, por ser uma análise multirresíduo, o comportamento dos analitos se diferenciam entre si. Conforme mostrado nos resultados acima, parte dos 41 compostos analisados apresentaram similaridades e parte não. A opção foi trabalhar os dados obtidos para manga na sua respectiva curva construída na matriz.

Como foi observado o efeito da matriz, a construção da curva para a quantificação das amostras de manga sofreu todo o processo de extração descrito na Figura 19, na matriz de manga orgânica, isenta de quaisquer resíduos de agrotóxicos, com ressuspensão das amostras nos mesmos pontos da curva padrão.

Para amostras de maçã e morango, optou-se por trabalhar com a curva padrão.

Pinho *et al.* (2009), descrevem a diferença entre os resultados associados ao efeito da matriz, mostrando que, quando é utilizada solução padrão preparada em solvente puro, porcentagens de extração com recuperações superiores a 100% são obtidas, e quando é utilizada a curva preparada em amostras de matriz, as recuperações ficam em torno de 100%.

Hajslová *et al.* (2003), Salvador *et al.* (2006), Pinho *et al.*, (2009), descrevem que o efeito matriz pode causar algumas alterações na análise cromatográfica, como: a) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo, o que ocorre quando há perdas de quantidade do agrotóxico no sistema de injeção, fornecendo baixa resposta e dificultando a integração; b) erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse, gerando resultado falso positivo, problema que pode ser contornado com o uso de um espectrômetro de massas; c) aumento do sinal do detector, levando à superestimação dos resultados, que ocorre quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos

Compostos mais polares são mais suscetíveis ao efeito de matriz, assim como compostos contendo grupamentos -P=O (organofosforados), -O-CO-NH- (carbamatos), -OH (hidroxilados), -N= (imidazoles e benzimidazoles), -NH-CO-NH- (derivados da uréia) (Pinho *et al.*, 2009).

Os piretróides, apesar de serem menos polares, apresentam efeito de matriz significativo, pois a elevada massa molar dos agrotóxicos (acima de 400 g mol⁻¹) dificulta a volatilização e menor quantidade de analito é

introduzida na coluna cromatográfica quando preparado em solvente puro, produzindo menores respostas (Sanchez-Brunete *et al.*, 2005; Pinho *et al.*, 2009).

5.2.3. Repetibilidade

Os resultados para a repetibilidade foram obtidos pela adição do analito na concentração de 200 ng mL⁻¹ ao branco da amostra, para 8 amostras. Os resultados mostrados na Tabela 23 mostram, como exemplo, o CV com valor inferior a 20% para os compostos atrazina, pirimetanil, teflutrina, triadimefon, MGK-264, cipermetrina e bioaletrina, satisfazendo aos critérios estabelecidos para a avaliação da repetibilidade (SANTE/11945/2015). A mesma avaliação foi aplicada para todos os 41 compostos estudados.

Tabela 23: Resultados de repetibilidade para atrazina, pirimetanil, teflutrina, triadimefon, MGK-264, cipermetrina e bioaletrina

	Atrazina	Pirimetanil	Teflutrina	Triadimefon	MGK-264	Cipermetrina	Bioaletrina
	173,77	127,93	127,84	122,94	155,13	144,61	166,63
	150,70	94,89	109,70	106,38	113,63	114,38	135,54
	132,03	85,79	99,28	94,00	97,37	109,94	161,72
	91,80	79,17	94,45	72,97	138,83	102,23	99,86
	142,92	88,27	149,08	76,73	108,40	116,41	106,31
	157,31	117,62	146,63	89,58	117,85	89,12	115,26
	132,49	123,07	127,17	87,72	99,69	73,12	111,39
	106,21	103,45	150,26	89,53	147,98	106,39	136,10
Média	135,90	102,52	125,55	92,48	122,36	107,02	129,10
Desvio Padrão	26,76	18,45	22,44	16,00	22,14	20,90	25,19
CV (%)	20	18	18	17	18	19	19

5.2.4. Recuperação

A recuperação do processo de implementação do método QuEChERS foi avaliada através de 5 brancos fortificados com padrão de surrogate p-terfenil-D14. Os resultados variaram de 84 a 94%, conforme Tabela 24 abaixo, e estão dentro dos intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos de agrotóxicos.

Tabela 24: Resultados para teste de recuperação para implementação do método

Amostras	Recuperação (%)
Branco 1	86
Branco 2	84
Branco 3	87
Branco 4	94
Branco 5	86
Média	88
Desvio Padrão	4

A Figura 24 mostra a distribuição da recuperação do conjunto de dados obtidos para todas as amostras considerando todas as diferentes culturas estudadas, mostrando que a maior parte das amostras analisadas está dentro da faixa aceitável de recuperação (70-120%).

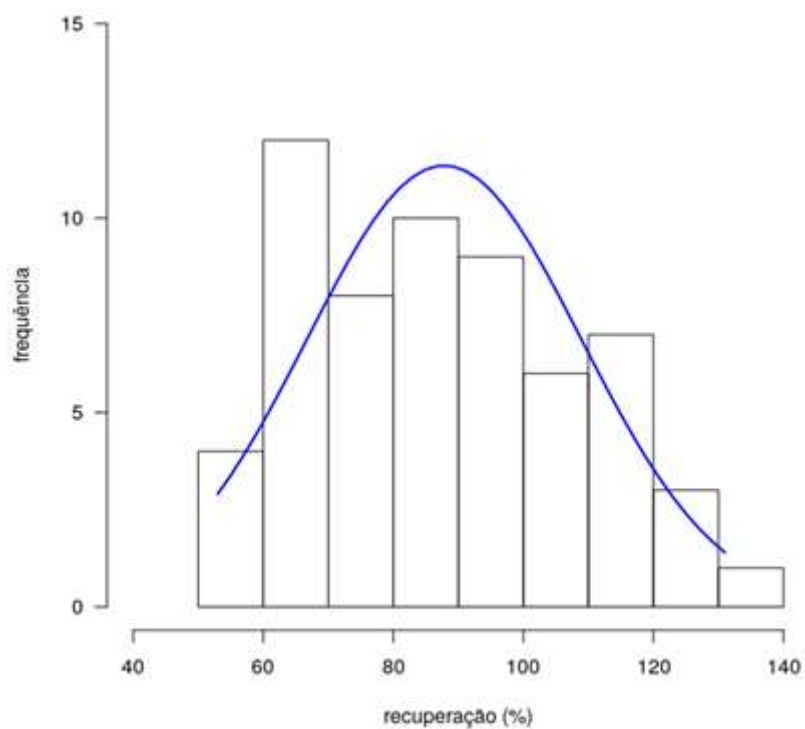


Figura 24: Distribuição do percentual de recuperação das amostras analisadas

5.2.5. Homocedasticidade

A homocedasticidades foi testada para os 41 compostos analisados nas curvas alta e baixa. Como exemplo, a Figura 25 e Figura 26 apresentam o modelo de planilha com os dados obtidos para a atrazina e para a vinclozolina, respectivamente. Os dados exibidos são expostos para as curvas de baixa concentração, utilizadas para a quantificação das amostras. As curvas de alta concentração para todos os compostos também se apresentaram adequadas, entretanto, por características das amostras coletadas, não foram utilizadas.

Os resíduos decorrentes dos ajustes da curva analítica obtida através do MMQO foram avaliados em função da homogeneidade na variância dos resíduos da regressão, através do teste de Cochran. O valor de $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$ ($k=6$; $n=3$) é um critério de aceitação do método. A avaliação da curva analítica foi realizada através de uma planilha eletrônica para cada substância estudada.

Os gráficos de resíduos da regressão obtidos para as substâncias estudadas mostram que não foram observados valores discrepantes em nenhuma situação apresentada e que os comportamentos são homocedásticos.

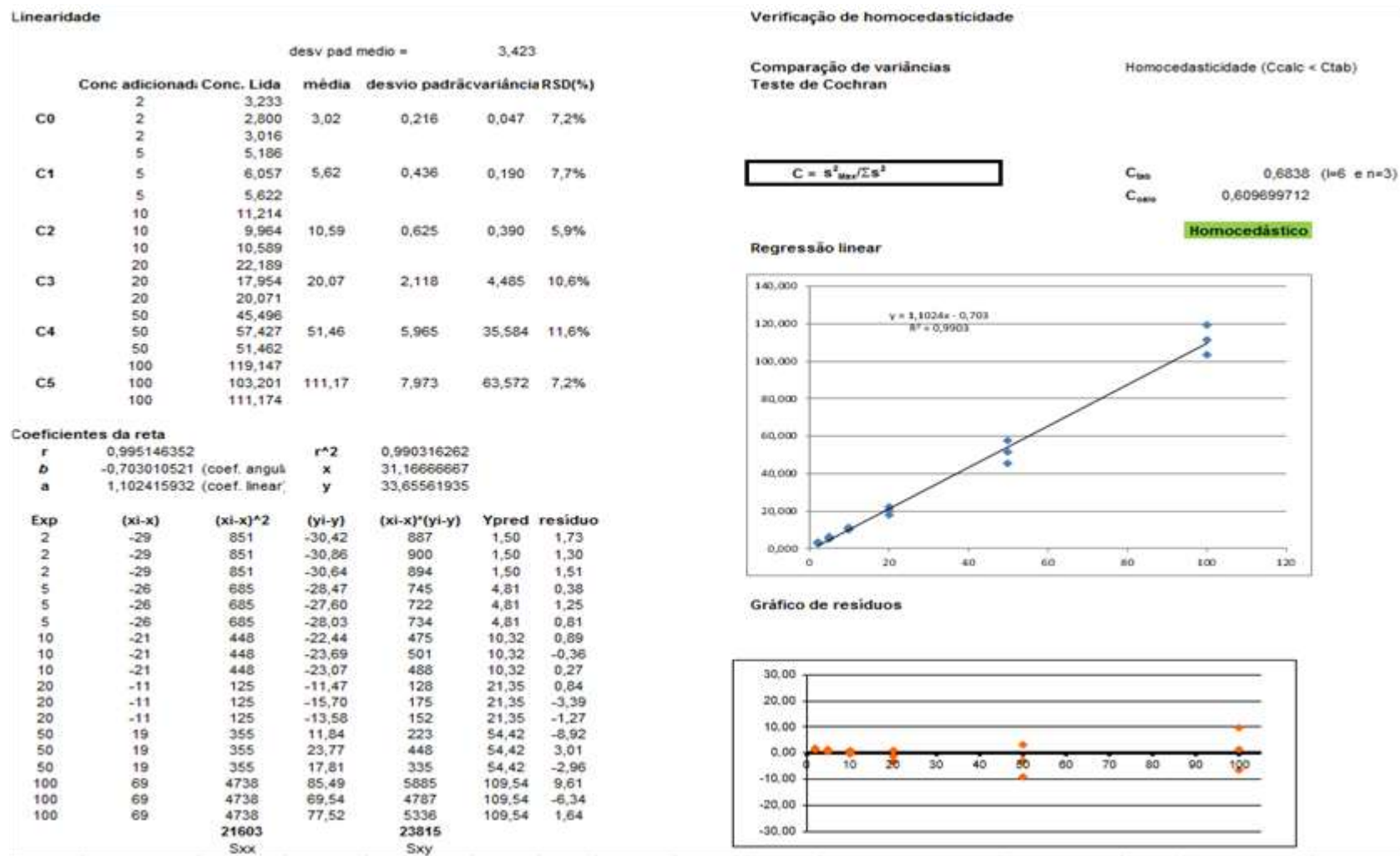


Figura 25: Avaliação da homocedasticidade e demais critérios de validação para a curva de baixa concentração da atrazina.

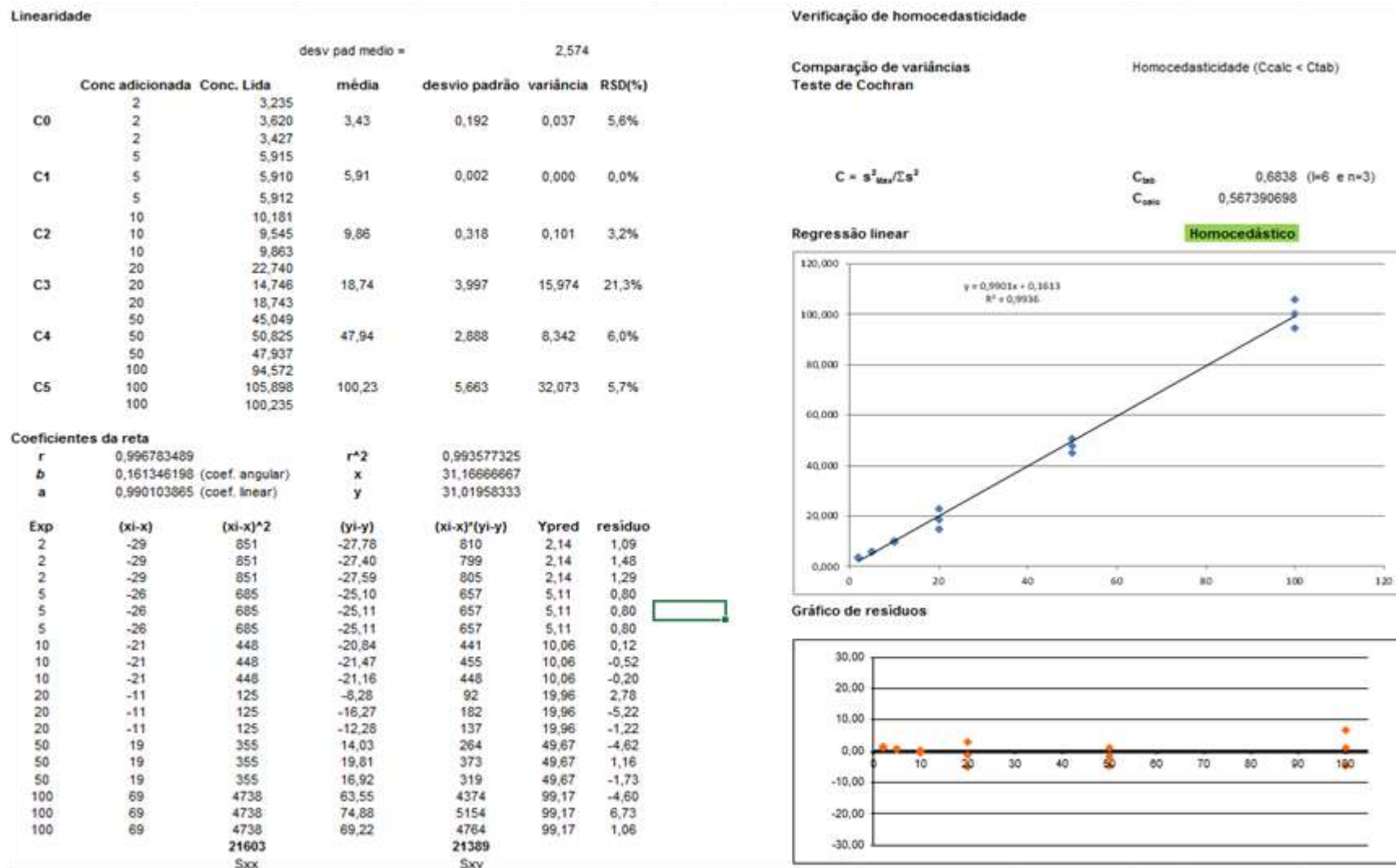


Figura 26: Avaliação da homocedasticidade e demais critérios de validação para a curva de baixa concentração da viclozolina.

5.2.6. Limite de Detecção do Método

A Tabela 25 apresenta os valores encontrados para o limite de detecção do método, onde “a” refere-se à amostra e “b” refere-se ao branco. O LDM variou de 0,08 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 10,22 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Tabela 25: Valores encontrados para o limite de detecção do método

Pesticida	LDMa $\mu\text{g g}^{-1}$	LDMb $\mu\text{g g}^{-1}$	Pesticida	LDMa $\mu\text{g g}^{-1}$	LDMb $\mu\text{g g}^{-1}$
Antraquinona	0,08	0,13	Lambda-cialotrina	2,85	0,23
Atrazina	5,41	2,82	Lenacil	5,99	4,75
Bifentrina	2,81	0,83	MGK-264	4,67	0,59
Bioaletrina	5,15	1,98	Miclobutanil	2,32	0,05
Bupirimate	3,80	3,02	Paclobutrazol	1,91	0,04
Ciflutrin	5,53	0,89	Penconazol	2,93	0,20
Cipermetrina	4,21	0,43	Permetrina	2,14	0,16
Ciprodinil	5,17	0,05	Pirimetanil	3,69	0,19
Clorfenapir	10,22	9,40	Piriproxifem	5,83	0,73
Deltametrina	5,29	5,81	Procimidona	1,99	2,37
Etofenprox	1,34	0,03	Propargite	2,31	0,94
Fenarimol	2,72	0,39	Tau-fenvalinate	5,29	5,81
Fenotrin	5,35	0,97	Tebuconazol	3,14	2,77
Fenvalerate	4,75	2,74	Teflutrina	4,72	2,06
Fipronil	2,61	-	Terbutilazina	10,16	4,97
Flucitrinate	2,94	0,27	Tetrametrina	6,68	0,75
Fludioxonil	3,57	-	Transflutrina	6,65	3,07
Fluridona	5,34	6,10	Tridamefon	3,37	0,38
Flusilazol	1,37	3,59	Triflumizol	2,00	0,13
Flutriafol	4,23	0,92	Viclozolin	5,36	3,65
Hexazinona	2,49	5,32			

5.3. Monitoramento das amostras de frutos

Após a validação da metodologia, a mesma foi aplicada para avaliação da qualidade de amostras de maçã, manga, morango, pepino e tomate que são comercializados na cidade do Rio de Janeiro, conforme figuras abaixo.

As cinco culturas analisadas foram coletadas durante quatro meses, entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017, e todas as amostras foram analisadas em triplicata. As Figuras 27 a 36 mostram, graficamente, a variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em ng g^{-1} , para cada uma das culturas.

A comparação entre os resultados encontrados nesse estudo com os valores de limites máximos permitidos pela ANVISA é apresentada na Tabela 26. Piriproxifem em maçã e tebuconazol em morango foram os únicos agrotóxicos detectados com concentração superior ao permitido pela ANVISA.

Os valores de LMR são calculados pela ANVISA com base nos valores de IDMT e de IDA. A quantidade de uma substância em mg.kg^{-1} peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem oferecer risco apreciável para a saúde humana permite avaliar o risco da ingestão de resíduos de praguicidas em alimentos (ANVISA, 2015). A IDA, determinada para cada ingrediente ativo de agrotóxicos, é estabelecida com base em estudos sobre as propriedades físico-químicas, metabólicas, farmacológicas e toxicológicas dos praguicidas, advindas dos estudos conduzidos com animais de laboratórios, e realizados com procedimentos reconhecidos em nível internacional (Santos *et al.*, 2007).

Para agrotóxicos, o limite máximo de resíduo (LMR) também é um importante critério para o auxílio na prevenção da saúde pública, e é estabelecido a partir dos valores de IDA. Entende-se por LMR a quantidade máxima de resíduo de agrotóxicos oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em mg do ingrediente ativo por kg de alimento (Santos *et al.*, 2007).



Figura 27: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em ng g⁻¹, para a cultura de maçã entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses na mesma escala.**

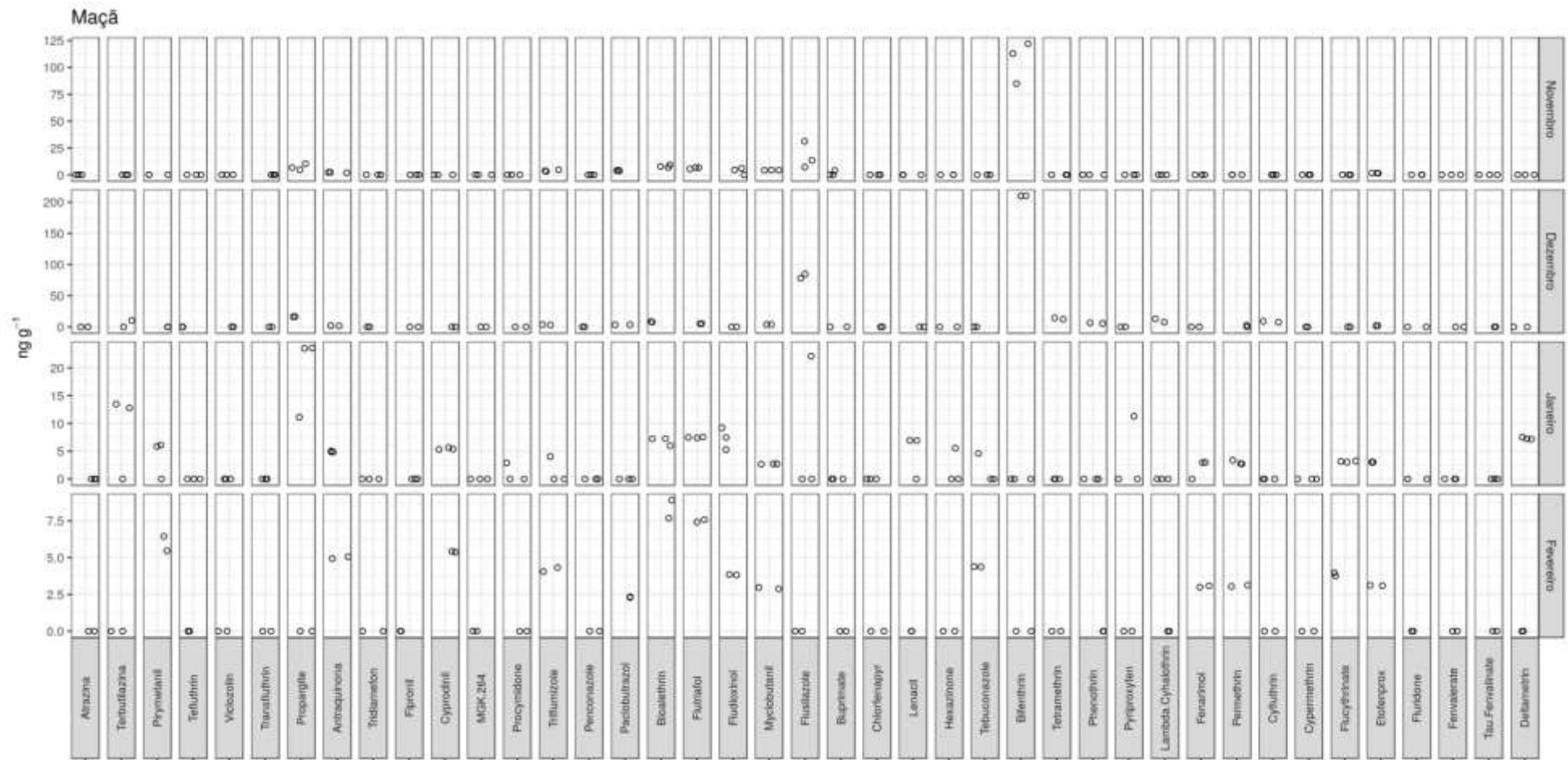


Figura 28: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em ng g^{-1} , para a cultura de maçã entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses em diferentes escalas.**

Nas amostras de maçã analisadas, os resultados indicam que muitos resíduos de agrotóxicos não autorizados pela legislação brasileira foram encontrados, como antraquinona, bifentrina, bioaletrina, buprimato, ciflutrina, flucitrinato, fludioxinol, flusilazole, hexazinona, lamba-cialotrina, lenacil, paclobutrazol, permetrina, fenotrina, terbutilazina e tetrametrina, representando 39% dos pesticidas analisados.

Ciprodinil, deltametrina, etofemproxi, fenarimol, miclobutanil, pirimetanil, procimidona, propargito, piriproxifem, tebuconazol e triflumizol foram detectados, porém com concentração inferior aos valores permitidos pela ANVISA.

Atrazina, cipermetrina, clorfenapir, fenvalerato, fipronil, fluridone, MGK-264, penconazol, tau fenvalinate, teflutrina, transflutrina, triadimefom e vinclozolina foram detectados com valores inferiores ao limite de detecção do método.

A análise dos resultados do PARA de 2015, mostra que 89% das amostras de maçã analisadas em território nacional no período de 2013 a 2015 foram consideradas satisfatórias. Agrotóxicos do grupo dos ditiocarbamatos, carbendazim e acetamiprido foram os que apresentaram maior número de detecções nas amostras analisadas. De um total de 764 amostras analisadas, 68 apresentaram agrotóxicos não autorizados para a cultura de maçã, representando 8,9% dos agrotóxicos avaliados.

Resíduos de pirimetanil foram encontrados em dezessete amostras (PARA, 2015), representando 2,2% dos agrotóxicos analisados. Nesse estudo, resíduos de pirimetanil foram encontrados com valor abaixo do permitido pela ANVISA, como exposto acima, representando 2,4% dos agrotóxicos analisados.

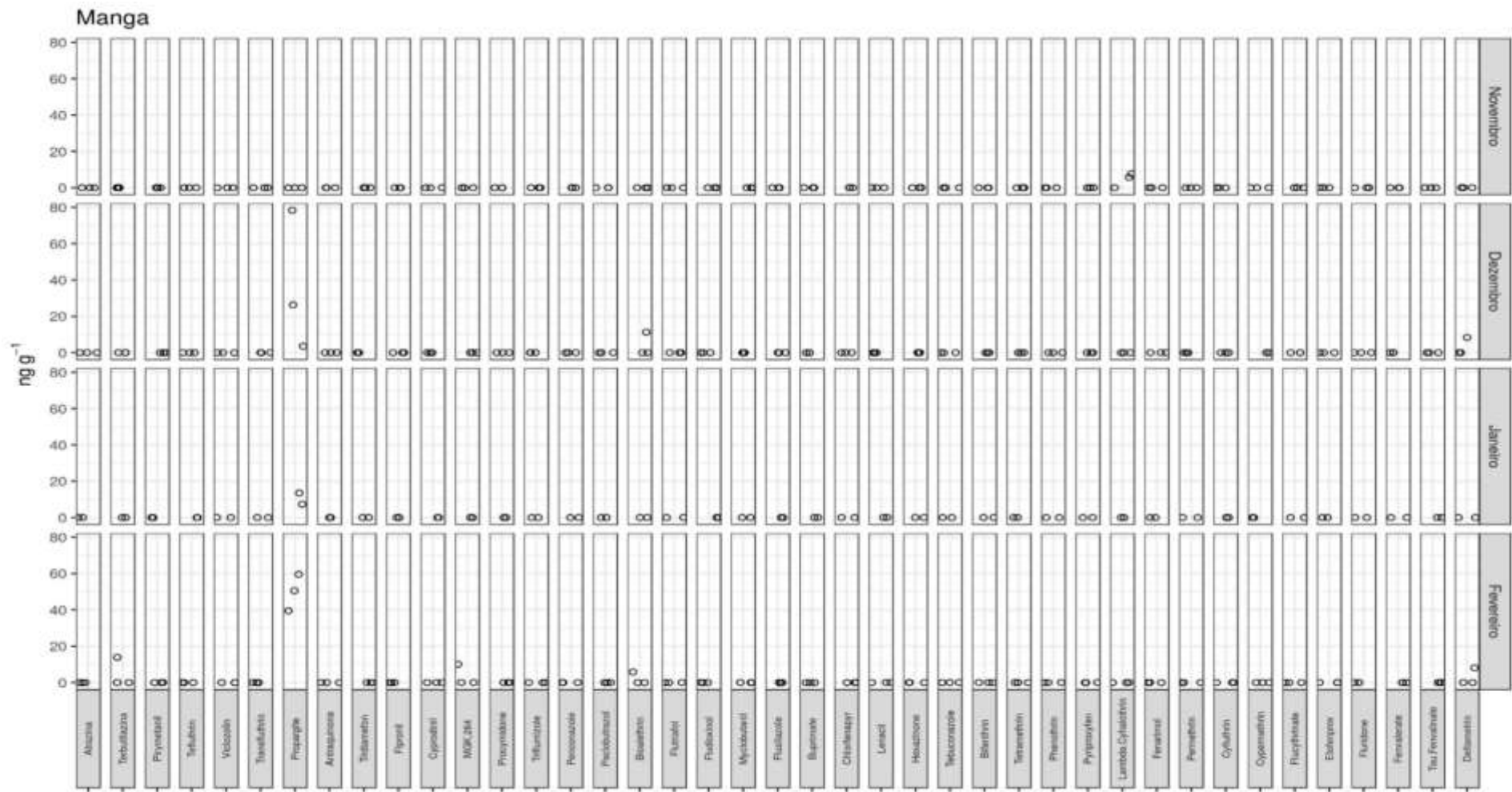


Figura 29: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg⁻¹, para a cultura de manga entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses na mesma escala.**

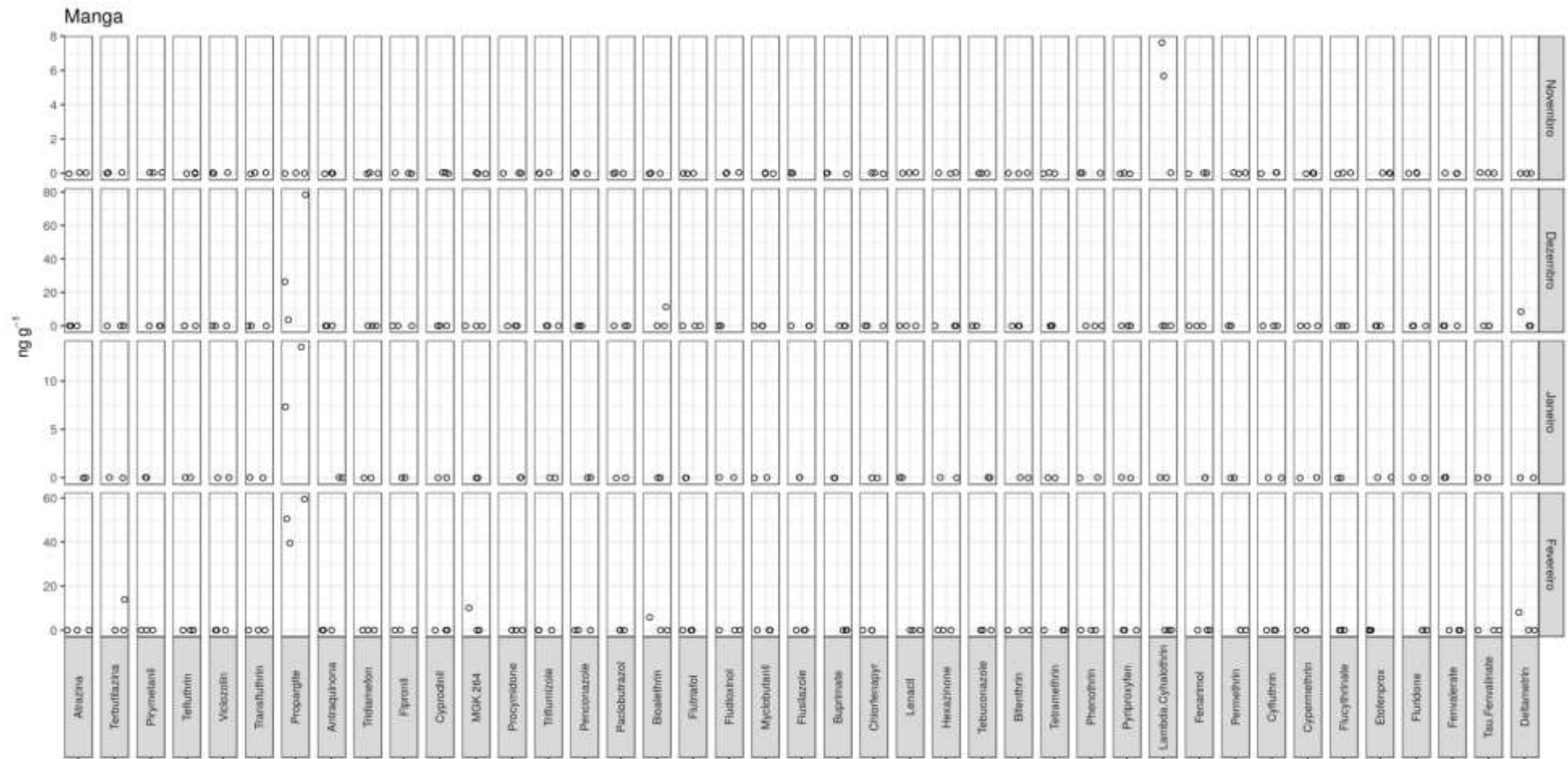


Figura 30: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg⁻¹, para a cultura de manga entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses em diferentes escalas.**

Os resultados encontrados para a manga mostram que os seguintes resíduos de agrotóxicos não autorizados pela ANVISA foram encontrados: bioaletrina, deltametrina, MGK-264, propargito e terbutilazina. Lambda-cialotrina foi encontrada em concentração igual a 0.008 mg kg^{-1} , valor inferior ao de referência da ANVISA. Todos os demais agrotóxicos analisados, foram detectados com valores inferiores ao limite de detecção do método.

A análise dos resultados do PARA de 2015, mostra que 84% das amostras de manga analisadas no período de 2013 a 2015 foram consideradas satisfatórias. Agrotóxicos do grupo dos ditiocarbamatos e o acefato foram os que apresentaram maior número de detecções nas amostras analisadas. De um total de 219 amostras analisadas, 32 apresentaram agrotóxicos não autorizados para a cultura de manga, entre eles resíduos de cipermetrina (ANVISA, 2015), que foram detectados com valores inferiores ao limite de detecção do método para as amostras de manga analisadas nesse estudo.

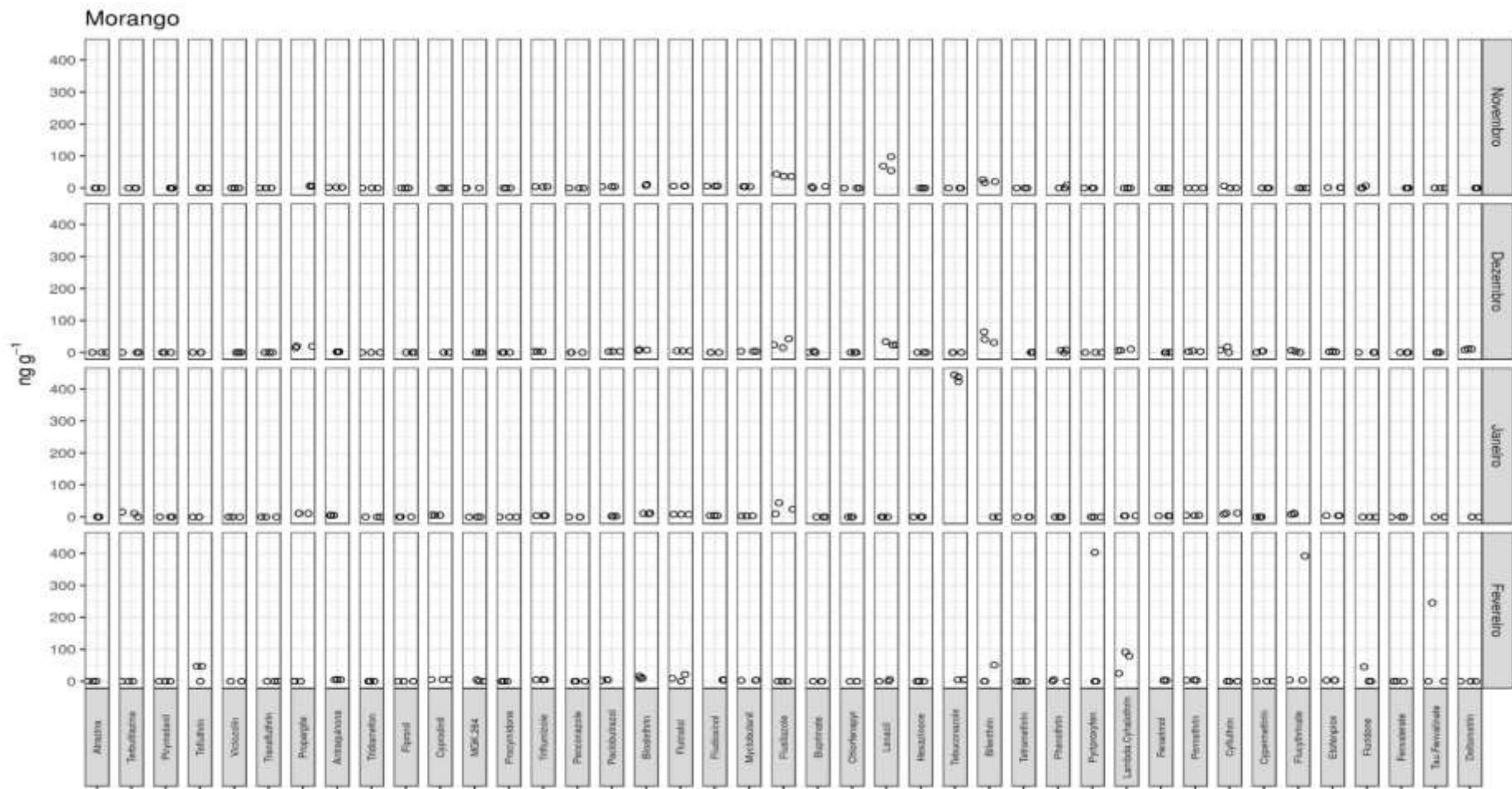


Figura 31: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg⁻¹, para a cultura de morango entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses na mesma escala.**

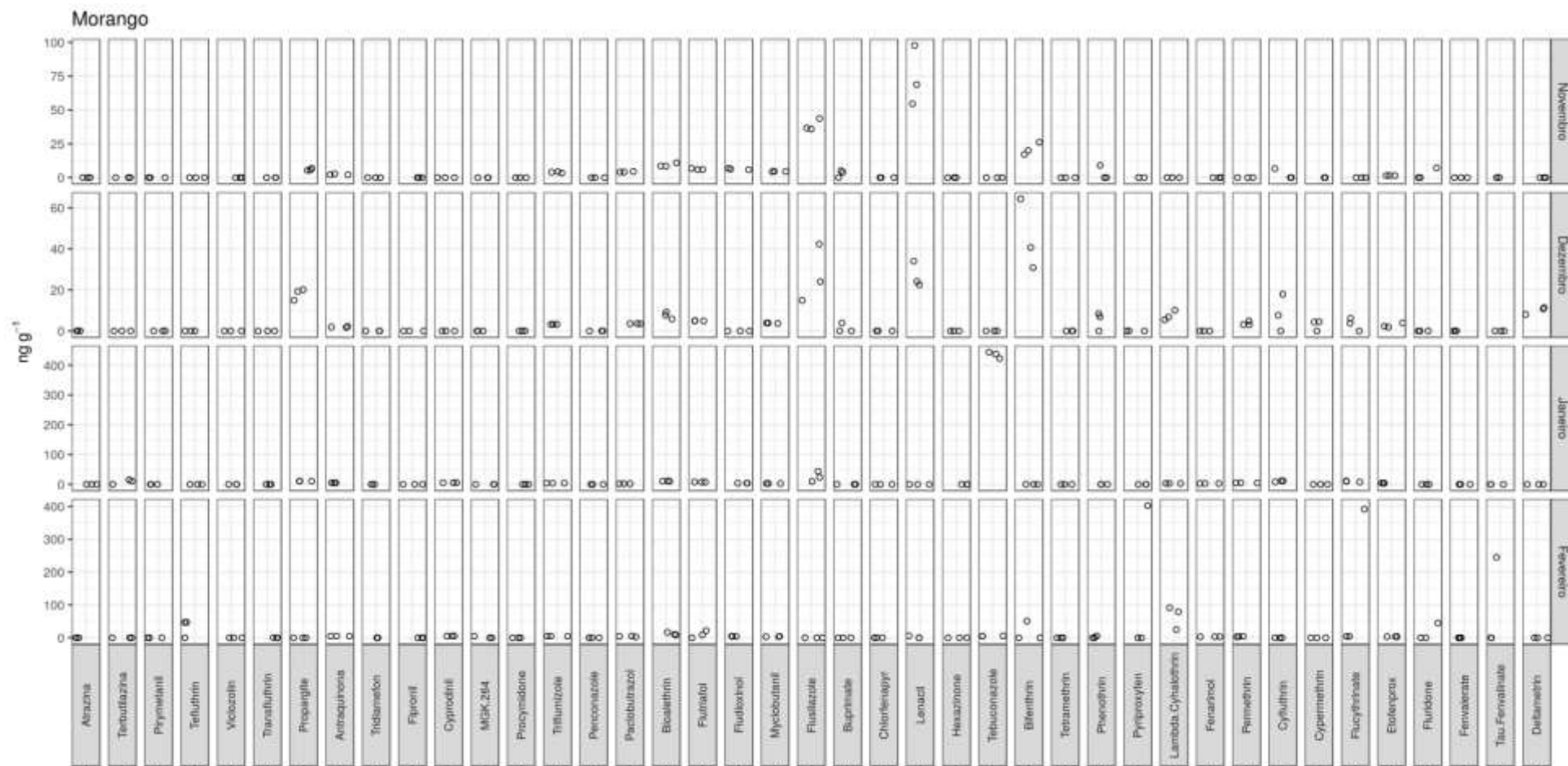


Figura 32: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg⁻¹, para a cultura de morango entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses em diferentes escalas.**

Os resultados encontrados para o morango mostram que os seguintes resíduos de agrotóxicos não autorizados pela ANVISA foram encontrados: antraquinona, bifentrina, bioaletrina, buprimate, ciflutrina, cipermetrina, ciprodinil, deltametrina, etofemproxi, fenarimol, flucitrinato, fludioxinol, fluridone, flusilazole, flutriafol, lenacil, MGK-264, miclobutanil, paclobutrazol, permetrina, fenotrina, propargito, piriproxifem, tau fenvallinate, tebuconazol, teflutrina, terbutilazina e triflumizol, representando 71% dos agrotóxicos analisados.

Lambda-cialotrina foi encontrada em concentração igual a 0,091 mg kg⁻¹, abaixo do valor de referência da ANVISA de 0,50 mg kg⁻¹. Propargito foi encontrado com concentração igual a 0,02, mg kg⁻¹, abaixo do valor de referência da ANVISA de 0,50 mg kg⁻¹. Tebuconazol foi encontrado com concentração igual a 0,444 mg kg⁻¹, acima do valor de referência da ANVISA de 0,10 mg kg⁻¹. Os demais agrotóxicos foram detectados com valores abaixo do limite de detecção do método.

A análise dos resultados do PARA de 2015, mostra que apenas 27% das amostras de morango analisadas no período de 2013 a 2015 foram consideradas satisfatórias. De um total de 157 amostras analisadas, 41 apresentaram agrotóxicos acima do LMR, entre eles tebuconazol, que também foi encontrado nesse estudo, porém com concentração inferior ao permitido pela ANVISA. Desse mesmo total de amostras, 110 apresentaram agrotóxicos não autorizados para a cultura de morango (ANVISA, 2015), representando, 70% dos agrotóxicos analisados, resultados que são compatíveis aos encontrados nesse estudo.

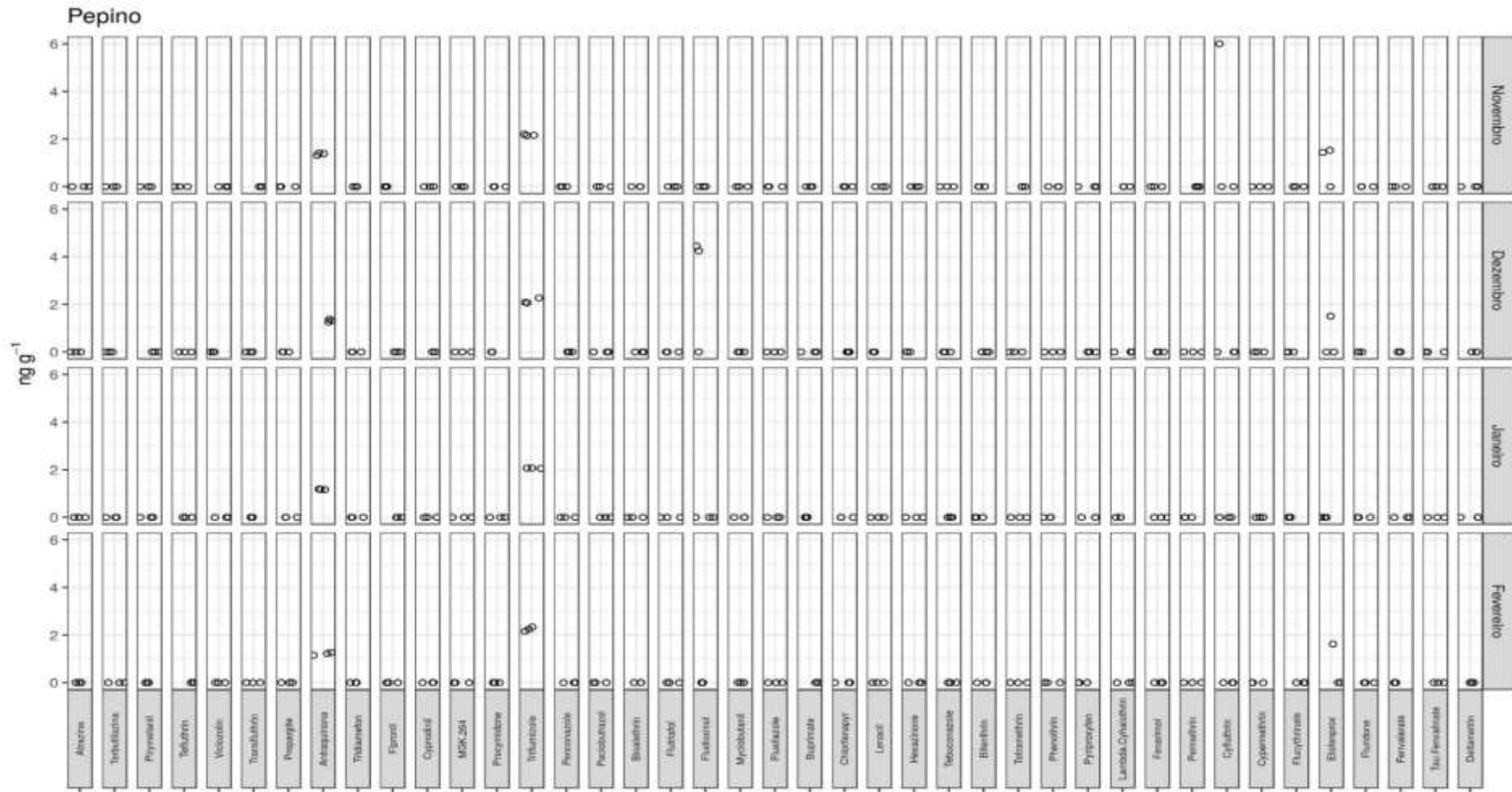


Figura 33: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg⁻¹, para a cultura de pepino entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses em diferentes escalas.**

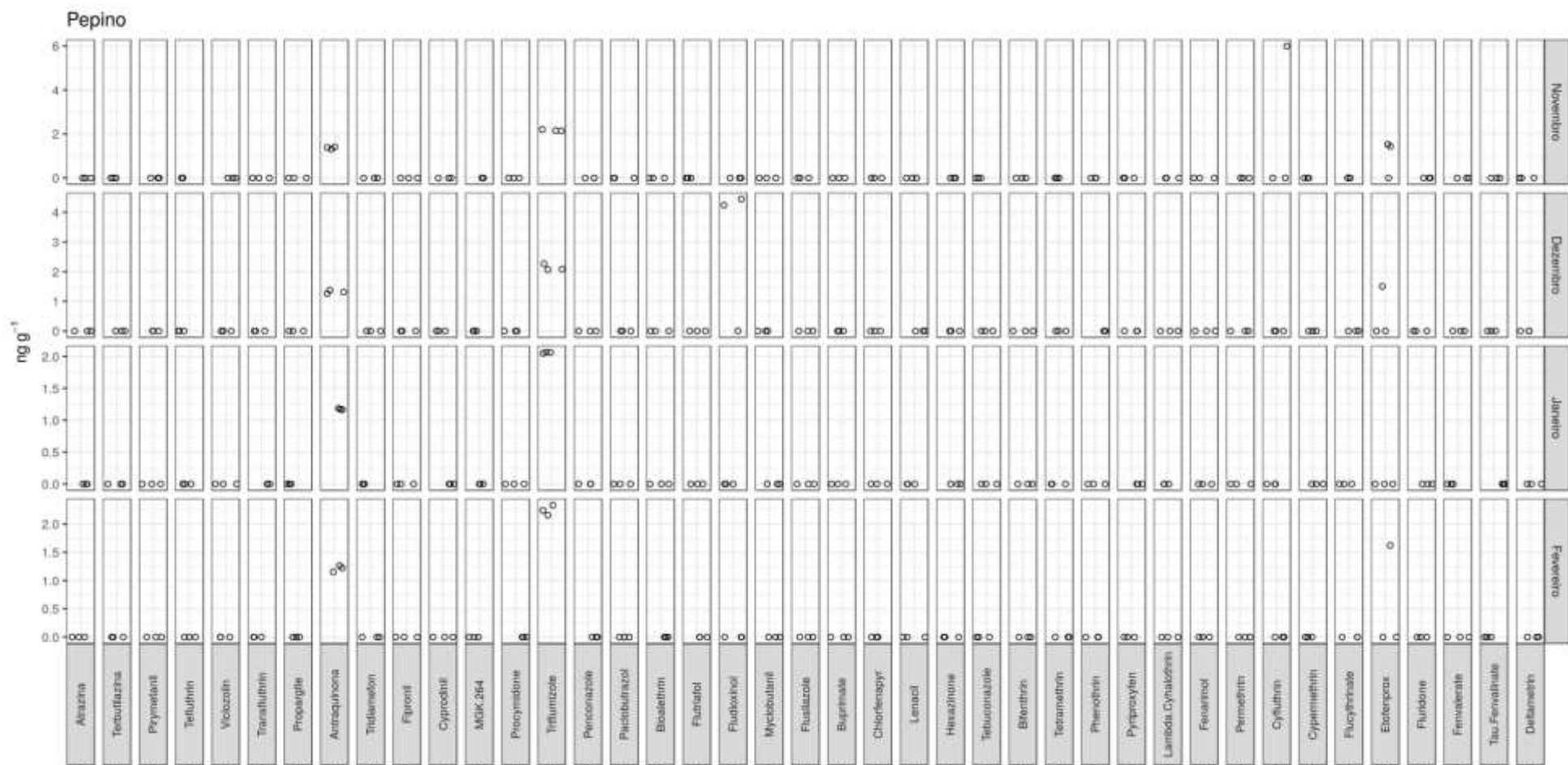


Figura 34: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg^{-1} , para a cultura de pepino entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses em diferentes escalas.**

Os resultados encontrados para o pepino mostram que os seguintes resíduos de agrotóxicos não autorizados pela ANVISA foram encontrados: antraquinona, ciflutrinam, etofenproxi e fludioxinol, representando 10% dos agrotóxicos analisados.

Triflumizol foi encontrado em concentração igual a $0,002 \text{ mg kg}^{-1}$, quando o valor de referência da ANVISA é de $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$.

A análise dos resultados do PARA de 2015, mostra que 70% das amostras de pepinos analisadas no período de 2013 a 2015 foram consideradas satisfatórias. De um total de 487 amostras analisadas, 13 apresentaram agrotóxicos acima do LMR, entre eles a deltametrina. Desse mesmo total de amostras, 138 apresentaram agrotóxicos não autorizados para a cultura de pepino (ANVISA, 2015), representando 28% dos agrotóxicos analisados. Nesse estudo, deltametrina foi detectada com valor inferior ao limite de detecção do método.

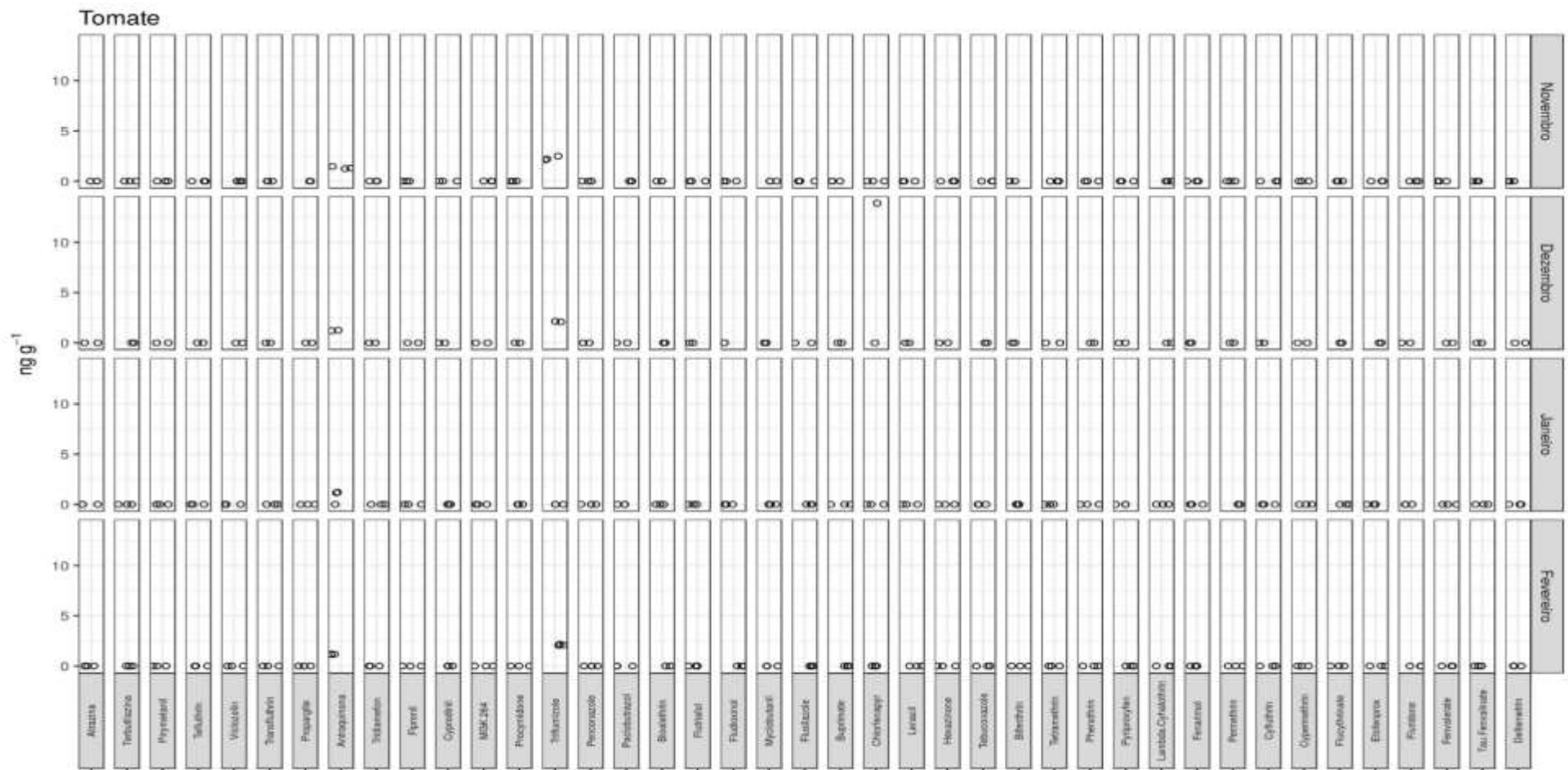


Figura 35: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg⁻¹, para a cultura de tomate entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses em diferentes escalas.**

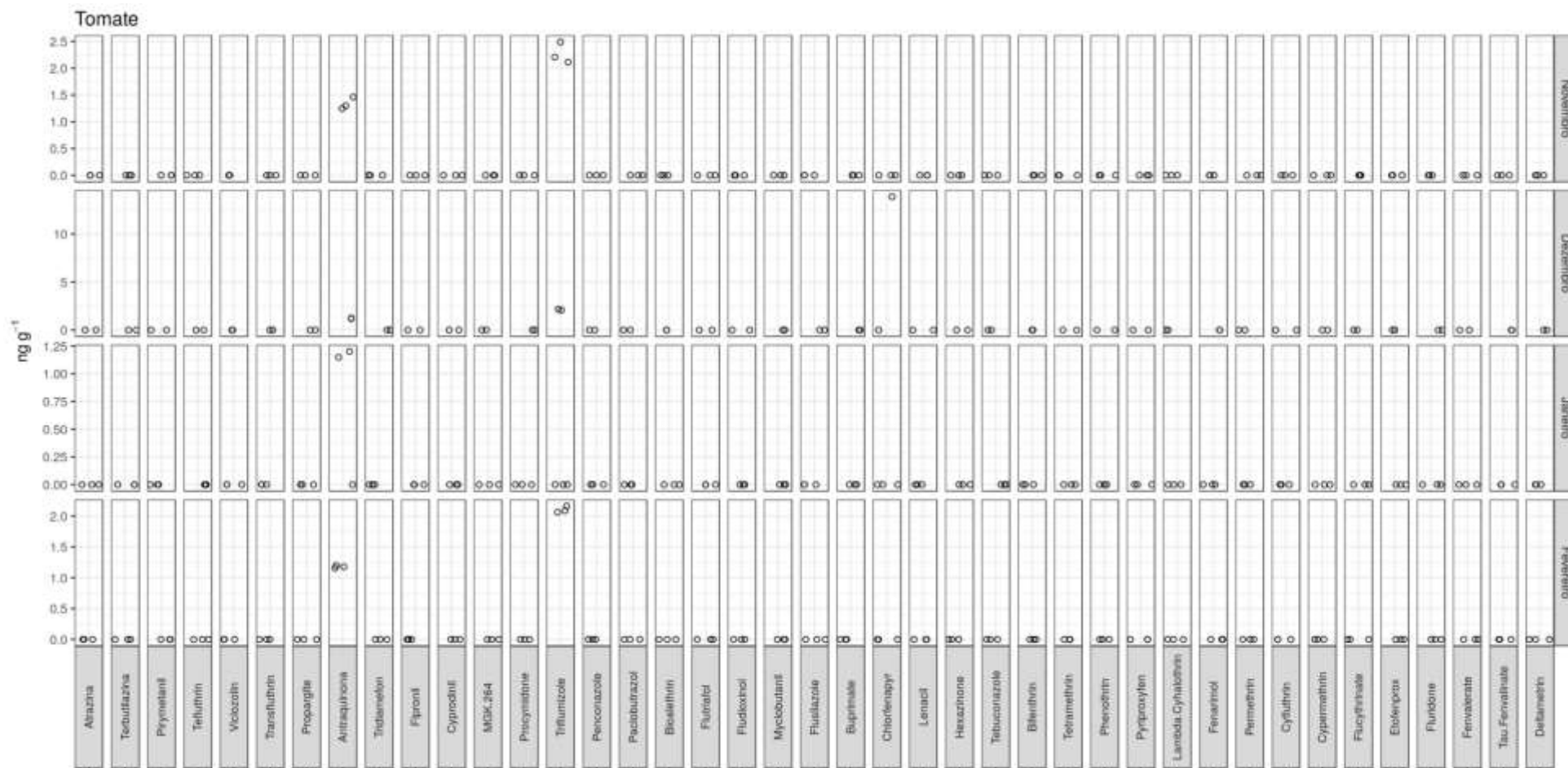


Figura 36: Variação mensal da concentração dos 41 pesticidas analisados em triplicata, em mg kg⁻¹, para a cultura de tomate entre novembro de 2016 e fevereiro de 2017. **Meses em diferentes escalas.**

Os resultados encontrados para o tomate mostram que resíduos de antraquinona e triflumizol foram encontrados, sendo que esses resíduos não são autorizados pela ANVISA (2015). Clorfenapir foi encontrada em concentração igual a $0,014 \text{ mg kg}^{-1}$, quando o valor de referência da ANVISA (2015) é de $0,20 \text{ mg kg}^{-1}$. Todos os demais compostos foram detectados com valores abaixo do limite de detecção do método.

A análise dos resultados do PARA de 2015, mostra que 68% das amostras de tomates analisadas no período de 2013 a 2015 foram consideradas satisfatórias. De um total de 730 amostras analisadas, 62 apresentaram agrotóxicos acima do LMR, entre eles a lamba-cialotrina, cipermetrina e bifentrina. Desse mesmo total de amostras, 200 apresentaram agrotóxicos não autorizados para a cultura de tomate (ANVISA, 2015), representando 27% do total de agrotóxicos analisados. Lambda-cialotrina, cipermetrina e bifentrina foram detectados com valores abaixo do limite de detecção do método nesse estudo.

Tabela 26: Concentrações máximas permitidas pela ANVISA em diferentes culturas e a concentração máxima reportada neste estudo

	IAs/Culturas/LMR (mg kg ⁻¹) ANVISA					Concentração máxima reportada neste estudo (mg kg ⁻¹)				
	Maçã	Manga	Morango	Pepino	Tomate de mesa	Maçã	Manga	Morango	Pepino	Tomate de mesa
Antraquinona	NA	NA	NA	NA	NA	0,005	<LDM	0,005	0,001	0,001
Atrazina	NA	NA	NA	NA	NA	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Bifentrina	NA	0,10	NA	0,02	0,02	0,210	<LDM	0,064	<LDM	<LDM
Bioaletrina	NA	NA	NA	NA	NA	0,009	0,011	0,017	<LDM	<LDM
Bupirimate	NA	NA	NA	NA	NA	0,004	<LDM	0,005	<LDM	<LDM
Ciflutrina	NA	NA	NA	NA	0,02	0,009	<LDM	0,018	0,006	<LDM
Cipermetrina	NA	NA	NA	0,05	0,10	<LDM	<LDM	0,004	<LDM	<LDM
Ciprodinil	1,00	NA	NA	NA	0,50	0,006	<LDM	0,006	<LDM	<LDM
Clorfenapir	NA	NA	2,00	NA	0,20	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	0,014
Deltametrina	0,02	NA	NA	0,03	0,03	0,008	0,008	0,011	<LDM	<LDM
Etofemproxi	0,50	0,30	NA	NA	0,50	0,003	<LDM	0,004	0,002	<LDM
Fenarimol	0,05	NA	NA	0,05	NA	0,003	<LDM	0,003	<LDM	<LDM
Fenvalerato	NA	NA	NA	NA	NA	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Fipronil	NA	NA	NA	NA	NA	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Flucitrinato	NA	NA	NA	NA	NA	0,004	<LDM	0,392	<LDM	<LDM
Fludioxinol	NA	NA	NA	NA	NA	0,009	<LDM	0,007	0,004	<LDM
Fluridone	NA	NA	NA	NA	NA	<LDM	<LDM	0,045	<LDM	<LDM
Flusilazole	NA	NA	NA	NA	NA	0,085	<LDM	0,044	<LDM	<LDM

Tabela 26: Concentrações máximas permitidas pela ANVISA em diferentes culturas e a concentração máxima reportada neste estudo

	IAs/Culturas/LMR (mg kg ⁻¹) ANVISA					Concentração máxima reportada neste estudo (mg kg ⁻¹)				
	Maçã	Manga	Morango	Pepino	Tomate de mesa	Maçã	Manga	Morango	Pepino	Tomate de mesa
Flutriafol	NA	NA	NA	NA	0,10	0,008	<LDM	0,022	<LDM	<LDM
Hexazinona	NA	NA	NA	NA	NA	0,006	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Lambda-cialotrina	NA	0,10	0,50	0,01	0,05	0,013	0,008	0,091	<LDM	<LDM
Lenacil	NA	NA	NA	NA	NA	0,007	<LDM	0,098	<LDM	<LDM
MGK.264	NA	NA	NA	NA	NA	<LDM	0,010	0,005	<LDM	<LDM
Miclobutanil	0,10	NA	NA	NA	NA	0,004	<LDM	0,005	<LDM	<LDM
Paclobutrazol	NA	0,02	NA	NA	NA	0,004	<LDM	0,005	<LDM	<LDM
Penconazol	NA	NA	NA	NA	NA	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Permetrina	NA	NA	NA	NA	0,30	0,003	<LDM	0,005	<LDM	<LDM
Phenothrin	NA	NA	NA	NA	NA	0,007	<LDM	0,009	<LDM	<LDM
Pirimetanil	1,00	NA	1,00	NA	1,00	0,006	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Procimidona	2,00	NA	3,00	NA	2,00	0,003	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Propargito	1,00	NA	0,50	NA	2,00	0,024	0,078	0,020	<LDM	<LDM
Piriproxifem	0,01	NA	NA	0,05	0,10	0,011	<LDM	0,403	<LDM	<LDM
Tau.Fenvalinate	NA	NA	NA	NA	NA	<LDM	<LDM	0,245	<LDM	<LDM
Tebuconazol	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30	0,005	<LDM	0,444	<LDM	<LDM
Tefluthrin	NA	NA	NA	NA	NA	<LDM	<LDM	0,047	<LDM	<LDM

Tabela 26: Concentrações máximas permitidas pela ANVISA em diferentes culturas e a concentração máxima reportada neste estudo

	IAs/Culturas/LMR (mg kg ⁻¹) ANVISA					Concentração máxima reportada neste estudo (mg kg ⁻¹)				
	Maçã	Manga	Morango	Pepino	Tomate de mesa	Maçã	Manga	Morango	Pepino	Tomate de mesa
Terbutilazina	NA	NA	NA	NA	NA	0,013	0,014	0,015	<LDM	<LDM
Tetramethrin	NA	NA	NA	NA	NA	0,014	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Transfluthrin	NA	NA	NA	NA	NA	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Triadimefom	0,20	NA	NA	NA	NA	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
Triflumizol	0,05	0,10	NA	0,10	NA	0,005	<LDM	0,005	0,002	0,002
Vinclozolina	NA	NA	NA	NA	NA	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM

NA – Não Autorizado

<LDM – Menor que o limite de detecção do método

Fonte: ANVISA, 2015.

A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura sobre triazinas e piretróides envolve análise de corpos d'água (Herrero-Hernández *et al.*, 2017; Pascual Aguilar *et al.*, 2017; Teerlink *et al.*, 2017) ou solos e sedimentos (Jaramillo Colorado *et al.*, 2016; Lingling *et al.*, 2017). Apenas alguns estudos internacionais citam esta classe de compostos em alimentos (Aldana-Madrid *et al.*, 2011; Anwar *et al.*, 2011). A maioria dos estudos possui maior foco em organofosforados e organoclorados, tanto no Brasil (Cardoso *et al.*, 1999; Bastos *et al.*, 2014; Corralo *et al.*, 2016; Zirena Vilca *et al.*, 2017) quanto no mundo (Frenich, A. G., *et al.*, 2012; Murga Juárez *et al.*, 2017).

Aldana-Madrid *et al.* (2011), reporta a presença dos agrotóxicos piretróides ciflutrina, cipermetrina, fenvalerate e deltametrina, nas concentrações 0,004-0,573 mg kg⁻¹, em 9% do total de amostras avaliadas (345) em vegetais produzidos e consumidos em Sonora, Mexico.

Anwar *et al.* (2011), reporta a presença dos agrotóxicos piretróides cipermetrina e deltametrina em amostras de maçã coletadas em mercados locais de Nawabshah, Paquistão, nas concentrações de 0,940 mg kg⁻¹ e 0,039 mg kg⁻¹, respectivamente. Nesse estudo, cipermetrina foi detectada em maçã com concentração inferior ao limite de detecção do método, e deltametrina foi detectada com concentração igual a 0,008 mg kg⁻¹, inferior ao LMR estabelecido pela ANVISA (0,02 mg kg⁻¹).

Santos *et al.* (2007), detectou resíduos de cipermetrina, deltametrina e permetrina em algumas hortaliças comercializadas nas Centrais de Abastecimento de Campinas, coletadas no período de outubro/2000 a agosto/2001. Os resultados evidenciaram o uso inadequado desses piretróides, sendo detectados resíduos de permetrina em duas amostras de alface (2,0 mg kg⁻¹) e em três amostras de tomate (8,6 - 18,8 mg kg⁻¹) acima dos limites máximos de resíduos (LMR) (0,3 mg kg⁻¹ em tomate) permitidos pela ANVISA, sendo que seu uso em alface não está autorizado pela legislação vigente. A cipermetrina também foi encontrada em uma amostra de tomate (3,0 mg kg⁻¹) acima dos LMR permitidos (0,1 mg kg⁻¹). Nesse estudo, permetrina e cipermetrina foram detectadas em tomate, com concentração inferior ao limite de detecção do método.

Piretróides foram avaliados em amostra de leite por CG-MS/MS e o limite de detecção foi na ordem de 2,29-1071pg g⁻¹ (Feo, 2011).

Li *et al.* (2013), reportam que onze triazinas em seis amostras de cereais foram detectadas com concentração variando de 0,013 a 0,987 g kg⁻¹.

Embora recebam menor atenção, estudos envolvendo triazinas e piretróides em alimentos não deveriam ser negligenciados. A Tabela 27 indica o percentual encontrado de cada composto abaixo do limite de detecção do método, demonstrando que os resultados foram satisfatórios para a maioria dos compostos analisados. Observa-se que atrazina, fenvalerato, fipronil, penconazol, transflutrina, triadimefom e vinclozolina foram detectados com valores inferiores ao LDM em todas as amostras analisadas. Antraquinona foi o agrotóxico com maior percentual de detecção, e foi detectado com valores acima do LDM em 77% das amostras analisadas, seguido por triflumizol que foi detectado com valores acima do LDM em 68% das amostras analisadas.

Tabela 27: Percentual encontrado de cada composto abaixo do LDM

Composto	(%) < LDM	Composto	(%) < LDM
Antraquinona	23	Lambda-cialotrina	78
Atrazina	100	Lenacil	85
Bifentrina	80	MGK.264	97
Bioaletrina	57	Miclobutanil	63
Bupirimate	93	Paclobutrazol	68
Ciflutrina	85	Penconazol	100
Cipermetrina	97	Permetrina	75
Ciprodinil	82	Phenothrin	90
Clorfenapir	98	Pirimetanil	93
Deltametrina	87	Procimidona	98
Etofemproxi	57	Propargito	55
Fenarimol	83	Piriproxifem	96
Fenvalerato	100	Tau.Fenvalinate	98
Fipronil	100	Tebuconazol	85
Flucitrinato	78	Tefluthrin	97
Fludioxinol	70	Terbutilazina	90
Fluridone	97	Tetramethrin	97
Flusilazole	75	Transfluthrin	100
Flutriafol	65	Triadimefom	100
Hexazinona	98	Triflumizol	32
		Vinclozolina	100

6. Conclusões

O trabalho desenvolvido possibilitou a implementação de metodologia para extração de resíduos de agrotóxicos e análise em GC-MS/MS no LABMAM da PUC-Rio

Foram analisadas 5 culturas de alimentos, em triplicata, durante 4 meses, totalizando 60 amostras analisadas e uma média de 120 injeções. O método apresentou alta sensibilidade de detecção para os analitos estudados. O limite de detecção do método apresentou-se na faixa de 1,34 a 10,22 ng g⁻¹.

O estudo de método multirresíduo de agrotóxicos dos grupos piretróides e atrazinas em amostras de maçã, manga, morango, pepino e tomate utilizando a técnica de quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas tandem (GC-MS/MS) apresentou resultados em níveis aceitáveis na avaliação de desempenho do método em todos os analitos. A validação da metodologia foi baseada em parâmetros recomendados pela ANVISA (2003) e INMETRO (2016). O limite de detecção do método foi validado segundo a EPA (2016).

A metodologia aplicada contribui para ampliação de tecnologia quanto aos princípios ativos estudados, uma vez que são escassos os estudos na literatura envolvendo análises de piretróides e triazinas em alimentos, bem como para a qualidade e segurança alimentar da população. Inovações na área de análises químicas permitiram um desenvolvimento nos estudos para análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos, culminando em pesquisas que podem, cada vez mais, contribuir para avaliar a qualidade dos alimentos ingeridos pelo homem.

Por ser um centro de grande distribuição de alimentos, a Ceasa do Rio de Janeiro é suprida por diferentes fornecedores, sendo assim, a variabilidade das fontes de alimentos coletados é muito grande. Portanto,

a continuidade desta sistemática de avaliação torna-se necessária. Um estudo mais representativo sobre a qualidade de alimentos para o Rio de Janeiro necessitaria de um elevado número de amostras com maior frequência de amostragem.

Os níveis de resíduos de agrotóxicos para os analitos estudados nas amostras coletadas estão abaixo dos LMR estabelecidos, com exceção de piriproxifem em maçã, que foi o único agrotóxico detectado com concentração de $0,011 \text{ mg kg}^{-1}$, levemente superior ao permitido pela ANVISA ($0,01 \text{ mg kg}^{-1}$), não significando um risco para a saúde do consumidor. Entretanto, foi detectado um alto número de resíduos de agrotóxicos não autorizados pela legislação brasileira, o que pode ser tornar um problema à saúde da população.

Maçã e morango foram as amostras que mais apresentaram resíduos de agrotóxicos nesse estudo, tornando fundamental a necessidade de estudos mais frequentes nessas amostras, principalmente por apresentarem muitos ingredientes ativos que não são autorizados pela ANVISA. Poucos trabalhos de análise desses compostos em alimentos são relatados na literatura, mostrando a importante contribuição acadêmica desse trabalho e a necessidade de aprofundamento nas pesquisas.

Antraquinona, agrotóxico não autorizado para todas as amostras em estudo, foi o mais encontrado nas amostras e foi reportado em 77% as amostras, exceto na manga, seguido pelo triflumizol que foi encontrada em amostras de maçã e pepino, com valores abaixo do LMR permitido pela ANVISA, e em morango e tomate, onde não são autorizados pela ANVISA.

Pode-se concluir que o maior problema relacionado aos níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos não está somente na forma de aplicação do produto na cultura e dos limites permitidos, mas sim, no uso indiscriminado de agrotóxicos não autorizados para as culturas. Para esses compostos, não existe um valor de LMR definido pela ANVISA, o que pode se tornar um problema toxicológico para a população.

7.

Referência bibliográficas

AGRA, N. G. e SANTOS, R. F. S. Agricultura brasileira: situação atual e perspectivas de desenvolvimento. **Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**, 2001.

AGRIANUAL 2009: **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2009.

AGUILAR, J. A. P.; ANDREU, V.; CAMPO, J.; PICÓ, Y. MASIÁ, A. Pesticide Occurrence in the Waters of Júcar River, Spain From Different Farming Landscapes. **Science of The Total Environment**, v. 607-608, p.752-760, 2017.

ALDANA-MADRID, M .L.; VALENZUELA-QUINTANAR, A.I.; SILVEIRA-GRAMONT, M.I.; RODRÍGUEZ-OLIBARRÍA, G. Residual Pyrethroids in Fresh Horticultural Products in Sonora, Mexico. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.87, p.436, 2011.

AMARAL, E. H.; **Resíduos de agrotóxicos organofosforados: validação de método de cromatografia a gás e quantificação em produtos agrícolas**. Dissertação de mestrado. UFMG, 2007.

ANASTASSIADES, M.; PAYA, P.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASfDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. Analysis of pesticide residues using Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. n.389, v.6, p. 1697-1714, 2007.

ANASTASSIEADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC Int.**, v.86, n.2, p.412-31, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Consulta Pública nº 77** publicada no Diário Oficial da União em 24 de agosto de 2007.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS (PARA). **Relatório das Análises de Amostras Monitoradas no Período de 2013 a 2015**, 2015.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS (PARA). **Relatório Complementar Relativo à Segunda Etapa das Análises de Amostras Monitoradas Coletadas em 2012**, 2014.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899**, de 29/05/2003.

ANWAR, T.; AHMAD, I.; TAHIR, S. Determination of pesticide residues in fruites of Nawabshah District, Sindh, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany Journal**, v. 43, n.2; p.1133-1139, 2011.

AOAC Official Method 2007.01. **Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry**, 2007.

ARAÚJO, A. J. de; PALADINO, L. T. do P.; ROSÁRIO, M. L. S. do; JESUS, M. C. N.de; QUEIROZ, M. S. de; ROLDAN, R.; BEZERRA, S. R. D.; SILVA, W. P. da. (Org.). **Meio ambiente, saúde e trabalho: o movimento sindical pode ajudar a melhorar o ambiente**. Rio de Janeiro: CUT-RJ, Comissão de Meio Ambiente, 2000. Disponível em: <<http://www.sindipetro.org.br/extra/cartilha-cut/11agrotoxicos.htm>> Acesso em: 05 de julho de 2016.

ARAÚJO, E. C. de. **Frota Brasileira de Aviões Agrícolas**, 2017.

BASTOS, L. H. P. ; GOUVÊA, A. V. ; ORTIZ, N. D. ; CARDOSO, M. H. W. M.; JACOB, S. do C. ; NÓBREGA, A. W. da . MONITORING OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDE RESIDUES IN FLUID AND POWDERED MILK BY GAS CHROMATOGRAPHY WITH FLAME PHOTOMETRIC DETECTOR. **Química Nova**, v. 38, p. 178-184, 2014.

BASTOS, L. H. P.; GOUVÊA, A. V.; MÁLAGA, F.; CARDOSO, M. H. W. M.; JACOB, S. do C.; NÓBREGA, A. W. da. Implementação de método analítico para determinação de resíduos de organofosforados em leite por cromatografia a gás com detector fotométrico de chama. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1657-1663, 2012.

BIZIUK, M.; FENIK, J.; KOSIKOWSKA, M.; TANKIEWICZ, M. **Pesticides**. Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Gdansk University of Technology, Gdansk, Poland. 2013.

BIZIUK, M.; PRZYJAZNY, A.; CZERWINSKI, J.; WIERGOWSKI, M.. Occurrence and determination of pesticides in natural and treated Waters. **Journal of ChromatographyA**, v. 754, p. 103-123, 1996.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a

experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Coluna 02, p. 001.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989.** Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, p.1, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância Ambiental em Saúde. **Avaliação de risco à saúde humana por resíduos de pesticidas organoclorados em Cidade dos Meninos, Duque de Caxias, RJ, 2002.** Brasília – DF, 2004.

CALDAS, E.D.; DE SOUZA, M.V; JARDIM, A.N. Dietary risk assessment of organophosphorus and dithiocarbamate pesticides in a total diet study at a Brazilian university restaurant. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.28, n.1, p.71-79, 2011.

CAMPOS, E.; FREIRE, C.; NOVAES, C de O.; KOIFMAN, R. J.; KOIFMAN, S. Exposição a pesticidas organoclorados e desenvolvimento cognitivo em crianças e adolescentes residentes em uma área contaminada no Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v.15, n.1, p.105-120, 2015.

CARDOSO, M. H. W. M.; CARDOZO, R. T. de M.; MELLO, J.L. de; ABRANTES, S.; M., K. M. P. . Extraction and clean-up method for the determination of twenty organochlorine pesticide residues in tomatoes by GLC-ECD. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, n.11, p. 619-622, 1999.

CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; NÓBREGA, A. W. da.; ABRANTES, S. de M. P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: experiência laboratorial. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, supl.1, p. 63-72, 2010.

CARMO, S. V.; OLIVEIRA, A. C. de; BASTOS, L. H. P.; CARDOSO, M. H. W. M. Otimização e validação de método analítico para determinação de resíduos de agrotóxicos em pimentão. **Revista Analytica**, 2016.

CASSAL, V.B.; AZEVEDO, L.F.; FERREIRA, R.P.; DA SILVA, D.G.; SIMÃO, R.S. **Agrotóxicos? Uma revisão das suas consequências para a saúde pública**. REGET/UFSM, v.18 n. 1, p.437-445, Abril 2014.

CASSIANO, M. N.; BARREIRO, C. J.; MARTINS, R. L.; OLIVEIRA, V. R.; CASS, B. Q. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n.4, p. 1021-1030, 2009.

CHIARADIA, M.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v.31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS – INTERNATIONAL FOOD STANDARDS..Harmonized IUPAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS INTERNATIONAL FOOD STANDARDS. **General Standard for Food Additives**. 2016.

COGO, J. P. **Determinação de resíduos pesticidas em planta de arroz empregando QuEChERS modificado e GC-ECD**. Dissertação de Mestrado, Ciências Naturais e Exatas, Santa Maria, RS, 2008.

CORRALO, V.; DA MORAIS, M.; BENEDETT, A.; FERRAZ, L. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 12 (22), p.101, 2016.

CRIBB, A. Y. **Embrapa**, 2009. Disponível em <<http://www.agrosoft.org.br/br/artigo-de-pesquisador-da-embrapa-sustenta-proposta-da-firjan-dirigida-a-candidatos-ao-governo-do-rio/tecnologia>> Acesso em 05 de julho de 2016.

CUADROS=RODRÍGUEZ, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E. M; BOSQUESENDRA, J. M.; **Trends in Analytical Chemistry**, v.20, p. 620, 2001.

Cultivo da Mangueira. **Embrapa**, 2010.

DA SILVA, S. M. **Intoxicações por Inibidores da Acetilcolinesterase: Etiologia, Diagnóstico e Tratamento**. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2015.

DORES, E.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo

humano em Primavera do Leste, Mato Grosso- Análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 27-36, 2001.

DUARTE, J. da S.; DORES, E. F. G. de C.; VILLA, R. D. Microextração Líquido-líquido dispersive assistida por vortez e ultrassom aplicada à determinação de agrotóxicos triazinas, triazinonas e o triazol flutriafol em água. **Química Nova**, v.39, n.8, 2016.

EM 15662 – EUROPEAN STANDARDS. **Foods of Plant Origin: Determination of Pesticide Residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean up bu dispersive SPE – QuEChERS- methos**, 2008.

EPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. – **Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit, revision 2**, 2016.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**: Second edition, 57 p., 2014.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of Food and Agriculture**, 1994.

FEO, M. L.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. **Rapid Communications in Mass Spectrometry.**, v. 25, p. 869–876, 2011.

FEO, M. L.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D., A rapid and sensitive analytical method for the determination of 14 pyrethroids in water samples. **Trends in Analytical Chemistry Journal**, V. 1217, N. 15, P. 2248-2253, 2010.

FILHO, J. de S.R; MARIN, J. O. B; Fernandes, P. M. Os agrotóxicos na produção de tomate de mesa na região de Goianápolis, Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical.**, Goiânia, v. 39, n. 4, p. 307-316, 2009.

FIOCRUZ. Apostila do curso **Introdução a Análise de Resíduos de Agrotóxicos**, 2016.

Frenich, A. G.; Martín Fernández, M. Del M.; Moreno, L. D.; Martínez Vidal, J. L.; López-Gutiérrez, N. **Journal of AOAC International**, v. 95 (5), p. 1319-1331, 2012.

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas; **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos** (apostila), 1999.

GODOY, A. R.; CASTRO, M. M.; CARDOSO, A. I. I. Desempenho produtivo, partenocarpia e expressão sexual de linhagens de pepino caipira

em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2; p. 150-154, 2009.

GOMES, K.; KOKAY, E. 2015. Disponível em: <http://www.cartacapital.com.br/sustentabilidade/brasil-ainda-usa-agrotoxicos-ja-proibidos-em-outros-paises-9823.html> Acesso em: 05 de julho de 2016.

GOMES, M. A. F.; BARIZON, R. R. M. **Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: cenário 1992/2011**. Documento 98. ISSN 1517-5111, 2014.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, p. 392, 2005.

HAJSLOVÁ, J.; ZROSTLIKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n.1-2, p. 181-197, 2003.

HERRERO-HERNÁNDEZ, E.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M. S.; POSE-JUAN, E.; ZÁNCHEZ-GONZÁLEZ, S.; ANDRADES, M. S.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J. Seasonal Distribution of Herbicide and Insecticide Residues in the Water Resources of the Vineyard Region of La Rioja (Spain). **Science of The Total Environment**, v. 609, p. 161-171, 2017.

HUBER, L. Validation of Analytical Methods. **LC-GC Magazine**, 1998.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Brasil, 2015.

ICH - International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, Revisão 005, 2016.

JARAMILLO-COLORADO, B.E.; ECHEVERRI, G.; DUARTE-RESTREPO, E.; NOGUEIRA-OVIEDO, K. M. Pesticide residues in marine sediments. A case study: Cartagena Bay (Colombia). **Toxicology Letters**, 2016.

JARDIM, I. C. S. F.; A. J de A. Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n.4, 2009.

JEONG, I-S.; KWAK, B-M.; AHN, J-H.; JEONG, S-H. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 473-481, 2012.

KARAM, D.; RIOS, J. N. G.; FERNANDES, R. C. Agrotóxicos. **Embrapa**, 2014.

Klanovicz, J. Toxicidade e produção de maçãs no Sul do Brasil. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro**, v. 17, n.1, p. 67-85, 2010.

KUSSUMI, T.A. **Desenvolvimento de Método Multirresíduo para Determinação de Pesticidas Benzimidazóis, Carbamatos e Triazinas em Milho por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem e sua Certificação**. Dissertação de mestrado, USP, 2004.

LACASSIE, E.; DREYFUSS, M.F.; DAGUET, J.L.; VIGNAUD, M.; MARQUET, P.; LACÂTRE, G. Multiresidue determination of pesticides in apples and pears by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 805, p. 319-326, 1998.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis?” **Scientia Chromatographica**, v.1, n.2, p. 35-61, 2009.

LARA, W.H. & BATISTA, G.C., Pesticidas. **Química Nova**, v.15, p.161-166, 1992.

LATUSZYNSKA, J.; LUTY, S.; RASZEWSKI, G.; PRZEBIROWSKA, D.; TOKARSKA-RODAK, M. Neurotoxic effect of dermally applied chlorpyrifos and cypermethrin. Reversibility of changes. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.10, p.197-201, 2003.

LEANDRO, C ; HANCOCK, P.; FUSSELL, R J.; KEELY, B.J. Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in food by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching. **Journal of Chromatography A**, v. 1144, p. 161-169, 2007.

LEHOTAY, S.T.; AE SON, K.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOO, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography. A**, v.1217, p. 2548–2560, 2010.

LI, P.; YANG, X.; MIAO, H.; ZHAO, Y.; LIU, W.; WU, Y. Simultaneous determination of 19 triazine pesticides and degradation products in processed cereal samples from Chinese total diet study by isotope dilution–high performance liquid chromatography–linear ion trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 781, p. 63-71, 2013.

LINGLING, L.; YANG, DA.; SONG, Y.; SHI, Y.; YAN, J.; The potential acute and chronic toxicity of cyfluthrin on the soil model organism, *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.1, p.456-463, 2017

LIU, T.; REN, Y.; XIW, J. SONG, G.; HU, Y. Determination of Organophosphorus Pesticides in Edible Oils by Dispersive Microextraction

Based on Acetonitrile/Water-coated Fe₃O₄. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.90, n.12, p.1937-1943, 2013.

LUCCHESI, G. **Agrotóxicos – Construção da Legislação; Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados**. 2005.

MARTINS, G. F. **Rrelatório: Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos no Estado do Rio de Janeiro**. Ministério da Saúde, 2015.

MATOS, P. F. e PESSÔA, V. L. S. A modernização da agricultura no Brasil e os novos usos dos territórios. **Geo UERJ**, Rio de Janeiro, UERJ, v.2, n.22, p. 290-322, 2011.

MELO, R. F. de; BRITO, L. T. de L.; GIONGO, V.; ANGELOTTI, F.; MIGUEL, A. A. Impactos ambientais causados pela agricultura do Semiárido brasileiro. **Petrolina: Embrapa Semiárido**, cap.4, p. 101-136, 2010.

MENEZES, E. A.; BARBOSA, F. R. Pragas da Mangueira: monitoramento, nível de ação e controle. **Embrapa Semi-Árido**. Petrolina – PE, 2005.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry: Sixth Edition. Pearson Education Limited 2000, 2010.

MOURA-ANDRADE, G. C. R.; OETTERER, M.; TORNISIELO, V. L. O tomate como alimento – cadeia produtiva e resíduos de agrotóxicos. **Pesticidas: revista. ecotoxicológica e meio ambiente**, v. 20, 2010.

MURGA JUARÉZ, M. N.; GUTIÉRREZ TOLENTINO, R.; VEJA LEÓN, S.; PÉREZ GONZÁLEZ, J. J.; SCHETTINO BERMÚDEZ, B.; RUÍZ ROJAS, J. L.; YAMAZAKI MAZA, A. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v.8(2), p.157-166, 2017.

NASUTI, C.; CANTALAMESSA, F.; FALCIONI, G.; GABBIANELLI, R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, v.191, n.2-3, p.233-244, 2003.

NETO, J. V.; GONÇALVES, P. AS. Resíduos de agrotóxicos em pepinos para conserva in natura e industrializados. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 1; p. 126-129, 2016.

NUNES, G.S.; RIBEIRO, M.L. Pesticidas: uso, legislação e controle. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 9, p. 31-44, 1999.

ORSO, D.; MARTINS, M. L.; DONATO, F. F.; RIZZETTI, T. M.; KEMMERICH, M.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Multiresidue determination of pesticide residues in honey by modified QuEChERS method and gas chromatography with electron capture detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.25, n. 8, 2014.

ORTELLI, D.; EDDER, P.; CORVI, C. Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p.33-45, 2004.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. **Química Nova**, v. XY, p.1-9, 2015.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n.1, p. 52-76, 2012.

PANG, G.; CAO, Y.; ZHANG, J.; FAN, C.; LIU, Y.; LI, X.; JIA, G.; LI, Z.; SHI, Y.; WU, Y.; GUO, T.; **Journal of Chromatography A**, 1125, 1, 2006

PASCHOAL, A. D. **Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções**. Rio de Janeiro: FGV, 1979.

PASCHOAL, A.D. **Agrotóxicos são do mal, sim**. 2015. Disponível em: <http://contraosagrototoxicos.org/agrototoxicos-sao-do-mal-sim/>. Acesso em 21/12/2016.

PASCUAL AGUILAR, J.A.; ANDREU, V.; CAMPO, J.; PICÓ, Y.; MASIÁ, A. Pesticide Occurrence in the Waters of Júcar River, Spain From Different Farming Landscapes. **Science of the Total Environment** 607-608, 752-760, 2017.

PATEL, K.; FUSSELL, R.J.; HETMANSKI, M.; GOODALL, D.M.; KEELY, B.J. Evaluation of gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils. **Journal of Chromatography A**, v.1068, n.2, p.289–296, 2005.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um polo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 23, supl. 4, p. S612-S621, 2007.

PETRARCA, M. H.; CCANCCAPA-CARTAGENA, A.; MASIÁ, A.; GODOY, M. H.; PICÓ, Y. Comparison of green sample preparation techniques in the analysis of pyrethrins and pyrethroids in baby food by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1497, p. 28–37, 2017.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v.32, n.4, 2009.

PORTO, M. F. e SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, São Paulo, v. 37, n.125, p.17-50, 2012.

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**, vol. 32, no. 6, p. 1620-1634. 2009

RESENDE, J. T. V. de. Análise Sensorial e caracterização química de frutos de morango. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n.3, p. 371-374, 2008.

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.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D.P.; ROCHA, M.M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Caderno Saúde Pública**, v. 30, n.7, 2014.

ROSA, R. da SILVA; MESSIAS, R. A.; AMBROZINI, B. **Importância da compreensão dos ciclos biogeoquímicos para o desenvolvimento sustentável**. Universidade de São Paulo. 2003.

SALVADOR, M.; FRENICH, A. G.; GONZÁLEZ, F. J.; VIDAL, M. **Chromatographia**, v. 64, p. 667, 2006.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; MARTIN, G.; TADEO, J. L..Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. **Analytical Sciences**, v.21, n.11, p.1291-1296, 2005.

SANTE/11945/2015. **Guidance documento n analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed**.

SANTOS, M. A. T dos.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. Piretróides – uma visão geral. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.18, n.3, p.339-349, 2007.

SCHENCK, F.J.; CALLERY, P.; GANNETT, P. M.; DAFT, J. R.; LEHOTAY, S. J. Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods. **Journal of AOAC International**, v. 85, n.5, p. 1177-1180, 2002.

SCHREIBER, A. Advantages of Using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to Quantify and Identify the Presence of Pesticides in Water and Soil Samples. **Food & Environmental**, 2010.

SHI, Z.; WU , Y.; GUO, T. Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gás chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1125, p. 1-30, 2006.

SHIMELIS, O.; Yang, Y.; STERNERSON, K.; Kaneko, T.; Ye, M.; Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. **Journal of Chromatography**, v.1165, p.18-25, 2007.

SOARES, W.L.; PORTO, M. F. de S.; Pesticide use and economic impacts on health. **Revista Saúde Pública**, v. 46, n. 2, 2012.

SODERLUND, D. M. CLARCK, J. M.; SHEETS, L.; MULLIN, L. D., PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v.171, n.1, p.3-59, 2002.

SPADOTTO, C.; GOMES, M.; LUCHINI, L.; Andrea, M.; Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente Documentos**, v. 42, p. 29, 2004.

STRELAU, J.R. de M.; **Metodologia para Determinação de Agrotóxicos por GC/MS em pluca e tecido de algodão**.Dissertação de mestrado, UFSC, 2013.

TANKIEWICZ, M.; FENIK, J.; BIZIUK, M. Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 9, 2010.

TAVELLA, L.B.; SILVA, I.N.; FONTES, L. de O.; DIAS, J. R. M; SILVA, M. I de L. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.7, n.2, p.06-12, 2011.

TEERLINK, J.; HERNANDEZ, J.; BUDD, R. Fipronil Washoff to Municipal Wastewater From Dogs Treated With Spot-On Products. **Science of The Total Environment**, v. 599-600, p. 960-966, 2017.

TELÓ, G. M.; MARCHESAN, E.; ZANELLA, R.; PEIXOTO, S. C.; PRESTES, O. D.; OLIVEIRA, M. L. de. Fungicide and insecticide residues in rice grains. **Acta Scientiarum**, v. 39, n.1, 2017

TERRA, F.H. B.; PELAEZ, V. A história da indústria de agrotóxicos no Brasil: das primeiras fábricas na década de 1940 aos anos 2000. **Apresentação Oral-Estrutura, Evolução e Dinâmica dos Sistemas Agroalimentares e Cadeias Agroindustriais**, 2009.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R; WOOD, R. Harmonizes Guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**., v. 74, n.5, p. 835-855, 2002.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E. Análise do risco de contaminação ambiental por agrotóxicos nos sistemas hídricos do município de Paty do Alferes, RJ. Documentos 98. **Embrapa Meio Ambiente**, 2005

VEKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A.**, v. 921, p. 227-236, 2001.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. de. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n.3, 2007.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Atrazine Health and Safety Guide**, 1990.

WHO – World Health Organization. **Water and Health in Europe**, 2002.

YOUNES, M.; GALAL-GORCHEV, H. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. S87-S90, 2000.

Zirena Vilca, F.; Zamalloa Cuba, W. A.; Nazato, C.; Luiz Tornisielo, V. **Revista Investigaciones Altoandinas**, v. 19 (1), p. 5-10, 2017.