



UNICAMP



1150097903

T/UNICAMP
M672v
BCCL

LÍGIA MARIA MIRANDA E SILVA

**“VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE
MULTIRESÍDUOS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS POR
GC-MS/MS E LC-MS/MS”**

**Campinas
2012**

I

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTER
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO



LÍCIA MARIA MIRANDA SILVA

VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE
MULTIRESÍDUOS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS POR
GC-MS/MS E LC-MS/MS

Campinas
2013

UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE
QUÍMICA ORGÂNICA



Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA

LÍGIA MARIA MIRANDA E SILVA

**“VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE MULTIRESÍDUOS
DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS POR GC-MS/MS E LC-MS/MS”**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA LÍGIA MARIA MIRANDA E SILVA
E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO ALEXANDRE PRADO**

Assinatura do Orientador

Campinas
2012

Unidade BCLL
T/UNICAMP /M672v
Cutter _____
V. _____ Ed. _____
Tombo BC 97903
Proc. 16P-10012
C _____ D _____
Preço 11,00
Data 12/12/12
Cód. tit. 880932

RR 2150

AUT.



UNESP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M672v Miranda e Silva, Lígia Maria, 1982-
Validação de método de análise de multiresíduos de defensivos agrícolas por GC-MS/MS E LC-MS/MS. / Lígia Maria Miranda e Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcelo Alexandre Prado.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Pesticidas. 2. Validação. 3. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS/MS). 4. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). I. Prado, Marcelo Alexandre. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Validation method of multiresidual analysis of agricultural pesticides by GC-MS/MS and LC-MS/MS

Palavras-chave em inglês:

Pesticides

Validation

Gas Chromatography-tandem mass spectrometer

Liquid chromatography-tandem mass spectrometer

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marcelo Alexandre Prado [Orientador]

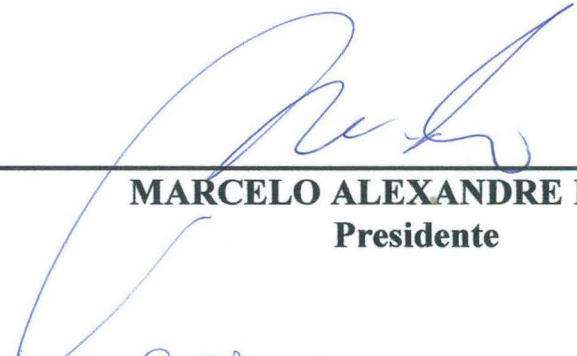
Raquel Grando de Oliveira

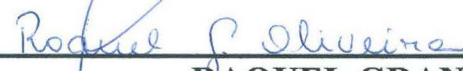
Claudia Hoffmann Kowalski Schroder

Data da defesa: 28/09/2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA


MARCELO ALEXANDRE PRADO
Presidente


RAQUEL GRANDO DE OLIVEIRA
Titular


CLÁUDIA HOFFMANN KOWALSKI SCHRODER
Titular

HELENA TEIXEIRA GODOY
Suplente

ADRIANA DILLEMBURG MEINHART
Suplente

CAMPINAS
2012

BANCA EXAMINADORA

MARCELO ALFONSO DE TRAJANO

Presidente

RAQUEL CRANDIO DE OLIVEIRA

Titular

CLAUDIA HOFMANN KOWALSKI SCHRODER

Titular

HELENA TEIXEIRA CODOY

Soprintendente

ADRIANA DILLENBURG MEINHART

Soprintendente

CAMPINAS

2012

DEDICATÓRIA

A todos os indivíduos responsáveis pela elaboração e concretização deste projeto, á minha família e ao meu grande amigo e amor Gustavo por toda a paciência, apoio e carinho. Que nossa união seja eterna e feliz.

DEDICATÓRIA

A todos os indivíduos responsáveis pela elaboração e concretização deste projeto, à minha família e ao meu grande amigo e mentor (falecido) por toda a paciência, apoio e carinho. Que nossa união seja eterna e feliz.

AGRADECIMENTOS

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências dos Alimentos, Laboratório de Análises de Alimentos (LAA) chefiado pelo Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado e Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy.

Universidade do Estado de São Paulo-ESALQ em Piracicaba, Departamento de Entomologia, Laboratório de Resíduos de Pesticidas-LARP, chefiado pelo Prof. Dr. Gilberto Casadei e Dr. Luiz Roberto Pimentel Trevizan.

AGRADECIMENTOS

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciência dos Alimentos, Laboratório de Análises de Alimentos (LAA),
chefe de laboratório Prof. Dr. Marcelo Alexandre Pardo e Prof. Dra. Helena Teixeira Cordeiro,
Universidade do Estado de São Paulo-UNESP, Departamento de
Fotomicrografia, Laboratório de Resíduos de Alimentos (LRA), chefe de laboratório Prof. Dr. Gilson
Lopes e Dr. Luiz Roberto Bussanel Teixeira.

RESUMO GERAL

O crescente aumento populacional em escala mundial, tornou necessário um grande esforço por parte da agricultura para aumentar, a cada ano, a produção de alimentos para atender as necessidades do mercado externo e interno do Brasil. Recursos técnicos e científicos passaram então, a serem aplicados em busca da melhoria na produção dos cultivos, principalmente mediante o uso de fertilizantes e praguicidas. Com isso, a sociedade se deparou com problemas de ordem de equilíbrio ambiental e saúde pública, pois devido à contínua diversificação dos fitoparasitas, surgem, a todo momento, reduções do período de tempo entre aplicações consecutivas, e mais importante talvez, usos de doses mais altas e emprego simultâneo de diferentes pesticidas, por parte dos agricultores, objetivando complementar ações específicas ou alcançar efeitos sinérgicos para maiores rendimentos na produção. Tal situação traz como consequência óbvia e direta, o aumento, inaceitável, dos riscos de contaminação do meio ambiente com resíduos químicos de defensivos da área agropecuarista prejudiciais à saúde, o que leva a inúmeros problemas relativos à segurança alimentar dos produtos consumidos, e à uma preocupação de âmbito nacional evidenciada pela criação do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA) da ANVISA. O aumento na necessidade de detecção e quantificação destes compostos, acarretou o desenvolvimento de pesquisas no setor, a fim de atingir uma melhoria na eficiência, qualidade e rapidez de resposta nas análises. A possibilidade do estudo de não apenas um de cada vez, mas de até 300 compostos sendo extraídos, detectados e quantificados simultaneamente se tornou a saída mais viável, tanto qualitativa quanto economicamente, facilitando o monitoramento contínuo do fornecimento de produtos do setor alimentício pelos chamados métodos multiresíduos. O presente trabalho teve como princípio a validação de um método multiresíduo para análise de 14 analitos usando uma técnica de alto poder de concentração e limpeza do extrato como o GPC (Gel Permeation Chromatography) e detecção e quantificação por GC-MS/MS e LC-MS/MS. Os pesticidas investigados englobam classes como: acaricidas, inseticidas, fungicidas, nematicidas e formicidas de aplicação foliar, em sementes ou em solo, sendo que o acefato, metamidofós, acetamiprido e o thiamethoxan foram extraídos de amostras de batata e feijão e analisados por LC-MS/MS e a azoxistrobina, bifentrina, carbofuran, chlorotalonil, clorpirifós, clorfenapir, etofenprox, famoxadone, metalaxil, procimidone e o tebuconazole em amostras de batata e tomate e analisados por GC-MS/MS. Os limites de detecção (LD) encontrados variaram de 0,06 a 2,89µg/L, e os coeficientes de variação (CV), de 0,036 a 2,036%. As recuperações foram determinadas em

RESUMO GERAL

O crescente aumento populacional em escala mundial, bem como a necessidade de produzir alimentos para a população, tem levado a agricultura para aumentar a produtividade e a eficiência de produção. Para atender às necessidades do mercado externo e interno do Brasil, faz-se necessário desenvolver pesquisas em áreas relacionadas com a melhoria da produção dos alimentos. O uso de fertilizantes e pesticidas é fundamentalmente necessário ao uso da terra para a produção de alimentos. Com isso, a produtividade dos alimentos tem aumentado. No entanto, o uso de fertilizantes e pesticidas também pode causar danos ao meio ambiente e à saúde pública. Portanto, é necessário desenvolver pesquisas para avaliar os efeitos desses produtos no meio ambiente e na saúde humana. Além disso, é necessário desenvolver pesquisas para avaliar a eficácia dos pesticidas e a segurança dos alimentos produzidos com o uso desses produtos. O objetivo deste trabalho é apresentar um resumo geral das pesquisas realizadas em áreas relacionadas com a melhoria da produção dos alimentos, com ênfase no uso de fertilizantes e pesticidas. O trabalho está organizado em três partes: a primeira parte trata da importância da produção de alimentos para a população; a segunda parte trata do uso de fertilizantes e pesticidas na agricultura; e a terceira parte trata dos efeitos desses produtos no meio ambiente e na saúde humana. O trabalho conclui que o uso de fertilizantes e pesticidas é necessário para aumentar a produtividade dos alimentos, mas que é necessário desenvolver pesquisas para avaliar os efeitos desses produtos no meio ambiente e na saúde humana, e para desenvolver métodos mais seguros e eficazes para o uso desses produtos.

cada tipo de amostras, e os valores encontrados estavam entre 93,34% e 109,67%. Nenhuma das matrizes utilizadas apresentaram resultados insatisfatórios e o método utilizado mostrou-se robusto e de fácil aplicação para todos os analitos testados.

ABSTRACT

The growing population worldwide, has required a great effort on the part of agriculture to increase each year, the production of food to meet the needs of external and internal market of Brazil. Technical and scientific resources spent then, to be applied in pursuit of improved crop production, mainly through the use of fertilizers and pesticides. With this, the company encountered problems in the balance of environmental and public health, since due to the continuous diversification of plant parasites, arise at any moment, reductions in the time period between consecutive applications, and perhaps most important, uses more doses high and simultaneous use of different pesticides by farmers, aiming to complete specific actions or to achieve synergistic effects in producing higher yields. This situation brings obvious and direct consequence, the increase unacceptable risk of environmental contamination with chemical residues from pesticides in farms are harmful to health, which leads to numerous problems relating to food safety of the products consumed, and to a concern nationwide evidenced by the creation of the Program Analysis of Pesticide Residues in Food (TO) of ANVISA. The increase in the necessity for detection and quantification of these compounds, led the development of research in the sector in order to achieve an improvement in efficiency, quality and responsiveness in the analyzes. The possibility of studying not just one at a time, but up to 300 compounds being extracted, detected and quantified simultaneously output became more viable, both qualitatively and economically, facilitating continuous monitoring of the supply of products by the food industry called methods multiresidue. The principle presentre work was the validation of a multiresidue method for analysis of 14 analytes using a technique of high power concentration and cleanup of the extract as GPC (Gel Permeation Chromatography) and detection and quantification by GC-MS/MS and LC- MS / MS. The pesticides investigated include classes such as acaricides, insecticides, fungicides, insecticides and nematocides foliar, seed or soil, and acephate, methamidophos, and Acetamiprid thiamethoxan were extracted from samples of potatoes and beans and analyzed by LC-MS / MS and azoxystrobin, bifenthrin, carbofuran, chlorothalonil, chlorpyrifos, chlorfenapyr, etofenprox, famoxadone, metalaxyl, procymidone

este tipo de métodos, e os valores encontrados estavam entre 0,144 e 119,57%. Portanto, os métodos utilizados apresentaram resultados insatisfatórios e o método utilizado mostrou-se robusto e de fácil aplicação para todos os análises testadas.

ABSTRACT

The growing population worldwide has required a great effort on the part of agriculture to increase each year the production of food to meet the needs of external and internal market of Brazil. Technical and scientific progress has been applied in the pursuit of improved crop production, mainly through the use of fertilizers and pesticides. With this, the company encountered problems in the balance of environment and public health since due to the continuous distribution of plant parasites, since at any moment, reductions in the time period between consecutive applications and perhaps more frequent use more doses high and simultaneous use of different pesticides by farmers, aiming to complete specific actions or to achieve synergistic effects in increasing higher yields. This situation brings obvious and direct consequences: the increase unacceptable risk of environmental contamination with chemical residues from pesticides in food, are harmful to health which leads to numerous problems relating to food safety of the product consumed, and to a country nationwide evidenced by the creation of the Program for Use of Pesticides Residues in Food (TOR of ANVISA). The increase in the necessity for detection and quantification of these compounds led the development of research in the area in order to achieve an improvement in efficiency, quality and responsiveness in the analysis. The possibility of analyzing not just one or a few, but up to 700 compounds being extracted, detected and quantified simultaneously output became more viable both qualitatively and economically, facilitating continuous monitoring of the supply of products by the food industry called methods multiresidue. The principle present work was the validation of a multiresidue method for analysis of 14 analytes using a technique of high power concentration and cleanup of the extract as GPC (Gel Permeation Chromatography) and detection and quantification by GC-MS/MS and LC-MS/MS. The pesticides investigated include classes such as acaricides, insecticides, fungicides, insecticides and acaricides foliar, seed or soil and acaphate, methamidophos and Acetamiprid thiamethoxan were extracted from samples of potatoes and beans and analyzed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. Pesticides: carbendazim, chlorothalonil, chlorpyrifos, chlorfenvinphos, etofenprox, fenoxadone, metalaxyl, propiconazole.

and tebuconazole in samples of potato and tomato and analyzed by GC-MS/MS. The limits of detection (LOD) ranged from 0.06 to 2.89 mg / L, and the coefficients of variation (CV), 0.036 to 2.036%. The recoveries were determined for each type of samples, and the values were between 93.34% and 109.67%. None of the arrays used had unsatisfactory results and method proved to be robust and easy to apply for all analytes tested.

• CAPÍTULO 1 - Introdução	1
• 1.1. Motivação	1
• 1.2. Objetivos	2
• 1.3. Estrutura do trabalho	3
• 1.4. Metodologia	4
• 1.5. Resultados e discussão	5
• 1.6. Conclusões	6
• 1.7. Referências	7
• 1.8. Anexos	8
• 1.9. Bibliografia	9
• 1.10. Glossário	10
• 1.11. Siglas	11
• 1.12. Referências	12
• 1.13. Anexos	13
• 1.14. Bibliografia	14
• 1.15. Glossário	15
• 1.16. Siglas	16
• 1.17. Referências	17
• 1.18. Anexos	18
• 1.19. Bibliografia	19
• 1.20. Glossário	20
• 1.21. Siglas	21
• 1.22. Referências	22
• 1.23. Anexos	23
• 1.24. Bibliografia	24
• 1.25. Glossário	25
• 1.26. Siglas	26
• 1.27. Referências	27
• 1.28. Anexos	28
• 1.29. Bibliografia	29
• 1.30. Glossário	30
• 1.31. Siglas	31
• 1.32. Referências	32
• 1.33. Anexos	33
• 1.34. Bibliografia	34
• 1.35. Glossário	35
• 1.36. Siglas	36
• 1.37. Referências	37
• 1.38. Anexos	38
• 1.39. Bibliografia	39
• 1.40. Glossário	40
• 1.41. Siglas	41
• 1.42. Referências	42
• 1.43. Anexos	43
• 1.44. Bibliografia	44
• 1.45. Glossário	45
• 1.46. Siglas	46
• 1.47. Referências	47
• 1.48. Anexos	48
• 1.49. Bibliografia	49
• 1.50. Glossário	50
• 1.51. Siglas	51
• 1.52. Referências	52
• 1.53. Anexos	53
• 1.54. Bibliografia	54
• 1.55. Glossário	55
• 1.56. Siglas	56
• 1.57. Referências	57
• 1.58. Anexos	58
• 1.59. Bibliografia	59
• 1.60. Glossário	60
• 1.61. Siglas	61
• 1.62. Referências	62
• 1.63. Anexos	63
• 1.64. Bibliografia	64
• 1.65. Glossário	65
• 1.66. Siglas	66
• 1.67. Referências	67
• 1.68. Anexos	68
• 1.69. Bibliografia	69
• 1.70. Glossário	70
• 1.71. Siglas	71
• 1.72. Referências	72
• 1.73. Anexos	73
• 1.74. Bibliografia	74
• 1.75. Glossário	75
• 1.76. Siglas	76
• 1.77. Referências	77
• 1.78. Anexos	78
• 1.79. Bibliografia	79
• 1.80. Glossário	80
• 1.81. Siglas	81
• 1.82. Referências	82
• 1.83. Anexos	83
• 1.84. Bibliografia	84
• 1.85. Glossário	85
• 1.86. Siglas	86
• 1.87. Referências	87
• 1.88. Anexos	88
• 1.89. Bibliografia	89
• 1.90. Glossário	90
• 1.91. Siglas	91
• 1.92. Referências	92
• 1.93. Anexos	93
• 1.94. Bibliografia	94
• 1.95. Glossário	95
• 1.96. Siglas	96
• 1.97. Referências	97
• 1.98. Anexos	98
• 1.99. Bibliografia	99
• 1.100. Glossário	100
• 1.101. Siglas	101
• 1.102. Referências	102
• 1.103. Anexos	103
• 1.104. Bibliografia	104
• 1.105. Glossário	105
• 1.106. Siglas	106
• 1.107. Referências	107
• 1.108. Anexos	108
• 1.109. Bibliografia	109
• 1.110. Glossário	110
• 1.111. Siglas	111
• 1.112. Referências	112
• 1.113. Anexos	113
• 1.114. Bibliografia	114
• 1.115. Glossário	115
• 1.116. Siglas	116
• 1.117. Referências	117
• 1.118. Anexos	118
• 1.119. Bibliografia	119
• 1.120. Glossário	120
• 1.121. Siglas	121
• 1.122. Referências	122
• 1.123. Anexos	123
• 1.124. Bibliografia	124
• 1.125. Glossário	125
• 1.126. Siglas	126
• 1.127. Referências	127
• 1.128. Anexos	128
• 1.129. Bibliografia	129
• 1.130. Glossário	130
• 1.131. Siglas	131
• 1.132. Referências	132
• 1.133. Anexos	133
• 1.134. Bibliografia	134
• 1.135. Glossário	135
• 1.136. Siglas	136
• 1.137. Referências	137
• 1.138. Anexos	138
• 1.139. Bibliografia	139
• 1.140. Glossário	140
• 1.141. Siglas	141
• 1.142. Referências	142
• 1.143. Anexos	143
• 1.144. Bibliografia	144
• 1.145. Glossário	145
• 1.146. Siglas	146
• 1.147. Referências	147
• 1.148. Anexos	148
• 1.149. Bibliografia	149
• 1.150. Glossário	150
• 1.151. Siglas	151
• 1.152. Referências	152
• 1.153. Anexos	153
• 1.154. Bibliografia	154
• 1.155. Glossário	155
• 1.156. Siglas	156
• 1.157. Referências	157
• 1.158. Anexos	158
• 1.159. Bibliografia	159
• 1.160. Glossário	160
• 1.161. Siglas	161
• 1.162. Referências	162
• 1.163. Anexos	163
• 1.164. Bibliografia	164
• 1.165. Glossário	165
• 1.166. Siglas	166
• 1.167. Referências	167
• 1.168. Anexos	168
• 1.169. Bibliografia	169
• 1.170. Glossário	170
• 1.171. Siglas	171
• 1.172. Referências	172
• 1.173. Anexos	173
• 1.174. Bibliografia	174
• 1.175. Glossário	175
• 1.176. Siglas	176
• 1.177. Referências	177
• 1.178. Anexos	178
• 1.179. Bibliografia	179
• 1.180. Glossário	180
• 1.181. Siglas	181
• 1.182. Referências	182
• 1.183. Anexos	183
• 1.184. Bibliografia	184
• 1.185. Glossário	185
• 1.186. Siglas	186
• 1.187. Referências	187
• 1.188. Anexos	188
• 1.189. Bibliografia	189
• 1.190. Glossário	190
• 1.191. Siglas	191
• 1.192. Referências	192
• 1.193. Anexos	193
• 1.194. Bibliografia	194
• 1.195. Glossário	195
• 1.196. Siglas	196
• 1.197. Referências	197
• 1.198. Anexos	198
• 1.199. Bibliografia	199
• 1.200. Glossário	200
• 1.201. Siglas	201
• 1.202. Referências	202
• 1.203. Anexos	203
• 1.204. Bibliografia	204
• 1.205. Glossário	205
• 1.206. Siglas	206
• 1.207. Referências	207
• 1.208. Anexos	208
• 1.209. Bibliografia	209
• 1.210. Glossário	210
• 1.211. Siglas	211
• 1.212. Referências	212
• 1.213. Anexos	213
• 1.214. Bibliografia	214
• 1.215. Glossário	215
• 1.216. Siglas	216
• 1.217. Referências	217
• 1.218. Anexos	218
• 1.219. Bibliografia	219
• 1.220. Glossário	220
• 1.221. Siglas	221
• 1.222. Referências	222
• 1.223. Anexos	223
• 1.224. Bibliografia	224
• 1.225. Glossário	225
• 1.226. Siglas	226
• 1.227. Referências	227
• 1.228. Anexos	228
• 1.229. Bibliografia	229
• 1.230. Glossário	230
• 1.231. Siglas	231
• 1.232. Referências	232
• 1.233. Anexos	233
• 1.234. Bibliografia	234
• 1.235. Glossário	235
• 1.236. Siglas	236
• 1.237. Referências	237
• 1.238. Anexos	238
• 1.239. Bibliografia	239
• 1.240. Glossário	240
• 1.241. Siglas	241
• 1.242. Referências	242
• 1.243. Anexos	243
• 1.244. Bibliografia	244
• 1.245. Glossário	245
• 1.246. Siglas	246
• 1.247. Referências	247
• 1.248. Anexos	248
• 1.249. Bibliografia	249
• 1.250. Glossário	250
• 1.251. Siglas	251
• 1.252. Referências	252
• 1.253. Anexos	253
• 1.254. Bibliografia	254
• 1.255. Glossário	255
• 1.256. Siglas	256
• 1.257. Referências	257
• 1.258. Anexos	258
• 1.259. Bibliografia	259
• 1.260. Glossário	260
• 1.261. Siglas	261
• 1.262. Referências	262
• 1.263. Anexos	263
• 1.264. Bibliografia	264
• 1.265. Glossário	265
• 1.266. Siglas	266
• 1.267. Referências	267
• 1.268. Anexos	268
• 1.269. Bibliografia	269
• 1.270. Glossário	270
• 1.271. Siglas	271
• 1.272. Referências	272
• 1.273. Anexos	273
• 1.274. Bibliografia	274
• 1.275. Glossário	275
• 1.276. Siglas	276
• 1.277. Referências	277
• 1.278. Anexos	278
• 1.279. Bibliografia	279
• 1.280. Glossário	280
• 1.281. Siglas	281
• 1.282. Referências	282
• 1.283. Anexos	283
• 1.284. Bibliografia	284
• 1.285. Glossário	285
• 1.286. Siglas	286
• 1.287. Referências	287
• 1.288. Anexos	288
• 1.289. Bibliografia	289
• 1.290. Glossário	290
• 1.291. Siglas	291
• 1.292. Referências	292
• 1.293. Anexos	293
• 1.294. Bibliografia	294
• 1.295. Glossário	295
• 1.296. Siglas	296
• 1.297. Referências	297
• 1.298. Anexos	298
• 1.299. Bibliografia	299
• 1.300. Glossário	300
• 1.301. Siglas	301
• 1.302. Referências	302
• 1.303. Anexos	303
• 1.304. Bibliografia	304
• 1.305. Glossário	305
• 1.306. Siglas	306
• 1.307. Referências	307
• 1.308. Anexos	308
• 1.309. Bibliografia	309
• 1.310. Glossário	310
• 1.311. Siglas	311
• 1.312. Referências	312
• 1.313. Anexos	313
• 1.314. Bibliografia	314
• 1.315. Glossário	315
• 1.316. Siglas	316
• 1.317. Referências	317
• 1.318. Anexos	318
• 1.319. Bibliografia	319
• 1.320. Glossário	320
• 1.321. Siglas	321
• 1.322. Referências	322
• 1.323. Anexos	323
• 1.324. Bibliografia	324
• 1.325. Glossário	325
• 1.326. Siglas	326
• 1.327. Referências	327
• 1.328. Anexos	328
• 1.329. Bibliografia	329
• 1.330. Glossário	330
• 1.331. Siglas	331
• 1.332. Referências	332
• 1.333. Anexos	333
• 1.334. Bibliografia	334
• 1.335. Glossário	335
• 1.336. Siglas	336
• 1.337. Referências	337
• 1.338. Anexos	338
• 1.339. Bibliografia	339
• 1.340. Glossário	340
• 1.341. Siglas	341
• 1.342. Referências	342
• 1.343. Anexos	343
• 1.344. Bibliografia	344
• 1.345. Glossário	345
• 1.346. Siglas	346
• 1.347. Referências	347
• 1.348. Anexos	348
• 1.349. Bibliografia	349
• 1.350. Glossário	350
• 1.351. Siglas	351
• 1.352. Referências	352
• 1.353. Anexos	353
• 1.354. Bibliografia	354
• 1.355. Glossário	355
• 1.356. Siglas	356
• 1.357. Referências	357
• 1.358. Anexos	358
• 1.359. Bibliografia	359
• 1.360. Glossário	360
• 1.361. Siglas	361
• 1.362. Referências	362
• 1.363. Anexos	363
• 1.364. Bibliografia	364
• 1.365. Glossário	365
• 1.366. Siglas	366
• 1.367. Referências	367
• 1.368. Anexos	368
• 1.369. Bibliografia	369
• 1.370. Glossário	370
• 1.371. Siglas	371
• 1.372. Referências	372
• 1.373. Anexos	373
• 1.374. Bibliografia	374
• 1.375. Glossário	375
• 1.376. Siglas	376
• 1.377. Referências	377
• 1.378. Anexos	378
• 1.379. Bibliografia	379
• 1.380. Glossário	380
• 1.381. Siglas	381
• 1.382. Referências	382
• 1.383. Anexos	383
• 1.384. Bibliografia	384
• 1.385. Glossário	385
• 1.386. Siglas	386
• 1.387. Referências	387

SUMÁRIO

- CAPITULO 1- Importância, histórico e impacto dos defensivos agrícolas sobre os alimentos e a saúde pública e principais metodologias de análise.	1
• Resumo	2
• Abstract	3
• Introdução	3
• Revisão Bibliográfica	4
- Histórico	4
- Histórico no Brasil	6
- Conceitos e Definições	8
- Evolução dos Agrotóxicos	10
- Normas e Legislação	11
• Constituição Federal	11
• Lei Federal	11
• ABNT Norma 10004	12
- Classificação e Aplicações	13
• Classificação	13
• Aplicações	17
- Formulação	17
- Formas de Aplicação	19
• Aplicação via sólida	19
• Aplicação via líquida	21
- Equipamentos e Técnicas de aplicação	21
- Toxicologia dos defensivos agrícolas	24
- Impacto dos defensivos agrícolas sobre a saúde humana	25
- Impacto dos defensivos agrícolas sobre os alimentos	29
- Métodos de extração de defensivos agrícolas	34
- Métodos de análise de defensivos agrícolas	35
- Referências Bibliográficas	38
- CAPITULO 2 – Desenvolvimento e Validação de metodologia de análise de multiresíduos de pesticidas em amostras de batata e feijão por LC-MS/MS	44
• Resumo	45
• Abstract	46

46	• Abstract
45	• Resumo
44	CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento e Validação de metodologia de análise de
38	Referências Bibliográficas
32	Métodos de análise de defensivos agrícolas
34	Métodos de extração de defensivos agrícolas
20	Impacto dos defensivos agrícolas sobre os alimentos
22	Impacto dos defensivos agrícolas sobre a saúde humana
24	Toxicologia dos defensivos agrícolas
21	Equipamentos e Técnicas de aplicação
21	• Aplicação via líquida
19	• Aplicação via sólida
19	Formas de aplicação
17	Formulação
17	• Aplicações
13	• Classificação
13	Classificação e Aplicações
12	• ABNT Norma 10004
11	• Lei Federal
11	• Constituição Federal
11	Normas e Legislação
10	Evolução das Agrotóxicos
8	Conceitos e Definições
6	História no Brasil
4	História
4	Referência Bibliográfica
3	Introdução
3	• Abstract
2	• Resumo
1	CAPÍTULO 1 - Importância, histórico e impacto dos defensivos agrícolas sobre

SUMÁRIO

1. Introdução	47
2. Experimental	48
2.1 Reagentes e Compostos Químicos	48
2.2 Preparação das amostras e extração	48
2.3 Análises por LC-ESI-MS/MS	51
2.4 Confirmação das análises LC-ESI-MS/MS	54
2.5 Validação da Metodologia	54
3. Resultados e Discussão	55
3.1 Extração e preparação das amostras	55
3.2 Parâmetros de validação do método para a análise	56
4. Conclusão	59
Referências Bibliográficas	60
- CAPÍTULO 3 – Desenvolvimento e Validação de metodologia de análise de multiresíduos de pesticidas em amostras de batata e tomate por GC-MS/MS.	62
• Resumo	63
• Abstract	64
1. Introdução	65
2. Experimental	67
2.1 Reagentes e Compostos Químicos	67
2.2 Preparação das amostras e extração	68
2.3 Análises por GC-MS/MS	70
2.4 Confirmação das análises GC-MS/MS	73
2.5 Validação da Metodologia	73
3. Resultados e Discussão	74
3.1 Extração e preparação das amostras	74
3.2 Parâmetros de validação do método para a análise	75
4. Conclusão	82
Referências Bibliográficas	83
- Conclusões Gerais	85

47	1. Introdução
48	2. Experimental
48	2.1 Reagentes e Componentes Químicos
48	2.2 Preparação das amostras e extração
51	2.3 Análises por LC-ESI-MS
54	2.4 Confirmação das análises LC-ESI-MS/MS
54	2.5 Validação da Metodologia
55	3. Resultados e Discussão
55	3.1 Extração e preparação das amostras
56	3.2 Parâmetros de validação do método para a análise
59	4. Conclusão
60	Referências Bibliográficas
62	- CAPÍTULO 3 - Desenvolvimento e Validação da metodologia de análise de
63	multiciclos de pesticidas em amostras de batata e tomate por GC-MS/MS
64	* Resumo
64	* Abstract
65	1. Introdução
67	2. Experimental
67	2.1 Reagentes e Componentes Químicos
68	2.2 Preparação das amostras e extração
70	2.3 Análises por GC-MS/MS
73	2.4 Confirmação das análises GC-MS/MS
73	2.5 Validação da Metodologia
74	3. Resultados e Discussão
74	3.1 Extração e preparação das amostras
75	3.2 Parâmetros de validação do método para a análise
82	4. Conclusão
83	Referências Bibliográficas
83	- Conclusões Gerais

Capítulo 1

IMPORTÂNCIA, HISTÓRICO E IMPACTO DOS DEFENSIVOS AGRÍCOLAS SOBRE OS ALIMENTOS E A SAÚDE PÚBLICA E PRINCIPAIS METODOLOGIAS DE ANÁLISE

Silva, L. M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciências dos Alimentos

Capítulo 1

IMPORTÂNCIA, HISTÓRICO E IMPACTO DOS DEFENSÍVOS AGRÍCOLAS SOBRE OS ALIMENTOS E A SAÚDE PÚBLICA E PRINCIPAIS METODOLOGIAS DE ANÁLISE

Silva, L. M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciências dos Alimentos

RESUMO

Diversas publicações evidenciam a importância da utilização correta e do desenvolvimento de programas de controle de resíduos de pesticidas nos alimentos. Isto se dá pelo fato de atualmente o uso de agroquímicos nos vários estágios de cultivo e durante o armazenamento do pós-colheita iniciar uma importante regra de proteção e preservação da qualidade dos alimentos. Aliado a isso e ao elevado e sempre crescente número de pesticidas que são introduzidos nas práticas agrícolas, há a necessidade do desenvolvimento de metodologias analíticas que abranjam o maior número possível de ingredientes ativos pesquisados em programas de monitoramento de resíduos, que sejam de fácil execução, eficientes e de baixo custo. O monitoramento de resíduos de pesticidas é crucial para propor o acesso a exposição humana a esses componentes nos alimentos. As metodologias analíticas aplicadas devem ser capazes de mensurar uma taxa muito baixa de resíduos e também providenciar uma evidência que não seja ambígua para confirmar a identidade e quantidade de todos os resíduos detectados. Muitos são os métodos de extração, detecção e quantificação de pesticidas. Dentre os de extração os com solventes orgânicos são os mais difundidos. Já, para a detecção e quantificação a cromatografia a gás associada a detectores de alta eficiência como captura de elétrons (ECD), detector de nitrogênio-fósforo (NPD) e espectrômetro de massa (MS) foi a técnica mais largamente usada por muitos anos. Entretanto, muitos

pesticidas com características polares, iônicas, termicamente instáveis ou não-voláteis semelhantes aos carbamatos ou benzimidazóis são difíceis ou impossíveis de analisar usando as técnicas GC e GC-MS sendo a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC/MS) uma poderosa ferramenta para a determinação de compostos desta natureza em amostras de alimentos.

ABSTRACT

Several publications show the importance of proper use and development of control programs for pesticide residues in food. This is because the use of chemicals currently in various stages of cultivation and during postharvest storage start an important rule of quality protection and preservation of food. Together, this and the large and ever increasing number of pesticides that are introduced in agricultural practices, there is a need to develop analytical methodologies covering the largest possible number of active ingredients researched in residue monitoring programs, which are easy to perform, efficient and low cost. The monitoring of pesticide residues is crucial to offer access to human exposure to these components in foods. The analytical methodologies applied should be able to measure a very low rate of waste and also provide evidence that it is not ambiguous to confirm the identity and quantity of all residues detected. There are many methods of extraction, detection and quantification of pesticides. Among the extraction with organic solvents are the most widespread. Now, for the detection and quantificaçãoa gas chromatography detectors associated with high efficiency as electron capture (ECD), a nitrogen-phosphorus detector (NPD) and mass spectrometry (MS) is the technique most widely used for many years. However, many pesticides characteristics polar, ionic, or thermally unstable non-volatile similar to carbamates or benzimidazoles are difficult or impossible to analyze using the techniques GC and GC-MS and liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC / MS) one powerful tool for the determination of such compounds in food samples.

INTRODUÇÃO

Os pesticidas são resultado do antigo desejo do homem de livrar-se das pragas que invadem seu modo de vida. Mas, no mundo moderno, já é conhecida a outra face de algumas destas substâncias, como a de “venenos perigosos para a saúde e meio ambiente”. Logo, o uso

de defensivos agrícolas na agricultura está muito difundido, pois são considerados essenciais para conseguir-se melhor qualidade e rendimento de produção, o que leva ao atual vertiginoso crescimento do volume destes compostos comercializados no Mundo.[49]

Todos estes compostos químicos tem a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital para os organismos aos quais são tóxicos. Praticamente desde sua introdução, os pesticidas sintéticos constituem um problema devido ao seu potencial impacto sobre a saúde humana em virtude da ingestão de alimentos contaminados com esses produtos químicos.

Cerca da metade dos alimentos consumidos nos Estados Unidos contém níveis mensuráveis de, no mínimo, um pesticida. Por essa razão, muitos deles foram banidos ou tiveram seu uso limitado. Não obstante, um relatório de 1993 da National Academy of Sciences dos Estados Unidos destacou que a regulamentação dos pesticidas até aquela época não havia dado suficiente atenção à proteção da saúde humana, especialmente a dos bebês e das crianças, cujo crescimento e desenvolvimento apresentam-se ameaçados.[51]

Porém, o ataque cada vez mais vigoroso de pragas nas lavouras, se demonstrou um potente agente prejudicial para a atividade agrícola, levando os produtores, com o intuito de manter a produção, fazerem uso inadequado e excessivo destes compostos, ato que pode ser o grande responsável por problemas de saúde pública, devido a possibilidade de ocorrência de acúmulo de resíduos tóxicos destes compostos nos alimentos e no organismo humano e desequilíbrios ecológicos, com o surgimento de novas pragas, eliminação de insetos polinizadores e mortandade de peixes e pássaros, além da persistência no meio ambiente, de onde podem ser transferidos para outras formas de vida, pois ficam presentes durante muito tempo em solos, águas, vegetais e animais. [25]

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

HISTÓRICO

O uso de substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas na agricultura vem desde a Antiguidade Clássica. O uso de produtos como arsênico e enxofre para o controle de insetos, eram mencionados nos escritos de romanos e gregos nos primórdios da agricultura. A partir do século XVI até fins do século XIX o emprego de substâncias orgânicas como nicotina (extraída do fumo) e o piretro (extraído do crisântemo) eram constantemente utilizados na Europa e Estados Unidos para a mesma finalidade. A partir do início do século XX iniciaram-

se estudos sistemáticos buscando o emprego de substâncias inorgânicas para a proteção de plantas. Deste modo, compostos a base de cobre, chumbo, mercúrio, cádmio, entre outros, foram desenvolvidos comercialmente e empregados contra uma grande variedade de pragas.

A Segunda Guerra Mundial foi o marco decisivo para o avanço científico. As pesquisas começaram a desenvolver-se e trouxeram consigo conseqüências importantes para a vida do homem. Com a descoberta do extraordinário poder inseticida do organoclorado Diclorodifeniltricloreto (DDT), aclamado na época como o praguicida universal, tornando-se o mais amplamente utilizado dos praguicidas sintéticos, antes que seus efeitos ambientais tivessem sido intensivamente estudados. Outro exemplo é o do organofosforado Sharadam também denominado de gás neurotóxico ou “gases dos nervos”, inicialmente usado como arma na forma dos gases de guerra *sarin*, *soman* e *tabun*. [13,17,42]

Neste momento deu-se início a grande disseminação do uso dessas substâncias na agricultura devido ao crescimento populacional e econômico do pós-guerra e ao aumento na demanda por alimentos e matérias primas. Já na década de 1950, em todo o Mundo, especialmente nos países fornecedores de produtos agrícolas, ocorreu um expressivo crescimento das áreas agrícolas cultiváveis. Em termos mundiais o objetivo era acabar com a fome existente, desde que, para isso, fossem utilizados os componentes do pacote tecnológico da agricultura moderna, ou seja, máquinas, implementos agrícolas, fertilizantes sintéticos, sementes melhoradas e *praguicidas*. [8,43]

A tecnologia imposta pela Revolução Verde que ocorreu a partir dos anos 60, fundamentada na melhoria do desempenho dos índices de produção agrícola e disseminada entre os agricultores maximizou, num primeiro momento, a produtividade, porém, criou-se estreita dependência a essa tecnologia, fazendo-se aumentar o custo do cultivo agrícola. [42] Socialmente, a Revolução Verde representou uma grande ilusão, pois aumentou a concentração de terra e tornou precária a vida dos pequenos agricultores descapitalizados, como também não solucionou o problema da fome no Mundo.

Ambientalmente, esta revolução provocou intenso processo erosivo, perda de fertilidade dos solos, perda da diversidade genética e utilização de matriz energética fóssil (altamente poluidora), além da contaminação de corpos hídricos, solo, alimentos, animais e do próprio homem, pelos venenos agrícolas. [13]

Cronologicamente, os praguicidas podem ser colocados segundo uma sucessão de gerações: [42,54]

- a) 1º Geração: I) Inorgânicos - enxofre (S), arsênio (As), Fluoretos, etc.; II) Botânicos- nicotina, piretrinas naturais, etc.; III) Organominerais- óleos minerais.
- b) 2º Geração: (organoclorados) Organosintéticos -I) Fumigantes: brometo de metila (CH_3Br), fosfina (PH_3), etc.; II) Organofosforados: paration, malation, diclorvos, disulfoton, etc.; III) Carbamatos: carbaril, aldicarb, carbofuran, etc.; IV) Piretróides: permetrina, deltametrina, etc.
- c) 3º Geração: I) Microbianos: fungos, bactérias e vírus; II) Ferormônios sexuais: Gossyplure, Grandlure.
- d) 4º Geração: Hormônios juvenis: juvabiona.
- e) 5º Geração: I) Vegetais: precocenos; Microrganismos: lactonas (evermectin).

HISTÓRICO NO BRASIL

Devido ao modelo agrícola adotado e a ampla diversidade biológica, predominante na maior parte do seu território, que favorece a incidência de pragas e moléstias, o Brasil é um dos países que mais consomem praguicidas nas suas culturas. Desde o século passado, eram utilizados venenos caseiros, à base de soda cáustica, querosene, carvão mineral, azeite de peixe entre outros produtos. Até a década de 40, foram muito usados produtos botânicos (piretro, retenona e nicotina), que eram até exportados. Venenos inorgânicos também foram usados, como o sulfato de tálio, cianeto de cálcio, carbonato de bário e sulfato de cobre.[12]

O primeiro praguicida introduzido no país foi o Benzeno Hexaclorado (BHC), em dezembro de 1946, para exterminar gafanhotos, em Caçador, Santa Catarina. Logo depois, este produto foi empregado ao controle da “broca” do café e entrou na composição das primeiras misturas no combate às pragas em lavouras de algodão. Em seguida veio o DDT, o parathion e o toxafeno que abriram caminho para os demais. [43]

Com a sintetização de novas substâncias químicas para o emprego na agricultura, e o poder das indústrias fabricantes, a partir de 1970, intensificaram-se as propagandas e foram colocados milhares de representantes em todo o país, com o objetivo de aumentar as vendas significativamente.

Em 1975 com a edição pelo Ministério da Fazenda do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA) vinculado ao 1º Plano Nacional de Desenvolvimento implantado em 1972 (PND), ocorreu a grande explosão das indústrias de praguicidas no país. O principal objetivo do PNDA era tornar o país auto suficiente na produção de defensivos, pois grande parte dos produtos ainda era importada. Dezenas de formulações foram colocadas

no mercado brasileiro, sem a preocupação da interferência destas substâncias na diversidade ecológica das regiões tropicais. [43,49]

Os praguicidas chegaram ao sul do país junto com a monocultura da soja, trigo e arroz, associados à utilização desses produtos para quem pretendesse usar o crédito previsto no Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR), onde a venda desses insumos era financiada pelo governo, que exigia dos produtores rurais, a aplicação em tecnologias modernas de pelo menos 15% do total do custeio das safras. Hoje em dia, os praguicidas encontram-se disseminados na agricultura convencional, como uma solução de curto prazo para a infestação de pragas e doenças. [28,52,74]

O país tornou-se o terceiro maior consumidor de praguicidas no Mundo na década de 70 e ocupando a quarta posição em 1980. A quantidade de formulações entre 1970 e 1980 era de 36 tipos diferentes, quase dobrando para 51, em 1985.[73]

Segundo dados oficiais, a soja é a maior consumidora nacional de agrotóxicos, com 44% do valor total das vendas efetuadas no Brasil, seguida pelo algodão (11,1%) e pela laranja (4,1%). Em 2000, as vendas de agrotóxicos atingiram o volume de 313,8 mil toneladas do produto comercial ou 140 mil toneladas do ingrediente ativo e, em 2003, 375,0 mil toneladas do produto comercial ou 182,4 mil toneladas do ingrediente ativo [73,77,79], conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Venda de Agrotóxicos, Brasil

	Produto Comercial (t)				Ingrediente Ativo (t)			
	1999	2000	2002	2003	1999	2000	2002	2003
Herbicidas	142.855	174.070	175.748	215.090	68.131	81.862	83.859	110.215
Fungicidas	48.826	41.111	34.407	41.863	20.168	19.072	17.262	19.363
Inseticidas	68.158	67.305	57.576	73.232	19.231	19.447	18.404	24.422
Acaricidas	13.655	12.561	15.055	14.362	9.676	8.985	10.804	9.627
Outros	16.581	18.777	23.643	30.501	10.379	11.107	15.223	18.819
Total	288.075	313.824	306.429	375.048	127.585	140.473	145.552	182.446

Fonte:[74,77]

O ano de 2008 foi considerado o melhor ano para o setor de venda de agrotóxicos no Brasil. As vendas atingiram US\$ 7,1 bilhões sendo que a movimentação norte-americana não alcançou US\$ 7 bilhões, segundo o diretor da Associação Nacional de Defesa Vegetal. No ano de 2010, o mercado estadunidense movimentou US\$ 7,8 bilhões em vendas de agrotóxicos e o Brasil US\$ 7,3 bilhões. Segundo estudo elaborado pela consultoria alemã Kleffmann, o consumo de agrotóxicos pelo produtores norte-americanos teve queda de 6% entre 2004 e 2009. No Brasil o crescimento foi de 1,5% no mesmo período. [81]

O mercado brasileiro é o terceiro colocado mundial em exportações de produtos agrícolas, atrás dos Estados Unidos e União Europeia. A área norte americana cultivada é

50% maior que a brasileira e produz três vezes e meio mais grãos que esta. O Brasil é o principal destino de agrotóxicos proibidos no exterior. Segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU), pelo menos dez variedades vendidas livremente aos agricultores, no Brasil, não circulam na União Europeia e Estados Unidos. [81]

O fato de plantações de clima tropical exigirem mais produtos químicos também eleva a demanda, no entanto, em 2011, não observou-se aumento nos preços dos produtos. Uma pesquisa do Instituto Agrícola de São Paulo aponta que 98,4% dos produtos pesquisados tiveram queda de preço no ano anterior. A redução foi de até 39,7% sendo que 88% dos produtos haviam tido decréscimo nos preços. Especialistas da área afirmam que o câmbio e a concorrência têm favorecido a queda. O mercado tem oferecido produtos genéricos e o número de empresas no segmento aumentou sendo em 2011, catalogadas 129 companhias no setor no Brasil. [77,80,81]

Observa-se que o Brasil é um país de grande extensão de áreas agrícolas e o seu consumo de agrotóxicos é significativo até os dias atuais, tornando este um mercado lucrativo e interessante para grandes investidores, o que leva a sérios reflexos econômicos, sociais e ambientais. [77,79]

CONCEITOS E DEFINIÇÕES

Existe uma ampla literatura e várias terminologias sobre os pesticidas, o que explica a multiplicidade de visões que cercam essas substâncias químicas utilizadas na agricultura.

O dicionário Aurélio conceitua defensivo como aquilo: “1) que serve para defesa, 2) que visa à defesa, a resistir ao ataque, 3) defensivo agrícola: produto químico utilizado no combate e prevenção de pragas agrícolas; agrotóxico. Esta terminologia é bastante adotada pelas indústrias produtoras desses compostos, pois o termo utilizado traz a idéia de proteção (defesa) da produção agrícola da ação de pragas e doenças que poderiam causar prejuízos econômicos. [12,42]

Os defensivos agrícolas compreendem uma categoria especial de insumos. Promovem benefícios indiretos à produtividade, uma vez que o objetivo de sua utilização é o de evitar a perda nas safras, provocada pelo ataque prejudicial de pragas e doenças às culturas. Diferem, portanto, das outras categorias de insumos agrícolas, como fertilizantes, corretivos e sementes melhoradas, produtos que, se bem utilizados, promovem aumentos substanciais de produtividades. Distribuem-se em três grandes categorias, de acordo com a sua destinação

específica de uso: inseticidas, que controlam as pragas; fungicidas, que controlam doenças fúngicas e herbicidas para o controle de ervas e outras plantas consideradas invasoras. [15,31]

O termo mais popular, usado atualmente no meio agrícola e na sociedade como um todo, é agrotóxico. Agrotóxico é “a substância química utilizada na agricultura para combater os diferentes tipos de pragas que atacam as lavouras (exemplo: insetos, fungos e ervas daninhas)”. [17] Essa terminologia não foge do sentido ‘tóxico do uso agrícola’ (agro + tóxico), sendo a toxicologia a ciência que estuda seus efeitos. Se admitirmos que *agro* seja um designativo daquilo que se refere às atividades humanas dedicadas ao cultivo das plantas, e *tóxico* aquilo que tem a propriedade de envenenar, deduz-se, portanto, por agrotóxicos, aqueles que são utilizados no controle de parasitas e moléstias que atacam as plantas, ou de outras plantas que concorram com a cultura comercial implantada (ervas daninhas que estejam prejudicando a cultura). [10,12,17] A opção pela terminologia ‘agrotóxico’ geralmente apoia-se na abrangência do conceito descrito acima e na facilidade de identificação pela sociedade.

Segundo a Lei Federal Brasileira de Agrotóxicos (7.802/89), no seu artigo 2º, inciso I, são considerados agrotóxicos e afins: “a) os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; b) as substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”. [6]

Contudo, segundo alguns pesquisadores, talvez o termo tecnicamente mais indicado para representar as substâncias que agem no controle de organismos nocivos devesse ser biocida. Pois, a palavra biocida significa “mata a vida”. Este termo inclui os organismos não alvos, mas que também são atingidos pelos mecanismos nocivos destes produtos químicos. [42]

Os biocidas são definidos como: “Substância química, natural ou sintética, utilizada para controlar ou eliminar organismos considerados nocivos a uma atividade humana ou determinada região. Qualquer químico tóxico, usado para matar organismos vegetais ou animais que causam danos econômicos às colheitas, ou criação de plantas, ou animais domésticos. Os herbicidas, inseticidas e demais gêneros de pesticidas são exemplos de

biocidas. Os pesticidas artificiais geralmente causam danos ambientais significativos por seus efeitos colaterais indesejados e desarmonia com os processos naturais". [42]

As diversas designações como agrotóxico, defensivo agrícola, praguicida, pesticida e biocida são usados de maneira geral para indicar os produtos químicos sintetizados artificialmente para conter a ação das pragas invasoras (animais, vegetais, fungos, insetos, etc.), que interferem na qualidade ou produtividade das lavouras ou na armazenagem e transporte destes produtos, provocando perdas econômicas consideráveis. [49,53,54]

Há pesquisadores que incluem, em seu conceito, somente as substâncias artificiais, entretanto, os demais autores ampliam o entendimento e mencionam também as substâncias de origem natural e biológica, como se refere à Legislação Brasileira sobre biocidas. Pode-se notar que as definições descritas se manifestam sobre substâncias produzidas ou manipuladas pelo homem para conter a ação de quaisquer organismos que possam, por ventura, causar dano às plantas, animais, homem e outros organismos alvos e não alvos destes agentes e, conseqüentemente, ao meio ambiente onde estes estão inseridos. [54,56]

EVOLUÇÃO DOS AGROTÓXICOS

Com o uso dos defensivos agrícolas químicos por mais de 50 anos, é possível identificar uma série de problemas a eles relacionados. Foi na década de 50 que os pesquisadores começaram a descobrir que seus efeitos não eram tão fáceis de controlar. Segundo John Wargo (1996) podemos citar algumas surpresas que se abateram sobre os *experts* de então. A evolução rápida da resistência de insetos aos inseticidas foi a primeira grande surpresa. Este fato trouxe a necessidade de novos produtos, fabricados pelas mesmas empresas, para que retomassem o combate aos insetos em níveis anteriores já registrados. Este processo de substituição de produtos antigos, que ao longo dos anos tornaram-se ineficientes, por produtos novos, passou a ser o mecanismo central de concorrência entre as indústrias produtoras dos defensivos agrícolas. [13,25,28]

A segunda surpresa se relaciona a persistência por longo tempo, dos resíduos destes insumos que, além disto, eram encontrados a longas distâncias do lugar onde tinham sido aplicados, denotando assim sua mobilidade espacial. Portanto, persistiam e se deslocavam no meio ambiente. [53]

A produção destes compostos depende atualmente das multinacionais, as quais executaram inovações primárias, consubstanciadas nos defensivos agrícolas organoclorados que apresentaram sérios problemas ambientais e toxicológicos, os quais os tornavam

transitórios, implicando em que o *market share* também pudesse ser transitório. Foram as multinacionais também, que apresentaram um fluxo contínuo de inovações na sua produção quer para manter e/ou ampliar suas posições no mercado.[28,40,43,49]

Procedeu-se assim à substituição progressiva dos defensivos agrícolas clorados pelos fosforados, piretróides e carbamatos que apresentavam menor efeito residual sobre o meio ambiente. Estes produtos se caracterizam por serem mais específicos em termos de espectro de ação, portanto, são mais seletivos.[43,49,52] O mesmo princípio se deu em relação aos grupos químicos neonicotinóide, dicarboximida, imidazolinona e estrobilurinas, os quais são os compostos mais recentemente elaborados pelas empresas a fim de atingir-se as pragas já resistentes à ação dos organofosforados, piretróides e carbamatos.

NORMAS E LEGISLAÇÃO

CONSTITUIÇÃO FEDERAL

Como começou se a observar e sentir se os efeitos danosos advindos da utilização abusiva e errônea dos defensivos agrícolas, instaurou-se a necessidade de uma Legislação para tais produtos.

A Constituição Federal de 1988 (CF/88) [6,42] regulamenta a política agrícola pela ordem econômica (art.170), prevendo o respeito ao princípio da defesa do meio ambiente (inciso VI).

Desta forma as substâncias agroquímicas estão regulamentadas no artigo 225, paragrafo 1º, inciso V, da CF/88, que incube ao Poder Público “controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para a vida e ao meio ambiente”.

Os defensivos podem ser utilizados legalmente, no entanto deve-se ter um controle do uso, para que possa assegurar o direito que todos têm ao meio ambiente ecologicamente equilibrado e a sadia qualidade de vida (art. 225, caput).

LEI FEDERAL

A Lei Federal 7.802 de julho de 1989 [6,42] além de conceituar os praguicidas, 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 praguicidas, seus componentes e afins. Ela foi alterada pela Lei 9.974 de 06 de junho de 2000 , e posteriormente regulamentada pelo Decreto 4.074, de 04 de janeiro de 2002. [6]

O Decreto 4.074/02, nos seus artigos 2º, 3º, 4º, tratam da competência administrativa conjunta dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Saúde e Meio Ambiente e do que cabe a cada um desses ministérios em particular em relação aos praguicidas (arts. 5º, 6º e 7º). [6,52]

O Decreto também institui o Comitê Técnico de Assessoramento para Praguicidas (art. 95), o qual tem, dentre outras competências, “assessorar os Ministérios responsáveis na concessão do registro para o uso emergencial de praguicidas e afins e no estabelecimento de diretrizes e medidas que possam reduzir os efeitos danosos desses produtos sobre a saúde humana e o meio ambiente” (inciso VI).[6,42]

A Lei 7.802/89, em seu artigo 3º, caput, prevê que só se pode produzir, comercializar, exportar, importar e utilizar praguicidas caso haja um registro prévio em órgão federal, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores da saúde, meio ambiente e agricultura.[6,8]

O transporte de praguicidas é tido como transporte perigoso (art. 63, Decreto 4.074/02), submetendo-se às regras e procedimentos estabelecidos na legislação específica de transporte de produtos perigosos.

A Lei de Crimes Ambientais, a Lei 9.065/98 [6], prevê a responsabilidade penal do condutor do veículo e da pessoa jurídica (proprietário do veículo ou a transportadora) quando não observadas as cautelas mínimas exigidas pela legislação vigente referente ao transporte de produtos perigosos.

O artigo 6º da Lei 7.802/89, parágrafo 2º, determina que ao usuários de praguicidas e afins tenham a obrigação de devolver as embalagens vazias dos compostos, aos estabelecimentos onde foram adquiridos, devendo ser submetidas pelo usuário à operação de triplice lavagem. Neste caso as embalagens vazias lavadas estão isentas das exigências legais e técnicas para o transporte de produtos perigosos.[6,25,78]

ABNT NORMA 10004

Segundo a Norma Brasileira (NBR) 10004 da Associação Brasileira de Normas Técnicas [6,8], que classifica os resíduos quanto aos seus riscos potenciais ao meio ambiente e a saúde pública indicando quais devem ter manuseio e destinação mais rigidamente

controlados, os resíduos provenientes dos defensivos agrícolas de classe I são considerados perigosos. São aqueles que podem apresentar, dentre outras características, toxicidade, podendo acarretar risco à saúde pública, provocando ou contribuindo para um aumento de mortalidade ou incidência de doenças e/ou apresentar efeitos adversos ao meio ambiente, quando manuseados ou dispostos de forma inadequada.

A Norma define por agente tóxico “qualquer substância ou mistura cuja inalação, ingestão ou absorção cutânea tenha sido cientificamente comprovada como tendo efeito adverso (tóxico, carcinogênico, mutagênico, teratogênico ou ecotoxicológico)”. Um resíduo é caracterizado como tóxico, segundo a NBR 10004, quando uma amostra representativa dele, obtida segundo a ABNT NBR 10007, que fixa os requisitos exigíveis para amostragem de resíduos sólidos, apresentar uma das seguintes propriedades:

- a) O extrato obtido desta amostra, segundo a ABNT NBR 10005, que “fixa os requisitos exigíveis para a obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos, visando diferenciar os resíduos classificados pela ABNT NBR 10004 como classe I – perigosos e classe II – não perigosos”, apresentar qualquer um dos contaminantes em concentrações superiores aos valores constantes no anexo F da referida Norma (concentração – limite máximo no extrato obtido no ensaio de lixiviação);
- b) Possuir uma ou mais das substâncias constantes no anexo C a referida Norma (substâncias que conferem periculosidade aos resíduos) e apresentar toxicidade;
- c) Ser constituída por restos de embalagens contaminadas, ou resultar de derramamentos ou de produtos fora de especificação ou do prazo de validade, com substâncias constantes nos anexos D (substâncias agudamente tóxicas) ou E (substâncias tóxicas) da referida Norma;
- d) Ser comprovadamente letal ao homem ou que demonstrem uma DL50 (Dose Letal) oral para ratos menor que 50 mg/Kg ou CL50 (Concentração Letal) inalação para ratos menor que 2mg/L ou uma DL50 dérmica para coelhos menor que 200 mg/Kg.

CLASSIFICAÇÃO E APLICAÇÕES

CLASSIFICAÇÃO

Dada a grande diversidade dos produtos, cerca de 300 princípios ativos em duas mil formulações comerciais diferentes no Brasil, é importante conhecer a classificação dos agrotóxicos quanto ao seu modo de ação e ao grupo químico a que pertencem.

Os agrotóxicos podem ser divididos quanto ao modo de ação entre sistêmicos e de contato. Os sistêmicos são aqueles que, quando aplicados nas plantas, circulam através da seiva por todos os tecidos vegetais, de forma a se distribuir uniformemente e ampliar o seu tempo de ação. Os de contato são aqueles que agem externamente no vegetal, tendo necessariamente que entrar em contato com o alvo biológico. E mesmo estes são também, em boa parte, absorvidos pela planta, penetrando em seu interior através de suas porosidades. [6,17]

Segundo a literatura os agrotóxicos podem também ser classificados de acordo com as pragas a que se destinam, ou seja, quanto à finalidade:

a) *Inseticidas*: usados no controle de insetos. Englobam os larvicidas (atacam as larvas dos insetos), ovicidas (atingem os ovos dos insetos), formicidas (atacam as formigas) e bernicidas. Os inseticidas pertencem a quatro grupos químicos distintos:

- Organofosforados: são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditofosfórico. Ex.: Folidol, Azodrin, Malation, Diazinon, Nuvacron, Tamaron, Rhodiatox;

- Carbamatos: são derivados do ácido carbâmico. Ex.: Carbaril, Furadan;

- Organoclorados: são compostos à base de carbono, com radicais de cloro. São derivados do clorobenzeno, do ciclo-hexano ou do ciclodieno. Foram muito utilizados na agricultura, como inseticidas, porém seu emprego foi progressivamente restringido ou mesmo proibido. Ex.: Aldrin, Endrin, MtIC, DUr, Endossulfan, Heptacloro, Lindane, Mirex;

- Piretróides: são compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes a piretrina, substância existente nas flores do *Chrysanthmum* (pyrethrum) *cinerariaefolium*. Alguns desses compostos são: aletrina, resmetrina, decametrina, cipermetrina.

b) *Fungicidas*: usados no combate aos fungos. Os principais grupos químicos são:

- Etileno-bis-ditiocarbonatos: Maneb, Mancozeb, Dithane, Zineb, Tiram;

- Trifenil estânico: Duter e Brestan;

- Captan: Ortocide a Merpan;

- Hexaclorobenzeno.

c) *Herbicidas*: usados como extirpadores de ervas daninhas ou plantas invasoras. Nas últimas duas décadas, este grupo tem tido uma utilização crescente na agricultura. Seus principais representantes são:

- Paraquat: comercializado com o nome de Gramoxone;

- Glifosato: Round-up;

- Pentaclorofenol;

- Derivados do ácido fenoxiacético: 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) a 2,4,5 triclorofenoxiacético (2,4,5 T). A mistura de 2,4 D com 2,4,5 T representa o principal componente do agente laranja, utilizado como desfolhante na Guerra do Vietnã.

- Dinitrofenóis: Dinoseb a DNOC.

Outros grupos importantes compreendem:

- d) *Raticidas*: utilizados no combate a roedores;

- e) *Acaricidas*: usados no combate aos aracnídeos (aranhas, escorpião e ácaros);

- f) *Nematicidas*: ação de combate a nematóides;

- g) *Molusquicidas*: usados no controle dos caracóis (caramujos). Como por exemplo, no controle da *Schistosoma*, parasita causador da esquistossomose.

Outra classificação sugerida [8] refere-se à maneira dos agrotóxicos agirem sobre as pragas, podendo ser por:

- a) *Ingestão*: a praga deve ingerir a planta com o produto;

- b) *Contato*: ao tocar o corpo da praga o produto já faz efeito;

- c) *Fumigante*: agem no sistema respiratório, são substâncias em forma de gases usados para matar espécies subterrâneas e pragas em produtos armazenados;

- d) *Microbiano*: o produto contém microorganismos que atacarão a praga ou o agente causador da doença.

Os agrotóxicos também podem ser classificados, em relação a sua constituição química, em inorgânicos e orgânicos. Os inorgânicos incluem os produtos arsenicais, os produtos fluorados, os óleos minerais, os compostos de antimônio, de bário, de boro, de chumbo, de mercúrio, de tálio, além da calda sulfocálica. Os arsenicais, os fluorados e outros compostos minerais agem por ingestão; os óleos minerais agem por contato, matando as pragas por asfixia.

Os orgânicos compreendem os de origem vegetal ou botânico e os organosintéticos. Os primeiros, muito utilizados por algumas correntes da agroecologia são de baixa toxicidade e de curta permanência no ambiente (como o piretro contido no crisântemo e a rotenona extraída do timbó). Já os organosintéticos, além de persistirem muitos anos nos ecossistemas, contaminando-os, também trazem uma série de problemas de saúde para os seres humanos, o que torna seu uso proibido pelas correntes agroecológicas. São subdivididos em: clorados, clorofosforados, fosforados e carbamatos. [4,8]

Os clorados compreendem o grupo químico dos agrotóxicos compostos por um hidrocarboneto clorado que tem um ou mais anéis aromáticos. Embora seja menos tóxico (em termos de toxicidade aguda que provoca morte imediata) que outros organosintéticos, são mais persistentes no corpo e no ambiente, causando efeitos patológicos a longo prazo, daí a necessidade de um controle mais rígido sobre estes produtos. O agrotóxico organoclorado atua no sistema nervoso, interferindo nas transmissões dos impulsos nervosos. São agrotóxicos que agem por contato, ingestão e fumigação. São bastante estáveis e tóxicos, lipossolúveis, sem ação sistêmica, nem de profundidade, podem permanecer no ambiente por mais de 30 anos. São empregados como inseticidas, acaricidas, nematicidas e, às vezes, fungicidas. Os mais usados foram: Aldrin, Dieldrin, Endossulfan, Endrin, Confeutor, Clordano, DDT, Heptacloro, Lindane, Mirex, Metoxicloro e BHC.[4,16]

Os clorofosforados que estão dentro da classe dos clorados como o Diclorvós e Triclofom, possuem um éster de ácido fosfórico e outros ácidos à base de fósforo, que em um dos radicais da molécula possui também um ou mais átomos de cloro. Apresentam toxidez aguda (são capazes de provocar morte imediata) atuando sobre uma enzima fundamental do sistema nervoso (a colinesterase) e nas transmissões de impulsos nervosos, têm ação residual moderada, possuem maior dificuldade de acumulação nos organismos, têm ação de penetração nos tecidos vegetais e não são dotados de ação sistêmica.

Os fosforados como o Fenitrothion e o Fosalone são formados apenas por ésteres de ácido fosfórico e outros ácidos à base de fósforo. Em relação aos agrotóxicos clorados e carbamatos, os organofosforados são mais tóxicos (em termos de toxicidade aguda), mas se degradam rapidamente e não se acumulam nos tecidos gordurosos. A maioria dos ésteres organofosforados são rapidamente hidrolisados por água fornecendo produtos solúveis, não deixando, portanto, resíduos permanentes após o espargimento. Atua inibindo a ação da enzima colinesterase na transmissão dos impulsos nervosos. Incluem produtos de ação sistêmica e não sistêmica. Possuem ação de contato, ingestão, fumigação e profundidade. São geralmente muito tóxicos ao homem, principalmente os sistêmicos. [16,59]

Os carbamatos como Aldicarb e Carbofuran são compostos por ésteres de ácido metilcarbônico ou dimetilcarbônico. Em relação aos pesticidas organoclorados e organofosforados, os carbamatos são considerados de toxicidade aguda média, sendo degradados rapidamente e não se acumulando nos tecidos gordurosos. Os carbamatos também atuam inibindo a ação da colinesterase na transmissão dos impulsos nervosos cerebrais. Muitos desses produtos foram proibidos em diversos países também em virtude de seu efeito

altamente cancerígeno. Esses produtos têm ação de contato e ingestão não apresentando ação sistêmica, nem de profundidade. [16,55,58]

APLICAÇÕES

FORMULAÇÃO

Segundo estudos, formular um produto fitossanitário consiste em preparar os ingredientes ativos na concentração adequada, adicionando substâncias coadjuvantes, tendo em vista que o produto final deve ser disperso em determinadas condições técnicas de aplicação, para poder cumprir eficazmente sua finalidade biológica, mantendo estas condições durante o armazenamento e transporte. O produto resultante do ato de formular denomina-se formulação. [17]

As formulações, quanto à forma de uso, podem ser:

a) *Formulação pré-mistura*: são formulações que necessitam ser diluídas até uma concentração adequada, no ato da aplicação. Via de regra esta diluição se faz com adição de água. Algumas mudanças nesta formulação já foram realizadas com o objetivo de facilitar o processo de preparação da calda e remoção dos resíduos internos das embalagens;

b) *Formulação de pronto uso*: são formulações cuja concentração já está adequada para a aplicação em campo.

Os agrotóxicos apresentam-se no comércio em diversos tipos de formulações. Dentre elas destacam-se as seguintes:

I) *Pó Seco (P)*: é formulação sólida de pronto uso, para aplicação via sólida. Na sua elaboração, partículas sólidas finamente moídas de um material adsorvente (mineral de argila), são impregnadas com o ingrediente ativo. Essas partículas sofrem diluição com partículas de material inerte (talco) para aumentar-lhe o volume e possibilitar a distribuição através de máquinas polvilhadoras. Somente os inseticidas são formulados como pós-secos, podendo, eventualmente, encontrar alguns fungicidas;

II) *Pó Molhável (PM)*: é uma formulação sólida para ser diluída em água, para posterior aplicação via líquida. O pó-molhável, quando diluído em água, forma uma mistura homogênea de sólido no meio aquoso (suspensão). A suspensão não é tão estável e necessita de agitação contínua para que a calda se mantenha homogênea. Por

outro lado, o atrito de partículas sólidas nas passagens estreitas do pulverizador (válvulas, bicos), provoca desgaste acentuado do equipamento, principalmente se o veículo da formulação apresentar alto grau de dureza. Apesar de suas limitações, o pó-molhável é uma formulação mais barata que outras equivalentes. É uma formulação largamente utilizada para fungicidas, herbicidas e inseticidas;

III) *Pó Solúvel (PS)*: é uma formulação sólida destinada à diluição em água e posterior aplicação via líquida. É uma formulação pouco comum, pois o ingrediente ativo deve ser solúvel em água. O resultado da diluição de um pó solúvel na água é uma solução verdadeira, o que é interessante na aplicação, pois, uma vez dissolvida, a calda resultante sempre se mantém homogênea, sem a necessidade de agitação constante. A solução é translúcida podendo ser colorida ou não.

IV) *Concentrado Emulsionável (CE)*: é uma formulação líquida destinada à diluição em água. Para sua elaboração o ingrediente ativo é primeiramente dissolvido em um solvente apropriado, resultando em uma solução concentrada.

O resultado da diluição do concentrado emulsionável na água é uma mistura homogênea, onde glóbulos líquidos da formulação ficam dispersos na fase aquosa (emulsão), constituindo uma calda de aspecto leitoso. Esta formulação é bastante comum para inseticidas e encontrada também em alguns herbicidas;

V) *Solução Aquosa Concentrada (SAqC)*: é uma formulação líquida para ser diluída em água. Na sua elaboração, o ingrediente ativo solúvel, geralmente na forma de sal, é dissolvido em água, até próximo do limite de saturação. Esta formulação é muito pouco comum;

VI) *Grânulo (Gr)*: formulação de pronto uso, para aplicação via sólida. Na sua elaboração, partículas sólidas são impregnadas pelo ingrediente ativo. Essas partículas são relativamente grandes e podem ser dos mais diversos materiais: silicatos, argila granulada, gesso, resíduos, vegetais triturados e homogeneizados (sabugos, bagaço), plásticos, etc. Dentre as formulações granuladas predominam os inseticidas sistêmicos, sendo mais raros os fungicidas e os herbicidas;

VII) *Suspensão Concentrada (SC)*: é uma formulação líquida para ser diluída em água. Surgiu para contornar as dificuldades apresentadas pelo pó-molhável, sendo elas: dificuldade de se medir a dose, a necessidade de se preparar uma pasta à parte antes de diluição final, desgaste e entupimento de bicos pulverizadores, além do perigo de inalação do pó durante a preparação da calda. Essas dificuldades foram superadas e

a suspensão concentrada pode ser diretamente despejada no tanque do pulverizador, estando o agitador ligado. Esta formulação é bastante utilizada para herbicidas e fungicidas;

VIII) *Ultra Baixo Volume (UBV)*: é uma formulação líquida de pronto uso, para aplicação em pulverização a ultra baixo volume. Na sua elaboração, o ingrediente ativo é dissolvido em um solvente que deve possuir as seguintes propriedades: volatilidade muito baixa; alta capacidade de dissolução do ingrediente ativo; baixa viscosidade; não fitotóxico e compatível com o ingrediente ativo. Esta formulação era bastante popular entre 1965 e 1975, época em que muitos inseticidas foram empregados em pulverização a UVB, tanto por equipamentos terrestres como por meio de aeronaves. Atualmente, ainda existem alguns inseticidas e fungicidas nesta formulação. [21]

Além das formulações citadas existem outras menos comuns, geralmente destinadas a usos específicos, como: comprimido (CP), tablete (TB), pastilha (PA), pasta (PT), fibras plásticas (FP), grânulos dispersíveis em água (GRDA), etc. [17,67,75,78] A apresentação do produto deve ser cuidadosamente observada e a aquisição feita mediante receituário agrônomo, isto evitará desperdícios, riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

FORMAS DE APLICAÇÃO

A aplicação ocorre através de equipamentos especiais, dependendo do estado físico do material a aplicar. Os métodos de aplicação dividem-se, basicamente, em aplicações via sólida, via líquida ou via gasosa. Dentre esses, a aplicação via líquida com o preparo da calda, é o método predominante. A aplicação via gasosa é bastante restrita, devido às dificuldades associadas ao processo.

APLICAÇÃO VIA SÓLIDA

Segundo [17,67] uma das principais vantagens dessa aplicação, é a não utilização de água, o que dispensa diluição pelo usuário. Nessas aplicações, as formulações estão prontas para o uso, isto é, já se encontram diluídas em concentrações adequadas para o campo.

Dependendo da granulometria do material, a aplicação de sólidos comporta duas modalidades: aplicação de pó e aplicação de grânulo.

a) Aplicação de pó:

A aplicação de pó conhecida como polvilhamento, consiste na utilização da formulação pó seco. Esta prática está entrando em desuso, devido a algumas desvantagens que a tornaram inviável nos dias atuais, sendo substituído por outros processos mais eficientes. Sendo constituído de partículas finas (abaixo de 30 μm) de pequena massa, a aplicação do pó encerra aspectos bastante críticos, pois essas partículas são facilmente carregadas pelas correntes de ar, podendo alcançar a dezenas de quilômetros. [74]

Uma outra desvantagem está relacionada a pouca tenacidade do depósito sobre a superfície tratada. O pó adere com pouca força e qualquer distúrbio (chuva, vento, etc.) é capaz de removê-lo com facilidade. A heterogeneidade na distribuição do ingrediente ativo é outra grande desvantagem. Na maioria das formulações de pó seco, somente uma parte das partículas carrega na sua superfície o ingrediente ativo, a grande maioria das partículas funcionam como diluente. Durante a aplicação através da corrente de ar, as partículas de densidades diferentes se separam, depositando-se a diferentes distâncias, isto é, dentro de uma faixa existirão regiões onde a proporção do ingrediente ativo é maior que as outras.

Além dessas desvantagens, cita-se o risco de contaminação para o aplicador no processo de polvilhamento, devido ao tamanho das partículas. Dentre as vantagens destaca-se a alta capacidade operacional expressa em hectares por hora (ha/h), ou seja, rendimento das máquinas polvilhadoras, devido a grande largura de tratamento que é possível alcançar. [21,79]

b) Aplicação de grânulos:

Bastante utilizados para aplicação no solo para controle de pragas que se alimentam da seiva (insetos e ácaros), larvas de brocas, etc. Inseticidas de contato são granulados e aplicados no controle de pragas da parte aérea das gramíneas. Herbicidas granulados estão cada vez mais presentes, e fungicidas também são experimentados nessa formulação. [21,78]

Uma das vantagens dos granulados é que por suas partículas serem suficientemente pesadas, conseguem resistir à ação do vento durante a aplicação, tornando o processo mais seguro, sendo que até os produtos altamente tóxicos podem ser aplicados com relativa segurança.

A aplicação pode ser efetuada com equipamentos mais simples, fazendo com que seja mais facilmente aceita nas regiões subdesenvolvidas. O desenvolvimento do processo de aplicação de granulados tem sido lento, porém progressivo. Uma das causas dessa lentidão é a inexistência de máquinas aplicadoras, que por serem demasiadamente simples não despertam o interesse dos grandes fabricantes. [17,78]

- *APLICAÇÃO VIA LÍQUIDA*

Nesta modalidade, geralmente uma formulação é diluída em um líquido apropriado antes da aplicação. O diluente mais aplicado é a água e as formulações empregadas são: pó molhável, suspensão concentrada, pó solúvel, concentrado emulsionável e solução concentrada. A calda, resultante da adição do diluente à formulação, possui a concentração adequada para a aplicação. Há casos em que a aplicação via líquida se faz sem a adição do diluente, sendo, neste caso, o UBV. Via de regra, a aplicação é feita na forma de gotas (pulverização), havendo, no entanto, casos em que se faz na forma de filete líquido (rega ou injeção) ou na forma de gotas muito diminutas formando neblina (nebulização).

A adesividade das partículas líquidas no alvo é muito superior à do pó, bem como a sua tenacidade, o que leva a recomendação de dosagens muito baixas. Como o método é bastante antigo, existem muitos tipos de equipamentos apropriados para as mais variadas situações, bem como as formulações existentes que estão bem desenvolvidas para serem miscíveis à água. [17,67]

EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS DE APLICAÇÃO

Os equipamentos para a aplicação de defensivos agrícolas são numerosos e podem ser classificados segundo o material que aplicam. Assim a polvilhadora aplica pó; a granuladora, os grânulos; o pulverizador, as gotas; e o nebulizador, a neblina. As polvilhadoras aplicam a formulação pó seco, de pronto uso. A base do processo consiste em assoprar o pó sobre a área a ser tratada. Portanto, o equipamento deve possuir, no mínimo, um reservatório para se colocar o pó e um sistema de ventilação. Para poder controlar a vazão do pó, um sistema dosador regula a quantidade de saída do pó. As polvilhadoras costais manuais foram muito utilizadas no início, em cafezais para o controle da broca. Já as polvilhadoras de grande porte, tratorizadas, foram empregadas na lavoura de algodão. Hoje, praticamente, estes equipamentos estão em desuso substituídos por outros processos mais seguros e eficazes. [17,67,74,78]

Ao contrário do que ocorre com o polvilhamento, a aplicação de granulados vem crescendo gradativamente. A máquina aplicadora é ainda mais simples que as polvilhadoras, pois dispensa o ventilador. Já os aplicadores via líquida podem ser divididos em injetores, pulverizadores e nebulizadores. Os injetores aplicam filete líquido (sem fragmentação em

gotas), os pulverizadores aplicam gotas e os nebulizadores, neblina (gotas menores que 50 μm).

No Brasil a utilização de injetores e nebulizadores são de pouco uso. As atenções concentram-se em pulverizadores, que aplicam a maior parte dos defensivos agrícolas (Figuras 2 e 3).

Os pulverizadores possuem três pontos em comum: o líquido armazenado no tanque é conduzido por meio de uma bomba (às vezes por gravidade) até uma ou mais saídas, denominadas bicos. O bico é a peça final do pulverizador e tem por função formar as gotas (Quadro 1). [17,74]

Quadro 1 – Tipos de Bicos e Suas Aplicações

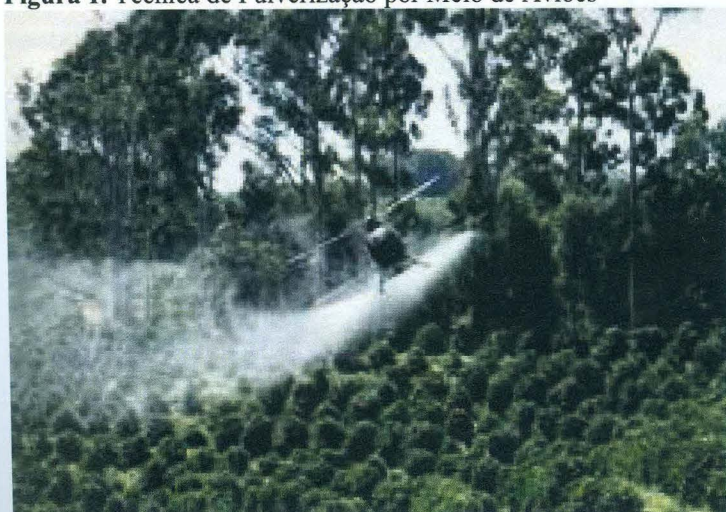
ENERGIA	TIPO	USOS
Hidráulica	Impacto	• Bico de baixa pressão com gotas grandes. • Aplicação de herbicida.
	Leque	• Para pulverização de superfícies planas como solo e parede.
	Cone	• Para pulverização de folhagens.
Gasosa	Pneumático	• Pulverização defolhagens, especialmente árvores e arbustos.
Centrífuga	Disco ou gaiola rotativa	• Aplicação de volumes mínimos com controle do tamanho de gotas. • Baixa rotação para gotas grandes. • Alta rotação para gotas pequenas.
Cinética	Vibratório	• Gotas grandes e uniformes para evitar deriva.
Térmica		• Tratamento espacial em armazéns e florestas.
Elétrica	Eletrostático	• Gotas eletricamente carregadas e atraídas por objetos aterrados.

Fonte: [17]

Citam-se ainda outras formas de aplicação inovadoras, porém pouco usuais, sendo elas: processo de aplicação de gotas controladas (Controlled Drop Application – CDA), pulverização eletrostática, sistema de suspensão de barras auto-estáveis, controle eletrônico

dos pulverizadores, aplicação por contato direto (Direct Contact Application – DCA), entre outras. [74,78]

Figura 1. Técnica de Pulverização por Meio de Aviões



Fonte: [28]

Figura 2. Técnica de Pulverização Manual



Fonte: [28]

Figura 3. Técnica de Pulverização com Trator



Fonte: [28]

TOXICOLOGIA DOS DEFENSIVOS AGRÍCOLAS

Define-se por toxicidade a “capacidade inerente e potencial do agente tóxico de provocar efeitos nocivos em organismos vivos”, sendo o agente tóxico ou toxicante, a “entidade química capaz de causar dano a um sistema biológico, alterando uma função ou levando-o à morte, sob certas condições de exposição”. [23,73,75]

A Tabela 2 relaciona as classes toxicológicas com a DL50 (dose letal para 50% da população), comparando-a com a quantidade suficiente para matar uma pessoa adulta.

Tabela 2 – Classificação Toxicológica dos Agrotóxicos Segundo DL50

GRUPOS	DL50	DOSE CAPAZ DE MATAR UMA PESSOA ADULTA
Extremamente tóxicos	5mg/Kg	Uma pitada – algumas gotas
Altamente tóxicos	5-50	Algumas gotas -1 colher de chá
Medianamente tóxicos	50-500	Uma colher de chá – 2 colheres de sopa
Pouco tóxicos	500-5000	Duas colheres de sopa – um copo
Muito pouco tóxicos	5000 ou +	Um copo – litro

Fonte: [24]

Por determinação legal, todos os produtos devem apresentar nos rótulos uma faixa colorida indicativa de sua classe toxicológica, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Classe Toxicológica e Cor da Faixa no Rótulo do Produto Agrotóxico

CLASSE	CLASSIFICAÇÃO	COR
Classe I	Extremamente tóxicos	Faixa Vermelha
Classe II	Altamente tóxicos	Faixa Amarela
Classe III	Medianamente tóxicos	Faixa Azul
Classe IV	Pouco ou muito pouco tóxicos	Faixa Verde

Fonte: OPAS/OMS (1996, p. 22)

Em geral os biocidas produzem dois tipos de toxicidade: [42]

- a) *Aguda*: neste tipo a intoxicação pode ser fatal ou temporária. A toxicidade aguda é a mais comum em pessoas que manipulam o agrotóxico (trabalhadores rurais). Ocorre também as intoxicações acidentais com pessoas ou animais domésticos. Decorre de um único contato (dose única) ou múltiplos contatos (efeitos cumulativos) com o agente tóxico, num período de tempo aproximado de 24 horas. Os efeitos surgem de imediato ou no decorrer de alguns dias, no máximo duas semanas. Estuda a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL50 (Tabela 2).
- b) *Crônica*: na toxicidade crônica, pode haver ou não sintoma de intoxicação, dependendo do nível de administração do defensivo e a duração da exposição. Além dos produtores rurais que manipulam o produto, pode ocorrer contaminação dos alimentos advindos, daí, a intoxicação crônica. Resulta em efeito tóxico após exposição prolongada a doses cumulativas do agente tóxico, num período prolongado, geralmente de três meses a alguns anos.

IMPACTO DOS DEFENSIVOS AGRÍCOLAS SOBRE A SAÚDE HUMANA

Cada ano várias pessoas morrem intoxicadas por manuseio inadequado destes produtos nas lavouras. Os casos de óbitos por contaminação por produtos tóxicos vêm crescendo assustadoramente, em todo o mundo. Calcula-se que 2 a 10% dos envenenamentos acidentais sejam provenientes de agrotóxicos mal preparados, ou mal aplicados. [4,5,16]

Segundo a Organização Pan-Americana (OPAS/OMS, 1996, p. 23), a notificação e a investigação das intoxicações por agrotóxicos são ainda muito precárias em nosso país. Dificuldade de acesso dos trabalhadores rurais aos centros de saúde, diagnósticos incorretos e

a negligência, na maioria dos estados e municípios brasileiros pelos sistemas de vigilância epidemiológica e/ou sanitária, são alguns dos fatores que influem no registro. De acordo com o Centro de Epidemiologia (CEPI) da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA) [23,38,51], os agrotóxicos aparecem em segundo lugar como causa de intoxicação humana, nos anos de 1993 e 1994, tendo sido registrados 1141 e 1059 casos, respectivamente. Os agrotóxicos podem determinar três tipos de intoxicação: aguda, subaguda e crônica.

Na intoxicação aguda os sintomas surgem rapidamente, algumas horas após a exposição excessiva. Pode ocorrer de forma leve, moderada ou grave, dependendo da quantidade de veneno absorvido. Os sinais e sintomas são nítidos e objetivos.

A intoxicação subaguda ocorre por exposição moderada ou pequena a produtos altamente tóxicos ou medianamente tóxicos e tem aparecimento mais lento. Os sintomas são subjetivos e vagos, tais como dor de cabeça, fraqueza, mal estar, dor de estômago, sonolência, entre outros.

A intoxicação crônica caracteriza-se por surgimento tardio, após meses ou anos, por exposição pequena ou moderada a produtos tóxicos ou a múltiplos produtos, acarretando danos irreversíveis, do tipo paralisias e neoplasias. (Tabela 4)[38,51]

Tabela 4- Efeitos da Exposição Prolongada a Múltiplos Agrotóxicos

SISTEMA/ÓRGÃO	EFEITO
Sistema Nervoso	Síndrome asteno-vegetativa, polineurite, radiculite, encefalopatia, distonia vascular, esclerose cerebral, neurite retrobulbar, angiopatia da retina
Sistema respiratório	Traqueíte crônica, pneumofibrose, enfisema pulmonar, asma brônquica
Sistema cardiovascular	Miocardite tóxica crônica, insuficiência coronária crônica, hipertensão, hipotensão
Fígado	Hepatite crônica, colecistite, insuficiência hepática
Rins	Albuminúria, nictúria, alteração do clearance da uréia, nitrogênio e creatinina
Trato gastrointestinal	Gastrite crônica, duodenite, úlcera, colite crônica (hemorrágica, espástica, formações polipóides), hipersecreção e hiperacidez gástrica, prejuízo da motricidade
Sistema hematopoiético	Leucopenia, eosinopenia, monocitose, alterações na hemoglobina
Pele	Dermatites, eczemas
Olhos	Conjuntivite, blefarite

Fonte: [24]

As intoxicações devem levar em conta fatores como:

- a) *Características do produto*: características toxicológicas, forma de apresentação, estabilidade, solubilidade, presença de contaminantes, presença de solventes, etc.
- b) *Características do indivíduo exposto*: idade, sexo, peso, estado nutricional, escolaridade, conhecimento sobre os efeitos e medidas de segurança, etc.
- c) *Condições de exposição*: condições gerais do trabalho, frequência, dose, formas de exposição, etc.

O grupo dos inseticidas organofosforados é responsável pelo maior número de intoxicações e mortes no Brasil, citam-se como pertencentes deste grupo o Folidol, Azodrin, Malanion, Diazinon, Nuvacron, Tamaron e Rhodiatox. Agem como inibidores de enzimas colinesterases, no sistema nervoso central, nos glóbulos vermelhos, no plasma e em outros órgãos, porém não se acumulam no organismo. [5,25]

Os Inseticidas organoclorados, como o Aldrin, Endrin, BHC, DDT, Endossulfan, Heptacloro, Lindane, Mirex, Toxafeno, podem ser absorvidos por via dérmica, via digestiva e respiratória. Devido à grande lipossolubilidade e à lenta metabolização, esses compostos acumulam-se na cadeia alimentar e no tecido adiposo humano. A eliminação se faz pela urina, cabendo destacar também a eliminação pelo leite materno.

Atuam sobre o sistema nervoso central, de que resultam alterações do comportamento, distúrbios sensoriais, do equilíbrio, da atividade da musculatura involuntária e depressão dos centros vitais, particularmente da respiração. Em casos de intoxicação aguda, após duas horas aparecem sintomas neurológicos de inibição, hiperexcitabilidade, parestesia na língua, nos lábios e nos membros inferiores, desassossego, desorientação, fotofobia, estocomas, cefaléia persistente (que não cede aos analgésicos comuns), fraqueza, vertigem, alterações do equilíbrio, tremores, ataxia, convulsões tônico-crônicas, depressão central severa, coma e morte.

Em casos de inalação ou absorção respiratória, podem ocorrer sintomas específicos, como tosse, rouquidão, edema pulmonar, irritação laringotraqueal, rinorréia, broncopneumonia (complicação freqüente), bradipnéia, hipertensão. [4,24]

Os inseticidas piretróides são facilmente absorvidos pelo trato digestivo, pela via respiratória e pela via cutânea. São pouco tóxicos, porém, irritantes para os olhos e mucosas, e principalmente hipersensibilizantes, causando tanto alergias de pele como asma brônquica. [4,5,24]

Os fungicidas que contêm manganês, como o Maneb e o Dithane, podem ocasionar parkinsonismo pela ação no sistema nervoso central. Outro aspecto importante refere-se à

presença de etileno-etiluréia (ETU), já se tendo observado efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos em animais de laboratórios.

As intoxicações por esses compostos freqüentemente ocorrem pelas vias oral e respiratória, podendo também ser absorvidos por via cutânea. Nos casos de exposição intensa provocam dermatite, faringite, bronquite e conjuntivite. [16,24]

Os herbicidas do grupo Dipiridilos, como exemplo o Paraquat, são absorvidos pela ingestão ou através da pele irritada ou lesionada. Provoca lesões hepáticas, renais e fibrose pulmonar irreversível. Em casos graves, a fibrose pulmonar pode levar à morte por insuficiência respiratória em até duas semanas. [24]

O Glifosato causa problemas dermatológicos, principalmente dermatite de contato. Além disso, é irritante de mucosas, principalmente da mucosa ocular. O pentaclorofenol é absorvido pelas vias cutâneas, digestiva e respiratória. Esses compostos possuem na sua formulação impurezas chamadas dioxinas, principalmente a hexaclorodibenzodioxina (DCDD), que é uma substância extremamente tóxica, cancerígena e fetotóxica. [17,24]

Os derivados do ácido fenoxiacético têm dois representantes, o 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) e o 2,4,5 triclorofenoxiacético (2,4,5 T). É bem absorvido pela pele, por ingestão e inalação, podendo produzir neurite periférica e diabetes transitória no período da exposição.

A mistura do 2,4 D com o 2, 4,5 T representa o principal componente do “agente laranja”, utilizado como agente desfolhante na Guerra do Vietnã, responsável pelo aparecimento de cânceres e de mal formações congênitas. [4,16,24]

Quanto aos fumigantes, são bem absorvidos pela via respiratória e menos pela via dérmica. São excelentes irritantes de mucosas.

O brometo de metila causa edema pulmonar, pneumonite química, insuficiência circulatória e perfurações neuropsicológicas, como psicoses e tremores (sintomas extrapiramidais).

A fosfina causa lesões herpéticas, por alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. Provoca edema pulmonar e arritmia cardíaca.

Os raticidas são absorvidos por via oral. São anticoagulantes, inibindo a formação da protombina. Assim, promovem hemorragias em diversos órgãos. [17,24]

IMPACTO DOS DEFENSIVOS AGRÍCOLAS SOBRE OS ALIMENTOS

A contaminação de alimentos por agrotóxicos vem assumindo uma posição bastante relevante na pauta de pesquisas de diversos países. Preocupam-se, principalmente, pela quase inexistência de produtos domésticos livres desses resíduos tóxicos. Os primeiros relatos sobre resíduos de inseticidas organoclorados nos alimentos datam da década de cinquenta. Esses produtos mostram-se altamente persistentes, havendo bioconcentração e bioacumulação na cadeia alimentar, o que resulta em altos teores no corpo humano. [3,21,82]

Os organoclorados, devido a sua maior estabilidade e persistência no ambiente, devem ser considerados os mais perigosos e problemáticos dos componentes orgânicos, deixando resíduos tóxicos em quase todos os alimentos em que são utilizados, portanto os alimentos são a principal fonte de contaminação pelos organoclorados. Calcula-se que 90% do DDT ingerido pelo homem provenha dos alimentos. A água e o ar contribuem com os outros 10%. [84]

Muitos países têm estabelecido limites de tolerância para resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal e origem animal. O Decreto 4074/02 [84], no seu artigo 1º, XXI, considera Limite Máximo de Resíduo (LMR) a quantidade máxima de resíduos de agrotóxicos, expressa em ppm ou mg.Kg^{-1} , permitida em produto alimentar estando este no estágio de transporte, armazenamento, industrialização e comercialização. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como órgão que participa do Sistema de Registro de Agrotóxicos, componentes e afins, realiza a avaliação toxicológica e de risco, estabelecendo os LMRs para a cultura agrícola a qual se destina a substância tóxica. [6,84]

Para o cálculo da tolerância considera-se a ingestão diária aceitável e o teor de resíduo presente no alimento. A ingestão diária aceitável exprime a quantidade de um biocida, que pode ser ingerido diariamente pelo homem sem que apresente sinais clínicos de advertência[24]

A carência, que é o período estabelecido entre a última aplicação do agrotóxico e a colheita do produto, tem alta importância na segurança quanto à presença de resíduos abaixo dos limites de tolerância permitidos. A falta de conhecimentos por parte da maioria dos agricultores e a ausência de orientação técnica são fatores que contribuem para o desrespeito aos prazos de carência e como consequência, o aparecimento de níveis de resíduos acima dos limites toleráveis nos alimentos.[17,25,59]

No âmbito do comércio internacional, os países do terceiro mundo que são exportadores de alimentos para países desenvolvidos, têm enfrentado uma série de

dificuldades como impedimento de venda ou devolução dos produtos, devido aos mesmos apresentarem limites acima dos toleráveis pelos países importadores. Estes estão periodicamente revisando e atualizando suas legislações a respeito de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. [12,18,25]

Deve-se lembrar que desde os anos 70, há um programa de ação do governo coordenado pelo Ministério da Agricultura: Produção Integrada de Frutas (PIF), o qual consiste no uso de técnicas voltadas à produção de alimentos de melhor qualidade, garantindo a utilização mínima de produtos agrotóxicos, diminuindo, assim, os efeitos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde das pessoas.[85]

No contexto do controle destas substâncias no Brasil, a ANVISA iniciou em 2001 um projeto de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. O projeto foi consolidado no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), por meio da Resolução RDC 119 de 19 de maio de 2003, prestando à população brasileira um serviço de controle da qualidade dos alimentos em relação aos resíduos de agrotóxicos, e disponibilizando ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) uma estrutura de monitoramento do uso de agrotóxicos.

Trata-se de um trabalho complexo em que os laboratórios participantes analisam 92 tipos diferentes de princípios ativos em cada amostra, incluindo aqueles proibidos no país. [82] Esse programa tem como objetivo geral avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que a população consome, fortalecendo a capacidade do Governo em atender a segurança alimentar evitando, assim, possíveis agravos à saúde da população. [84]

Entre 2001 e 2004 o PARA analisou 4 mil amostras de alimentos. Como primeiros resultados, foram detectadas irregularidades no uso dos defensivos. Foi encontrado algum tipo de problema em 28% das amostras. Entre as irregulares 83% dos desvios foram referentes ao uso de produtos não autorizados para determinada cultura. Nos 17% restantes os problemas estavam na quantidade de resíduos de agrotóxicos acima dos níveis permitidos pela legislação. [82]

Em 2010, a Vigilância Sanitária avaliou 2.488 amostras de alimentos, sendo que 28% apresentaram resultado insatisfatório para a presença de resíduos dos produtos. Deste total, 605 (24,3%) amostras estavam contaminadas com agrotóxicos não autorizados. Quando o uso de um agrotóxico é autorizado no país, os órgãos responsáveis por essa liberação, indicam para que tipo de plantação ele é adequado e em que quantidade pode ser aplicado. Em 42

amostras (1,7%), o nível de agrotóxico estava acima do permitido. Em 37% dos lotes avaliados, não foram detectados resíduos de agrotóxicos.

Tabela 5 - Dados Consolidados do PARA 2010

Cultura	Total de Amostras Analisadas	Amostras Insatisfatórias		Insumos Agrícolas encontrados nas Amostras Insatisfatórias
		Total	%	
Abacaxi	122	40	32,8	NA- Ditiocarbamatos, Procloraz, Acefato, Clorpirifós, Dimetoato, Triafós, Bifentrina, Cipermetrina, Esfenvalerato, Lambda-cialotrina, Permetrina, Microbutanil Acima do LMR= Carbendazim
Alface	131	71	54,2	NA- Clorfenapir, Carbendazim, Endolssulfam, Ditiocarbamato, Metomil, Acefato, Clorpirifós, Dimetoato, Metamidofós, Cipermetrina, Deltametrina, Lambda-cialotrina, Fenarimol, Tebuconazol Acima do LMR= Iprodiona, Difenconazol
Arroz	148	11	7,4	NA- Clorpirifós, Fenitrotrona, Metamidofós, Ciproconazol
Batata	145	0	0,0	-
Beterraba	144	47	32,6	NA-Carbendazim, Captana, Procimidona, Clorotalonil, Aldicarbe, Acefato, Clorpirifós, Metamidofós, Cipermetrina, Deltametrina, Ciproconazol, Tetraconazol Acima do LMR= Ditiocarbamato
Cebola	131	4	3,1	NA- Endossulfam, Acefato, Fentoato

NA= Não autorizado para a cultura; LMR= Limite Máximo de Resíduo.

Fonte: [6]

Tabela 5 - Dados Consolidados do PARA 2010 (continuação)

Cultura	Total de Amostras Analisadas	Amostras Insatisfatórias		Insumos Agrícolas encontrados nas Amostras Insatisfatórias
		Total	%	
Cenoura	141	70	49,6	NA- Captana, Aldicarbe, Metomil, Acefato, Clorpirifós, Diclorvós, Fenitrotona, Metamidofós, Triazofós, Deltametrina Acima do LMR= Triclorfom
Couve	144	46	31,9	NA- Carbendazim, Tiabendazol, Endossulfam, Iprodiona, Procimidona, Azoxistrobina, Clorotalonil, Clorpirifós, Diazinona, Metamidofós, Cipermetrina, Fempropatrina, Ciproconazol, Difenconazol, Tebuconazol Acima do LMR= Clorfenapir, Acefato, Deltametrina, Lambda-cialotrina
Feijão	153	10	6,5	NA- Metomil, Fenitrotona, Ciproconazol, Miclobutanil Acima do LMR= Cipermetrina, Tebuconazol
Laranja	148	18	12,2	NA- Endossulfam, Procloraz, Metomil, Parationa- Metílica, Profenofós, Beta-cipermetrina, Permetrina, Ciproconazol Acima do LMR= Carbofurano
Maçã	146	13	8,9	NA- Diclorvos, Parationa-metílica, Cipermetrina Acima do LMR=Ditiocarbamato, Metidationa, Deltametrina
Mamão	148	45	30,4	NA- Endossulfam, Iprodiona, Acefato, Dimetoato, Metamidofós, Cipermetrina, Deltametrina, Lambda-cialotrina Acima do LMR= Carbendazim, Difenconazol
Manga	125	5	4	NA- Acefato, Clorpirifós, Diazinona
Morango	112	71	63,4	NA- Clorfenapir, Tiabendazol, Endossulfam, Captana, Folpete, Procloraz, Clorotalonil, Metomil, Acefato, Clorpirifós, Dimetoato, Fosmete, Metamidofós, Parationa-metílica, Pofenofós, Cipermetrina, Deltametrina, Permetrina, Ciproconazol, Miclobutanil Acima do LMR= Carbendazim, Ditiocarbamato
Pepino	136	78	57,4	NA- Endossulfam, Procimidona, Acefato, Clorpirifós, Diclorvos, Dimetoato, Metamidofós, Pirimifós-etílico, Ciflutrina, Permetrina, Fempropatrina Acima do LMR= Ditiocarbamato, Cipermetrina
Pimentão	146	134	91,8	NA- Carbendazim, Endossulfam, Procimidona, Carbofurano, Carbaril, Metomil, Dicofof, Clorpirifós, Dimetoato, Fenitrotona, Metamidofós, Profenofós, Triazofós, Fipronil, Beta-ciflutrina, Beta-cipermetrina, Cipermetrina, Esfenvalerato, Lambda-cialotrina, Permetrina, Fempropatrina, Fenarimol, Propargito, Ciproconazol Acima do LMR= Acefato, Deltametrina, Tebuconazol.
Repolho	127	8	6,3	NA- Cabendazim, Procimidona, Diazinona, Metamidofós
Tomate	141	23	16,3	NA- Pirazofós, Clorpirifós, Diclorvós, Metamidofós Acima do LMR= Permetrina
TOTAL	2488	694	508,8	

NA= Não autorizado para a cultura; LMR= Limite Máximo de Resíduo.

Fonte: [6]

O relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) concluiu que os resultados insatisfatórios devido à utilização de agrotóxicos não autorizados resultam de dois tipos de irregularidades, a aplicação de um agrotóxico não autorizado, mas registrado no Brasil para uso permitido em outras ou aplicação de um produto banido do país que não possui registro.[86]

O pimentão lidera a lista dos alimentos com grande número de amostras contaminadas por agrotóxico. Em quase 92% das amostras foram identificados problemas. Em seguida, aparecem o morango e o pepino, com 63% e 57% das amostras com avaliação ruim. Em uma amostra de pimentão, foram encontrados sete tipos diferentes de agrotóxicos irregulares. A batata foi o único alimento sem nenhum caso de contaminação nas 145 amostras analisadas.[84]

A agência reguladora constatou também que, das 684 amostras consideradas insatisfatórias, 208 (30%) tinham resíduos de produtos que estão sendo revistos pela Vigilância Sanitária ou serão banidos do país, como é o caso do endossulfan e do metamidófos, que tem sua proibição no Brasil prevista para 2013 e 2014. [86]

Em consulta pública a Agência propos banir o parationa metílica e o forato do mercado brasileiro. O primeiro é um inseticida usado no controle de pragas nas plantações de algodão, alho, arroz, batata, cebola, feijão, milho, soja e trigo. Já o segundo é autorizado para o combate de parasitas e insetos nas lavouras de algodão, amendoim, café, feijão, milho, tomate e trigo. Os dois produtos já são proibidos na Comunidade Europeia e utilizados com restrições nos Estados Unidos. [87] Em 2010, a Anvisa recomendou o banimento do agrotóxico triclorfom e a restrição de uso para o fosmete, propondo a alteração de sua ingestão diária aceitável (IDA) de $0,01 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ p.c.}$ para $0,005 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ p.c.}$ e sua classificação toxicológica passando para extremamente tóxico, com sua aplicação somente por meio de trator. O metamidofós já teve seu uso proibido na China, Paquistão, Costa do Marfim, Japão, Indonésia, Samoa, Estados Unidos, União europeia, entre outros, quanto ao triclorfom seu uso foi proibido na Comunidade Europeia. [6]

Segundo a ANVISA, existem 431 ingredientes ativos autorizados para serem utilizados como agrotóxicos no Brasil de acordo com a cultura específica, sendo que 14 desses ingredientes estão em reavaliação toxicológica devido ao alerta de perigo desses compostos para a saúde humana. [6]

No Brasil a ANVISA adota o padrão internacional para autorizar o uso de defensivos agrícolas. Para registrar fertilizantes, herbicidas e pesticidas, os fabricantes de agrotóxicos

tem de apresentar estudos mais detalhados à Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O padrão de exigência para receber autorização para venda e aplicação desse tipo de insumo no cultivo de alimentos segue metodologias semelhantes às adotadas internacionalmente. Antes de um agrotóxico ser empregado na lavoura, ele precisa ser registrado junto ao Ministério da Agricultura. Como a pasta avalia apenas a eficácia agrônômica, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) também participa, avaliando impactos sobre o ambiente. [88]

A ANVISA levanta questões que dizem respeito principalmente a impactos sobre a saúde humana da adoção dos insumos. Com essas regras, a agência pretende que haja mais segurança na análise de resíduos de agrotóxicos. [88]

A principal referência para receber a autorização vem da própria empresa responsável pelo desenvolvimento do produto. Quando as pesquisas são realizadas de maneira insatisfatória, é necessário repetir estudos, o que torna a liberação mais cara e demorada.

As modificações nas normas dizem respeito a procedimentos técnicos, como critérios para preservação de amostras, apresentação de estudo de estabilidade de agrotóxico na cultura e curva de dissipação. Elas seguem padrões do programa da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial de Saúde (OMS), chamado Codex Alimentarius. [88]

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS

A análise de defensivos agrícolas se divide em três etapas básicas: extração do analito, limpeza do extrato obtido (se necessário) e detecção e quantificação deste por meio de equipamentos. As técnicas de extração largamente usadas para estes compostos são: soxhlet [20,65], shake-flaske [18,35], ultra-som [37,39] e mais recentemente extração por fluído supercrítico (SFE) [31,44], extração assistida por microondas (MAE)[48] e extração por solvente acelerado (ASE) [1] comumente difundidas por não serem tão caras, pois, geralmente utiliza-se para a extração dos insumos das amostras, solventes como acetona, diclorometano, acetato de etila, acetonitrila, n-hexano e ciclohexano, adicionando-se sulfato de sódio anidro para eliminação de água, se necessário.[45,70]

O momento crítico é geralmente o de limpeza do extrato, ou seja, realiza-se uma coextração do material lipídico, por exemplo, ácidos graxos, esteróis e glicerídios, pois estes compostos são incompatíveis com alguns sistemas como o cromatógrafo a gás. Nessa etapa vários métodos são testados incluindo extração líquido-líquido (ELL), permeação com gel

cromatografico (PGC) também chamada de exclusão cromatografica por tamanho, cromatografia de adsorção sobre diferentes adsorventes (sílica, alumina ou florisil) ou SPE (extração em fase sólida) e precipitação em baixa temperatura [14,47,60,64,66] que são utilizadas, na maioria das vezes, nesta etapa final por apresentarem um elevado custo em comparação com as demais técnicas mencionadas anteriormente. No caso de uma extração destes compostos em frutas e vegetais, as técnicas mais utilizadas são extração com solvente, extração com fluido supercrítico e dispersão de matriz em fase sólida. Na literatura, o solvente mais indicado para este procedimento nestas amostras é o acetato de etila em presença de sulfato de sódio anidro ou acetona, seguida por separação com diclorometano e éter de petróleo.[7,36,69]

MÉTODOS DE ANÁLISE DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS

Os equipamentos mais frequentemente usados para a análise de defensivos agrícolas em alimentos é o Cromatografo à Gas e o Cromatografo Líquido, os quais apresentam um limite de detecção que varia de acordo com o detector empregado, características da amostra e do composto a ser analisado. [3,22,27,33,83]

Dentre os diferentes detectores que podem ser utilizados para CG tem-se: DCE (detector de captura de elétrons) que apresenta como princípio de funcionamento a supressão de um fluxo de elétrons lentos causado pela sua absorção por espécies eletrofilicas. O decréscimo na corrente elétrica é proporcional à concentração do analito. Este detector é bastante eficiente na análise de organoalogenados: é sensível, seletivo e não destrutivo, porém como desvantagens apresenta a necessidade de trabalhar com um gás de arraste puro e seco (livre de oxigênio e água) e um controle rigoroso da temperatura do detector. Em publicações de análises quantitativas de defensivos agrícolas em Ginseng o nível de recuperação obtido foi em torno de 90 a 92% com GC/ECD [30,34,36,57]; Já o detector de ionização em chama (DIC) tem seu funcionamento baseado na formação do íon a partir da queima de um composto orgânico numa chama constituída de hidrogênio e oxigênio com consequente condução de corrente elétrica. Portanto, apenas compostos que sofrem combustão podem ser detectados. Embora seja seletivo para substâncias que contém ligações carbono-hidrogênio, na prática é considerado praticamente universal, extremamente sensível para hidrocarbonetos, além de sofrer baixa influência de temperatura. Por outro lado, é um detector destrutivo e exige o uso de amplificadores, pois a corrente elétrica gerada apresenta baixa

magnitude[9,34]; O detector de nitrogênio e fósforo (NPD) é similar ao DIC, porém com uma modificação: dentro do coletor de íons é inserida uma pérola de sal de metal alcalino (RbCl ou KCl) num fio de platina. Deste modo, apenas compostos contendo fósforo e nitrogênio geram sinal. Além disso este detector apresenta um elevado custo, é destrutivo, possui estabilidade regular e requer um controle rigoroso do fluxo de gases. Embora seja seletivo para compostos fosforados e nitrogenados atualmente não é muito empregado uma vez que tais compostos podem ser facilmente detectados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector UV. Em pesquisas de resíduos de defensivos agrícolas em vinho observou-se limites de detecção $\leq 2\mu\text{g.kg}^{-1}$ para organofosforados e 10-20 $\mu\text{g/kg}$ para organonitrogenados em GC/NPD.[7,11,15] O detector fotométrico de chama (DFC) baseia-se na mistura do efluente da coluna com oxigênio e sua posterior queima, causando um aumento na intensidade da chama, devido a fragmentação das moléculas contidas na amostra. Este aumento causa um sinal, o qual é registrado pelo equipamento[10,34]. Estudos de detecção e quantificação de resíduos de organofosforados em óleo de oliva demonstraram recuperação de 78 a 95% para diferentes espécies de defensivos agrícolas desta classe [22].

Na cromatografia líquida (LC), os detectores utilizados com sucesso na análise de defensivos agrícolas são: Detector por absorvância no ultravioleta e no visível (UV-Vis) que apresenta funcionamento baseado na absorvância da luz por parte da amostra, ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética (desde a região do ultravioleta até o infravermelho) em um dado comprimento de onda fixo [71,72]; Já o detector de arranjo de diodos (DAD) apresenta funcionamento similar ao do UV com a possibilidade de realizar análises em diferentes comprimentos de onda, pois, a luz da fonte passa pela cela do detector e se dispersa por uma grade holográfica, focalizando-se os comprimentos de onda resultantes sobre uma fila de fotodiodos. Logo, toda a informação pode ser armazenada sem a interrupção do fluxo da fase móvel para registrar o espectro de um dado componente.[63,71,72] Em estudos para a determinação de resíduos de clofentezine com estes detectores obteve-se uma recuperação de 81 a 96% dos analitos em amostras de frutas.[72]

Por fim, temos o MS ou EM (espectrômetro de massas), o qual não é um detector como os mencionados anteriormente, mas quando acoplado ao cromatografo à gás ou cromatografo líquido se torna um equipamento útil para a análise de inúmeros compostos orgânicos incluindo os defensivos agrícolas, pois permite a separação, identificação, quantificação e confirmação de um grande número destes compostos [19,22,27,33], uma vez que o espectro de massas obtido para o composto de interesse pode ser comparado a um

banco de dados do próprio instrumento. O espectrômetro de massas como detector de um cromatógrafo oferece várias vantagens. A mais importante delas é fornecer informações sobre a estrutura química do composto que está sendo eluído da coluna cromatográfica, apresentando também grande seletividade e sensibilidade. [21,22,32,41]

As controversias quanto ao uso do GC se dá pelo fato de que, muitas vezes, ele não apresenta adequada sensibilidade ou seletividade para detectar certos tipos de defensivos agrícolas altamente polares, solúveis em água, termolábeis e pouco voláteis. Para estes casos emprega-se, na maioria das vezes, a cromatografia líquida [11,15,26] que acoplada ou não ao espectrômetro de massas (LC-MS), ou na forma de LC-MS/MS, demonstra ser uma poderosa técnica analítica com excelente nível de desempenho para a identificação e quantificação de resíduos de defensivos agrícolas termolábeis e não-voláteis em alimentos. [50,66] Nos estudos realizados pelo Laboratório Nacional de Qualidade da Água em Denver, visando a quantificação de herbicidas em amostras de água, tal técnica demonstrou ser robusta podendo ser usada para concentrações na ordem de 10ng/L e apresentando recuperações de 56 a 86%.

Por fim, uma outra técnica de detecção destes compostos em alimentos é a Eletroforese Capilar acoplada ao Espectrômetro de Massas (EC-MS). Seu princípio se baseia na detecção de baixos níveis de resíduos polares, tornando-a extremamente seletiva, sensível e vantajosa, devido ao baixo tempo de análise, o que representa um aumento na reprodutibilidade em uma análise quantitativa com concentrações da ordem de partes por bilhão (ppb). [29,46,61] Há exemplos de análises de herbicidas em água onde a porcentagem de recuperação foi de aproximadamente 50%, o que é bastante aceitável para uma análise quantitativa em baixos níveis de concentração. [29,32]

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]ADOU, K., BONTOYAN, W.R., SWEENEY, P.J., J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 4153.
- [2]AGROW'S top25-1997 edition.PSB Publicationms LTDA,1997.
- [3]ALAN, R. C., REYNOLDS, S., REYNOLDS, H., Unit-to-unit variability of pesticide residues in fruit and vegetables. Food Additives and Contaminants 19(2005) 733-747.
- [4]ALAVANJA MCR, HOPPIN J.A., KAMEL F.2004 Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity.Annu. Rev. Public Health 25:157-197.
- [5]ALMEIDA,W.F.Perigos e Precauções na Utilização de Agrotóxicos. Revista da Organização Mundial da Saúde, agosto-setembro de 1984.
- [6]Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informações do setor. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em 10. dez. de 2011.
- [7]AVRAMIDES, E. J., LENTZA-RIZOS, CH., MOJASEVIC, M. Determination of pesticide residues in wine using gas chromatography with nitrogen-phosphorus and electron capture detection. J. F. Add. Contam.20 (2003)699-706.
- [8]BAIRD, Colin. Química Ambiental. Trad. Maria Angeles Lobo Recio e Luiz Carlos Marques Carrera.-2ªed- Porto Alegre: Bookman,2002.
- [9]BASHEER, C., LEE, H.K., OBBARD, J.P., J. Chromatogr. A 968 (2002) 191.
- [10]BOLLES H.G., DIXON-WHITE H.E., PETERSON R.K., TOMERLIN J.R., DAY E.W., WILL F, KRUGER E., J.Agric. Food Chem. 47 (1999) 858.
- [11]BOYD-BOLAND, A. A., and PAWLISZYN, J., 1996, Solid-phase micro-extraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of alkylphenol ethoxylate surfactants in water. Analytical Chemistry,68, 1521-1529.
- [12]BULL,David; Hathoway Pragas e Venenos: Agrotóxicos no Brasil e no Terceiro Mundo. Petrópolis, R.J. Ed Vozes/Oxfam/Fase,1986.
- [13] Catholic Institute for International Relations "Biodiversity-What's at stake?". Londres, CIIR,1993.
- [14]CHEN, S., GFRERER, M., LANKMAYR, E., QUAN, X., YANG, F., Chromatogr. 58 (2003)631.
- [15]CHEN, J., and PAWLISZYN, J., 1995, Solid-phase micro-extraction coupled with high performance liquid chromatography. Analytical Chemistry,67, 2530-2533.
- [16]COLOSSO C., TIRAMANI M. MARANI M. 2003. Neurobehavional effects of pesticides: state of the art. Neurotoxicology 24:577-591.
- [17]Compêndio de Defensivos Agrícolas -7ªed. São Paulo: Andrei Editora Ltda,2005.

- [18]COOK, J., BECKETT, M.P., RELIFORD, B., HAMMOCK, W., ENGEL, M., J. AOAC Int. 82 (1999) 1419.
- [19]CRUZ SICILIA, A.D., GARRIDO FRENICH, A., GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. J., MARTINEZ VIDAL, PLAZA BOLAÑOS, P.,J.Anal. Chem.77(2005) 4071.
- [20]DOONG, R., LEE, C., Analyst 124 (1999)1287.
- [21]DUGO, G., BELLA, G. D., TORRE, L. L., SAITTA, M. Rapid GC-FPD determination of organophosphorus pesticide residues in Sicilian and Apulian olive oil. Food Control. 16(2005) 435-438.
- [22]FERRER, C., GÓMEZ, M.J.,GARCÍA-REYES,J.F., FERRER,I., THRUMAN, E. M., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Determination of pesticide residues in olives oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, J. Chrom. A.1069(2005)183-194.
- [23]GALLO,M. & LAWRYK,N. Organic Phosphorus Pesticides In Hayes, W.J, LAWS, E.R. Handbook of Pesticide Toxicology. San Diego, California, USA. Academic Press, INC.,2,1991,p.917-1124.
- [24]GARCIA, A. Pesticide exposure and women's health. Am J Ind Med 2003; 44:584-94.
- [25]GARCIA E.G.1996. Segurança e Saúde no trabalho rural com agrotóxicos: contribuição para uma abordagem mais abrangente. Dissertação de mestrado. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [26]GARCIUNUÑO R.M., RAMOS L, FERNÁNDEZ-HERNANDO.P., CÁMARA C,J.Chromatogr. A 1043 (2004) 225.
- [27]GARRIDO FRENICH, A. GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. J., ARREBOLA,F.J., MARTINEZ VIDAL,J.L.Anal. Chem.77(2005) 4640.
- [28]COMIN, Alexandre & MULLER, Geraldo (1986).Crédito, modernização e atraso. São Paulo. CEBRAP (Cadernos CEBRAP, Nova Série, 6).
- [29]HUDAN S., REZA A., STANLEY K. Quantitative Analysis of imazamox herbicide in environmental water sample by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry.Jornal of Chromatography A, 1036 (2004) 217-222.
- [30]ISMAIL S.M.M, ALI H.M., HABIBA R.A., J.Agric. Food Chem. 41 (1993) 610.
- [31]JUHLER, R. K.,Analyst 123(1998) 1551.
- [32]JUHLER, R. K.,J. Chromatogr.A 786 (1997) 145.

- [33]KAWATA,K., ASADA, T., OIKAWA, K. Determination of pesticides in compost by pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1090 (2005) 10-15.
- [34]LANÇAS, F.M. Cromatografia em fase gasosa. Editora Acta- São Carlos, 1993.
- [35]LEHOTAY, S.J., ELLER, K.I., J. AOAC Int.78 (1995) 821.
- [36]LI, Y., KIM,M.R, LEE, K. B., KIM, I. S., SHIM, J. H. Determination of procymidone residues in ginseng by GC-ECD and GC-MS equipped with a solvent-free solid injector. J. Food Control. 11.001 (2005).
- [37]LINO, C.M., SILVEIRA, M.I.M, J. Chromatogr. A 769 (1997)275.
- [38]LOPEZ-CERVANTES, M., TORRES-SANCHEZ, L., TOBIAS, A., LOPEZ-CARRILLO, L. Dichlorodiphenyldichloroethane burden and breast cancer risk: A meta-analysis of the epidemiologic evidence. Environ Health Perspect 2004; 112:207-14.
- [39]MANIRAKIZA, P., COVACI, A., SCHEPENS, P., Chromatographia 52(2000) 787.
- [40]MARTINS, Paulo R."Ecological Reconstruction of the Industrial Society" Cadernos da FNS n.2 São Paulo, Julho de 1998.
- [41]MASTOVSKA, K., LEHOTAY, S.J.,J. Chromatogr. A 1000 (2003)153.
- [42]MORAGAS, W. M., SCHNEIDER, M. O. Biocidas: Suas propriedades e seu histórico no Brasil. Caminhos de Geografia 3(10)26-40,set/2003.
- [43]NAIDIM, Leane C., Crescimento e Competição na Indústria de Defensivos Agrícolas no Brasil. Rio de Janeiro, Tese de Mestrado, CPDA/URFJ. p 15-16
- [44]NAM, K.S., KING, W., J. Agric. Food Chem. 42 (1994) 1469.
- [45]OKIHASHI, M., OBANA, H., HORI, S., Analyst 123(1998) 711.
- [46]OTSUKA, K., SMITH, C.J., GRAINGER, J., BARR,J.R., PATTERSON D.G., TANAKA, N., TERABE, S. J. Chromatogr. A 817(1998) 75.
- [47]PAGLIUCA, G., GAZZOTTI, T., ZIRONI, E., STICCA, P., J. Chromatogr. A 1071(2005) 67.
- [48]PASTOR, A., VÁZQUEZ, E., CISCAR, R., DE LA GUARDIA, M., Anal. Chim. Acta 34(1997) 241.
- [49]PAULINO, Sônia R. A Indústria de Pesticidas Agrícolas no Brasil: Dinâmica Inovativa e Demandas Ambientais. Campinas, DPC/IG, 1993, Tese de Mestrado, p-23.
- [50]PERRETE D., GENTILL A, MARCHESE S., SERGI M., ASCENSO G.D.,J.AOAC Int.85 (2002) 724.

- [51]POGODA, J., PRESTON-MARTIN, S. Household pesticides and risk of pediatric brain tumors [electronic version]. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 1214-20.
- [52]RIBEIRO, R.L.D. Resíduos de Agrotóxicos e Piretróides nos Alimentos e sua relação com doenças no homem. Um enfoque agrônômico, político e estratégico. Informações do setor. Disponível em <<http://www.planetaorganico.com.br/>>. Acessado em 09/02/2006.
- [53]RISSLER, Jane and Mellon, Margaret. "The Ecological Risk of Engineered Crop. Cambridge, Massachusetts, MIT Press, 1996.
- [54]RODRIGUES, ARLETE M., Org. Meio Ambiente-Ecos da Eco. Campinas, Unicamp/IFCH,1993.
- [55]ROSATI, J.L.R. & FERREIRA M.C.Pancreatite em Intoxicações por "chumbinho". *Arquivo Brasileiro de Medicina*,72(1):9-11,1998.
- [56]SANBORN M., COLE D., KERR K., VAKIL, C., SANIN, L., BASSIL, K. Pesticides literature review. Toronto, Ontario, Canada: Ontario College of Family Physicians, 2004.
- [57]SANNINO A., BOLZONI L., BANDINI M., J.*Chromatogr.A* 1036 (2004) 161.
- [58]SILVA,J.M.etal1999.Familiar agriculture :production process and health conditions,p.40 *Anais do XV Congresso Mundial sobre Segurança e Saúde no Trabalho*, São Paulo.
- [59]SILVA,J.M.etal2000.Processo de trabalho e condições de exposição aos agrotóxicos: o caso dos horticultores de Baldim, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- [60]SIMPLÍCIO,A.L.,and BOAS, L. V., 1999,Validation of a solid phase micro-extraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *Journal of chromatography A*, 833, 35-42.
- [61]SONG, X., BUDDE, W.L., J. *Chromatogr. A*829 (1998) 327.
- [62]STEWART, P., PRINCE, J., COLT, J., WARD, M. Amethod for assessing occupational pesticide exposures of farmworkers. *Am J Ind Med* 2001; 40: 561-70.
- [63]TOPUZ S., OSAN G., ALPERTUNGA B., *Food Control*. 16 (2005) 87.
- [64]VOLANTE,M., CATTANEO, M., BIANCHI, M., and ZOCCOLA, G., 1998, Some applications of solid-phase microextraction in the analysis of pesticide residues in food. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, B33, 279-292.
- [65]WALTERS, S. M., *Anal. Chim. Acta* 236 (1990) 77.
- [66]WANG,Z.,HENNION,B., URRUTY, L., MONTURY, M.Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography: a complementary technique to solid-

phase microextraction-gas chromatography for the analysis of pesticide residues in strawberries . Food Additives and Contaminants, 2000;v.17;11:915-923.

[67]WARE, G. W., WHITRACRE, D. M. The Pesticide Book.-6^{ed}. Ohio:MeisterMedia Worldwide,2004.

[68]WARGO, John Our children`s Toxic Legacy- How Science and Law Fail to Protect us From Pesticides. Yale University Press,1996.

[69]ZHANG,Z., YANG,M.J., and PAWLISZYN,J.,1994,Solid-phase microextraction.Analytical Chemistry,66,844A-853A.

[70]ZHUANG, W., MCKAGUE, B., REEVE, D., CAREY, J., Chemosphere 54 (2004) 467.

[71]COLLINS,C.H.,BRAGA, G. L. BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. Editora Unicamp: Campinas,2006.

[72]NAVICKIENE, S. , RIBEIRO, M.L. A simplifiede procedure for determination of clofentezine residues em fruits by liquid chromatography with UV detection. Quimica Nova v.27, n.5, São Paulo,2004.

[73]VICENTE et al. O Uso de Agrotóxicos em Culturas Seleccionadas da Agricultura Paulista. Informações Econômicas, São Paulo, v. 32, n. 5 (maio), pp. 34-43, 2002.

[74]SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA – SINDAG . Disponível em: <http://www.sindag.com.br/new/setor/interna.php?cod=4>. Acesso em 05. 11 de 2008.

[75]ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA – ABIQUIM. Disponível em: <http://abiquim.org.br> Acesso em 05.11 de 2008.

[76]ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL – ANDEF (). Utilização dos defensivos agrícolas no Brasil: análise de seu impacto sobre o ambiente e a saúde humana. Disponível em: http://andef.com.br/util_defensivos/capitulo01.htm. Acesso em 11.11 de 2008.

[77]INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: <http://sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 11.11 de 2008.

[78]LACERDA, L. Logística Reversa- Uma visão sobre os conceitos básicos e as práticas operacionais. CEL, Centro de Estudos de Logística. COPPEAD-UFRJ Disponível em: <http://www.cel.coppead.ufrj.br/fr-rev.htm> . Acesso em 22. nov. 2004.

[79]VERGARA, S. C. Projetos e Relatórios de Pesquisa em Administração. 5 ed. São Paulo: Atlas, 2004.

- [80] RIBEIRO, L. Brasil aumenta vendas de agrotóxicos. Folha de São Paulo. Disponível em: <http://www.anapa.com.br/principal/index.php>. Acesso em 04. Ago. 2011.
- [81] FERNANDES, V. Venda de agrotóxicos cresce no Brasil, lucro no setor tende a superar o dos EUA. Radioagência NP. Disponível em: <http://www.radioagencianp.com.br/9994-venda-de-agrotoxico>. Acesso em 11. Out. 2011.
- [82] ANVISA. *Resíduos de agrotóxicos em alimentos*. Rev. Saúde Pública, 40 No. 2, 361-3, 2006.
- [83] COLLINS, C.H. Introdução a métodos cromatográficos. Editora UNICAMP, Campinas, 1997.
- [84] ANVISA; INCQS; Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. *Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Relatório anual* 04 de junho de 2001 a 30 de junho de 2002.
- [85] GARRIDO, L.R. *Produção integrada de frutas*. Disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/viticultura/prodint.html>
- [86] PIMENTEL, C. *Anvisa identifica uso de pesticidas proibidos*. Agência Brasil. Publicado em 08. dez. de 2011. Disponível em: <http://tribunadonorte.com.br/noticia/anvisa-identifica-uso-de-pesticidas-proibidos/205131>. Acesso em: 04. Jan. de 2012.
- [87] Redação da Rede Brasil Atual. *Agência quer banir dois produtos cujo uso já foi proibido na Europa*. Disponível em: <http://www.redebrasilatual.com.br/temas/ambiente/2012/01/anvisa-adota-padrao-internacional-para-autorizar-uso-de-agrotoxicos> com base em O Globo. Disponível em: <http://oglobo.globo.com/saude/anvisa-abre-consulta-publica-propondo-proibir-agrotoxicos-3750421#ixzz1l5IuZvWW>. Publicado: 24 jan. de 2012. Acesso em 02. fev. de 2012.
- [88] Redação da Rede Brasil Atual. *Anvisa adota padrão internacional para autorizar uso de agrotóxicos*. Publicado em: 23 jan. de 2012. Disponível em: <http://www.redebrasilatual.com.br/temas/ambiente/2012/01/anvisa-adota-padrao-internacional-para-autorizar-uso-de-agrotoxicos>. Acesso em 02. fev. de 2012.

Capítulo 2

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE MULTIRESÍDUOS DE QUATRO PESTICIDAS POR LC-MS/MS UTILIZADOS NA CULTURA DE BATATA

Silva, L. M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciências dos Alimentos

Capítulo 2

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE MULTIRESÍDUOS DE QUATRO PESTICIDAS POR LC-MS/MS UTILIZADOS NAS CULTURAS DE BATATA E FEIJÃO

Silva, L. M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciências dos
Alimentos

RESUMO

O uso de métodos de análises de multiresíduos de agrotóxicos são motivo de busca e aplicação nos laboratórios, em razão de sua utilidade e necessidade para ganhos de rendimento e de economia. Neste trabalho, foram conduzidos ensaios de recuperação de pesticidas organofosforados (acefato e metamidofós) e neonicotinóides (acetamiprido e thiamethoxan) em amostras de batata e feijão. Os pesticidas foram extraídos em acetato de etila, sob homogenização e o “clean-up” foi realizado por GPC (Gel Permeation Chromatography), diluídos em solvente e injetados no sistema LC-MS/MS. A técnica analítica de quantificação e confirmação utilizada foi a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas com ionização por Electrospray no modo positivo. A validação do método multiresíduo foi submetida em conformidade com a ANVISA, o INMETRO e atendendo os padrões estabelecidos pela norma ISO/IEC 17025 da Legislação Brasileira. Para quantificação dos analitos utilizou-se as curvas analíticas dos princípios ativos, nas concentrações que variaram de 0,005 a 1,0 ng.µL⁻¹ na amostra. Para o estudo da recuperação, os pesticidas foram avaliados em três níveis, correspondentes a níveis de fortificação de 0,02

a $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$. Os resultados das recuperações apresentaram níveis aceitáveis, na faixa de 98,86% a 105,04% para amostras de batata e 99,85% a 103,9% para as amostras de feijão, com precisão satisfatória e repetibilidade expressa como CV entre 0,28% e 2,8% para batata e 0,26% e 2,8% para feijão. Os limites de quantificação do método variaram de 5,1 a 5,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para as amostras de batata e de 2,97 a 3,24 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para as amostras de feijão e os limites de detecção do método, de 4 a 4,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para ambas. Os limites de quantificação do método atenderam aos limites máximos de resíduos da Legislação Brasileira em vigor. As amostras utilizadas no estudo, não apresentavam resíduos dos pesticidas analisados, sendo assim, o método demonstrou bons resultados para todos os parâmetros de avaliação, tendo o mesmo atendido a todos os critérios exigidos na Legislação Brasileira.

ABSTRACT

The use of methods of analysis of pesticide multiresidue cause for search and application laboratories, due to its usefulness and need for efficiency gains and savings. In this work, experiments were conducted recovery of organophosphorus pesticides (acephate and methamidophos) and neonicotinoids (Acetamiprid and thiamethoxan) in samples of potato and beans. Pesticides were extracted in ethyl acetate, under homogenization and "clean-up" was performed by GPC (Gel Permeation Chromatography), diluted in solvent and injected into the LC-MS/MS system. The analytical technique for quantification and confirmation was used liquid chromatography coupled to mass spectrometry with electrospray ionization in the positive mode. The validation of multiresidue method was submitted in accordance with ANVISA, INMETRO and meeting the standards set by ISO / IEC 17025 the Brazilian legislation. For quantification of analytes we used the standard curves of the active ingredients in concentrations ranging from 0.005 to 1.0 $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$ on sample. For the study of recovery, pesticides were evaluated in three levels, corresponding to the fortification levels from 0.02 to 0.5 mg.kg^{-1} . The results showed acceptable levels of recoveries in the range of 98.86% to 105.04% for potato samples and 99.85% to 103.9% for samples of beans, with satisfactory accuracy and repeatability expressed as CV between 0.28% and 2.8% for potato and 0.26% and 2.8% for beans. The limits of quantification of the method ranged from 5.1 to 5.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and detection limits of the method, 4 to 4.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The limits of quantification of the method met the maximum residue limits of Brazilian legislation in force. The samples used in the study, showed no residues of pesticides analyzed, so the method has

shown good results for all evaluation parameters having the same met all the criteria required by Brazilian law.

1. INTRODUCAO

A regulamentação quanto ao uso de defensivos agrícolas está baseada não só no controle das classes químicas dos princípios ativos autorizados para uso, mas também no estabelecimento do nível de referência, que corresponde à quantidade máxima de resíduo (LMRs) de determinado agrotóxico que pode ser aceita em cada alimento, quando destinado ao consumo humano. [1,2,3,4]. Em tese, o cumprimento destes limites máximos de resíduos permite preservar a saúde do consumidor da ação tóxica destes produtos. Neste sentido, diversos órgãos nacionais e internacionais estão encarregados de estabelecer tais limites e monitorar o cumprimento, por parte dos produtores e fornecedores, das exigências necessárias para o fornecimento destes produtos aos consumidores. [2,3,5]

A garantia da qualidade e inocuidade de grande parcela dos alimentos ofertada ao consumo é possibilitada pelo controle de resíduos, o qual é realizado por sistemas de monitoramento viabilizados pelo governo e executados em laboratórios credenciados pelo mesmo. A busca pelo desenvolvimento de metodologias mais simples e que abranjam a análise simultânea de um maior leque de analitos, capazes de detectar, identificar e quantificar componentes residuais em amostras complexas como alimentos é cada vez maior. [6,7,8,9]

Para a realização de programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, os métodos multiresíduos são ideais pela possibilidade de determinar, simultaneamente, diversos tipos de pesticidas em uma única extração. [10,11,12] Consequentemente, torna-se necessário um trabalho de desenvolvimento analítico e de validação dos métodos de análise quantitativa, a fim de determinar o desempenho destes de acordo com os principais critérios exigidos na Legislação, dentre estes, especificidade, seletividade, linearidade, limites de detecção, limites de quantificação, robustez, exatidão e precisão, sendo os dois últimos parâmetros os que possibilitam estimar os erros e as variações embutidos no processo analítico. [13,14]

No presente trabalho, realizou-se a validação de um método multiresíduo para análise de 4 analitos usando uma técnica de alto poder de concentração e limpeza do extrato o GPC (Gel Permeation Chromatography) e detecção e quantificação por LC-MS/MS para amostras de batata e feijão. Segue o objetivo de validar um procedimento analítico simples com

acuracia e rentabilidade adequados à realidade do monitoramento de multiresíduos de pesticidas atendendo a todos os parâmetros da Legislação Brasileira.

2. EXPERIMENTAL

2.1 *Reagentes e Compostos Químicos*

Todos os padrões dos princípios ativos acefato (O,S-dimethyl acetylphosphoramidothioate), acetamiprido (E- N1-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N2-cyano-N1-methylacetamidine), metamidofós (O,S-dimethyl phosphoramidothioate) e thiamethoxan (3-2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine) foram obtidos da marca Sigma e fornecidos pelo Laboratório de Análise de Defensivos Agrícolas da Esalq em Piracicaba, onde também foi desenvolvida a parte prática deste projeto.

Foram preparadas soluções de 1mg.mL^{-1} de cada sal ou composto, as quais foram armazenadas à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir destas montou-se o mix constituído de 4 componentes: acefato, metamidofós, acetamiprido e thiamethoxan; sendo 1ml de cada componente e 6ml de solvente para obter-se o mix de $100\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Com diluições sucessivas obteve-se as demais concentrações. As soluções de trabalho eram refeitas a cada duas semanas e mantidas sob refrigeração como prevenção a contaminações, adulterações ou mudanças de condições de análise.

Para elaboração dos brancos e extração dos compostos foram utilizados os solventes: acetato de etila, bicarbonato de sódio, sulfato de sódio, ciclohexano e metanol de grau de pureza analítico e cromatográfico. No processo de extração e na preparação da fase móvel, utilizou-se água obtida de sistema Milli-Q (MILLIPORE). Para a fase móvel foi utilizado metanol grau cromatográfico, e após a preparação e filtração desta em membrana Millipore Fluoropore, com $0,5\mu\text{m}$ de poro a mesma foi degaseificada em aparelho de ultra-som.

2.2 *Preparação das amostras e extração*

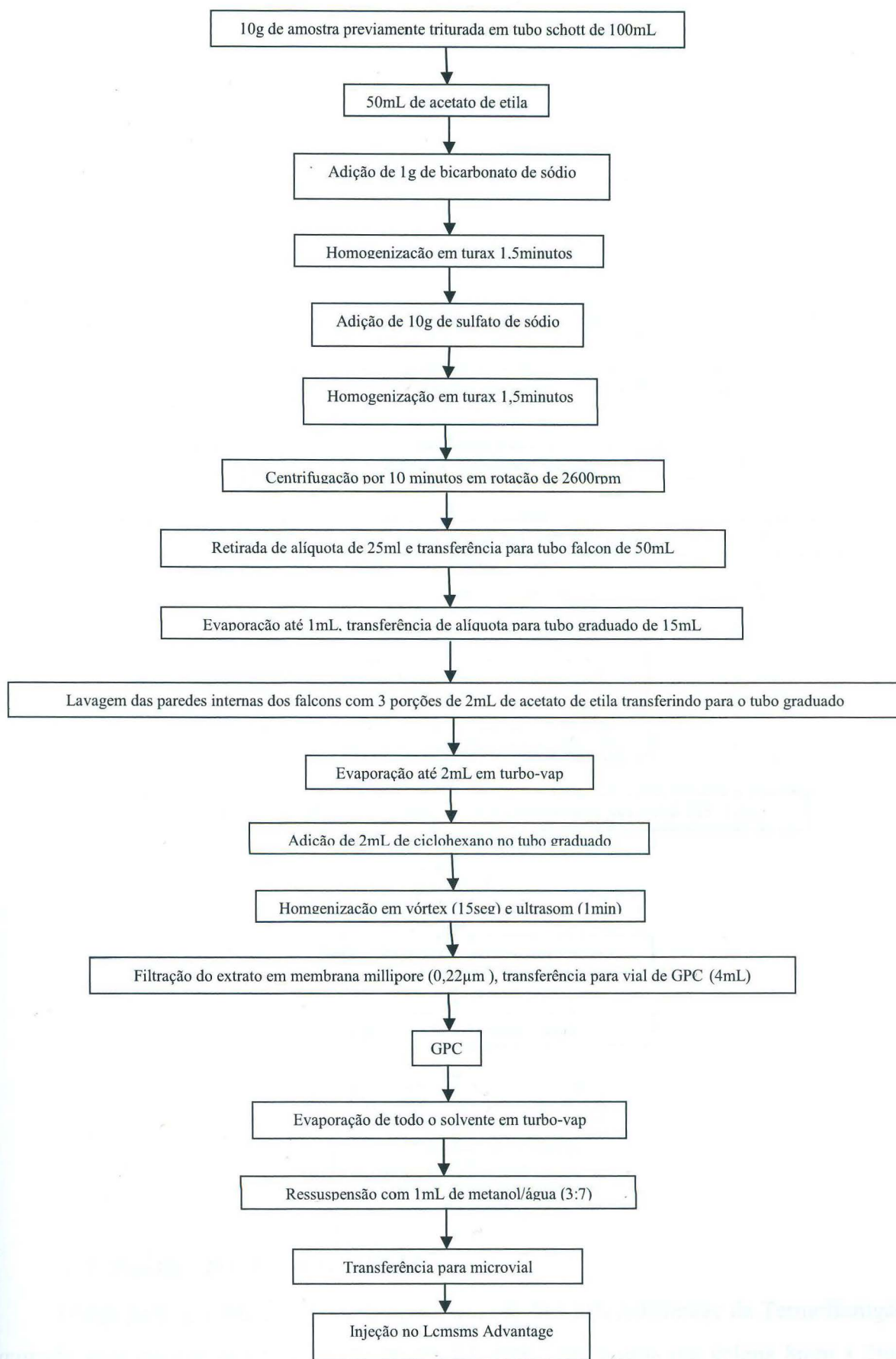
Amostras de batata e feijão provenientes diretamente do produtor ou de distribuidores da região de Campinas e São Paulo foram trituradas em cutter ou moídas em moedor de grãos cuisinart DCG-20N e homogenizadas, etapa importante para a garantia da reprodutividade dos resultados na análise.

A metodologia analítica para a extração simultânea dos compostos foi baseada no método desenvolvido por Ortelli, et al (2003). [25] Para a extração dos compostos da batata utilizou-se acetato de etila acrescido de bicarbonato de sódio, seguido de homogeneização em

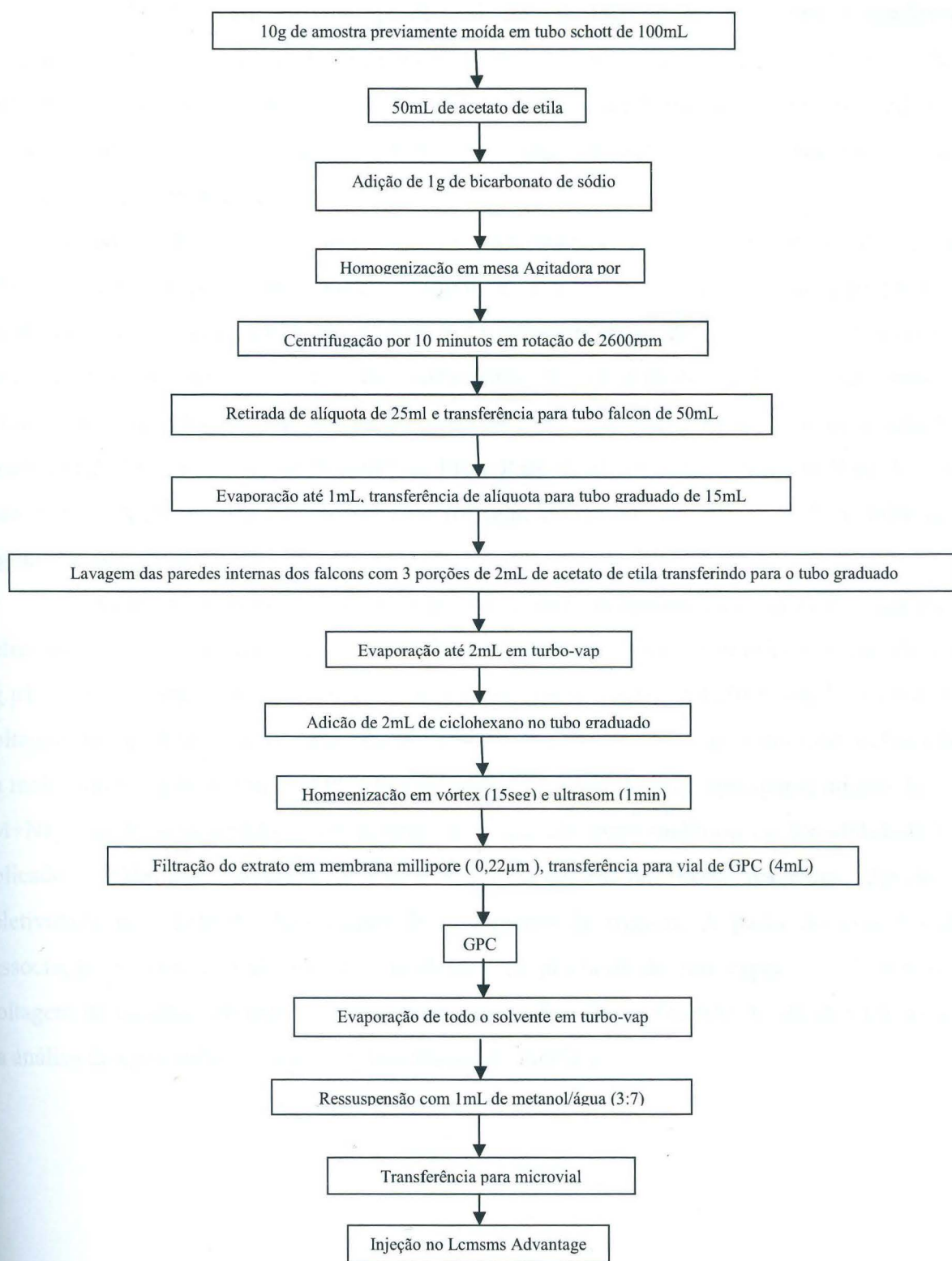
turrax por 1,5 minutos, adição de sulfato de sódio com nova homogenização seguida de centrifugação. Para as amostras de feijão foi utilizado acetato de etila acrescido de bicarbonato de sódio e sulfato de sódio, seguido de homogeneização em mesa agitadora por 30 minutos (trinta minutos) e centrifugação. Retirou-se uma aliquota do conteúdo, a qual foi evaporada e ressuspensa com acetato de etila, reconcentrada novamente e acrescida de ciclohexano. Filtrou-se o extrato em membrana Millipore de 10mm de diâmetro de 0,22 μ m de poro e o mesmo foi encaminhado para concentração por GPC. O processo de "clean-up" utilizado neste estudo teve como condições um sistema automático com uma coluna 10 mm id x 20 cm, empacotada com Bio-Beads SX-3, 200-400 mesh, operando com pressão de nitrogênio de 0,4 bar. O sistema de eluição foi acetato de etila/ ciclohexano (1:1 v/v) e a razão do fluxo foi de 1mL/min.

Por fim, evaporou-se todo o solvente e o extrato puro foi ressuspensa com metanol/água (3:7) e injetado no equipamento com um gradiente de eluição de duas fases móveis, sendo A= Metanol/H₂O/Ácido Fórmico (1:9/0,1%) e B= Metanol/Ácido Fórmico (100%/0,1%).

O fluxograma do procedimento realizado para amostras de batata esta representado a seguir:



O fluxograma do procedimento realizado para amostras de feijão esta representado a seguir:



2.3 Análises por LC-ESI-MS/MS

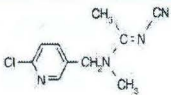
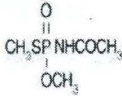
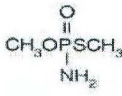
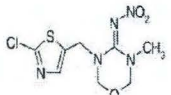
O equipamento utilizado na análise foi um LC-MS/MS Advantage da Termofinnigan, equipado com uma coluna Synergi 4u Hydro-RP 150x2mm e uma pré coluna 8mm x 2mm

contendo fase estacionária com volume de injeção de 10µL acoplado à uma bomba binária e injetor Gilson LCQ Advantage. O tempo de análise foi de 18 minutos. O sistema de gradiente de eluição da fase móvel foi: 0-5 min (80A : 20B), 5-6 min (60A : 40B), 6-8,9 min (50A : 50B), 8,9-13 min (80A : 20B), 13-15 min (80A : 20B) para retorno do sistema as condições iniciais, estabeleceu-se a vazão de 0,3mL.min⁻¹ com 7 minutos de condicionamento da coluna para a próxima injeção.

O sistema MS/MS consistiu em um espectrômetro de massa íon trap Advantage da Termofinnigan equipado com um electrospray e operado em modo de ionização positiva (modo positivo Z-Spray Electrospray ESI⁺). O software Xcalibur version 2.0 foi utilizado para aquisição de dados e controle do instrumento. A voltagem do capilar era em torno de 5.15kV e a temperatura de origem era em torno de 155 °C. A temperatura de dissolvatação foi fixada em 250°C com fluxo de Sheath Gas Flow Rate de 19.19 e Auxiliar Flow Rate de 3.81 para o cone. A pressão na colisão dos íons foi selecionada em torno de 1.10 Torr utilizando argônio como gás de colisão.

A reação de monitoramento ou scan selecionada primeiramente foi Full usada para detecção. Em cada pesticida foi feito o Tune usando uma solução padrão singular de 0,1 ng.µL⁻¹ e cada infusão era no fluxo de arraste de 50/50 (A/B) a 0,3mL.min⁻¹. O cone de voltagem foi otimizado em modo *MS SIM (Single Ion Monitoring)* para permitir a obtenção da maior intensidade do íon [M+H]⁺. Em alguns casos o íon [M+H]⁺ apresentou adição de íon [M+Na]⁺ sendo selecionado o íon parente. Em seguida, para melhoria de sensibilidade foi aplicado *MSMS* para diminuir a interferência dos íons de fundo presentes, devido a seletividade resultante de duas etapas de isolamento de massas. A partir do espectro de dissociação de colisão induzida, foram obtidos os produtos do íon experimental, sendo a voltagem de colisão otimizada para o menor íon filho. Os parâmetros detalhados utilizados na análise de cada substância estão relacionados na tabela 1.

Tabela 1: Estruturas e Condições Analíticas para LC-MSMS de multiresíduo dos 4 analitos

Analito	Estrutura	Ion MS	Ions MSMS	tr (min)	Cone (V)	Energia @
Acetamiprid		223	142.5-143.5	2,65	12.88	16
Acefato		184	125.5-126.5	6,4	10.9	35.2
Metamidofos		142	111.5-112.5	1,7	10.9	28
Thiamethoxan		292	210.5-211.5	3,6	12.81	20

tr= tempo de retenção de cada analito.

Cromatogramas

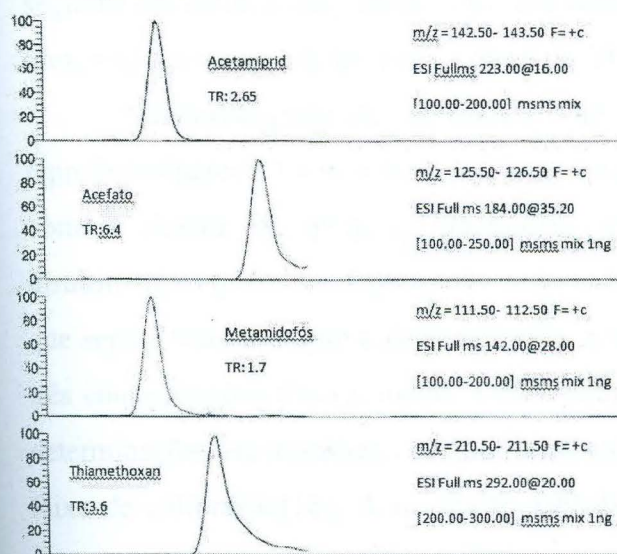


Figura : Cromatogramas MR para os padrões: Acetamiprid, Acefato, Metamidofós e Thiamethoxan obtidos por LC-MS/MS.

Logo, para a detecção e identificação foram utilizados como base os tempos de retenção e os filtros do espectro de massa de cada composto com sua respectiva energia de quebra de íon. Já a quantificação foi realizada pelo método de padronização externa com a elaboração de uma curva com 5(cinco) níveis de concentração de padrão.

2.4 Confirmação das análises LC-ESI-MS/MS

Na média, amostras de frutas e vegetais mostram a possibilidade de excederem os valores de concentração e massa de íons por serem acumulativas na coluna e no equipamento requerendo contínua confirmação. O método utilizado como CQ (controle de qualidade) era o de injeções, subsequentes às análises, de brancos do solvente e padrões puros, os quais passavam por todo o processo de extração à que as amostras eram submetidas, avaliando constantemente se havia variação no nível de recuperação.

2.5 Validação da Metodologia

Os valores adotados para os limites de detecção foram calculados com base na ANVISA. Obtidos com a análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes dos analitos até o menor nível detectável. O procedimento adotado foi o visual no qual aceitou-se como limite de detecção (LOD) a concentração ou massa do analito que gerou um sinal 3 (três) vezes superior ao ruído da linha de base. Para os limites de quantificação (LOQ) seguindo as recomendações da ANVISA foram obtidos valores 3,3 vezes o LOD, ou seja 10 (dez) vezes a relação sinal ruído. [14,15,23,24]

A precisão pode ser estimada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. O termo repetibilidade, ou precisão no dia define a precisão dos resultados obtidos dentro do próprio laboratório, por um mesmo analista e com a mesma instrumentação[16,17]. O guia ICH (International Conference on Harmonisation) recomenda que sejam realizadas nove determinações contemplando toda a faixa de calibração, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com amostras em triplicata, ou um mínimo de seis determinações em amostras contendo uma concentração equivalente à concentração média da faixa de calibração[18]. A resolução 899 da ANVISA segue o guia ICH e determina que sejam realizadas nove determinações contemplando toda a faixa de calibração[19]. O INMETRO recomenda que sejam realizadas de sete a nove replicatas para o cálculo do DPR[24] e a EPA não estabelece o número de amostras a serem analisadas para a estimativa da precisão em geral[17,20,21]. Cabe ressaltar que o termo utilizado em inglês é "repeatability". No Brasil, o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental) adota o termo repetitividade e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) adota o termo repetibilidade[19,24]

Para este estudo a Repetibilidade, ou Precisão no dia, foi avaliada por 10 replicatas em 3 níveis de concentração para os padrões de pesticidas em solução metanol/água (3/7). Já para a matriz foram realizadas sete replicatas em três níveis de concentração do analito atendendo o guia ICH e o INMETRO nas mesmas condições experimentais, em análises realizadas no mesmo dia. O mesmo procedimento foi realizado a cada dois dias em quatro dias de análise [18,23]. Avaliou-se também a precisão intermediária com a injeção de sete replicatas abrangendo uma concentração equivalente à concentração média da faixa de calibração, o que refletiu a capacidade do método de resistir a variações dos resultados analisados em quatro dias consecutivos de acordo com o planejamento experimental estabelecido pelo laboratório baseado no guia ICH [18].

A Linearidade do método foi verificada pela inclinação da reta resultante da curva analítica de 5 pontos de concentração variando entre 0,005 a 1ng.uL⁻¹ feita com 3 replicatas em cada ponto e pelo coeficiente de correlação linear (R^2), o qual deve se apresentar igual ou superior a 0,98 de acordo com a ANVISA. [23]

A Seletividade foi avaliada por testes de pureza de pico, evidenciando a capacidade do método de quantificar com exatidão os analitos estudados em presença de interferentes existentes na matriz tais como, isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, impurezas, produtos de degradação e outros.

A Recuperação do método foi avaliada pela análise de 10 repetições em 3 níveis de concentração tanto para os analitos quanto para a matriz isenta. Tais níveis foram determinados de forma a abrangerem todos os LMRs dos analitos e o procedimento foi repetido em duas outras ocasiões seguindo as exigências das agências regulamentadoras. Logo, a Exatidão evidenciada pela recuperação foi avaliada segundo as especificações da ANVISA, nas quais os níveis de recuperação devem se apresentar entre 80% e 120%.

3. RESULTADOS E DISCUSSAO

3.1 *Extração e preparação das amostras*

O objetivo do estudo era validar um método simples, rápido e robusto para a preparação das amostras baseado na extração com solvente seguida de um melhor “cleanup” realizado por GPC. O método deve ser facilmente aplicável na rotina de análise com alta recuperação nas amostras. A preparação das amostras é frequentemente a parte mais crítica no método de multiresíduo com a dupla consideração na diversidade das substâncias que tem de

ser extraídas. A seletividade da extração foi diminuída devido a ampla classe de substâncias analisadas ao mesmo tempo.

Diclorometano e acetato de etila são os solventes comumente, mais utilizados para extração dos pesticidas polares. Após 20 testes realizados no mesmo dia e sobre as mesmas condições ambientais, ambos os solventes mostraram similaridades em termos de recuperação e limpeza dos extratos. Finalmente, o acetato de etila foi selecionado como o mais adequado, devido a sua baixa toxicidade em comparação com o diclorometano e também para minimizar o uso de solventes à base de cloro. O procedimento de extração se apresentou rápido e robusto e perfeitamente adaptável ao controle de resíduos em amostras. Foi observado durante os testes a necessidade de limpeza da fonte de íons a cada 20 dias, devido ao acúmulo de componentes resultantes da análise.

3.2 Parâmetros de validação do método para a análise

As curvas analíticas de padronização externa dos analitos apresentaram linearidade nas faixas de concentração estabelecidas como pode ser visto na Figura 1. Isso pode ser verificado pelos valores e coeficientes de correlação, pois foram próximos do valor 1, o que demonstrou a probabilidade de existir uma relação linear definida pelas equações lineares apresentadas, onde $y = ax + b$ (Tabela 2). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90. [23,24]

Figura 1: Gráficos das curvas de calibração de cada analito na análise

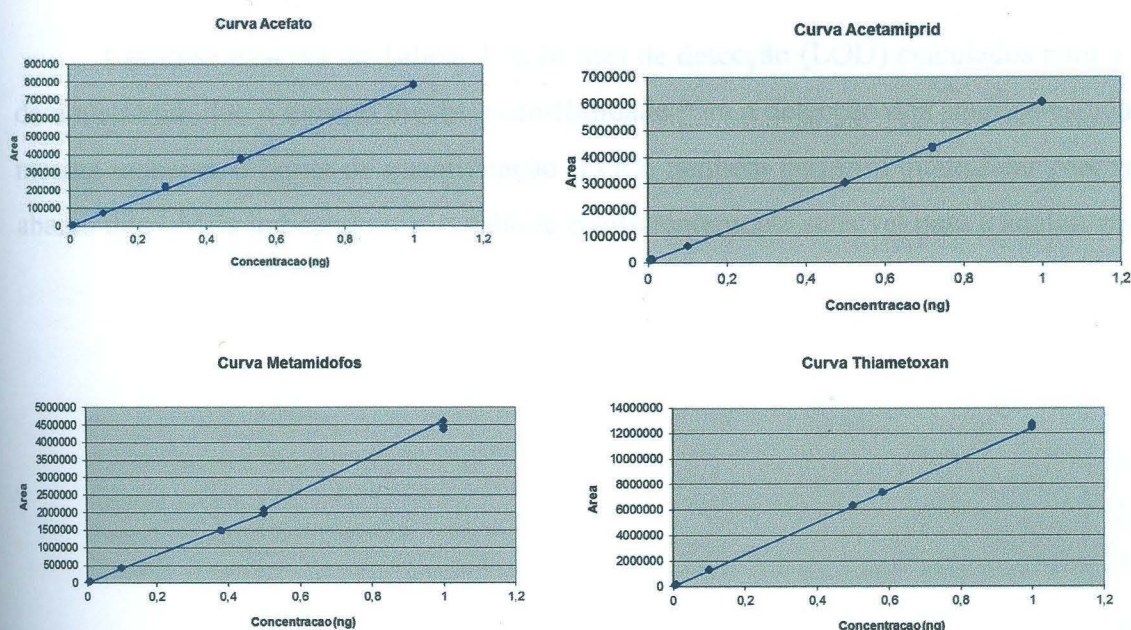


Tabela 2- Equações lineares LC-MS/MS para amostras de Batata e Feijão

ANALITO	FAIXA DE CONCENTRAÇÃO (ng.µL ⁻¹)	a	b	R ²
Acetamiprid	0,005-1,0	5986465	48545,01	0,998344
Metamidofós	0,005-1,0	4429956	-39581,6	0,99705
Thiamethoxan	0,005-1,0	12559603	8073,235	0,999708
Acefato	0,005-1,0	781220	-3906,64	0,99852

a= coeficiente angular; b=coeficiente linear (intercepto da reta quando x=0); R²= coeficiente de correlação linear.

Tabela 3- Limites de Detecção e Limites de Quantificação da mistura dos analitos analisados para amostras de batata e de feijão

ANALITOS	PADRÃO		BATATA		FEIJÃO	
	LOD mg.Kg-1	LOQ mg.Kg-1	LOD mg.Kg-1	LOQ mg.Kg-1	LOD mg.Kg-1	LOQ mg.Kg-1
Acetamiprid	0,0048	0,0158	0,0053	0,0174	0,00324	0,0105
Metamidofós	0,0046	0,0151	0,0055	0,0181	0,00297	0,0098
Thiamethoxan	0,004	0,0132	0,0051	0,0168	0,00315	0,0103
Acefato	0,0046	0,0151	0,0052	0,0171	0,00305	0,0100

Em 50mg de massa injetada

Como se observa na Tabela 3 os limites de detecção (LOD) calculados para o método demonstraram que o mesmo mostrou sensibilidade para a detecção dos analitos estudados. Da mesma maneira, o limite de quantificação (LOQ) também permitiu quantificar concentrações abaixo dos LMRs indicando que o método é suficientemente sensível para a análise realizada.

Tabela 4- Precisão no dia e Recuperação dos analitos em solução padrão e em amostras de batata e feijão

MATRIZ	ANALITO	CONCENTRACAO (ng)	PRECISÃO NO DIA (CV%)	RECUPERACAO (%)
PADRAO	Acetamiprido	0,02	1,6	-
		0,1	2,7	-
		0,5	1,7	-
	Acefato	0,02	1,6	-
		0,1	2,7	-
		0,5	0,23	-
	Metamidofós	0,02	1,7	-
		0,1	2,7	-
		0,5	1,6	-
	Thiamethoxan	0,02	1,7	-
		0,1	2,7	-
		0,5	0,39	-
	Acetamiprido	0,02	1,1	98,86
		0,1	2,4	105,04
		0,5	1,3	101,92
BATATA	Acefato	0,02	2,6	104,6
		0,1	2,8	102,86
		0,5	0,28	100,23
	Metamidofós	0,02	2,2	104,6
		0,1	2,2	104,7
		0,5	0,62	99,85
	Thiamethoxan	0,02	2,2	99,65
		0,1	2,3	101,96
		0,5	0,88	100,3
	Acetamiprido	0,02	0,65	101,85
		0,1	2,5	100,54
		0,5	1,27	101,75
	Acefato	0,02	0,81	102,45
		0,1	2,7	101,75
		0,5	0,43	101,73
FEIJÃO	Metamidofós	0,02	0,67	103,9
		0,1	2,8	101,55
		0,5	0,62	99,85
	Thiamethoxan	0,02	0,77	101,35
		0,1	2,3	101,96
		0,5	0,36	100,57

Foram calculados a Concentração Média (M) e o Desvio Padrão Estimado (dp), dos quais se obteve os Coeficientes de Variação (CV). Como evidenciado na Tabela 4 os Coeficientes de Variação encontrados para as análises de Precisão no dia ficaram entre 0,28% e 2,8% para amostras de batata e entre 0,36% e 2,8% para as amostras de feijão. Em métodos de análises de traços ou impurezas, são aceitos Coeficientes de Variação (CV) de até 5%, dependendo da complexidade da amostra. [23]

O coeficiente de variação obtido no cálculo da precisão no dia foi de 2,3% enquanto que o obtido entre os dias (precisão intermediária) de análise foi de 0,63% garantindo assim uma adequada precisão do método para ambas as amostras, visto que a legislação admite valores até 5 % para o cv. [23] Não foram feitos estudos de reprodutibilidade.

A Linearidade do método é verificado na figura 1 e na tabela 2, respectivamente pela inclinação da reta resultante da curva analítica e pelo coeficiente de correlação linear (R^2) de

aproximadamente 0,99 , o qual deve ser igual ou superior a 0,98 de acordo com a ANVISA [23]

A Seletividade do método se apresentou pela capacidade do mesmo de quantificar com exatidão os analitos estudados em presença de interferentes existentes na matriz tais como, isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, impurezas, produtos de degradação e outros. Foram feitos testes de pureza de pico com o auxílio da espectrometria de massas em aproximadamente 26 amostras de batata e feijão insentas dos compostos estudados (amostras branco). Foi realizada a verificação de interferentes presentes nas regiões esperadas de eluição dos analitos de interesse, o que poderia levar a uma identificação falsa. Nem a identificação, nem a quantificação dos analitos alvos foram influenciadas pela presença de interferentes, ou seja, a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito foi inferior a 20% da resposta do LQ como exigido pela ANVISA. [22,23,24]

A exatidão do método, determinada pela recuperação mostrou-se entre 98,86% e 105,04% para a batata e entre 99,85% e 103,9% para o feijão, ficando dentro das especificações de 80% a 120%.

4. CONCLUSAO

A validação de métodos analíticos é necessária para o reconhecimento das limitações e confiabilidade dos resultados obtidos. O uso de métodos validados é essencial para obtenção e resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. A exatidão e a precisão são as chaves do processo de validação de métodos analíticos. Diferentes procedimentos podem ser adotados para a avaliação da exatidão, sendo os ensaios de recuperação os mais empregados por não dependerem de fatores externos para serem realizados. Neste estudo, uma rápida e simples técnica de análise por LC-MS/MS foi desenvolvida e validada para determinação simultânea de quatro pesticidas em amostras de feijão e batata. O método desenvolvido mostrou parâmetros de validação satisfatórios. Nos casos relatados foram obtidas recuperações para as amostras de batata entre 98,86% e 105,04% e Coeficientes de Variação entre 0,28% e 2,8%, já para as amostras de feijão as recuperações ficaram entre 99,85% e 103,9% e Coeficientes de Variação entre 0,36% e 2,8%. Ambos os casos estão enquadrados na faixa recomendada pela ANVISA para os níveis de concentração investigados assegurando sua aplicabilidade em análises de rotina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Y.N. Wang, Food Safely Calls for Green Pesticides, Qinhuangdao Daily, 2 November 2004.
- [2] Standardization Administration of China, GB/T1926-2003 Method for Determination for 304 Pesticide Multiresidues in Honeys, Fruit Juices and Fruit Wines by GC and LC-MS-MS, Standards Press of China, Beijing (2003).
- [3] D. A. Bennett, A.C. Chung, S. M. Lee, J. AOAC Int. 80 (1997) 1065.
- [4] D.M. Holstege, D.L. Scharberg, E.R. Richardson, G. Moeller, J. AOAC Int. 74 (1991) 394.
- [5] F.J. Schenck, D.J. Donoghue, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 6412.
- [6] U. Eiji, O. Harumi, S. Isao, M. Hiroshi, J. Food Hyg. Soc. 42 (2001) 385.
- [7] A. Aguera, M. Contreras, J. Crespo, A. R. Fernández-Alba, Analyst 127 (2002) 347.
- [8] J.S. Jasinski, J. Chromatogr. 478 (1989) 349.
- [9] F. Bordet, D. Inthavong, J.M. Fremy, J. AOAC Int. 85 (2002) 1398.
- [10] Council Directive 90/642/EEC of 27 November 1990 on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on certain products of plant origin, including fruit and vegetables, EUROPEAN Union, Brussels, 1990.
- [11] A.R. Long, M.D. Crouch, S. A. Barker, J. AOAC Int. 74 (1991) 667.
- [12] C. Yague, S. Bayarri, R. Lazoro, P. Conchello, A. Arino, A. Herrera, J. AOAC Int. 84 (2001) 1561.
- [13] Y. Kimihiko, T. Yukari, N. yumiko, I. Susumo, T. Yasuhide, T. Tsuyoshi, K. Mika, S. Yukihiro, J. Food Hyg. Soc. 40 (1999) 68.
- [14] A. Sannino, P. Mambriani, M. Bandini, L. Bolzoni, J. AOAC Int. 79 (1996) 1434.
- [15] A. Sannino, P. Mambriani, M. Bandini, L. Bolzoni, J. AOAC Int. 78 (1995) 1209.
- [16] Maynard, A. W.; Chemtech. 1999, 20, 1517.
- [17] US Environmental Protection Agency;. Method 8260B - Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Revision 2, CD-ROM, 1996.
- [18] International Conference on Harmonisation (ICH); Guidance for Industry Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures, November 1996.
- [19] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Y.N. Wang, Food Safely Calls for Green Pesticides, Qinhuangdao Daily, 2 November 2004.
- [2] Standardization Administration of China, GB/T1926-2003 Method for Determination for 304 Pesticide Multiresidues in Honeys, Fruit Juices and Fruit Wines by GC and LC-MS-MS, Standards Press of China, Beijing (2003).
- [3] D. A. Bennett, A.C. Chung, S. M. Lee, J. AOAC Int. 80 (1997) 1065.
- [4] D.M. Holstege, D.L. Scharberg, E.R. Richardson, G. Moeller, J. AOAC Int. 74 (1991) 394.
- [5] F.J. Schenck, D.J. Donoghue, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 6412.
- [6] U. Eiji, O. Harumi, S. Isao, M. Hiroshi, J. Food Hyg. Soc. 42 (2001) 385.
- [7] A. Agüera, M. Contreras, J. Crespo, A. R. Fernández-Alba, Analyst 127 (2002) 347.
- [8] J.S. Jasinski, J. Chromatogr. 478 (1989) 349.
- [9] F. Bordet, D. Inthavong, J.M. Fremy, J. AOAC Int. 85 (2002) 1398.
- [10] Council Directive 90/642/EEC of 27 November 1990 on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on certain products of plant origin, including fruit and vegetables, EUROPEAN Union, Brussels, 1990.
- [11] A.R. Long, M.D. Crouch, S. A. Barker, J. AOAC Int. 74 (1991) 667.
- [12] C. Yague, S. Bayarri, R. Lazoro, P. Conchello, A. Arino, A. Herrera, J. AOAC Int. 84 (2001) 1561.
- [13] Y. Kimihiko, T. Yukari, N. yumiko, I. Susumo, T. Yasuhide, T. Tsuyoshi, K. Mika, S. Yukihiro, J. Food Hyg. Soc. 40 (1999) 68.
- [14] A. Sannino, P. Mambriani, M. Bandini, L. Bolzoni, J. AOAC Int. 79 (1996) 1434.
- [15] A. Sannino, P. Mambriani, M. Bandini, L. Bolzoni, J. AOAC Int. 78 (1995) 1209.
- [16] Maynard, A. W.; Chemtech. 1999, 20, 1517.
- [17] US Environmental Protection Agency; Method 8260B - Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Revision 2, CD-ROM, 1996.
- [18] International Conference on Harmonisation (ICH); Guidance for Industry Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures, November 1996.
- [19] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.

- [20] US Environmental Protection Agency; Method 8000B – Determinative Chromatography Separations, CD-ROM, 1996.
- [21] US Environmental Protection Agency; Test Methods SW846 - Test Methods for Evaluating Solid Wastes, Chapter One: Quality Control, Revision 1, 2005. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/main.htm>, acessada em Janeiro 2007.
- [22] F.M. Lanças, Validação de métodos cromatográficos de análise. V.6. São Carlos; Editora Rima, 2004.
- [23] ANVISA- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- [24] INMETRO- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientações sobre validação de métodos de ensaio químico, DOQ-CGCRE=008, 2003.
- [25] ORTELLI, D., EDDER, P., CORVI, C. LC-MS/MS Multiresidue Method used for the analysis of pesticides in fruits and vegetables. Genève- Suisse, 2003.

Capítulo 3

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE MULTIRESÍDUOS DE PESTICIDAS PARA CULTURA DE BATATA E TOMATE POR GC-MS/MS

Silva, L. M. M.; Prado, M. A.
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciências dos Alimentos

Capítulo 3

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE MULTIRESÍDUOS DE PESTICIDAS PARA CULTURA DE BATATA E TOMATE POR GC-MS/MS

Silva, L. M. M.; Prado, M. A.

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciências dos Alimentos

RESUMO

O uso de métodos multiresíduos para análises de agrotóxicos tem sido objeto de grande interesse dos analistas, especialmente pelos ganhos de economia e de rendimento analítico que propicia. O objetivo deste estudo foi, validar um método analítico para a identificação e quantificação de pesticidas das classes dos carbamatos e dicarboximidas em batata e tomate, por Cromatografia a gás acoplada a um Espectrômetro de massa. O método foi validado, de acordo com os parâmetros estatísticos para a validação de métodos de ensaios químicos preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e pelo *Codex Alimentarius*. Os analitos foram extraídos com acetato de etila, sob homogenização e o clean-up foi realizado por GPC (Gel Permeation Chromatography), os extratos foram diluídos em solvente e injetados no sistema GC-MS/MS. A técnica analítica de quantificação e confirmação utilizada foi a Cromatografia a gás acoplado ao MS Ion Trap (Varian instruments, Sunnyvale, CA, USA) com uma coluna capilar de sílica (30m x 0,25mm I.D., 0,25µm film thickness), revestida com uma fase estacionária de polaridade intermediária (phenyl/methylpolysiloxane) (supelco Inc.,USA). O impacto de elétrons foi no modo de

ionização positiva, com uma energia de ionização de 70 eV aplicada à multiplicadora de íons. Para quantificação dos analitos utilizou-se as curvas analíticas dos princípios ativos, nas concentrações que variaram de 20 a 1000 pg.µl⁻¹, correspondentes à 0,02 a 1 mg.kg⁻¹ na amostra. Para o estudo da recuperação, os pesticidas foram avaliados em três níveis, correspondentes a níveis de fortificação de 0,02 a 1 mg.kg⁻¹. Os resultados das recuperações apresentaram níveis aceitáveis, na faixa de 93,34% e 109,67% para amostras de batata e na faixa de 96,32% e 104,4% para as amostras de tomate, com precisão satisfatória e repetibilidade expressa como CV entre 0,048% e 2,091% para a batata e entre 0,0361% e 1,7281% para o tomate. Os limites de quantificação do método variaram de 0,2 a 5,5 µg.L⁻¹ para as amostras de batata e de 0,3 a 5,5 µg.L⁻¹ para as amostras de tomate. Os limites de detecção do método de 0,07 a 2,5 µg.L⁻¹ para as amostras de batata e 0,1 a 2,5 µg.L⁻¹ para as amostras de tomate. Os limites de quantificação do método atenderam aos limites máximos de resíduos da legislação brasileira em vigor. Nas amostras utilizadas no estudo, não haviam resíduos dos pesticidas estudados, sendo assim, o mesmo demonstrou bons resultados para todos os parâmetros de avaliação, tendo o método atendido a todos os critérios exigidos pelos órgãos oficiais normatizadores.

ABSTRACT

The use of methods for multiresidue analysis of pesticides has been the subject of great interest to analysts, especially by the gains in economy and performance analytical provides. The aim of this study was to validate an analytical method for the identification and quantification of pesticides in classes of carbamates and dicarboximides in potato and tomato by gas chromatography coupled to a mass spectrometer. The method was validated according to the statistical parameters for the validation of methods for chemical testing recommended by the National Health Surveillance Agency (ANVISA), the National Institute of Metrology, Standardization and Industrial Quality (INMETRO) and the Codex Alimentarius. The analytes were extracted with ethyl acetate, and the homogenization under clean-up was performed by GPC (Gel Permeation Chromatography), the extracts were diluted in solvent and injected into the GC-MS/MS system. The analytical technique for the quantification and confirmation used was gas chromatography coupled to MS Ion Trap (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA) with a silica capillary column (30m x 0.25 mm ID, film thickness 0.25 mM) coated with a stationary phase of intermediate polarity (phenyl / methylpolysiloxane) (Supelco Inc., USA). was the impact of electrons in the positive ionization mode with an

ionization energy of 70 eV applied to multiplier ions. for quantification of analytes it was used the standard curves of the active at concentrations ranging from 20 to 1000 pg.µl-1, corresponding to 0.02 to 1 mg.kg-1 in the sample. For the study of recovery, pesticides were evaluated in three levels, corresponding to the fortification levels from 0.02 to 1 mg.kg-1. The results showed acceptable levels of recoveries in the range of 109.67% and 93.34% for samples of potato and in the range of 104.4% and 96.32% for the samples of tomato with satisfactory accuracy and repeatability expressed as CV, 0.48% and 2.091% for potatoes and between 0.0361% and 1.7281% for tomatoes. The limits of quantification of the method ranged from 0.2 to 5.5 microg.L-1 to the samples of potato and from 0.3 to 5.5 microg.L-1 for samples of tomato. The limits of detection from 0.07 to 2.5 microg.L-1 for samples of potato and from 0.1 to 2.5 microg.L-1 for samples of tomato. The limits of quantification of the method met the maximum residue limits of current Brazilian law. The samples used in the study, there were no residues of pesticides studied, so it showed good results for all evaluation parameters, the method having met all the criteria required by the official standard-setters.

1- INTRODUÇÃO

O monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, para a determinação do nível de exposição de uma população, é fundamental para se conhecer a real situação da contaminação por esses substratos alimentares e as possíveis consequências toxicológicas a longo prazo.

A realização de programas voltados para o monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos são imprescindíveis para que ações de vigilância sanitária possam ser desenvolvidas, com foco na prevenção e controle dos riscos à saúde humana decorrentes do consumo de alimentos contaminados.

Os dados obtidos nestes programas possibilitam verificar a qualidade e segurança dos produtos consumidos pela população com a caracterização das fontes de contaminação, proporcionando uma avaliação quanto ao uso inadequado e não autorizado de agrotóxicos, para estimular a adoção de Boas Práticas Agrícolas (BPA), além de fornecer subsídios para uma possível reavaliação dos mesmos.

Diversos países como Holanda[1], Suécia[2], Inglaterra[3], Austrália[4] e Estados Unidos[5], estabeleceram programas de monitoramento de resíduos de pesticidas, com

análises contínuas e programadas, podendo afirmar-se, pelos dados obtidos, que é frequente a identificação de resíduos desses componentes em alimentos, e em muitos casos, acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) permitidos, além dos não autorizados. [6]

No Brasil, de acordo com resultados de programas nacionais realizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Agricultura, voltados para esse fim, o aparecimento de defensivos agrícolas na mesa do consumidor justifica-se pelo alto consumo destes insumos na produção agrícola.[7,8,9]

Para a superação desses problemas o desenvolvimento teórico científico no controle de qualidade dos alimentos, em relação à contaminação por defensivos, é de importância fundamental, não somente para assegurar a integridade dos dados laboratoriais, bem como, para o estabelecimento de normas regulamentadoras para a obtenção de credenciamento junto aos órgãos oficiais no atendimento às exigências recomendadas em Gestão de Sistemas de Controle de Qualidade Nacional e Internacional. O controle rotineiro e frequente de resíduos deve ser feito tanto para moléculas novas, que foram sintetizadas como alternativas aos produtos fitossanitários já mais antigos, menos eficazes, como também para aqueles que já tenham sido proibidos ou que tiveram seu uso restringido pelos órgãos responsáveis.

Na área de análise de resíduos, o desenvolvimento de métodos analíticos mais eficazes é de extrema importância, onde a investigação deve sempre incluir a validação do método desenvolvido em diferentes tipos de matrizes e não apenas estudos com solução padrão [10], ou seja, o mesmo deve ser submetido a um processo de avaliação que estime sua eficiência e mérito.

Entre os métodos de análises mais atuais encontram-se os de multiresíduos, os quais permitem uma análise ampla de vários analitos de diferentes naturezas químicas, em uma única extração em diversos tipos de matrizes ao mesmo tempo, apresentando um menor custo se comparado aos métodos singulares.

O uso destes métodos aliado a cromatografia a gás associada a detectores de alta eficiência como captura de elétrons (ECD), detector de nitrogênio-fósforo (NPD) e espectrômetro de massa (MS) foram as técnicas mais largamente usada por muitos anos.[2] Recentemente, muitas aplicações usando GC-MS/MS para a determinação de pesticidas em frutas e vegetais tem sido descritas na literatura por serem consideradas análises rápidas e inequívocas.[3,4]

Entretanto, muitos pesticidas, os quais são termicamente instáveis ou não-voláteis semelhantes aos carbamatos ou benzimidazóis são difíceis ou impossíveis de analisar usando

as técnicas GC e GC-MS. A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (MS/MS) oferece uma poderosa ferramenta para a determinação desses compostos em amostras de alimentos. [5,6]

O presente trabalho descreve a validação de um método multirresíduo para análise de 10 analitos, usando uma técnica de alto poder de concentração e limpeza do extrato como o GPC (Gel Permeation Chromatography) e detecção e quantificação por GC-MS/MS. Os pesticidas investigados englobam classes como: acaricidas, inseticidas, fungicidas, nematocidas e formicidas de aplicação foliar ou em solo, comumente utilizados nas culturas de batata e tomate.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes e Compostos Químicos

Todos os padrões dos princípios ativos, chlorotalonil(tetrachloroisophthalonitrile), metalaxil (methyl N-methoxyacetyl -N- 2,6-xylyl-D-Alaninate), clorpirifós (O, O- diethyl O-3,5,6-trochloro-2-pyridylphosphorothioate), clorfenapir (4-bromo-2-(4-chlorophenyl)-1-ethoxymethyl-5-(trifluoromethyl)pyrrole-3-carbonitrile, tebuconazole (RS-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl penten-3-ol), bifentrina (2methylbiphenyl-3-ylmethyl Z-1RS,3RS-3-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate, etofenprox (2-4-ethoxyphenyl-2-methypropyl 3-phenoxy benzyl ether, famoxadone (3-anilino-5-methyl-5-4-phenoxyphenyl-1,3-oxazolidine-2,4-dione), carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-ylmethylcarbamate), procimidone (N-3,5-dichlorophenyl -1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide), azoxistrobina (methyl E -2-2-6-2-cyanphenoxy pyrimidin-4-yloxy phenyl-3-methoxyacrylate), foram obtidos da marca sigma e fornecidos pelo Laboratório de Análise de Defensivos Agrícolas da Esalq em Piracicaba, onde também foi desenvolvida a parte prática deste projeto.

Foram preparadas soluções padrão de 1mg.mL^{-1} de cada sal ou composto, as quais foram armazenadas à -10°C . A partir destas montou-se 2 misturas, sendo uma de 9 componentes: chlorotalonil, metalaxil, clorpirifós, clorfenapir, tebuconazole, bifentrina, etofenprox, famoxadone, azoxistrobina; e outra com apenas 2 componentes: carbofuran, procimidone. Em ambos os casos, foram pipetados 1ml de cada solução padrão em balão de 10mL sendo o volume completado com solvente para obter-se o padrão de $100\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Com diluições sucessivas obteve-se as demais concentrações. As soluções de trabalho eram refeitas

a cada duas semanas e mantidas sobre refrigeração como prevenção a contaminações, adulterações ou mudanças de condições de análise.

Para elaboração dos brancos e extração dos compostos foram utilizados os componentes e solventes: acetato de etila, bicarbonato de sódio, sulfato de sódio e ciclohexano de grau de pureza analítico e cromatográfico. No processo de extração utilizou-se água obtida de sistema Milli-Q (MILLIPORE). Para a fase móvel do GPC foram utilizados solventes grau cromatográfico, e após a preparação e filtração desta em membrana Millipore Fluoropore, com 0,5µm de poro a mesma foi degaseificada em aparelho de ultra-som.

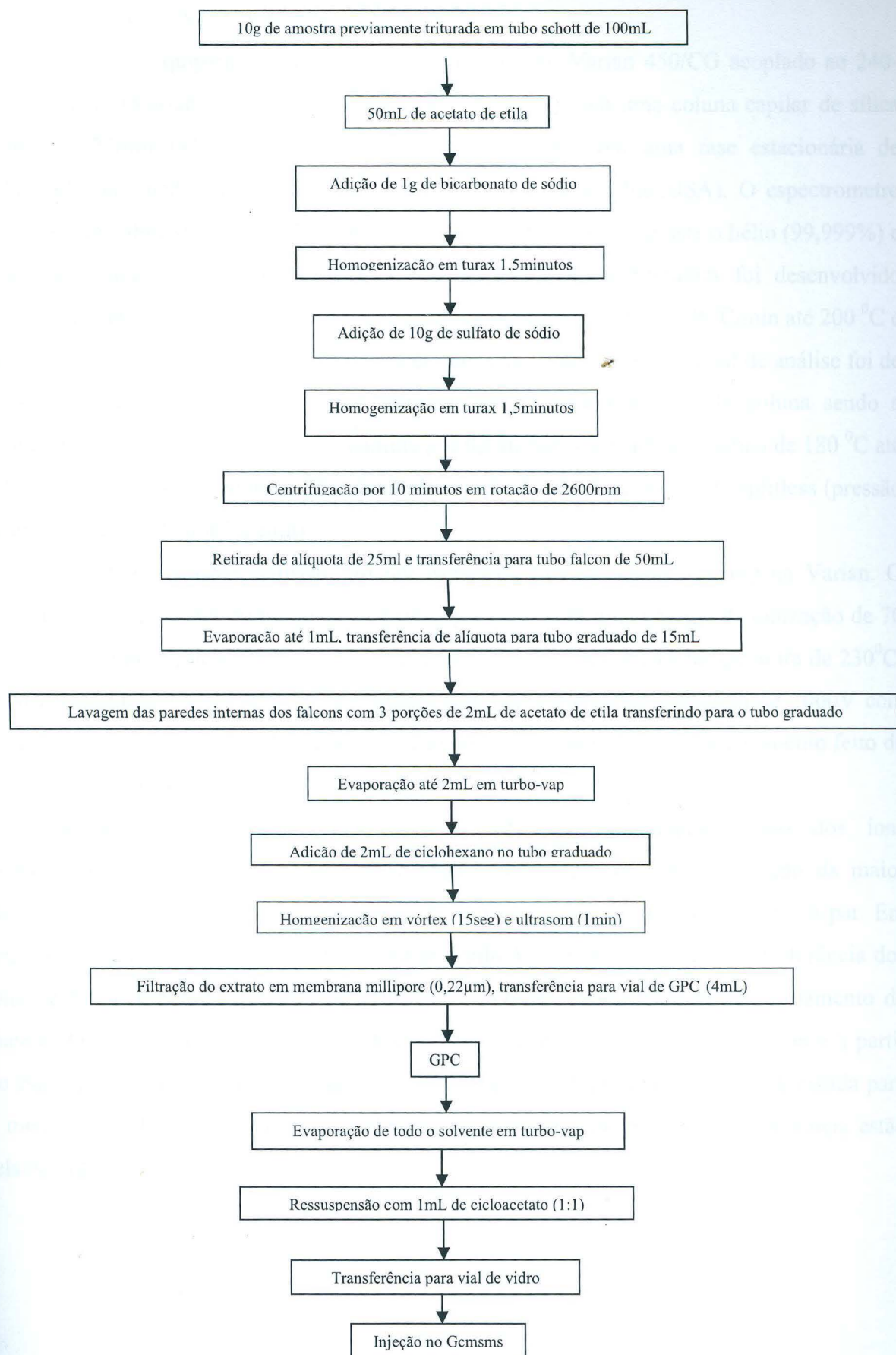
2.2 Preparação das amostras e extração

Amostras de batata e tomate provenientes diretamente do produtor ou por distribuidores da região de Campinas e São Paulo foram trituradas em cutter e homogenizadas, etapa importante para a garantia da reprodutividade dos resultados na análise.

A metodologia analítica para a extração simultânea dos compostos foi baseada no método desenvolvido por Ortelli, et al (2003).[11] Para a extração dos compostos utilizou-se acetato de etila acrescido de bicarbonato de sódio, seguido de homogenização em turrax por 1,5 minutos (um minuto e meio), adição de sulfato de sódio com nova homogenização seguida de centrifugação. Retirou-se uma alíquota do conteúdo, a qual foi evaporada e ressuspensa com acetato de etila, reconcentrada novamente e acrescida de ciclohexano. Filtrou-se o extrato em membrana Millipore e o mesmo foi encaminhado para concentração por GPC. O processo de “clean-up” utilizado neste estudo teve como condições um sistema automático com uma coluna 10 mm id x 20 cm, empacotada com Bio-Beads SX-3, 200-400 mesh, operando com pressão de nitrogênio de 0,4 bar. O sistema de eluição foi acetato de etila/ ciclohexano (1:1 v/v) e a razão do fluxo foi de 1mL/min.

Por fim evaporou-se todo o solvente e o extrato puro foi ressuspensa com cicloacetato (1:1) e injetado no equipamento.

O fluxograma do procedimento realizado para as amostras de batata e tomate está representado a seguir:



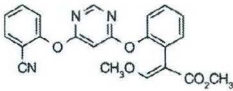
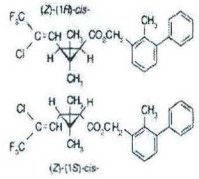
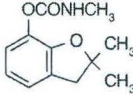
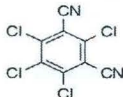
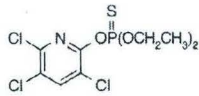
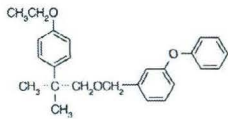
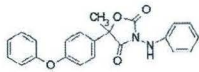
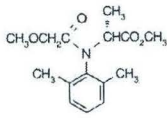
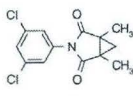
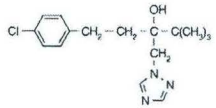
2.3 Análises por GC-MS/MS

O equipamento utilizado na análise foi um Varian 450/CG acoplado ao 240-MS Ion Trap (Varian instruments, Sunnyvale, CA, USA) com uma coluna capilar de sílica (30m x 0,25mm I.D., 0,25µm film thickness) revestida com uma fase estacionária de polaridade intermediária (phenyl/methylpolysiloxane) (supelco Inc.,USA). O espectrometro de massa foi calibrado com perfluorotributylamine sendo o gás de arraste o hélio (99,999%) e o gás de colisão o argônio (99,999%). O programa de temperatura foi desenvolvido inicialmente em: 70 °C por 2 min com rampa de 25 °C/min até 150 °C, 30 °C/min até 200 °C e de 8 °C/min até 280 °C mantendo esta temperatura por 10min. O tempo total de análise foi de aproximadamente 36 minutos com 5 minutos de recondicionamento da coluna sendo a temperatura inicial do injetor 80 °C, mantida por 0,1 minutos seguida por rampa de 180 °C até 280 °C mantida por 27 minutos. O volume de injeção foi de 2 µL no modo splitless (pressão de injeção de 30kPa por 1,5 min).

O sistema MS/MS consiste em um espectrômetro de massa íon trap da Varian. O impacto de elétrons foi no modo de ionização positiva, com uma energia de ionização de 70 eV aplicada à multiplicadora de íons, aparecendo o íon de interesse na temperatura de 230°C. O MS foi aplicado à 150°C com a multiplicadora de elétrons na voltagem de 1000V com base no autotune, quando realizou-se a seleção do íon monitorado pelo escaneamento feito de 50 a 500 m/z (mass range) com 3,62s por scan.

A análise foi desenvolvida primeiramente com o monitoramento dos íons experimentais no modo *SIM* (*Single Ion Monitoring*) para permitir a obtenção da maior intensidade do íon $[M+H]^+$ baseado no uso de um só alvo e em alguns casos 1 íon par. Em seguida, para melhoria de sensibilidade foi aplicado *MSMS* para diminuir a interferência dos íons de fundo presentes, devido a seletividade resultante de duas etapas de isolamento de massas. Os pesticidas foram identificados de acordo com o seu tempo de retenção e a partir do espectro de dissociação de colisão induzida, sendo a voltagem de colisão otimizada para o menor íon filho. Os parâmetros detalhados utilizados na análise de cada substância estão relacionados na tabela 1.

Tabela 1: Estruturas e Condições Analíticas para GC-MS/MS do multiresíduo dos 11 analitos

Analito	Estrutura	Ions MS	Ions MSMS	tr (min)	Energia @
Azoxistrobina		419	344-345-346	16,8	20
Bifentrina		422	181-182-166	17,5	10
Carbofuran		221	149-164	10,74	15
Chlorotalonil		264	266-268	8,6	20
Clorpirifós		349	197-199-314-316	10,2	10
Clorfenapir		407	362-364	18,34	14
Etofenprox		376	135-163	24,7	15
Famoxadone		374	224-330-331	19,4	10
Metalaxil		279	206-160	16,6	17
Procimidone		283	96-282	15,8	24
Tebuconazole		307	125-250	19,84	33

tr= tempo de retenção de cada analito.

Cromatogramas

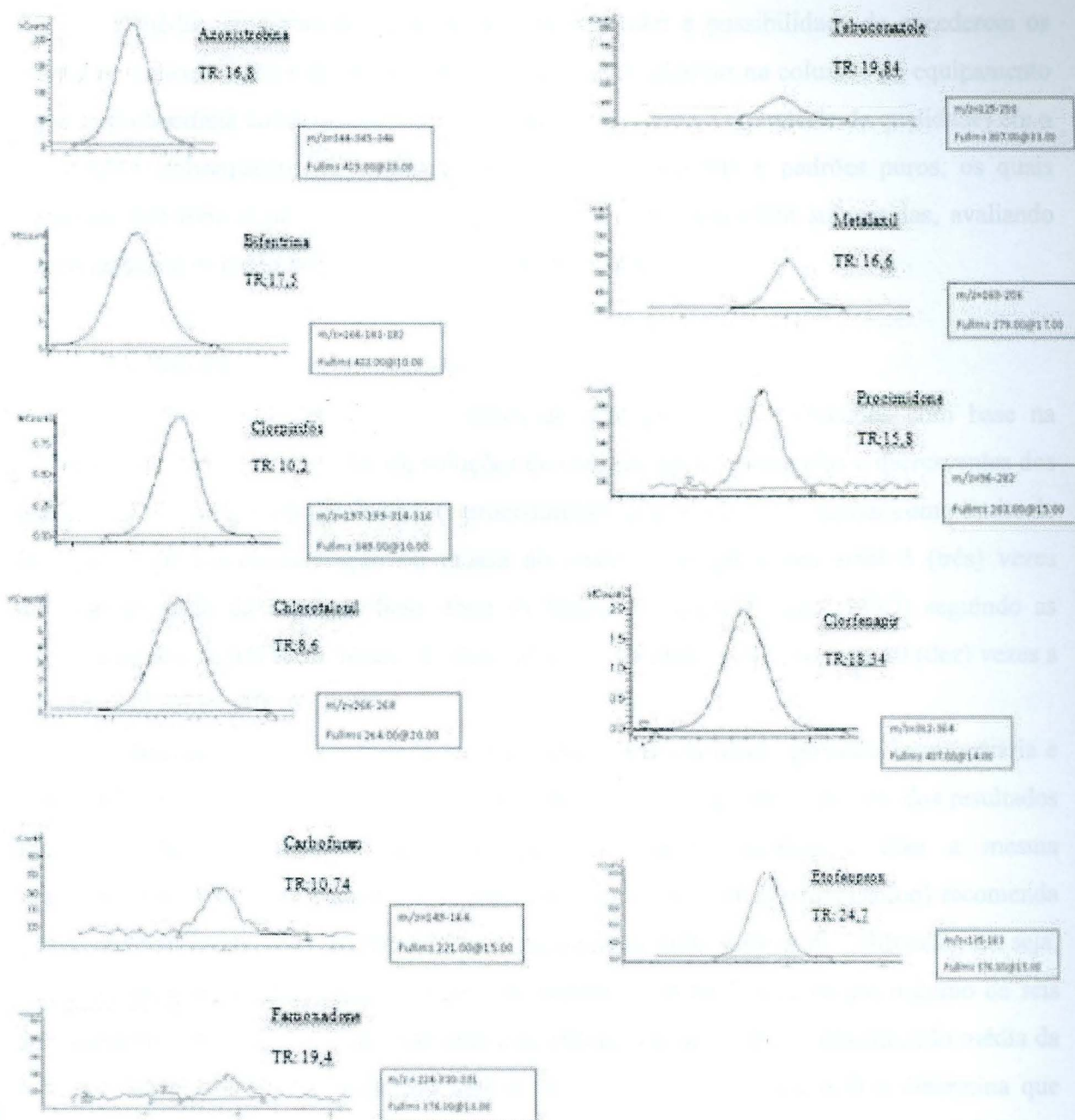


Figura : Cromatogramas MR para os padrões: Azoxistrobina, Bifentrina, Carbofuran, Chlorotalonil, Clorfenapir, Clorpirifos, Etofenprox, Famoxadone, Metalaxil, Procimidone e Tebuconazole obtidos por GC-MS/MS.

Logo, para a detecção e identificação foram utilizados como base os tempos de retenção e os filtros do espectro de massa de cada composto com sua respectiva energia de quebra de íon. Já a quantificação foi realizada pelo método de padronização externa com a elaboração de uma curva com 5(cinco) níveis de concentração de padrão.

2.4 Confirmação das análises GC-MS/MS

Na média, amostras de frutas e vegetais mostram a possibilidade de excederem os valores de concentração e massa de íons por serem acumulativas na coluna e no equipamento requerendo contínua confirmação. O método utilizado como CQ (controle de qualidade) era o de injeções, subsequentes às análises, de brancos do solvente e padrões puros, os quais passavam por todo o processo de extração à que as amostras eram submetidas, avaliando constantemente se havia variação no nível de recuperação.

2.5 Validação da Metodologia

Os valores adotados para os limites de detecção foram calculados com base na ANVISA. Obtidos com a análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes dos analitos até o menor nível detectável. O procedimento adotado foi o de aceitar como limite de detecção (LOD) a concentração ou massa do analito que gerou um sinal 3 (três) vezes superior ao ruído da linha de base. Para os limites de quantificação (LOQ) seguindo as recomendações da ANVISA foram obtidos valores 3,3 vezes o LOD, ou seja 10 (dez) vezes a relação sinal ruído. [12,13,20,21]

A precisão pode ser estimada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. O termo repetibilidade, ou precisão no dia define a precisão dos resultados obtidos dentro do próprio laboratório, por um mesmo analista e com a mesma instrumentação[14,15]. O guia ICH (International Conference on Harmonisation) recomenda que sejam realizadas nove determinações contemplando toda a faixa de calibração, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com amostras em triplicata, ou um mínimo de seis determinações em amostras contendo uma concentração equivalente à concentração média da faixa de calibração[16]. A resolução 899 da ANVISA segue o guia ICH e determina que sejam realizadas nove determinações contemplando toda a faixa de calibração[17]. O INMETRO recomenda que sejam realizadas de sete a nove replicatas para o cálculo do DPR[21] e a EPA não estabelece o número de amostras a serem analisadas para a estimativa da precisão em geral[15,18,19]. Cabe ressaltar que o termo utilizado em inglês é "repeatability". No Brasil, o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental) adota o termo repetitividade e a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) adota o termo repetibilidade[17,21].

Para este estudo a Repetibilidade, ou Precisão no dia, foi avaliada por 10 replicatas em 3 níveis de concentração para os padrões de pesticidas em solução cicloacetato (1:1). Já para a matriz foram realizadas sete replicatas em três níveis de concentração do analito atendendo o guia ICH e o INMETRO nas mesmas condições experimentais, em análises realizadas no mesmo dia. O mesmo procedimento foi realizado a cada dois dias em quatro dias de análise [22,16]. Avaliou-se também a precisão intermediária com a injeção de sete replicatas abrangendo uma concentração equivalente à concentração média da faixa de calibração, o que refletiu a capacidade do método de resistir a variações dos resultados analisados em quatro dias consecutivos de acordo com o planejamento experimental estabelecido pelo laboratório baseado no guia ICH [16].

A Linearidade do método foi verificada pela inclinação da reta resultante da curva analítica de 6 pontos de concentração variando entre 20 a 1000 pg.µL⁻¹ feita com 3 replicatas em cada ponto e pelo coeficiente de correlação linear (R^2), o qual deve se apresentar igual ou superior a 0,98 de acordo com a ANVISA. [20]

A Seletividade foi avaliada por testes de pureza de pico, evidenciando a capacidade do método de quantificar com exatidão os analitos estudados em presença de interferentes existentes na matriz tais como, isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, impurezas, produtos de degradação e outros.

A Recuperação do método foi avaliada pela análise de 10 repetições em 3 níveis de concentração tanto para os analitos quanto para a matriz isenta. Tais níveis foram determinados de forma a abrangerem todos os LMRs dos analitos e o procedimento foi repetido em duas outras ocasiões seguindo as exigências das agências regulamentadoras. Logo, a Exatidão evidenciada pela recuperação foi avaliada segundo as especificações da ANVISA, nas quais os níveis de recuperação devem se apresentar entre 80% e 120%.

3. RESULTADOS E DISCUSSAO

3.1 Extração e preparação das amostras

O objetivo do estudo era validar um método simples, rápido e robusto para a preparação das amostras, baseado na extração com solvente seguida de um melhor "cleanup" realizado por GPC. O método deve ser facilmente aplicável na rotina de análise com alta recuperação nas amostras. As preparação das amostras é frequentemente a parte mais crítica no método de multiresíduo com a dupla consideração na diversidade das substâncias que tem

de ser extraídas. A seletividade da extração foi diminuída devido a ampla classe de substâncias analisadas ao mesmo tempo.

Diclorometano e acetato de etila são os solventes comumente, mais utilizados para extração dos pesticidas polares. Após 20 testes realizados no mesmo dia e sobre as mesmas condições ambientais, ambos os solventes mostraram similaridades em termos de recuperação e limpeza dos extratos. Finalmente, o acetato de etila foi selecionado como o mais adequado, devido a sua baixa toxicidade em comparação com o diclorometano e também para minimizar o uso de solventes à base de cloro. O procedimento de extração se apresentou rápido e robusto e perfeitamente adaptável ao controle de resíduos em amostras. Foi observado durante os testes a necessidade de limpeza da fonte de íons a cada 20 dias, devido ao acúmulo de componentes resultantes da análise.

3.2 Parâmetros de validação do método para a análise

As curvas analíticas de padronização externa dos analitos apresentaram linearidade nas faixas de concentração estabelecidas como pode ser visto na Figura 1. Isso pode ser verificado pelos valores e coeficientes de correlação, pois foram próximos do valor 1, o que demonstrou a probabilidade de existir uma relação linear definida pelas equações lineares apresentadas, onde $y = ax + b$ (Tabela 2). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90. [12,20,21]

Figura 1: Gráficos das curvas de calibração de cada analito na análise

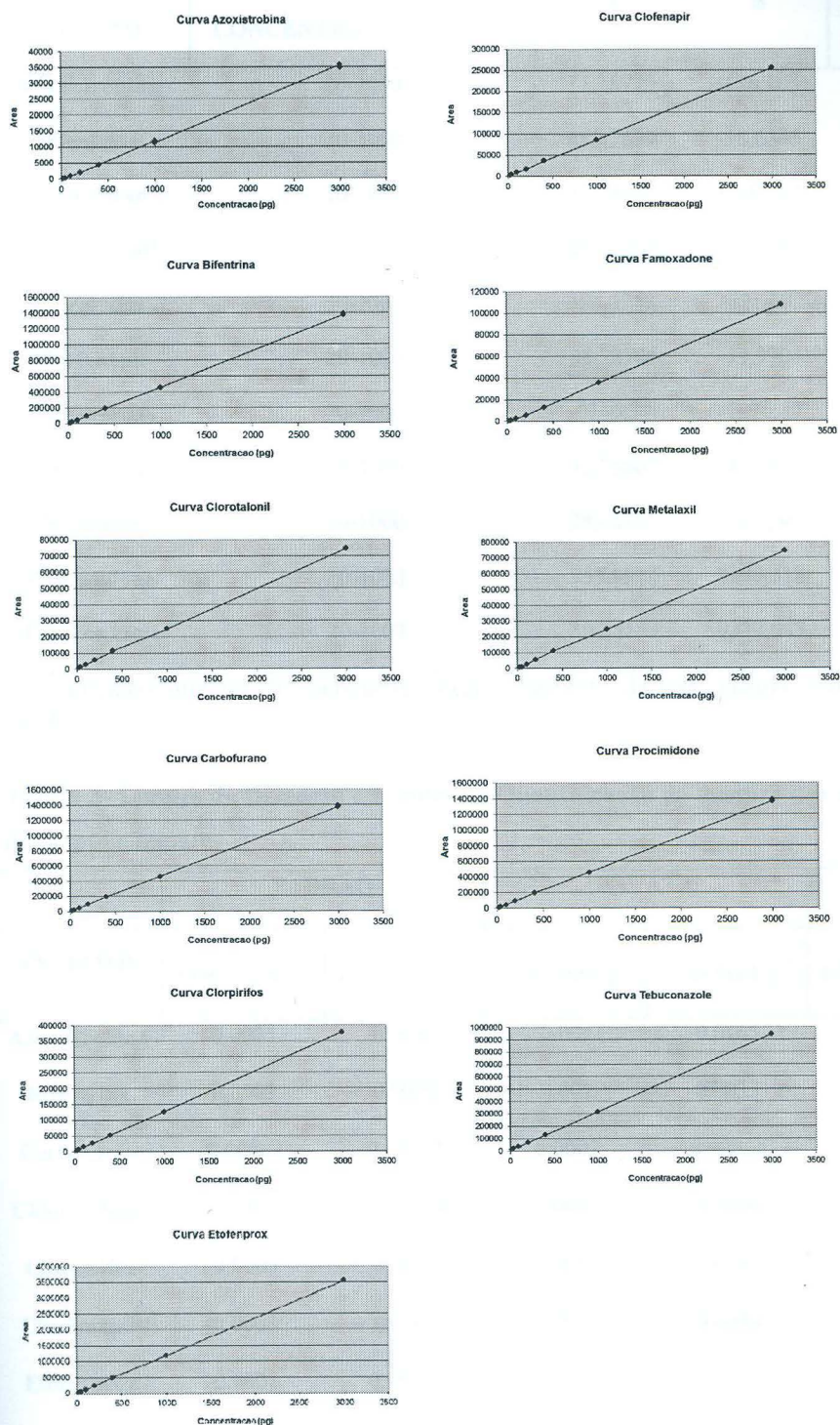


Tabela 2- Equações lineares GC-MS/MS em amostras de Batata e Tomate

ANALITO	FAIXA DE CONCENTRAÇÃO (pg. μ L ⁻¹)	A	B	R ²
Azoxistrobina	20-1000	11,28775	-176,163	0,997782
Bifentrina	20-1000	483,7639	-38,6346	0,999747
Carbofuran	20-1000	395,4616	3330,281	0,996991
Chlorotalonil	20-1000	283,1888	-16,4964	0,999945
Clorpirifós	20-1000	124,1753	2621,692	0,999528
Clorfenapir	20-1000	88,78794	-39,9704	0,998381
Etofenprox	20-1000	1246,34	-1970,87	0,999675
Famoxadone	20-1000	32,76867	-421,503	0,997638
Metalaxil	20-1000	283,6765	-353,46	0,999825
Procimidone	20-1000	957,9936	3339,518	0,999688
Tebuconazole	20-1000	301,5153	9377,043	0,999789

a= coeficiente angular; b=coeficiente linear (intercepto da reta quando x=0); R²= coeficiente de correlação linear.

Tabela 3- Limites de Detecção e Limites de Quantificação da mistura dos analitos analisados em amostras de batata e tomate

ANALITOS	PADRÃO		BATATA		FEIJÃO	
	LOD mg.Kg ⁻¹	LOQ mg.Kg ⁻¹	LOD mg.Kg ⁻¹	LOQ mg.Kg ⁻¹	LOD mg.Kg ⁻¹	LOQ mg.Kg ⁻¹
Azoxistrobina	0,0025	0,0082	0,005	0,0165	0,0042	0,0138
Bifentrina	0,0003	0,0009	0,001	0,0033	0,0018	0,0059
Carbofuran	0,00007	0,00023	0,0002	0,00066	-	-
Chlorotalonil	0,00015	0,00049	0,0005	0,0016	0,0002	0,0006
Clorpirifós	0,0005	0,0016	0,0015	0,0049	0,0012	0,0039
Clorfenapir	0,0003	0,0009	0,0015	0,0049	0,0011	0,0036
Etofenprox	0,0001	0,00033	-	-	0,0003	0,0009
Famoxadone	0,0025	0,0082	0,0055	0,0181	0,0047	0,0155
Metalaxil	0,0003	0,00099	0,001	0,0033	0,0014	0,0046
Procimidone	0,0001	0,00033	0,0004	0,0013	-	-
Tebuconazole	0,0005	0,0016	0,003	0,0099	0,0025	0,0082

Em 5mg de massa injetada

Como se observa na Tabela 3 os limites de detecção (LOD) calculados para o método demonstraram que o mesmo mostrou sensibilidade para a detecção dos analitos estudados. Da mesma maneira, o limite de quantificação (LOQ) também permitiu quantificar concentrações menores que os LMRs dos mesmos indicando que o método é suficientemente sensível para a análise realizada.

Tabela 4- Repetibilidade e Recuperação dos analitos em solução padrão e em amostras de batata e tomate

MATRIZ	ANALITO	CONCENTRAÇÃO (pg)	PRECISÃO NO DIA (CV%)	RECUPERAÇÃO (%)
PADRÃO	Azoxistrobina	20	0,9509	-
		100	0,3089	-
		1000	0,4577	-
	Bifentrina	20	0,3942	-
		100	0,4760	-
		1000	0,4951	-
	Carbofuran	20	0,1832	-
		100	0,3131	-
		1000	0,4630	-
	Chlorotalonil	20	1,1706	-
		100	0,0708	-
		1000	0,2935	-
	Clorpirifós	20	0,7027	-
		100	0,6052	-
		1000	0,7744	-
	Clorfenapir	20	1,3599	-
		100	0,1247	-
		1000	1,5309	-
	Etofenprox	20	0,2122	-
		100	0,0378	-
		1000	0,6436	-
	Famoxadone	20	2,0915	-
		100	0,2394	-
		1000	0,6527	-
	Metalaxil	20	0,6063	-

		100	0,0541	-
		1000	1,0568	-
	Procimidone	20	0,3555	-
		100	0,04823	-
		1000	0,2931	-
	Tebucnazole	20	0,4934	-
		100	0,9339	-
		1000	1,3975	-
BATATA	Azoxistrobina	20	0,9829	103,07
		100	1,1406	97,90
		1000	1,4416	97,95
	Bifentrina	20	0,4006	104,27
		100	0,4754	98,19
		1000	0,2228	98,71
	Carbofuran	20	0,2757	97,77
		100	0,2911	104,14
		1000	0,2471	101,5
	Chlorotalonil	20	1,1755	99,55
		100	1,1158	98,77
		1000	0,7286	100,80
	Clorpirifós	20	0,7374	102,44
		100	0,6266	103,24
		1000	0,7435	98,84
	Clorfenapir	20	1,4526	102,89
		100	0,2457	101,54
		1000	0,1161	100,31
	Famoxadone	20	2,0368	103,70
		100	0,2356	93,34
		1000	0,2913	96,32
	Metalaxil	20	0,3971	109,67
		100	0,0480	99,37
		1000	0,3062	99,38
	Procimidone	20	0,1760	100,59

		100	0,1118	101,51
		1000	0,1678	102,45
	Tebuconazole	20	0,3505	104,09
		100	0,06969	96,25
		1000	0,3851	97,91
TOMATE	Azoxistrobina	20	0,1816	96,32
		100	0,5546	98,95
		1000	0,4857	98,75
	Bifentrina	20	0,4212	102,84
		100	0,0462	98,72
		1000	0,0476	98,70
	Etofenprox	20	0,2717	104,4
		100	0,1002	98,75
		1000	0,4326	98,71
	Chlorotalonil	20	0,3451	99,96
		100	0,5837	101,57
		1000	0,3212	100,56
	Clorpirifós	20	0,7051	99,07
		100	0,3552	101,15
		1000	0,3586	98,5
	Clorfenapir	20	0,7338	99,73
		100	0,3029	102,18
		1000	0,0568	100,2
	Famoxadone	20	0,4761	98,73
		100	0,2747	97,32
		1000	0,2883	97,32
	Metalaxil	20	0,2791	102,84
		100	0,4803	97,68
		1000	0,3093	98,38
	Tebuconazole	20	1,7281	104,27
		100	0,0361	98,91
		1000	0,0381	98,91

Foram calculados a Concentração Média (M) e o Desvio Padrão Estimado (dp), dos quais se obteve os Coeficientes de Variação (CV). Como evidenciado na Tabela 4 os Coeficientes de Variação encontrados para as análises de Precisão no dia ficaram entre 0,0480% e 2,0368% para amostras de batata e entre 0,0361% e 1,7281% para as amostras de tomate. Em métodos de análises de traços ou impurezas, são aceitos Coeficientes de Variação (CV) de até 5%, dependendo da complexidade da amostra. [20]

O coeficiente de variação obtido no cálculo da precisão no dia foi de 1,5% para batata e 1,3% para o tomate enquanto que o obtido entre os dias (precisão intermediária) de análise foi de 0,83% para a batata e 0,53% para o tomate garantindo assim uma adequada precisão do método para ambas as amostras, visto que a legislação admite valores até 5 % para o cv. [20] Não foram feitos estudos de reprodutibilidade.

A Linearidade do método é verificado na figura 1 e na tabela 2, respectivamente pela inclinação da reta resultante da curva analítica e pelo coeficiente de correlação linear (R^2) de aproximadamente 0,99 , o qual deve ser igual ou superior a 0,98 de acordo com a ANVISA [20]

A Seletividade do método se apresentou pela capacidade do mesmo de quantificar com exatidão os analitos estudados em presença de interferentes existentes na matriz tais como, isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, impurezas, produtos de degradação e outros. Foram feitos testes de pureza de pico com o auxílio da espectrometria de massas em aproximadamente 26 amostras de batata e tomate insentas dos compostos estudados (amostras branco). Foi realizada a verificação de interferentes presentes nas regiões esperadas de eluição dos analitos de interesse, o que poderia levar a uma identificação falsa. Nem a identificação, nem a quantificação dos analitos alvos foram influenciadas pela presença de interferentes, ou seja, a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito foi inferior a 20% da resposta do LQ como exigido pela ANVISA. [19,20,21]

No caso do analito famoxadone observou-se que sua identidade e consequente quantificação correta somente foi possível pela determinação de estabelecer como critério o tempo de retenção do analito e a presença obrigatória do seu menor íon filho após o emprego dos filtros do espectro de massa com sua respectiva energia de quebra de íon.

A exatidão do método, determinada pela recuperação mostrou-se entre 93,34% e 109,67% para a batata e entre 96,32% e 104,27% para o tomate, ficando dentro das especificações de 80% a 120%.

4. CONCLUSÃO

A validação é essencial para definir se métodos desenvolvidos estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Esta forma, possibilita o conhecimento das limitações e da confiabilidade nas medidas realizadas nas análises.

Neste estudo, uma rápida e simples técnica de análise por CG-MS/MS foi desenvolvida e validada para determinação simultânea de 10 pesticidas em amostras de batata e de 9 em amostras de tomate. O método desenvolvido mostrou parâmetros de validação satisfatórios porém, dificuldades evidenciadas em métodos multiresíduos devido a influencia da natureza e concentração do composto de interesse e da matriz foram observadas.

Nos casos relatados foram obtidas recuperações para as amostras de batata entre 93,34% e 109,67% e Coeficientes de Variação entre 0,048% e 2,0368%, já para as amostras de tomate as recuperações ficaram entre 96,32% e 104,27% e Coeficientes de Variação entre 0,0361% e 1,7281%. Ambos os casos estão enquadrados na faixa recomendada pela ANVISA para os níveis de concentração investigados assegurando sua aplicabilidade em análises de rotina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] INSPECTIE W&V . Report of monitoring Results Concerning Directive 90/642/EEC, 86/362/EEC and recommendation 96/738/EU. The Netherlands, 1998.
- [2] NFA - NATIONAL FOOD ADMINISTRATION. Pesticide Residues in Food of Plant Origin /1997. Suecia, 1998.
- [3] MAFF - MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. Annual Report of the Working Party on Pesticide Residue 1998. London. 1999.
- [4] AUSTRALIA - DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FORESTRY. Report on the Australian National Residue Survey 1 January to 30 June 1999. Results, Canberra, 2000.
- [5] USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Pesticide Data program : Annual Summary Calendar Year 1998. Washington, DC, Jan/2000.
- [6] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informações do setor. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acessado em 10/02/2006.
- [7] GEBARA, A. B. Pesticide residues in fruits analysed by the Instituto Biológico de São Paulo from 1990 to 1995. In: IUPAC/GARP Workshop on Pesticides. Uses and Environmental Safety in Latin American. São Paulo, 13-16 outubro, 1996.
- [8] ZANDONÁ, M.; ZAPPIA, S.V. Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos: Resultado de cinco anos de monitoramento realizado pela Secretaria de Saúde do Paraná. Pesticidas: R. Ecotox. e Meio Ambiente, Curitiba, v.3, n. 3, p. 49-95, 1993.
- [9] IMOTO, M. N.; JESUS, D.A.; QUEIROZ, V.S. e NOGUEIRA. K.S. Apresentação dos Resultados do Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Produtos Orgânicos (frutas e legumes), realizado pelo Laboratório de Toxicologia do LACEN-PR. In: XII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos . ENAAL, CT-RS 12, Maceió - AL, 2000.
- [10] BRITO, N. M.; DE AMARANTE JR, O. P.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente, Curitiba, v.12, p. 155-166, jan./dez. 2002.
- [11] ORTELLI, D., EDDER, P., CORVI, C. LC-MS/MS Multiresidue Method used for the analysis of pesticides in fruits and vegetables. Genève- Suisse, 2003.
- [12] A. Sannino, P. Mambriani, M. Bandini, L. Bolzoni, J. AOAC Int.79 (1996) 1434.
- [13] A. Sannino, P. Mambriani, M. Bandini, L. Bolzoni, J. AOAC Int.78 (1995) 1209.

- [14] Maynard, A. W.; Chemtech. 1999, 20, 1517.
- [15] US Environmental Protection Agency;. Method 8260B - Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Revision 2, CD-ROM, 1996.
- [16] International Conference on Harmonisation (ICH); Guidance for Industry Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures, November 1996.
- [17] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.
- [18] US Environmental Protection Agency; Method 8000B – Determinative Chromatography Separations, CD-ROM, 1996.
- [19] US Environmental Protection Agency; Test Methods SW846 - Test Methods for Evaluating Solid Wastes, Chapter One: Quality Control, Revision 1, 2005.
<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/main.htm>, acessada em Janeiro 2007.
- [20] F.M. Lanças, Validação de métodos cromatográficos de análise. V.6. São Carlos; Editora Rima, 2004.
- [21] ANVISA- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- [22] INMETRO- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL.Orientações sobre validação de métodos de ensaio químico, DOQ-CGCRE=008, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

Na busca de rapidez e qualidade para atender a crescente demanda de análises necessárias para monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, a aplicação de métodos multirresíduos (MR) aliados à cromatografia a gás ou líquida com detecção por espectrometria de massas (EM ou MS) apresentadas neste trabalho, certificaram que esta técnica, demonstrou-se eficiente na análise de substâncias tóxicas em nível de traços em alimentos, no sentido de terem sido atingidos os Limites de Quantificação (LQ) abaixo dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) dos compostos de interesse. De ter sido possível, detectar todos os compostos que se desejou analisar, sendo um grande número de analitos de diferentes classes simultaneamente e da possibilidade de confirmar a identidade dos mesmos com exatidão, graças aos diferentes modos de varredura e ionização que puderam ser utilizados.

No estudo isso foi observado pelos resultados de precisão no dia obtidos para as amostras de batata (CV entre 0,28% e 2,8%) e feijão (CV entre 0,36% e 2,8%) em análises por LC-MS/MS e amostras de tomate (CV entre 0,047% e 1,72%) e batata (CV entre 0,048% e 2,036%) em análises por GC-MS/MS, pois todos estão dentro dos limites preconizados pela ANVISA e Inmetro que foram os órgãos legisladores utilizados na elaboração do trabalho. A exatidão representada pela recuperação do método foi outro parâmetro com resultados para as amostras de batata (entre 98,86% e 105,04%) e feijão (entre 99,85% e 103,9%) para análises por LC-MS/MS e amostras de tomate (entre 96,32% e 104,4%) e batata (entre 93,34% e 109,67%) para por GC-MS/MS dentro do exigido pelos órgãos normatizadores.

O uso, tanto da Cromatografia a Gás (GC) quanto da Líquida (LC) se torna indispensável, pois cada uma atende as necessidades específicas de cada componente, ou seja compostos iônicos, polares e termicamente instáveis ou não voláteis se adaptam melhor a Cromatografia Líquida enquanto que as características contrárias são melhor analisadas na Cromatografia a Gás.

Apesar da grande seletividade da técnica MS/MS, alimentos são matrizes muito complexas, das quais nem sempre é possível extrair o analito sem que interferentes estejam presentes nos extratos obtidos, sendo muitas vezes necessária uma etapa adicional de "cleanup" no preparo da amostra que supriu-se com o uso da técnica de GPC. Outra limitação da aplicação da cromatografia com detecção por espectrometria de massas em

análises de rotina com métodos multiresíduos é que vários parâmetros instrumentais têm que ser otimizados para cada analito, como energia de ionização, ajuste das janelas de scans, energia de dissociação (quando se utiliza DIC), para que sejam obtidos espectros de massas com abundâncias relativas adequadas dos íons de interesse.

A capacidade da espectrometria de massa de fornecer informação estrutural com exatidão, permitiu a realização da distinção entre compostos isobáricos de interesse ou provenientes da matriz, quando estes produziam um espectro de massas com fragmentos de íons distintos. Mas, caso alguns destes compostos gerem espectros com fragmentos de mesma massa, o MS/MS não é capaz de distinguí-los. Em alguns casos, a aplicação de apenas MS possibilita a diferenciação destes tipos de analitos, porém, na maioria dos casos causa uma diminuição da detectabilidade, seletividade e aumento na razão sinal/ruído. No emprego do MS/MS observou-se uma maior seletividade, o que reduz a necessidade de se obterem separações cromatográficas com grande resolução, uma vez que esta técnica permitiu identificar e, muitas vezes quantificar, compostos que coeluem, entretanto, os dados obtidos com MS/MS não são mais complexos que aqueles provenientes da MS.

Segundo a literatura, e como pôde ser observado no trabalho uma das principais vantagens de se acoplar a cromatografia à MS/MS é que esta permite a identificação de compostos com alto grau de confiança, o que não seria possível apenas com base nas características de retenção/eluição fornecidas por outros detectores utilizados em CLAE e GC. Uma vantagem muito importante é que, quando os analitos de interesse fazem parte de uma mistura, apenas utilizando a técnica espectrométrica, o espectro obtido apresenta íons de todos os componentes desta mistura e a identificação de cada um é feita com maior dificuldade. Mas, graças à combinação desta técnica com a capacidade de separação da cromatografia, na maioria das vezes compostos “puros” são introduzidos no espectrômetro de massas, de maneira que podem ser identificados de forma inequívoca.