



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

TATIANA SAINARA MAIA FERNANDES

**USO DAS TÉCNICAS QuEChERS E CG-EM NA GESTÃO AMBIENTAL PARA
MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS
EM PIMENTÃO**

FORTALEZA

2018

TATIANA SAINARA MAIA FERNANDES

USO DAS TÉCNICAS QuEChERS E CG-EM NA GESTÃO AMBIENTAL PARA
MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS EM
PIMENTÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F412u Fernandes, Tatiana Sainara Maia.
Uso das técnicas QuEChERS e CG-EM na gestão ambiental para monitoramento de resíduos de agrotóxicos organofosforados em pimentão / Tatiana Sainara Maia Fernandes. – 2018.
186 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil: Saneamento Ambiental, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.
1. ecotoxicologia. 2. cromatografia gasosa. 3. resíduos de agrotóxicos. 4. pimentão. I. Título.
CDD 628
-

TATIANA SAINARA MAIA FERNANDES

USO DAS TÉCNICAS QuEChERS E CG-EM NA GESTÃO AMBIENTAL PARA
MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS EM
PIMENTÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Aprovada em 03/ 08/ 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ronaldo Stefanutti
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Pesq. Dra. Marisete Dantas de Aquino
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Pesq. Dr. Guilherme Julião Zocolo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Prof. Dr. Francisco Wagner de Sousa
Instituto Federal do Ceará – IFCE (Caucaia)

A todos que de alguma forma contribuíram
para que eu alcançasse esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a vida por ter me dado à oportunidade de adquirir mais conhecimento e de alguma forma contribuir com a humanidade.

Ao Professor Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento, meu orientador Científico, pela oportunidade e confiança que me deu, pela disponibilidade apresentada e pelas condições que me proporcionou na realização deste trabalho no Laboratório de Análises de Traços (LAT).

Ao Daniel Barbosa Alcântara que se disponibilizou a me ensinar e auxiliar no preparo das amostras, bem como no tratamento dos dados e escrita da Tese.

Ao Pesquisador Dr. Guilherme Julião Zocolo, pela disponibilidade apresentada e pelas condições que me proporcionou na realização deste trabalho na Embrapa.

À técnica da Embrapa Tigressa Rodrigues que realizou as medidas.

Aos coordenadores do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN/Embrapa) por disponibilizar o espaço físico e toda infraestrutura para realização deste trabalho.

Aos colegas do grupo de pesquisa, Hélio, Pablo, Vitor, Edmilson, Itana, Marília, Rouse, Breno, Fran, Amanda, Mayza, Juliene, Liana, Luiza, Igor, Thiago, Álvaro, Raquel, Socorro entre outros, pelos agradáveis momentos de descontração no LAT e pelos conhecimentos compartilhados.

À Universidade Federal do Ceará, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil pela oportunidade de realização do Doutorado.

À Fundação cearense de Apoio Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa de Doutorado.

E por fim, a todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indireta para execução deste trabalho.

RESUMO

O desenvolvimento de métodos analíticos é crucial para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, pois assegura que as concentrações destes compostos estejam dentro dos limites considerados seguros para a saúde, bem como promove as Boas práticas Agrícolas (BPA), contribuindo tanto para a sociedade quanto para o meio ambiente. Este trabalho descreve a validação de uma metodologia analítica baseada no método QuEChERS-citrato (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) e detecção por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) para análise simultânea de seis agrotóxicos organofosforados (clorpirifós diclorvós, dissulfotom, etoprofós, fenclorfós e protiofós) em pimentão orgânico e não-orgânico. O pimentão foi escolhido por se tratar de um produto bastante consumido no Brasil e no mundo, e principalmente porque nos últimos anos o PARA (Programa de Análise de Resíduos em Alimentos) identificou várias amostras de pimentão fora dos padrões de conformidade, sendo entre 2010 e 2012 o primeiro da lista de alimentos mais contaminados por agrotóxicos organofosforados. O método QuEChERS-citrato gerou um extrato mais limpo, ajudando a manter um maior tempo de vida tanto do *liner* quanto da coluna. Os testes estatísticos teste-*t* e teste-*F* foram aplicados para verificar as significâncias dos parâmetros e da regressão das curvas analíticas obtidas na matriz. O estudo do efeito matriz (EM) foi realizado devido à complexidade da amostra, onde todos os compostos avaliados apresentaram efeito negativo. Os agrotóxicos estudados apresentaram boa linearidade com coeficientes de correlação superior a 0,99. Os limites de detecção (LOD) variaram entre 0,002 mg.kg⁻¹ e 0,039 mg.kg⁻¹ e os limites de quantificação (LOQ) variaram entre 0,006 mg.kg⁻¹ e 0,130 mg.kg⁻¹. Somente uma das amostras no mercado local (Fortaleza-CE) apresentou contaminação pelo agrotóxico clorpirifós, que não é permitido pela ANVISA nesse tipo de cultura.

Palavras-chave: Pimentão. Resíduos de agrotóxicos. Organofosforados. QuEChERS. CG-EM.

ABSTRACT

The development of analytical methods is crucial for the monitoring of pesticide residues in food, as it ensures that the concentrations of these compounds are within the limits considered safe for health, as well as promotes Good Agricultural Practices (GAP), contributing both to society and the environment. This work describes the validation of an analytical methodology based on the QuEChERS citrate method and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) for the simultaneous analysis of six organophosphates pesticides (chlorpyrifos, dichlorvos, disulfotom, etoprophos, fenchlorphos and prothiophos) in bell pepper organic and non-organic. The bell pepper has been chosen because it is a much consumed product in Brazil and in the world, and mainly because in recent years the PARA (Food Pesticide Residues Analysis Program) has identified several samples of bell peppers outside the compliance standards, being between 2010 and 2012 the first on the list of foods most contaminated by organophosphates pesticides. The QuEChERS-citrate method generated a cleaner extract, helping to maintain a longer life for both liner and column. The *t*-test and *F*-test statistical tests were applied to verify the significance of the parameters and regression of the analytical curves obtained in the matrix. The study of the matrix effect (ME) was performed due to the complexity of the sample, in which all the evaluated compounds presented negative effect. The pesticides studied showed good linearity with coefficients of correlation higher than 0.99. The limits of detection (LOD) ranged from 0.002 mg.kg⁻¹ to 0.039 mg.kg⁻¹ and the limits of quantification (LOQ) ranged from 0.006 mg.kg⁻¹ to 0.130 mg.kg⁻¹. Only one of the samples obtained in the local market (Fortaleza-CE) showed contamination by the chlorpyrifos pesticide, which is not allowed by ANVISA in this type of crop.

Keywords: Bell pepper. Pesticide residues. Organophosphates. QuEChERS. GC-MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1	– Processo geral de registro de agrotóxicos	26
Figura 2.2	– Ciclo dos agrotóxicos no meio ambiente	32
Figura 2.3	– Principais rotas de transporte e degradação de agrotóxicos no ambiente	33
Figura 2.4	– Estruturas genéricas das principais subclasses dos organofosforados e exemplos de representantes de cada subclasse	37
Figura 2.5	– Selos Federais do SisOrg para produtos orgânicos no Brasil versão colorida	50
Figura 2.6	– Exemplo de embalagem contendo a certificação federal SisOrg e OAC orgânica	51
Figura 2.7	– Frutos de pimentão com antracnose	56
Figura 2.8	– Sintoma do ataque de <i>Phytophthora capsici</i> em pimentão, (A) plantas murchas; (B) apodrecimento do caule; (C) fruto recoberto com o micélio branco do fungo	57
Figura 2.9	– Sintoma do ataque de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> em pimentão, (A) folha de pimentão com pústulas; (B) frutos com cancrs pronunciados	58
Figura 2.10	– Esquema dos estágios das principais versões do método QuEChERS: a) original; b) acetato e c) citrato	76
Figura 2.11	– Esquema de um CG-EM	88
Figura 3.1	– Esquema do preparo das soluções estoque para análise em CG-EM	111
Figura 3.2	– Esquema do preparo das soluções padrões a partir da solução padrão de $1,0 \times 10^3 \mu\text{g.L}^{-1}$	113
Figura 3.3	– Esquema do preparo das soluções padrões a partir da solução padrão de $1,0 \times 10^4 \mu\text{g.L}^{-1}$	114
Figura 3.4	– Processo de trituração e armazenamento da amostra para curva na matriz	114
Figura 3.5	– Esquema da obtenção do extrato primário da matriz	115
Figura 3.6	– Formação das três fases na etapa de extração após centrifugação	116
Figura 3.7	– Esquema do procedimento de limpeza (<i>clean-up</i>)	117
Figura 3.8	– Procedimento de evaporação do solvente acetonitrila	118
Figura 3.9	– Procedimento de ressuspensão para obtenção do extrato de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ para	

injeção no sistema cromatográfico	118
Figura 3.10 – CG-EM utilizado no estudo (EMBRAPA - Fortaleza).....	120
Figura 3.11 – Programação de temperatura utilizado no estudo	120
Figura 3.12 – Formação das três fases na etapa de extração após centrifugação para as amostras não orgânicas	121
Figura 3.13 – Adição da solução padrão $1,0 \times 10^4 \mu\text{g.L}^{-1}$ para recuperação	126
Figura 3.14 – Esquema de obtenção da concentração do analito no extrato em $\mu\text{g.L}^{-1}$	128
Figura 4.1 – Cromatogramas obtidos após injeção de $1 \mu\text{L}$ do mix de $1,0 \times 10^3 \mu\text{g.L}^{-1}$ no modo CIT. (a) TI a 170°C e VI de $1,0 \mu\text{L}$, (b) TI a 240°C e VI de $3,0 \mu\text{L}$ e (c) TI a 240°C e VI de $5,0 \mu\text{L}$	131
Figura 4.2 – (a) CIT dos agrotóxicos na matriz do pimentão em concentração de $1500 \mu\text{g.L}^{-1}$, (b) Cromatograma de IE para o clorpirifós e (c) Espectro de massa do clorpirifós	136
Figura 4.3 – Espectros de massa e cromatogramas de IE de cada agrotóxico na matriz do pimentão na concentração de $1500 \mu\text{g.L}^{-1}$	137
Figura 4.4 – Distribuição do Efeito Matriz (%) para os 6 agrotóxicos em pimentão	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	– Classificação dos agrotóxicos quanto ao risco à saúde	30
Tabela 2.2	– Nomes e algumas características dos OFs estudados	43
Tabela 2.3	– Características químicas específicas e DL ₅₀ dos OFs estudados	44
Tabela 2.4	– Valores do IDA e suas respectivas agências reguladoras	69
Tabela 2.5	– Porcentagem de amostras de pimentão insatisfatórias nos últimos anos no PARA.....	72
Tabela 4.1	– Fragmentos utilizados para obtenção do CIE de cada agrotóxico	134
Tabela 4.2	– Comparação do efeito matriz (%) para os 6 agrotóxicos em pimentão	142
Tabela 4.3	– Curvas de calibração e coeficiente de correlação (<i>R</i>) dos agrotóxicos	143
Tabela 4.4	– Teste de linearidade das curvas analíticas preparadas na matriz, considerando nível de significância de 95% para o valor de F_{tabelado}	144
Tabela 4.5	– Resultados do teste estatístico de significância para os parâmetros da curva de calibração	145
Tabela 4.6	– Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para os seis agrotóxicos, com os respectivos LMRs da EC para o pimentão	146
Tabela 4.7	– Artigos publicados que analisaram um ou mais dos agrotóxicos estudados nesta Tese.....	148
Tabela 4.8	– Exatidão em termos de recuperação com desvio padrão relativo (DPR) e repetitividade da precisão instrumental em termos do coeficiente de variação (CV)	150
Tabela 4.9	– Valores do IDA e suas respectivas agências reguladoras	153

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 – Classificação de periculosidade ambiental dos agrotóxicos	31
Quadro 2.2 – Classe Agrônômica, classificação toxicológica e uso agrícola dos OFs estudados	45
Quadro 3.1 – Pontos de coleta das amostras analisadas	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>a</i>	Coeficiente angular
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>b</i>	Coeficiente linear
BPA	Boas Práticas Agrícolas
CAS	Serviço de Resumos de Química (<i>Chemical Abstract Service</i>)
CE	Ceará
CIT	Cromatograma de Íons Totais
CEASA	Centro de Abastecimento e Logística
CEN	Comitê Europeu de Normalização
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa com triplo quadrupolo
CV	Coeficiente de Variação
DG SANTE	Direção da Saúde e Segurança Alimentar da Comissão Europeia (<i>Directorate-General for Health and Food Safety</i>)
DPR	Desvio Padrão Relativo
DL ₅₀	Dose Letal Mediana
DOU	Diário Oficial da União
EC	Comissão Europeia (<i>European Commission</i>)
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (<i>European Food Safety Authority</i>)
EM	Espectrometria de Massa
EM/EM	Espectrômetro de massa com triplo quadrupolo
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (<i>United States Environmental Protection Agency</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)

FDA	Administração de Comidas e Remédio (<i>Food and Drug Administration</i>)
FPD	Detector Fotométrico de Chamas (<i>Flame Photometric Detector</i>)
g	gramas
GA	Gestão Ambiental
GCB	Negro de Carbono Grafitizado (<i>Graphitized Carbon Black</i>)
GL	Graus de Liberdade
IA	Ingrediente Ativo
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização (<i>International Conference on Harmonisation</i>)
IDA	Índice de Ingestão Diária Aceitável
IE	Ionização por Impacto de Elétrons
IE	Íons Extraídos
IFOAM	Federação Internacional dos Movimentos da Agricultura Orgânica (<i>International Federation of Organic Agriculture Movements</i>)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
K_{oc}	Coefficiente de partição de carbono orgânico
K_{ow}	Constante de partição octanol - água
LAT	Laboratório de Análises de Traços
LD	Limite de Detecção
LMQPN	Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais
LMRs	Limite Máximo de Resíduos
LQ	Limite de Quantificação
μ EC/NP	Detector de captura de microelétrons acoplado a um detector de nitrogênio-fósforo
m/z	massa/carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MMR	Monitoramento de Múltiplas Reações
MR	Multiresíduo
OFs	Organofosforados

p.c	Peso corpóreo
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PD	Ponto de Degradação
PNAPO	Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
POF	Pesquisa de Orçamento Familiar
ppm	partes por milhão
ppt	partes por trilhão
PSA	Amina Primária Secundária (<i>Primary Secondary Amine</i>)
PV	Pressão de Vapor
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto e Seguro (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i>)
<i>R</i>	Coefficiente de correlação
SIM	Monitoramento Seletivo de Íons (<i>Selective Ion Monitoring</i>)
SISORG	Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica
TI	Temperatura de injeção
Tr	Tempo de Retenção
UFC	Universidade Federal do Ceará
VI	Volume de Injeção
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Motivação para realização do trabalho de pesquisa	20
1.2	OBJETIVOS	21
1.2.1	<i>Objetivos gerais</i>	<i>21</i>
1.2.1	<i>Objetivos específicos</i>	<i>22</i>
1.3	Organização da Tese	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	Agrotóxicos	23
2.1.1	<i>Uso de agrotóxicos no Brasil</i>	<i>24</i>
2.1.1.1	<i>Registro de Agrotóxicos no Brasil</i>	<i>26</i>
2.1.2	<i>Classificação</i>	<i>27</i>
2.1.2.1	<i>Classificação toxicológica</i>	<i>28</i>
2.1.2.2	<i>Classificação química</i>	<i>29</i>
2.1.2.3	<i>Classificação ambiental</i>	<i>31</i>
2.1.3	<i>Agrotóxicos e seus efeitos negativos</i>	<i>31</i>
2.1.3.1	<i>Meio ambiente</i>	<i>33</i>
2.1.3.2	<i>Saúde Humana</i>	<i>34</i>
2.1.4	<i>Agrotóxicos Organofosforados (OFs)</i>	<i>36</i>
2.1.4.1	<i>Aspectos gerais dos OFs</i>	<i>36</i>
2.1.4.2	<i>Uso dos OFs</i>	<i>38</i>
2.1.4.3	<i>Ação dos OFs nos humanos</i>	<i>39</i>
2.1.5	<i>OFs avaliados no estudo</i>	<i>41</i>
2.1.5.1	<i>Aspectos Gerais</i>	<i>41</i>
2.2	Orgânicos	46
2.2.1	<i>Produção orgânica no Brasil</i>	<i>47</i>
2.2.2	<i>Certificação de produtos orgânicos no Brasil</i>	<i>49</i>
2.3	Pimentão (<i>Capsicum annuum</i> L.)	52
2.3.1	<i>Pragas e tratos culturais</i>	<i>55</i>
2.4	Gestão Ambiental (GA)	59
2.5	Ecotoxicologia dos agrotóxicos	60

2.6	Monitoramento de agrotóxicos em alimentos	61
2.6.1	<i>Métodos multiresíduos</i>	64
2.6.2	<i>Limite máximo de resíduos (LMRs)</i>	66
2.6.3	<i>Índice de Ingestão Diária Aceitável (IDA)</i>	68
2.6.4	<i>Programas de Análise de Resíduos em Alimentos</i>	69
2.6.4.1	<i>Pimentão no PARA</i>	71
2.7	Preparo de amostras para extração de resíduos de agrotóxicos	73
2.7.1	QuEChERS	75
2.7.1.1	<i>Extração</i>	79
2.7.1.2	<i>Partição (salting out)</i>	81
2.7.1.3	<i>Limpeza (clean-up)</i>	83
2.8	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)	87
2.8.1	Efeito Matriz	91
2.8.1.1	<i>Efeito Matriz na Quantificação de Agrotóxicos por CG</i>	92
2.8.1.2	<i>Aumento da Resposta Cromatográfica</i>	94
2.8.1.3	<i>Diminuição da Resposta Cromatográfica</i>	95
2.8.1.4	<i>Atenuação do Efeito Matriz</i>	96
2.9	Validação de métodos analíticos	98
2.9.1	Seletividade	100
2.9.2	Linearidade	101
2.9.2.1	<i>teste-F</i>	103
2.9.2.2	<i>Teste de Student (teste-t)</i>	103
2.9.3	Precisão	104
2.9.4	Exatidão	105
2.9.4.1	<i>Ensaio de recuperação</i>	107
2.9.5	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	108
3	MATERIAIS E MÉTODOS	110
3.1	Reagentes, solventes e materiais utilizados	110
3.2	Limpeza das vidrarias	111
3.3	Preparo das soluções estoque para análise em CG-EM	111
3.4	Preparo das soluções padrão e obtenção das curvas analíticas	112
3.4.1	<i>Curva analítica no solvente</i>	112

3.4.2	<i>Curva analítica na matriz</i>	112
3.4.2.1	<i>Procedimento de extração e limpeza pelo método QuEChERS – citrato</i>	112
3.4.2.2	<i>Efeito matriz</i>	119
3.5	Condições cromatográficas	119
3.6	Amostragem	121
3.7	Parâmetros de validação do método CG-EM	123
3.7.1	<i>Seletividade</i>	123
3.7.2	<i>Linearidade</i>	123
3.7.3	<i>Exatidão</i>	125
3.7.4	<i>Precisão</i>	127
3.7.5	<i>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)</i>	127
3.8	Conversão da relação massa/volume ($\mu\text{g.L}^{-1}$) para relação massa/massa (mg.kg^{-1})	128
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	130
4.1	Análise cromatográfica por CG-EM	130
4.2	Aplicação do método QuEChERS-citrato no preparo das amostras	132
4.3	Seletividade	133
4.4	Efeito Matriz	138
4.5	Linearidade	143
4.5.1	<i>Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão)</i>	144
4.5.2	<i>Teste de significância dos parâmetros de calibração</i>	144
4.6	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	146
4.7	Exatidão e Precisão	149
4.8	Análises qualitativas e quantitativas de amostras de pimentão da cidade de Fortaleza-CE	152
5	CONCLUSÃO	156
	REFERÊNCIAS	157
	ANEXO A – PUBLICAÇÃO DE CAPÍTULO DE LIVRO	184
	ANEXO B – PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS	185

1 INTRODUÇÃO

O aumento no uso de agrotóxicos na produção agrícola e a decorrente presença de resíduos acima dos níveis permitidos nos alimentos têm sido motivo de apreensão na área da saúde pública, requerendo dos diversos setores do governo, investimento e organização para implementar ações de controle do uso de agrotóxicos (ANVISA, 2011, 2013, 2014). Além disso, a percepção dos consumidores sobre a qualidade dos alimentos sempre esteve sujeita a mudanças ao longo do tempo (PAYÁ *et al.*, 2007). Nos últimos anos houve um aumento substancial da importância atribuída aos aspectos relacionados aos resíduos de agrotóxicos e um crescente demanda por melhores práticas agrícolas, transparência e rastreabilidade na produção e comercialização dos alimentos (PAYÁ *et al.*, 2007; GIACINTI *et al.*, 2016).

Com o rápido crescimento da população, a demanda mundial de alimentos aumentará e, potencialmente, a necessidade de uso de agrotóxicos (KO *et al.*, 2014). A aplicação de agrotóxicos na produção agrícola sem dúvida traz muitos benefícios, uma vez que os mesmos controlam pragas e aumentam os rendimentos de produção (LU *et al.*, 2013; BANDEIRA *et al.*, 2014; BAKIRCI *et al.*, 2014; PORTOLÉS *et al.*, 2014; BARGAŃSKA, ŚLEBIODA; NAMIEŚNIK, 2014; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; REICHERT *et al.*, 2015; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017; SRIVASTAVA *et al.*, 2017). A agricultura convencional depende fortemente do uso de agrotóxicos, mas traz consigo um impacto negativo devido às suas propriedades tóxicas, persistência no meio ambiente e capacidade de bioacumulação (AKTAR, 2014; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; GIACINTI *et al.*, 2016; ZOCCALI *et al.*, 2017).

Além de serem prejudiciais à saúde, os agrotóxicos podem atingir fontes de água, prejudicar os animais, destruir o solo, devastar os ecossistemas naturais e contaminar os alimentos (AKTAR, 2014; BARGAŃSKA, ŚLEBIODA; NAMIEŚNIK, 2014; GIACINTI *et al.*, 2016). A definição do termo "contaminante" definido inclui compostos formados durante a produção, armazenamento ou processamento de alimentos (por exemplo, micotoxinas), mas não inclui substâncias (por exemplo, agrotóxicos ou medicamentos veterinários), intencionalmente adicionados aos alimentos, que são chamados de "resíduos" (FRENICH; ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014; CODEX ALIMENTARIUS, 2015).

O uso sem critérios técnicos adequados dos agrotóxicos, muitas vezes através de aplicações incorretas, pode resultar na ocorrência de resíduos nos alimentos, e

consequentemente em problemas de segurança alimentar, arriscando a saúde dos consumidores (BANDEIRA *et al.*, 2014; BAKIRCI *et al.*, 2014; GÓMEZ-ALMENAR; GARCÍA-MESA, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2017; SILVA, 2017). Com a ocorrência de resíduos nos alimentos, muitas vezes compostos potencialmente nocivos, a segurança alimentar passou a ser uma das principais preocupações da sociedade (FRENICH, ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014; WU, 2017).

De acordo com a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*, EFSA), o risco potencial que os agrotóxicos oferecem ao homem através da alimentação, como decorrência de uma exposição crônica diária, acabou por exigir a criação da concentração máxima de agrotóxico legalmente aceito no alimento, em decorrência das Boas Práticas Agrícolas (BPA), conhecido como Limites Máximos de Resíduos (LMRs) (BANDEIRA *et al.*, 2014; WALORCZYK, 2014). Além da questão de saúde pública, a presença de substâncias indesejáveis e perigosas nos alimentos também limita ou reduz a comercialização desses produtos nos mercados internacionais, e consequentemente, várias organizações internacionais estabeleceram LMRs para agrotóxicos, medicamentos veterinários ou micotoxinas (FRENICH; ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014).

Assim, os resíduos de agrotóxicos devem cumprir os níveis máximos de resíduos estabelecidos por regulamentos nacionais e internacionais, onde até mesmo quando alguns agrotóxicos são aplicados de acordo com as BPA, os resíduos podem permanecer nas culturas (MACHADO *et al.*, 2017). Em vista disso, muitos países estabeleceram programas de monitoramento e regulamentos legais a fim de avaliar e controlar o uso de agrotóxicos em culturas comestíveis, como vegetais e frutas (LU *et al.*, 2013; WALORCZYK, 2014; MACHADO *et al.*, 2017; ZOCCALI *et al.*, 2017).

Com o intuito de garantir a segurança dos consumidores e do comércio, as agências governamentais têm intensificado o estabelecimento e a regulamentação dos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) nos alimentos (MACHADO *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2017; ZOCCALI *et al.*, 2017; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017), onde a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a instituição responsável por estabelecer e regulamentar os LMRs para diversos tipos de alimentos comercializados no Brasil (OSHITA; JARDIM, 2012; QUEIROZ; FERRACINI; ROSA, 2012; REBELO *et al.*, 2016).

Através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA), a ANVISA monitora periodicamente diversos alimentos *in natura*, inclusive o pimentão, investigando a

conformidade desses produtos quanto ao teor dos resíduos de agrotóxicos que podem estar presentes (ANVISA, 2009, 2011, 2013, 2014; JARDIM; CALDAS, 2012).

Embora os seres humanos estejam expostos a pequenas quantidades de resíduos de agrotóxicos, a exposição prolongada a estes resíduos pode prejudicar a vida humana através da modificação da função de diferentes órgãos do corpo, incluindo os sistemas nervoso, reprodutivo, respiratório, renal, endócrino e imunológico (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; KO *et al.*, 2014). Existem cada vez mais evidências sobre o vínculo da exposição aos agrotóxicos com a incidência de doenças crônicas, incluindo esclerose múltipla, diabetes, doenças cardiovasculares, renais, câncer, infertilidade, distúrbios hormonais, Parkinson e Alzheimer (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; KO *et al.*, 2014; KIRA; LINKER; DUBOWSKI, 2016; SINYANGWE; MBEWE; SIJUMBILA, 2016; GERAGE; MEIRA; SILVA, 2017; COSTA; MELLO; FRIEDRICH, 2017). Assim, é necessário prever as quantidades residuais de agrotóxicos, a fim de evitar a distribuição de produtos agrícolas contaminados aos consumidores (KO *et al.*, 2014). Portanto, a inspeção rigorosa de resíduos de agrotóxicos nos alimentos pelos órgãos estaduais apropriados ou outras instituições é considerada de suma importância (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015). A análise de resíduos de agrotóxicos representa uma importante aplicação analítica com o intuito de monitorar vários produtos alimentares e agrícolas, protegendo a saúde humana e apoiando as agências reguladoras para garantir a segurança alimentar (RAI *et al.*, 2016).

Este trabalho visa desenvolver e validar uma metodologia analítica para ser utilizada na gestão ambiental para o monitoramento de seis agrotóxicos organofosforados em pimentão orgânico e não orgânico, usando o método QuEChERS-citrato e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

1.1 Motivação para realização do trabalho de pesquisa

A acumulação de agrotóxicos em produtos agrícolas é uma grande preocupação, já que as plantas atuam como intermediárias no transporte de contaminantes do solo, da água e do ar para os seres humanos e a fauna (KO *et al.*, 2014). O Brasil dispõe de legislação relativa aos agrotóxicos, mas o monitoramento ainda está distante de outros países, a exemplo do que ocorre nos Estados Unidos da América (EUA) e a Europa (WALORCZYK, 2014). Assim, é necessário estabelecer melhores práticas de avaliação dos resíduos de agrotóxicos nos alimentos (BENBROOK; BAKER, 2014; QUIJANO *et al.*, 2016). Estudos mostram que

os alimentos produzidos organicamente apresentam menores riscos de contaminação por agrotóxicos em relação aos alimentos que não são produzidos organicamente. Contudo, os alimentos produzidos organicamente não estão inteiramente isentos de resíduos de agrotóxicos (BENBROOK; BAKER, 2014).

Apesar da melhora na tecnologia de instrumentação e dos novos métodos analíticos, a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes de alimentos complexas ainda representa uma aplicação desafiadora (LU *et al.*, 2013; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2014; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017). A avaliação dos resíduos de agrotóxicos nos alimentos tornou-se um objetivo prioritário a fim de garantir a qualidade dos alimentos e proteger os consumidores contra possíveis riscos (JOKANOVIĆ, 2012; PIRSAHEB *et al.*, 2017).

Para Portolés *et al.* (2014) existe uma necessidade de métodos abrangentes capazes de detectar um maior número de compostos em níveis baixos em matrizes de amostras complexas de forma eficiente e efetiva. De acordo com os PARA (ANVISA 2009, 2010, 2011, 2013, 2016) o pimentão tem apresentado um elevado índice de resultados insatisfatórios, com amostras contendo agrotóxicos não autorizados para cultura, onde se verificou a presença de organofosforados. Assim é necessário um método para a determinação de resíduos de agrotóxicos em pimentões, uma vez que se espera que a exposição potencial humana seja maior a partir de vegetais que são consumidos crus. (KO *et al.*, 2014; QUIJANO *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2016; LEMOS *et al.*, 2016; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a análise qualitativa e quantitativa de seis agrotóxicos organofosforados no pimentão (*Capsicum annuum L.*) orgânico e não orgânico por método cromatográfico acoplado a espectrometria de massa (CG-EM), empregando o método QuEChERS-citrato no preparo das amostras, com o intuito de mostrar sua aplicabilidade no monitoramento ambiental.

1.2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Testar as melhores condições cromatográficas para identificação dos seis agrotóxicos organofosforados;
- ✓ Utilizar o método QuEChERS-citrato como forma de preparo das amostras para extração dos seis agrotóxicos organofosforados;
- ✓ Avaliar a influência do efeito matriz do pimentão nos seis agrotóxicos organofosforados estudados;
- ✓ Validar as curvas analíticas através de testes estatísticos;
- ✓ Comparar os resultados obtidos neste estudo com outros da literatura;
- ✓ Aplicar a metodologia desenvolvida em pimentões orgânicos e não orgânicos obtidos em diferentes pontos comerciais da cidade de Fortaleza-CE.

1.3 Organização da Tese

Esta Tese está organizada em 6 capítulos. O primeiro capítulo trata de uma introdução de forma geral do tema em estudo, o segundo capítulo realiza uma revisão da literatura sobre agrotóxicos, descrevendo seus aspectos básicos para melhor entendimento da técnica escolhida, bem como da matriz adotada para análise. Os capítulos 3 e 4 apresentam a parte experimental, análise e discussão dos resultados, respectivamente, enquanto o Capítulo 5 apresenta as considerações finais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção é abordada a definição de agrotóxicos e sua classificação, bem como aspectos dos agrotóxicos analisados. Também são encontradas tanto informações relativas à matriz escolhida (pimentão) e a cultura orgânica, quanto tópicos relacionados às figuras de mérito presentes na validação de métodos.

2.1 Agrotóxicos

Inicialmente, os agrotóxicos foram desenvolvidos para uso como armas químicas nas guerras mundiais, mas no período pós-guerra ganharam um novo e promissor mercado na agricultura (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017). Para obter elevados índices de produtividade, os agrotóxicos acabaram sendo parte fundamental do modelo agrícola contemporâneo, mas seu impacto social e ambiental exige constante preocupação por parte da sociedade (CHOWDHURY *et al.*, 2013; SILVA, 2017).

Os agrotóxicos são utilizados na pré-colheita (QUIJANO *et al.*, 2016; FARAJZADEH *et al.*, 2016) para proteger as culturas da infestação por doenças de pragas e plantas (ervas daninha) (QUIJANO *et al.*, 2016), e pós-colheita para assegurar o alto rendimento (RAI *et al.*, 2016). Mais de 800 agrotóxicos pertencentes a mais de 100 classes de substâncias foram registrados e usados globalmente por décadas, e as propriedades químicas e físicas destes podem variar consideravelmente (HONG *et al.*, 2016). Atualmente existem cerca de 1000 substâncias ativas consideradas como agrotóxicos (MASIÁ *et al.*, 2016).

Atualmente os agrotóxicos são considerados como um dos principais fatores envolvidos na contaminação ambiental (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013). Como a preocupação da fiscalização no campo está relacionada apenas com a comercialização dos agrotóxicos, não existindo vigilância nem orientação para a sua correta aplicação, isso acaba gerando riscos não somente para o homem do campo (SILVA, 2017; DOMÉNECH; MARTORELL, 2017). A intoxicação por agrotóxicos pode resultar de exposição ocupacional, acidental e intencional (JOKANOVIĆ, 2012). Os seres humanos estão expostos a uma grande variedade de riscos químicos ao longo de suas vidas através da poluição ambiental do ar (DOMÉNECH; MARTORELL, 2017), água, solo e alimentos, sendo os agrotóxicos um dos perigos mais frequentes nos alimentos (SILVA, 2017; DOMÉNECH; MARTORELL, 2017).

As BPA surgiram com o intuito de ajudar a reduzir o uso de agrotóxicos mais perigosos (GRIMALT *et al.*, 2016). De acordo com Prestes *et al.* (2009) a determinação de resíduos de agrotóxicos exerce um papel importante para a estimativa da exposição humana a estes compostos, favorecendo a avaliação da conformidade da produção agrícola com as BPA, e com isso, viabilizando decisões regulatórias comerciais visando garantir a segurança alimentar.

A regulamentação e o controle do uso de agrotóxicos em todo o mundo são feitos por órgãos internacionais como a *World Health Organization* (WHO), *Food and Drugs Administration* (FDA) e a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), através do estabelecimento de normas e padrões a serem seguidos pelos produtores e pelo mercado (RESTREPO *et al.*, 2014). O controle dos agrotóxicos só pode ser realizado se os organismos reguladores e de vigilância contarem com metodologias analíticas apropriadas que, de forma eficaz e confiante, sejam aptos de verificar a realização dos LMRs (BESIL *et al.*, 2015).

Agrotóxico é o termo usado legalmente e está definido na Lei 7.802/89, também chamada Lei de Agrotóxicos (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; OSHITA; JARDIM, 2012; ANVISA, 2017). Conforme Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989 (BRASIL, 1989), bem como no Decreto 4.074 de 04 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002), os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas, de culturas florestais e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

2.1.1 Uso de agrotóxicos no Brasil

A utilização dos agrotóxicos em larga escala ocorreu a partir da década de 70 (SILVA, 2017), com a alegação de que eles garantiriam a produção de alimentos para combater a fome (SILVA, 2017; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017) e, foram incluídos forçadamente, junto com fertilizantes e adubos químicos, nos financiamentos agrícolas, com o inocente nome de "defensivos agrícolas". (SILVA, 2017). A implementação de agrotóxicos

foi encorajada por várias políticas e pesquisas agrícolas, que comprovaram a necessidade dos mesmos na agricultura, juntamente com o apelo de que a revolução verde e a modernização agrícola poderiam ser essenciais para eliminar a fome no mundo (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017) Assim, com o aumento do uso de agrotóxicos no Brasil a partir de 1970, houve a necessidade de regulamentar o seu uso (SOARES; FREITAS; COUTINHO, 2005; TAVELLA *et al.*, 2011).

O Brasil é um dos principais produtores de alimentos do mundo, onde mais de 90% dos agricultores dependem do uso de agrotóxicos, fazendo com que o país ficasse em primeiro lugar no uso de agrotóxicos em todo o mundo nos últimos anos, com mais de 673 milhões de toneladas aplicadas em 2008 (REICHERT *et al.*, 2015). A partir de 2008 o Brasil assumiu o posto de maior consumidor mundial de agrotóxicos (OSHITA; JARDIM, 2012; RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014; MOURA, 2015; CARNEIRO *et al.*, 2015; SAMBUICHI *et al.*, 2017), onde estatísticas revelaram que cada brasileiro consome em média 5,2 L de agrotóxicos por ano (OSHITA; JARDIM, 2012).

De 2000 a 2013 as vendas de agrotóxicos no país aumentaram 205,1%. De 2009 a 2012, houve um aumento de 59,08%, atingindo o volume de 495.764,55 toneladas de ingredientes ativos (IA) vendidos em 2013 (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017). Uma das agências federais responsáveis pelo registro e controle desses insumos no país, juntamente com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), cuja responsabilidade é os dados sobre venda e comercialização de agrotóxicos no Brasil (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017; IBAMA, 2017). De acordo com art. 41 do Decreto nº 4.074 de 2002, as empresas são obrigadas a fornecer valores semestrais de produção, importação, exportação e vendas aos órgãos federais e estaduais responsáveis pela supervisão desses produtos (IBAMA, 2017; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017).

O Brasil possui uma legislação moderna, restritiva e exigente, no que se refere aos agrotóxicos, onde dispõe sobre pontos que vão além da necessidade de comprovação da eficiência agrônômica, das garantias de redução dos riscos aos seres humanos (seja de caráter ocupacional, alimentar e de saúde pública) e das ameaças ao meio ambiente ocasionadas por essas substâncias químicas (SPADOTTO, 2006). A primeira lei a ser editada para garantir a segurança do uso de agrotóxicos foi a Lei Federal 7.802 de 1989, sendo regulamentada pelo decreto Nº 4.074 de 2002 (ANVISA, 2012; JARDIM; CALDAS, 2012), e depois surgiu o decreto Nº 5981/2006, onde esses padrões legais regulam todos os aspectos relacionados aos

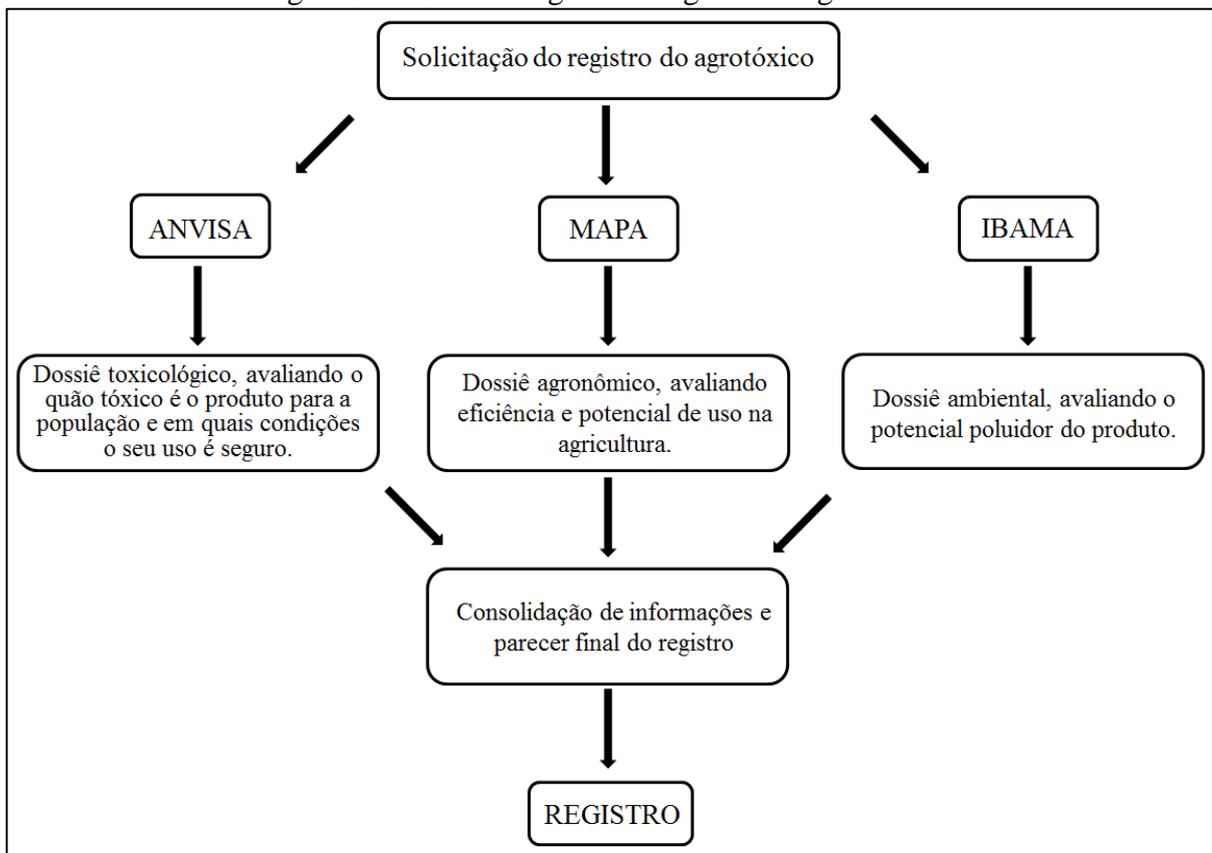
agrotóxicos, incluindo registro, uso, produção, armazenamento, transporte e disposição (JARDIM; CALDAS, 2012).

2.1.1.1 Registro de Agrotóxicos no Brasil

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos em escala mundial (SILVA; SILVA, 2016). De acordo com a lei brasileira é aconselhável utilizar somente agrotóxicos que são registrados em órgão federal competente, conforme as diretrizes e exigências dos órgãos responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura (CARNEIRO *et al.*, 2015; COSTA; MELLO; FRIEDRICH, 2017).

Para obtenção do registro no Brasil, o agrotóxico deve passar pela análise de três órgãos do governo federal (OSHITA; JARDIM, 2012; JARDIM; CALDAS, 2012; MAPA, 2012; ANVISA, 2017; FOOD SAFETY BRAZIL, 2018), como mostra a Figura 2.1.

Figura 2.1 – Processo geral de registro de agrotóxicos.



Fonte: Adaptado de MAPA (2012).

O Ministério da Saúde, através da ANVISA, é responsável pela análise do impacto do uso de agrotóxicos na saúde humana (JARDIM; CALDAS, 2012), através avaliação toxicológica do produto abrangendo os riscos à saúde do trabalhador (exposição ocupacional), assim como os riscos à saúde do consumidor e do alimento tratado (FOOD SAFETY BRAZIL, 2018) e pela determinação dos LMRs.

O MAPA atua na avaliação da eficácia do controle de pragas (JARDIM; CALDAS, 2012) e a aprovação do rótulo e bula do produto (JARDIM; CALDAS, 2012; FOOD SAFETY BRAZIL, 2018), enquanto o MMA, através do IBAMA, avalia o impacto sobre as espécies não humanas (JARDIM; CALDAS, 2012) através da avaliação ambiental e ecotoxicológica (FOOD SAFETY BRAZIL, 2018), sendo que cada um desses órgãos realiza um determinado tipo de avaliação do produto, de modo independente do outro, e a empresa solicita o registro do agrotóxico simultaneamente nos três órgãos regulatórios (MAPA, 2012), sendo o MAPA o órgão responsável por fornecer o registro de agrotóxicos (ANVISA, 2017).

A empresa precisa fornecer uma grande quantidade de informações sobre o produto para a ANVISA para determinar o perigo potencial, visando reduzir o risco para os consumidores finais (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017). De acordo com a ANVISA (2017) os agrotóxicos, componentes e afins possuem validade indeterminada, podendo ser cancelados nos casos de reavaliação toxicológica, de impossibilidade de serem sanadas irregularidades identificadas ou quando constatada fraude. Para maiores informações a cerca do registro de agrotóxicos no Brasil é interessante consultar a Lei 7.802, de 1989, e o Decreto 4.074, de 2002, bem como as Instruções Normativas Conjuntas.

2.1.2 Classificação

A classificação dos agrotóxicos representa um tema questionável, uma vez que várias denominações têm sido empregadas para determinar sua ação ou organismo alvo (OSHITA; JARDIM, 2012). As principais formas de classificação dos agrotóxicos são quanto à finalidade (organismo-alvo de ação), modo de ação, origem, nível de toxicidade e grupo químico funcional da substância (BRASIL, 1989; JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; OSHITA; JARDIM, 2012; KAILASA; WU; HUANG, 2013; RIZZETTI *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2018).

Na classificação por finalidade eles possuem várias classes agronômicas: acaricidas (controlar ácaros) (OSHITA; JARDIM, 2012; ANVISA, 2017), inseticidas

(controlar insetos), fungicidas (controlar fungos) (OSHITA; JARDIM, 2012; KAILASA; WU; HUANG, 2013; ANVISA, 2017), herbicidas (combate às plantas invasoras), nematicidas (controlar nematoides) (KAILASA; WU; HUANG, 2013; ANVISA, 2017), reguladores de crescimento, entre outras (ANVISA, 2017). Já na classificação por modo de ação, existem as seguintes possibilidades: ingestão, contato, fumegante e microbiano (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; OSHITA; JARDIM, 2012). Enquanto na classificação por origem os agrotóxicos podem ser provenientes de compostos orgânicos ou inorgânicos, de bactérias, fungos e vegetais (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; OSHITA; JARDIM, 2012). Sendo que a classificação por nível de toxicidade e grupo químico funcional da substância é mais explorada nos itens 2.1.2.1 e 2.1.2.2.

As formulações dos agrotóxicos são constituídas de ingredientes ativos (princípios ativos) responsáveis por intervir na atividade biológica normal dos seres vivos (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). Existem mais de 1000 ingredientes ativos que são comercializados como inseticida, herbicida e fungicida (LU *et al.*, 2018). Tanto a dimensão biológica quanto a química servem de base para a produção e ação dos agrotóxicos, onde especialmente quando princípios ativos resultam da química, a capacidade tóxica se amplia, não só para o alvo visado, mas também para todos os organismos que venham a entrar em contato com os mesmos (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; RIZZETTI *et al.*, 2016). Dentre outras competências, é de responsabilidade da ANVISA, avaliar e classificar toxicologicamente os agrotóxicos, seus componentes e afins (ANVISA, 2016).

Um fator muito importante é o conhecimento sobre as propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, pois elas afetam a permanência ou degradação deles no ambiente, influenciando a quantidade de resíduos nos alimentos (GILBERT-LÓPEZ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2009; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017).

2.1.2.1 Classificação toxicológica

A classificação toxicológica é fundamental para o conhecimento da toxicidade de um produto, do ponto de vista de seus efeitos agudos (SILVA, 2017). Ela corresponde exclusivamente a quem manuseia o produto havendo exposição única, sendo importante como medida de segurança para quem trabalha na produção, embalagem, armazenamento, transporte, preparo da calda e sua aplicação. Esta classificação não está relacionada com a exposição em longo prazo e segurança do meio ambiente (STÜTZER; GUIMARÃES, 2003;

CARVALHO; PIVOTO, 2011; SILVA, 2017). Este tipo de classificação esta relacionada com a identificação do componente de risco referente a uma substância química, diferenciando a toxicidade dos agrotóxicos levando-se em consideração o ingrediente ativo e sua formulação (MORAIS, 2009).

A classificação toxicológica no Brasil é de responsabilidade do Ministério da Saúde, sendo que a determinação legal recomenda especificamente que esses produtos mostrem em seus rótulos uma faixa colorida indicando a classe toxicológica (SILVA, 2017). Assim, a cor dos rótulos das embalagens ou as numerações podem variar dependendo da toxicidade do agrotóxico (OSHITA; JARDIM, 2012).

Outra forma de classificar os agrotóxicos em função das classes toxicológicas é através da dose letal mediana (DL_{50}) (MORAIS, 2009; JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; OSHITA; JARDIM, 2012). Os dados de toxicidade são obtidos através de experiências com animais e análises laboratoriais (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017; IBAMA, 2017). A DL_{50} é a dose de uma substância administrada por via oral, por contato ou pela via inalatória, que é letal para 50% dos organismos submetidos à experimentação (MORAIS, 2009; JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017; IBAMA, 2017). A Tabela 2.1 apresenta os tipos de classificação toxicológica citados anteriormente bem como a dose capaz de matar um adulto.

A DL_{50} é representada pela relação mássica, isto é, miligramas da substância tóxica por quilograma de massa viva, onde para propósitos de estabelecer medidas de segurança contra os riscos à saúde humana, os produtos comerciais devem ser enquadrados em função da DL_{50} , inerente a cada substância (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

2.1.2.2 Classificação química

Os agrotóxicos abrangem uma ampla variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais, resultando em diferentes modos de ação, biotransformação e eliminação (GALLI *et al.*, 2006; LORENZ, 2015). Com base na natureza química do agrotóxico, as principais classes são os organofosforados, organoclorados, carbamatos (GALLI *et al.*, 2006; JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; LORENZ, 2015; SINYANGWE; MBEWE; SIJUMBILA, 2016), piretróides (GALLI *et al.*, 2006; LORENZ, 2015) e neonicotinóides (LU *et al.*, 2018).

Tabela 2.1 – Classificação dos agrotóxicos quanto ao risco à saúde.

Classe	Classificação	Cor da faixa	DL ₅₀ (mg.kg ⁻¹ de peso corpóreo)				Dose capaz de matar um adulto
			Oral		Dérmica		
			Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	
I	extremamente tóxico	vermelho	5	20	10	40	1 pitada/algumas gotas
II	altamente tóxico	amarelo	5 - 50	20 - 200	10 - 100	40 - 400	Algumas gotas/ 1 colher de chá
III	medianamente tóxico	azul	50 - 500	200 - 2000	100 -1000	400 - 4000	1 colher de chá/2 colheres de sopa
IV	pouco ou muito pouco tóxico	verde	> 500	> 2000	> 1000	> 4000	2 colheres de sopa/ 1 copo

Fonte: adaptado de Paschoarelli e Menezes (2009); Morais (2009); Jardim, Andrade e Queiroz (2009); Silva (2017b); Carvalho e Barbosa (2013).

2.1.2.3 Classificação ambiental

Uma classificação não menos importante é a de acordo com sua periculosidade ambiental, que vai de “pouco” até “altamente perigoso” (PASCHOARELLI; MENEZES, 2009; SILVA, 2017), como mostra o Quadro 2.1. O MMA (Ministério do Meio Ambiente) é quem avalia e classifica o potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico através de estudos físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos (SILVA, 2017).

Quadro 2.1 – Classificação de periculosidade ambiental dos agrotóxicos.

Classe	Nível de perigo ao meio ambiente
I	Altamente perigoso
II	Muito perigoso
III	Perigoso
IV	Pouco perigoso

Fonte: Adaptado de Paschoarelli e Menezes (2009).

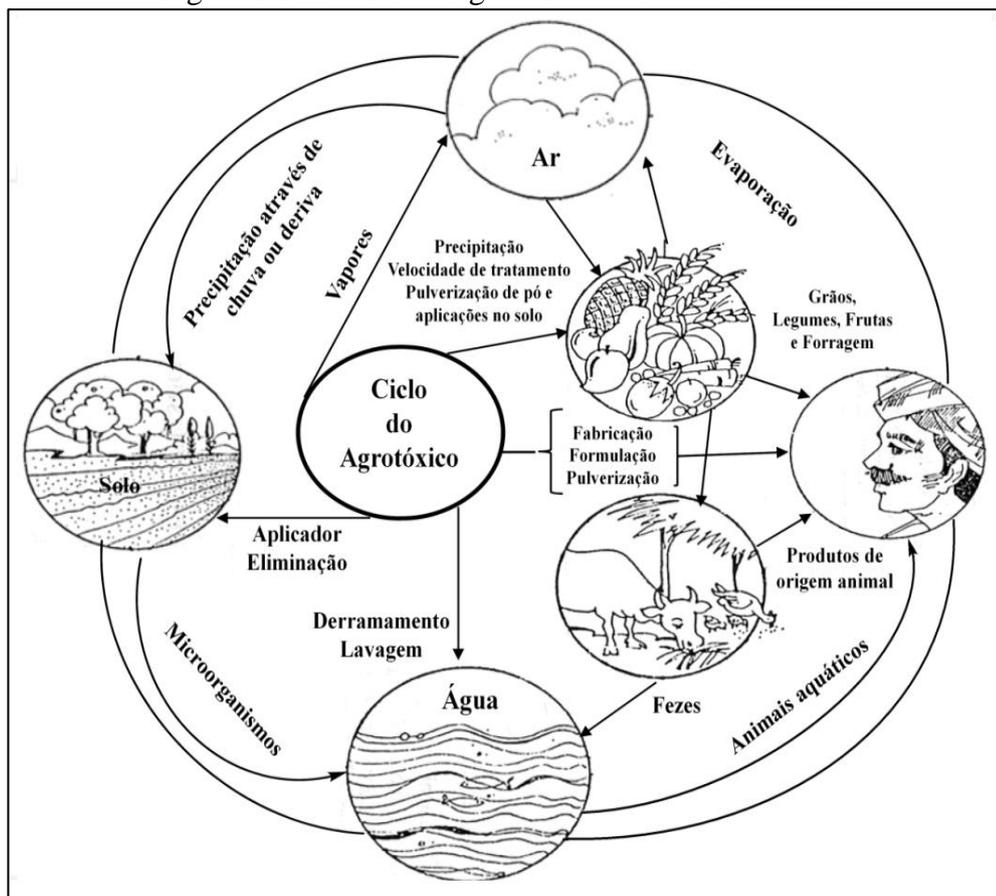
2.1.3 Agrotóxicos e seus efeitos negativos

Os agrotóxicos são considerados venenos utilizados para matar pragas específicas (SINYANGWE; MBEWE; SIJUMBILA, 2016), mas o principal efeito colateral do seu uso excessivo na agricultura moderna (KIRA, LINKER; DUBOWSKI, 2016), muitas vezes incorreto (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; BLANKSON *et al.*, 2016), é a exposição a produtos químicos tóxicos (KIRA, LINKER; DUBOWSKI, 2016; ZIVAN; BOHBOT-RAVIV; DUBOWSKI, 2017). Os resíduos de agrotóxicos estão incluídos nos perigos químicos, onde os efeitos nocivos de substâncias químicas normalmente são avaliados em exposições em longo prazo, sendo que no caso de agrotóxicos é necessário considerar tanto os efeitos agudos como os crônicos (DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008).

Os riscos não se restringem ao homem do campo (SILVA, 2017), pois os agrotóxicos e seus resíduos são persistentes e podem se acumular em vários ecossistemas (BARGAŃSKA; ŚLEBIODA; NAMIEŚNIK, 2014), atingindo os mananciais de água e o solo (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; SILVA, 2017). O uso intenso de agrotóxicos pode acarretar na degradação, em alguns casos de forma irreversível, dos recursos naturais como água, solo, fauna e flora, levando a desequilíbrios ecológicos e biológicos (BLANKSON *et al.*, 2016).

É praticamente impossível quantificar o risco de ingestão de agrotóxicos considerando todos os efeitos cumulativos e sinérgicos (LEMOS *et al.*, 2016). A Figura 2.2 mostra como diversos fatores podem influenciar a persistência de resíduos de agrotóxicos de uma esfera para outra através do ciclo do agrotóxico, como por exemplo: a natureza e a dosagem da aplicação, sua degradação com o tempo, metabolismo e conversão em vários produtos (KAILASA; WU; HUANG, 2013).

Figura 2.2 – Ciclo dos agrotóxicos no meio ambiente.



Fonte: Adaptado de Kailasa, Wu e Huang (2013).

Devido à própria essência, a maioria dos agrotóxicos apresenta um alto grau de toxicidade já que eles possuem a finalidade de matar certos organismos (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; SINYANGWE; MBEWE; SIJUMBILA, 2016), mas outros seres vivos, inclusive os humanos, acabam sendo vulneráveis aos efeitos tóxicos dos agrotóxicos em graus distintos (SILVA, 2017; DOMÉNECH; MARTORELL, 2017), pois possuem funções bioquímicas e fisiológicas parecidas com estes organismos (SILVA, 2017). Assim, o uso de agrotóxicos gera graves preocupações não só de efeitos potenciais na vida selvagem e nos ecossistemas sensíveis, mas também sobre a saúde humana (JARDIM;

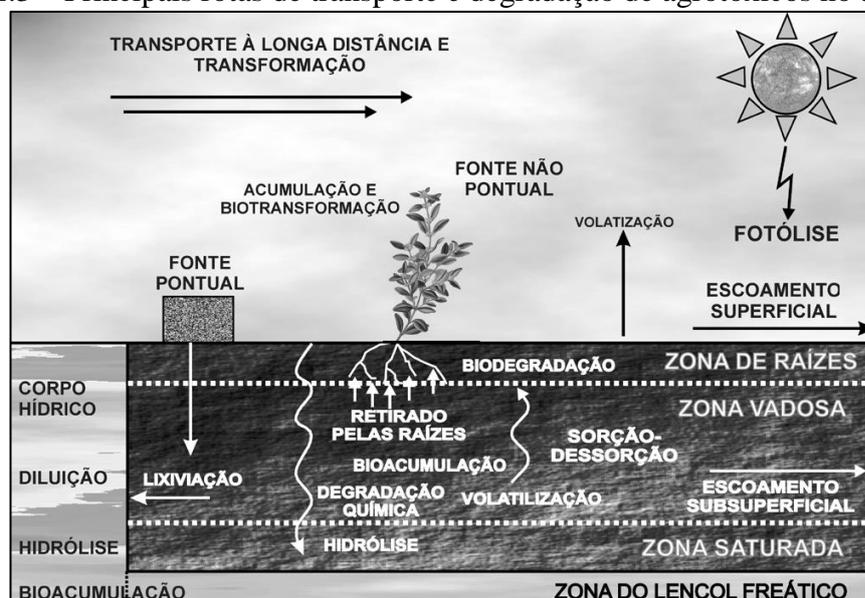
ANDRADE; QUEIROZ, 2009; SINYANGWE; MBEWE; SIJUMBILA, 2016; LU *et al.*, 2018).

2.1.3.1 Meio ambiente

A contaminação ambiental provocada pelo uso de agrotóxicos tem motivado preocupações quanto ao uso inapropriado destes compostos, necessitando medidas em relação à aplicação, resíduos provenientes das mais diversas fontes, bem como a disposição final apropriada desses resíduos, sem prejudicar o meio ambiente (SILVA, 2017).

Diversos fatores podem influenciar no comportamento dos agrotóxicos no meio ambiente como, por exemplo, tipo de formulação, método de aplicação, solubilidade dos compostos em água, características de solo e plantas, adsorção às partículas de solo, volatilização, persistência, mobilidade e condições climáticas (SILVA, 2017). A Figura 2.3 apresenta os principais processos que agem na movimentação e na degradação de agrotóxicos no meio ambiente, demonstrando as rotas mais prováveis nas quais esses compostos podem ser localizados (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

Figura 2.3 – Principais rotas de transporte e degradação de agrotóxicos no ambiente.



Fonte: Jardim, Andrade & Queiroz (2009).

Os agrotóxicos podem interferir em processos básicos do ecossistema, tais como a respiração do solo, a ciclagem de nutrientes, a mortandade de peixes ou aves, bem como a

redução de suas populações, entre outros efeitos, dependendo da toxicidade e do tempo que permanecem presentes no meio ambiente (SILVA, 2017).

A aplicação de agrotóxicos é um episódio de poluição do ar em curto prazo com efeitos próximos ou de longo alcance (ZIVAN; SEGAL-ROSENHEIMER; DUBOWSKI, 2016). A deriva atmosférica é parte da pulverização agrícola carregada para fora da área-alvo através da ação do vento (SILVA, 2017), sendo considerada uma importante via de perda de agrotóxicos (ZIVAN; BOHBOT-RAVIV; DUBOWSKI, 2017; SILVA, 2017), e consequentemente contaminação ambiental (SILVA, 2017), porém ainda existe uma grande lacuna de conhecimento sobre esse fenômeno complexo (ZIVAN; BOHBOT-RAVIV; DUBOWSKI, 2017). O agrotóxico pode ser transportado da área-alvo na forma de gotas ou vapor, onde dependendo da pressão de vapor e das características da formulação do produto, a perda na forma de vapor pode acontecer durante (deriva primária) ou depois da aplicação (deriva secundária) (ZIVAN; SEGAL-ROSENHEIMER; DUBOWSKI, 2016; SILVA, 2017). Condições relativamente quentes e secas podem aumentar a deriva (ZIVAN; SEGAL-ROSENHEIMER; DUBOWSKI, 2016).

2.1.3.2 Saúde Humana

A utilização de agrotóxicos nas produções agrícolas gera graves consequências aos seres humanos, tanto aos que lidam diretamente com o produto, quanto à população em geral consumidora dos alimentos (SILVA, 2017). O uso incorreto de agrotóxicos durante as aplicações agrícolas pode ocasionar a presença de seus resíduos em produtos agrícolas (SRIVASTAVA *et al.*, 2017), e, portanto, levar à exposição dietética de populações humanas (LEMOS *et al.*, 2016; SRIVASTAVA *et al.*, 2017). A exposição dietética aos resíduos de agrotóxicos chega a ser cinco vezes maior do que outras rotas de exposição, como a respiração de ar ou água potável (LEMOS *et al.*, 2016).

Uma vez que a maioria dos agrotóxicos aplicados chega à folhagem vegetal (ZIVAN; SEGAL-ROSENHEIMER; DUBOWSKI, 2016), a exposição aos agrotóxicos acaba sendo proveniente do consumo de frutas e vegetais contendo resíduos de agrotóxicos, por contato com superfícies contaminadas ou por inalação de resíduos no ar, por exemplo, deriva de agrotóxicos (ZIVAN; SEGAL-ROSENHEIMER; DUBOWSKI, 2016; KIRA, LINKER; DUBOWSKI, 2016).

Estudos mostram que a ingestão de alimentos contaminados por resíduos de agrotóxicos resulta em uma maior exposição tóxica para humanos, cerca de 10^3 a 10^5 vezes maior do que a induzida pela inalação ou água ingerida (MARGNI *et al.*, 2002). A contaminação por agrotóxicos ocorre principalmente devido ao uso indiscriminado ao longo dos anos (SILVA, 2017). Além disso, os agrotóxicos quase sempre ocorrem em misturas, cujos efeitos combinados toxicológicos sobre a saúde humana são em grande parte desconhecidos (ROUSIS; ZUCCATO ; CASTIGLIONI, 2016).

Alguns dos efeitos tóxicos nos seres humanos incluem toxicidade neurológica aguda, comprometimento do desenvolvimento neurológico, distúrbios no sistema imunológico, distúrbios nos sistemas reprodutivo e endócrino, câncer, doenças renais crônicas e várias outras doenças (CHOWDHURY *et al.*, 2013; COSTA; MELLO; FRIEDRICH, 2017). Os agrotóxicos estão associados a um amplo espectro de riscos para a saúde humana (BAKIRCI *et al.*, 2014; JAHANMARD; ANSARI; FEIZI, 2016), que vão desde intoxicações agudas (BAKIRCI *et al.*, 2014; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017) a crônicas (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; BAKIRCI *et al.*, 2014; JAHANMARD; ANSARI; FEIZI, 2016).

Na intoxicação aguda cada substância pode ser responsável por sintomas ou efeitos distintos (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017), podendo apresentar sintomas como fraqueza, cólicas abdominais, vômitos, espasmos musculares, convulsões, irritação da conjuntiva (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017), dor de cabeça (BAKIRCI *et al.*, 2014; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017), náuseas (BAKIRCI *et al.*, 2014), respiração difícil, perda de apetite e hemorragia nasal, entre outros, e cada substância pode ser responsável para sintomas ou efeitos distintos (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017).

A intoxicação crônica também possui sintomas característicos para cada substância, desde (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017) câncer (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; BAKIRCI *et al.*, 2014; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017), danos reprodutivos, má funcionamento do sistema endócrino (BAKIRCI *et al.*, 2014), diabetes (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013), efeitos neurotóxicos retardados, alterações cromossômicas, dermatite de contato, dano hepático, arritmias cardíacas, danos nos rins, neuropatias periféricas, alergias (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017), asma (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013), doença de Parkinson (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017; COSTA; 2018), Alzheimer (MOSTAFALOU;

ABDOLLAHI, 2013; COSTA, 2018) efeitos teratogênicos e perda de audição, entre outros (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017).

Os humanos têm exposições ambientais aos resíduos de agrotóxicos principalmente por meio da dieta na ingestão de produtos alimentares, que geralmente é muito maior do que aqueles relacionados ao consumo de água e à inalação do ar, com exceção da exposição ocupacional ou em casa (JOKANOVIĆ, 2012).

2.1.4 Agrotóxicos Organofosforados (OFs)

2.1.4.1 Aspectos gerais dos Ofs

Os compostos OFs são um grupo de agrotóxicos que engloba alguns dos produtos químicos mais tóxicos utilizados na agricultura (KAZEMI *et al.*, 2012), sendo uma das principais classes de agrotóxicos (COSTA, 2018). Apesar de existirem regras de nomenclatura formal para esses compostos, eles são geralmente reportados na literatura por seus nomes comuns (SCHENK *et al.*, 2016). Os agrotóxicos OFs são ésteres sintéticos, amidas ou derivados tiol (STOYTCHIEVA, 2011a) de ácido fosfórico (AMARAL, 2007; STOYTCHIEVA, 2011a; SCHENK *et al.*, 2016; MANGAS *et al.*, 2017), fosfônico (STOYTCHIEVA, 2011a; AMARAL, 2007; SCHENK *et al.*, 2016), fosforotióico ou fosfonotóico (STOYTCHIEVA, 2011a).

Segundo Baird (2002) os agrotóxicos OFs possuem, sem exceção, um átomo de fósforo pentavalente ao qual podem estar conectados (BAIRD, 2002):

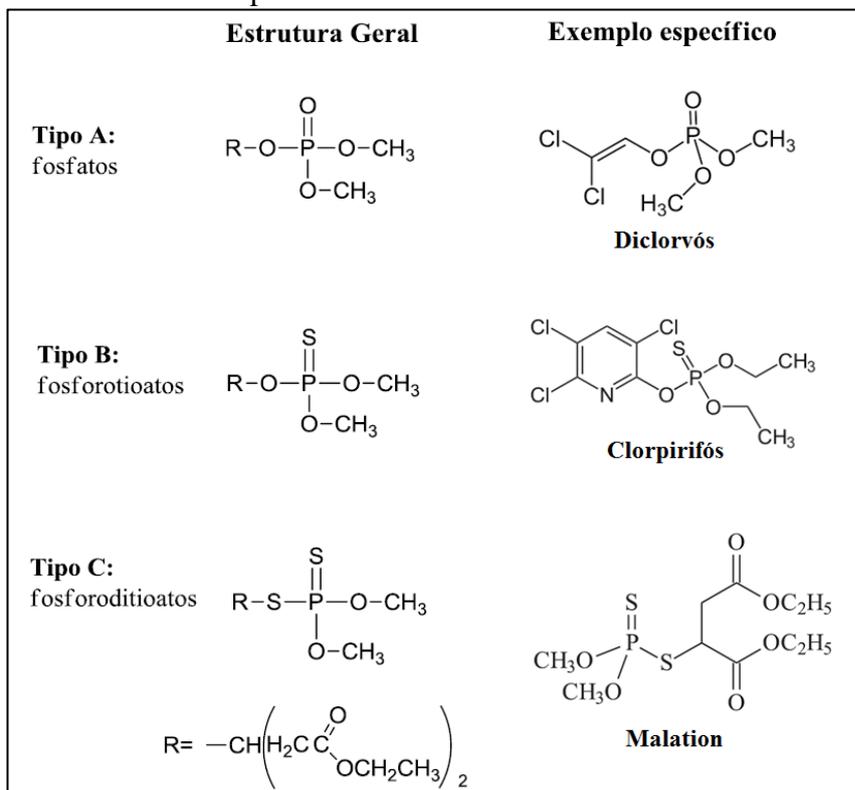
- a) um átomo de oxigênio ou enxofre, ligado ao átomo de fósforo através de uma dupla ligação;
- b) dois grupos radicais, metoxi ($-OCH_3$) ou etoxi ($-OCH_2CH_3$) ligados ao átomo de fósforo por meio de uma ligação simples;
- c) um grupo R (radical) mais longo e mais complexo, ligado ao átomo de fósforo, geralmente por meio de um átomo de oxigênio ou enxofre através de uma ligação simples.

A toxicidade do composto irá depender dos diversos radicais ligados ao átomo de fósforo, onde pequenas modificações como a substituição de radicais metil por etil aumenta a toxicidade do composto, sendo que, o paration etil é mais tóxico que o paration metil (MACIEL, 2005).

Os OFs apresentam uma grande variedade de possíveis estruturas. O átomo de fósforo pode estar ligado ao oxigênio ($P = O$) ou enxofre ($P = S$) e assim chamado como oxofosfato ou tio-fosfato, que tem um significado importante nas biotransformações dos agrotóxicos e a sua toxicidade (MANGAS *et al.*, 2017), sendo o primeiro mais tóxico (BAIRD, 2002). A maioria dos agrotóxicos OFs são tiofosfatos ou tiofosfonatos e são biotransformados por oxidação em oxofosfatos para induzir toxicidade por organofosforilação (MANGAS *et al.*, 2017).

Com base nas características estruturais, os OFs são divididos em pelo menos 13 tipos, incluindo fosfatos, fosfinatos, fosfonatos, fosforotrioatos, fosforoditioatos, fosforamidotioatos, fosforotioatos ($S =$), fosfonotioatos ($S =$), fosforotioatos (substituídos em S), fosfonotioatos (substituídos em S), (GUPTA, 2006; STOYTCHIEVA, 2011b). As três subclasses principais de OFs são os fosfatos, os fosforotioatos e os fosforoditioatos (BAIRD, 2002), como pode ser visto na Figura 2.4.

Figura 2.4 – Estruturas genéricas das principais subclasses dos OFs e exemplos de representantes de cada subclasse.



Fonte: Adaptado de Baird (2002).

A diversidade estrutural dos OFs gera diferentes propriedades físico-químicas e biológicas: pressão de vapor, solubilidade em água, estabilidade química e toxicidade, que

determinam sua aplicação específica (STOYTCHIEVA, 2011a). Os OFs geralmente possuem um efeito tóxico mais agudo para os seres humanos e outros mamíferos do que os organoclorados (BAIRD, 2002).

Os OFs são parcialmente solúveis em água (SCHENK *et al.*, 2016), porém mais facilmente solúveis em água do que os organoclorados (PAN *et al.*, 2017), e por isso podem penetrar facilmente no solo (SCHENK *et al.*, 2016) e nas águas subterrâneas (SCHENK *et al.*, 2016; PAN *et al.*, 2017), mas por serem menos estáveis quimicamente, não possuem tendência de bioacumulação (MORAIS, 2009; PINHO, 2007). Como a maioria dos OFs são voláteis e termicamente estáveis, eles são aptos para análise em CG (SAPAHIN; MAKAHLEH; SAAD, 2015).

2.1.4.2 *Uso dos OFs*

O uso maciço dos antigos organoclorados foi substituído por agrotóxicos baseados em OFs (CEQUIER *et al.*, 2016; FARAJZADEH *et al.*, 2016; MANGAS *et al.*, 2017), mas como seus predecessores, eles não são agrotóxicos seletivos (CEQUIER *et al.*, 2016) e apresentam risco grave de toxicidade aguda para os seres humanos (PINHO, 2007; MORAIS, 2009; CEQUIER *et al.*, 2016).

O uso dos OFs foi promovido em decorrência da busca por agrotóxicos menos persistentes no meio ambiente (OSHITA; JARDIM, 2012; CHOWDHURY *et al.*, 2013). Nos países em desenvolvimento ou desenvolvidos, os OFs são uma causa comum de intoxicação por exposição ocupacional (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; JOKANOVIĆ, 2012) e contaminação ambiental (SCHENK *et al.*, 2016).

Além do uso na agricultura (ROBERTS; REIGART, 2013; CEQUIER *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2017), eles também são utilizados em casas, jardins (ROBERTS; REIGART, 2013) e práticas veterinárias (ROBERTS; REIGART, 2013; MANGAS *et al.*, 2017). Eles são empregados na indústria agrícola há várias décadas (SCHENK *et al.*, 2016; CEQUIER *et al.*, 2016), sendo a classe mais utilizada para o controle de pragas tanto agrícola (SILVA; SAMARAWICKREMA; WICKREMASINGHE, 2006; REZG *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2010) como paisagística (REZG *et al.*, 2010), representando aproximadamente 40% do uso total de agrotóxicos a nível mundial (SHAPIRO *et al.*, 2016). Anualmente nos EUA são gastos bilhões de dólares com o uso de agrotóxicos OFs (SAPAHIN; MAKAHLEH; SAAD, 2015).

O uso extensivo de agrotóxicos OFs ocorre devido à sua ampla atividade contra pragas (FARAJZADEH *et al.*, 2016; MOJSAK; ŁOZOWICKA; KACZYŃSKI, 2018) e custo relativamente baixo (FARAJZADEH *et al.*, 2016; MANGAS *et al.*, 2017), o que acaba fazendo com que eles sejam uma importante fonte de contaminação ambiental e de produtos agrícolas (FARAJZADEH *et al.*, 2016). Os vegetais folhosos são mais propensos a insetos, onde as partes da folha e do caule podem ser facilmente contaminadas por excesso de OFs devido a maiores áreas de superfície (LI *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2016).

Os OFs também podem ser aplicados diretamente no produto agrícola durante o armazenamento, para protegê-lo de pragas, o que, por causa de taxas de degradação relativamente baixas, pode ser perigoso (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2017). Os OFs são amplamente utilizados em uma grande variedade de culturas e geralmente são dispersos como um aerossol constituído pelo agrotóxico adsorvido em uma partícula fina inerte dissolvida em um solvente hidrocarboneto (SAFE WORK AUSTRALIA, 2013).

A eliminação dos OFs pode gerar problemas, pois quando despejados em aterros podem se lixiviar no solo ao redor, enquanto a degradação química pode originar subprodutos tóxicos (SCHENK *et al.*, 2016). A classe dos OFs é considerada uma das mais tóxicas existentes e teve seu uso proibido devido à possibilidade de suas fórmulas favorecerem a formação de tumores cancerígenos, assim como vários outros problemas à saúde humana (GALLI *et al.*, 2006).

2.1.4.3 Ação dos OFs nos humanos

Geralmente, os OFs são usados para melhorar a qualidade e o rendimento de diferentes tipos de vegetais, grãos e frutas (JALALI *et al.*, 2011; FARAJZADEH *et al.*, 2016), podendo levar a intoxicação aguda através do consumo desses alimentos (SAPAHIN; MAKAHLEH; SAAD, 2015; HE *et al.*, 2015; CHIESA *et al.*, 2016; CEQUIER *et al.*, 2017), pois a principal via de exposição é a ingestão de alimentos contaminados (SHAPIRO *et al.*, 2016; CHIESA *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2016; CEQUIER *et al.*, 2017). Os compostos OFs são os responsáveis pelo maior número de intoxicações no meio rural (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001), e apesar de sua natureza não persistente, a maioria dos OFs apresenta efeitos tóxicos em mamíferos (BAIRD, 2002; BLANKSON *et al.*, 2016).

A exposição aos OFs depende das atividades agrícolas na área ou no país (CEQUIER *et al.*, 2017). De acordo com Mangas *et al.* (2017) as pessoas podem ser expostas

aos OFs em diversas circunstâncias, podendo desenvolver vários efeitos neurotóxicos distintos dependendo da dose, frequência de exposição, tipo de OF e os fatores do hospedeiro que influenciam a susceptibilidade e sensibilidade, onde os efeitos neurotóxicos são dependentes da interação com alvos enzimáticos envolvidos em vias toxicológicas ou de desintoxicação.

A exposição aos OFs por rotas múltiplas ou a múltiplos OFs pode levar à toxicidade aditiva séria, sendo importante compreender, no entanto, que existe uma ampla gama de toxicidade desses compostos e ampla variação na absorção dérmica, tornando a identificação específica do agente e do gerenciamento individualizado bastante importante (ROBERTS; REIGART, 2013).

O mecanismo de ação tóxica baseia-se na inibição da enzima acetilcolinesterase (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001; SAPAHIN; MAKAHLEH; SAAD, 2015; BASTOS *et al.*, 2015; FARAJZADEH *et al.*, 2016; CHIESA *et al.*, 2016; CEQUIER *et al.*, 2016; SINYANGWE; MBEWE; SIJUMBILA, 2016; SCHENK *et al.*, 2016; BLANKSON *et al.*, 2016), principalmente por fosforilação (ROBERTS; REIGART, 2013), sendo que esta enzima atua nas sinapses do sistema nervoso central e periférico (MORAIS, 2009; PINHO, 2007) através da inativação do neurotransmissor acetilcolina (SINYANGWE; MBEWE; SIJUMBILA, 2016). De acordo com Sinyangwe, Mbewe e Sijumbila (2016) os OFs também pode proporcionar a interrupção das respostas metabólicas, cardiovasculares e hormonais que podem levar à síndrome metabólica.

Nos últimos anos, muitos estudos provaram que OFs são mutagênicos, citotóxicos, genotóxicos, teratogênicos, imunotóxicos (SHARMA *et al.*, 2010) e carcinogênicos (SHARMA *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2017a). Alguns exemplos de doenças associadas aos OFs são desenvolvimento da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2 (SINYANGWE; MBEWE; SIJUMBILA, 2016; SHAPIRO *et al.*, 2016), Parkinson (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013) e Alzheimer (JOKANOVIĆ, 2012; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013). Alguns dos agrotóxicos pertencentes ao grupo das OFs também são conhecidos por suas interferências na reprodução, especialmente em machos (SHARMA *et al.*, 2010; CEQUIER *et al.*, 2017). O potencial de efeitos adversos dos OFs atinge principalmente mulheres grávidas, o feto (SILVA; SAMARAWICKREMA; WICKREMASINGHE, 2006) e as crianças (SILVA; SAMARAWICKREMA; WICKREMASINGHE, 2006; CEQUIER *et al.*, 2017).

Os efeitos do OFs são importantes na avaliação de risco, tanto que os regulamentos da EU definiram LMRs em amostras de alimentos e água na faixa de 0,01 - 0,5 mg.kg⁻¹ e 20 - 100 µg.L⁻¹, respectivamente (FARAJZADEH *et al.*, 2016). Para Sinyangwe, Mbewe e Sijumbila (2016) é altamente provável que quase todas as pessoas tenham resíduos de OFs em seus corpos e que a maioria das exposições esteja em concentrações muito baixas e, portanto, perca atenção e não seja detectada. Assim, é essencial desenvolver um método de detecção preciso e confiável para evitar seus efeitos negativos na saúde humana (LI *et al.*, 2017a).

2.1.5 OFs avaliados no estudo

2.1.5.1 Aspectos Gerais

A Tabela 2.2 mostra os seis agrotóxicos OFs que foram avaliados no estudo, indicando seus nomes comuns e oficiais, assim como algumas características químicas. O Código CAS (*Chemical Abstract Service*) é um identificador numérico único para cada substância, mas que não possui significado químico algum (ANVISA, 2017).

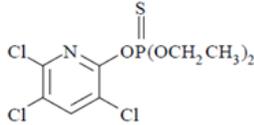
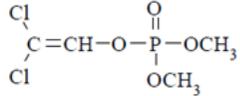
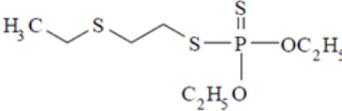
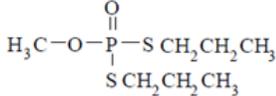
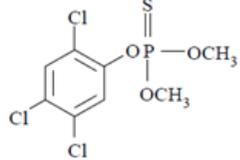
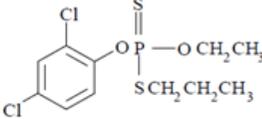
A Tabela 2.3 apresenta características químicas mais específicas, bem como a DL₅₀ de cada um deles (ANVISA, 2017). Uma forma de avaliar a sorção (absorção e adsorção ocorrendo simultaneamente) e a mobilidade de um dado agrotóxico no solo é através dos valores do coeficiente de partição octanol - água (K_{ow}), também chamado de fator de hidrofobicidade, e por meio do coeficiente de partição correlacionado com substâncias orgânicas, que é o coeficiente de partição de carbono orgânico (K_{oc}) (D'AGOSTINHO; FLUES, 2006).

Agrotóxicos que possuem $K_{oc} < 100$ possuem alta mobilidade no solo, já com K_{oc} entre 200 e 300, são classificadas como possuindo mobilidade intermediária no solo, enquanto $K_{oc} > 1000$ possuem baixa mobilidade no solo, sendo assim, menos suscetíveis à lixiviação, onde quanto adsorvido for o agrotóxico, maior será sua mobilidade (PEDROSO; NETO, 2018). Assim, quanto mais alto o valor de K_{oc} , mais fortemente o agrotóxico é sorvido e, portanto, menos móvel (KERLE; JENKINS; VOGUE, 1994). O K_{oc} depende das propriedades físico-químicas do agrotóxico e da porcentagem de carbono orgânico do solo (D'AGOSTINHO; FLUES, 2006). Além de ser afetada pelas características ambientais e do

local, a mobilidade é influenciada pela sorção, solubilidade em água e pressão de vapor do agrotóxico (KERLE; JENKINS; VOGUE, 1994).

O Quadro 2.2 mostra a classificação agrônômica, bem como a classificação toxicológica e os usos agrícolas, onde é possível perceber que o clorpirifós é o agrotóxico mais usado em diversos tipos de cultura no Brasil, mas não é permitido na do pimentão (ANVISA, 2017). O clorpirifós tem sido um dos OFs de amplo espectro mais comumente usados (MOJSAK; ŁOZOWICKA; KACZYŃSKI, 2018; COSTA, 2018), e um dos agrotóxicos mais utilizados no mundo, sendo moderadamente tóxico para os mamíferos, mas extremamente tóxico para uma ampla gama de espécies aquáticas (GHOTBADINI-BAHRAMAN; SHEIBANI; SHISHEHBORE, 2017).

Tabela 2.2 – Nomes e algumas características dos OFs estudados.

Ingrediente ativo ou nome comum	Nome IUPAC	N° CAS	* Estrutura Química	Massa molecular (g/mol)
Clorpirifós	O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate	2921-88-2		350,58
Diclorvós	2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate	62-73-7		220,98
Dissulfotom	O,O-diethyl S-2-ethylthioethyl phosphorodithioate	298-04-4		274,40
Etoprofós	O-ethyl S,S-dipropyl phosphorodithioate	298-04-4		242,30
Fenclorfós	O,O-dimethyl O-2,4,5-trichlorophenyl phosphorothioate	299-84-3		321,55
Protiofós	O-2,4-dichlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorodithioate	34643-46-4		345,25

Fonte: UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE DATABASE (2016) e ANVISA (2017).

CAS: Serviço de Resumos de Química (*Chemical Abstract Service*).

Tabela 2.3 – Características químicas específicas e DL₅₀ dos OFs estudados.

Agrotóxico	K _{ow} (pH 7, 20 °C)	K _{oc} (pH 7, 20 °C)	Solubilidade em água a 20 °C (mg.L ⁻¹)	Sensibilida de ao pH	^a PD (°C)	^b PV (mPa)	^c DL ₅₀ oral (mg.kg ⁻¹ de peso corpóreo)
Clorpirifós	5,01 x 10 ⁴ (alta)	5509 (não móvel)	1,05 (baixa)	não	170	1,43 (baixa volatilidade)	66 (alta)
Diclorvós	7,94 x 10 ¹ (baixa)	50 (móvel)	18000 (alta)	-	190	2100 (alta volatilidade)	80 (alta)
Dissulfotom	8,91 x 10 ³ (alta)	1345 (ligeiramente móvel)	25 (baixa)	-	-	7,2 (moderadamente volátil)	2,6 (alta)
Etoprofós	9,77 x 10 ² (moderada)	70 (móvel)	1300 (alta)	não	244,3	78,0 (alta volatilidade)	40 (alta)
Fenclorfós	7,59 x 10 ⁴ (alta)	10232 (não móvel)	40 (baixa)	-	-	110 (alta volatilidade)	500 (moderada)
Protiofós	4,68 x 10 ⁵ (alta)	24158 (não móvel)	0.07 (baixa)	-	-	0.3 (baixa volatilidade)	925 (moderada)

Fonte: Autor (2018) a partir de UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE DATABASE (2016). ^a Ponto de degradação; ^c Pressão de vapor a 25 °C; ^d Em ratos.

Quadro 2.2 – Classe Agronômica, classificação toxicológica e uso agrícola dos OFs estudados.

Agrotóxico	Classe Agronômica	Classificação toxicológica	Uso agrícola
Clorpirifós	Inseticida, formicida e acaricida	II	Aplicação foliar nas culturas de algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, pastagem, soja, sorgo, tomate* e trigo; Aplicação localizada na cultura da banana (saco para proteção do cacho) e no solo nas culturas de batata e milho; Aplicação no controle de formigas, apenas na forma de isca granulada, conforme aprovação em rótulo e bula.
Diclorvós	Inseticida	II	-
Dissulfotom		I	Aplicação no solo nas culturas de café e em sementes de algodão.
Etoprofós	Nematicida e inseticida	I	Aplicação no solo na cultura de batata.
Fenclorfós	Inseticida	III	-
Protiofós	Inseticida e acaricida	II	Aplicação foliar nas culturas de algodão, batata, citros, couve, soja e tomate.

Fonte: Autor (2018) à partir de ANVISA (2017). (*): Uso autorizado somente para tomate rasteiro, com fins industriais.

2.2 Orgânicos

No Brasil, a Lei nº 10.831 de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003) dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências, sendo regulamentada pelo Decreto nº 6.323 de 2007 (BRASIL, 2008b). Apesar de existir pequenas variações nas definições entre os países, o termo "alimento orgânico" geralmente é considerado aquele que foi produzido sem fertilizantes artificiais e que não recebeu tratamento com agrotóxicos sintéticos ou estimulantes de crescimento de qualquer tipo, incluindo hormônios e antibióticos (AKTAR, 2014).

O papel da agricultura orgânica é o de garantir a sustentabilidade e a saúde dos ecossistemas e organismos que o compõe, desde a produção, processamento, distribuição, até o consumo, buscando manter e aumentar a fertilidade do solo, minimizar todas as formas de poluição, evitar o uso de fertilizantes sintéticos e agrotóxicos, manter a diversidade genética da produção, considerar o amplo impacto social e ecológico do sistema produtivo de alimentos e garantir a segurança alimentar e o bem estar humano (IFOAM, 2014; MORAIS; OLIVEIRA, 2017).

Os consumidores passaram a se preocupar mais com os resíduos de agrotóxicos nos vegetais (DOGAN; SELCUK; ERKAN, 2016; PIRSAHEB *et al.*, 2017), porque muitas vezes são consumidos frescos e não processados (DOGAN; SELCUK; ERKAN, 2016), e conseqüentemente a demanda por alimento livre de produtos químicos e seguro está aumentando a cada dia (LOZANO *et al.*, 2016; MAHMOOD *et al.*, 2017), onde essas preocupações ampliaram o perfil do consumo orgânico de vegetais em todo o mundo (DOGAN; SELCUK; ERKAN, 2016; BARRIGA *et al.*, 2016).

O sistema orgânico leva em conta a relação solo/planta/ambiente com o intuito de preservar o meio ambiente, a saúde humana e dos animais (GOMES; FRINHANI, 2017). Assim, a agricultura orgânica surge como possibilidade de uma agricultura sustentável (PADUA; SCHLINDWEIN; GOMES, 2013; GOMES; FRINHANI, 2017).

Mesmo os alimentos orgânicos sendo vistos como um nicho de mercado, em determinados tipos de produtos, sua participação no mercado é significativa (BENBROOK; BAKER, 2014; MARINI *et al.*, 2016). O crescimento dos alimentos orgânicos está relacionado a vários fatores, que vão desde a preocupação com o meio ambiente e o bem estar dos animais, até razões mais pessoais (BENBROOK; BAKER, 2014; SOUZA; MACHADO; DALCIN, 2015; SILVA; SILVA, 2016). Em última análise, a escolha individual de comprar

alimentos orgânicos ou não orgânicos faz parte de uma decisão geral de estilo de vida, onde geralmente os consumidores que compram alimentos orgânicos são os que expressaram significativamente maiores críticas sobre os agrotóxicos nos alimentos (BENBROOK; BAKER, 2014). O custo de produção de um produto orgânico é cerca de 30% mais caro do que o tradicional (ORGANICSNET, 2018). Vale ressaltar que a agricultura orgânica, ao contrário da agricultura convencional, pode atuar de maneira a favorecer a segurança alimentar e nutricional (SILVA; SILVA, 2016).

A contaminação agrícola com agrotóxicos precisa ser abordada, em particular no campo dos sistemas de produção orgânica (CHIESA *et al.*, 2016), pois mesmo não sendo adicionados intencionalmente, seus resíduos às vezes estão presentes no produto final (BENBROOK; BAKER, 2014; DOMÉNECH; MARTORELL, 2017) devido a alguma contaminação através de vários caminhos como contaminação acidental por deriva (WALORCZYK *et al.*, 2013; BENBROOK; BAKER, 2014) de propriedades não-orgânicas adjacentes, (WALORCZYK *et al.*, 2013), escoamento ou transferência de uma transição recente, rotulagem incorreta (BENBROOK; BAKER, 2014), aplicações fraudulentas (WALORCZYK *et al.*, 2013; BENBROOK; BAKER, 2014) ou por meio de produtos residuais no solo (BASTOS *et al.*, 2015).

As análises de resíduos de agrotóxicos são cruciais como uma ferramenta de autenticação de culturas orgânicas, garantindo para consumidores que os produtos alimentares rotulados como orgânicos estão livres de resíduos de agrotóxicos (WALORCZYK *et al.*, 2013). Portanto, os consumidores devem optar por alimentos certificados, pois os produtos com a origem identificada aumentam o comprometimento dos produtores com a qualidade dos alimentos (MELO; ARAÚJO, 2016; SILVA; MELO; MELO, 2016).

2.2.1 Produção orgânica no Brasil

A produção orgânica vem crescendo no Brasil e no mundo (PADUA; SCHLINDWEIN; GOMES, 2013; WILLER; LERNOUD, 2016; SILVA; MELO; MELO, 2016; MORAIS; OLIVEIRA, 2017), principalmente devido à exigência cada vez maior por alimentos saudáveis e pela noção do produtor em diminuir a utilização de agrotóxicos nas plantações, em consequência dos riscos à saúde e ao meio ambiente (MORAIS; OLIVEIRA, 2017). Segundo Willer e Lernoud (2017) o Brasil está entre os dez países com maiores áreas de terras agrícolas orgânicas. A produção orgânica no Brasil é devida principalmente à

agricultura familiar (PADUA; SCHLINDWEIN; GOMES, 2013; MORAIS; OLIVEIRA, 2017).

Brasil tem o maior mercado de produtos orgânicos na América Latina, mas têm mostrando um crescimento lento nos últimos anos por causa de crises políticas e econômicas (WILLER; LERNOUD, 2017). A produção orgânica nacional vem crescendo mais de 20% ao ano, mas esse crescimento é inferior à demanda pelos produtos, o que é agravado pelo fato de que 70% da produção é exportada para a Europa (SEBRAE, 2017).

Em 2014, a agricultura orgânica no Brasil movimentou cerca de R\$ 2 bilhões, onde em 2015 a área cultivada em sistema orgânico foi de aproximadamente 950.000 hectares, produzindo café, cacau, açaí, guaraná, arroz, sucos, castanha do Brasil, cana-de-açúcar, mel, laticínios, palmito, ovos e hortaliças (MAPA, 2016; MORAIS; OLIVEIRA, 2017). No período de 1991 a 1996, no município de Tauá (CE), foi implantada uma das primeiras experiências de proposta da agricultura orgânica no Nordeste do Brasil (ALENCAR *et al.*, 2013)

É possível destacar algumas tentativas de incentivo à produção orgânica no Brasil, como o Decreto nº 7.794 de 2012 (BRASIL, 2012), que institui a Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica (PNAPO), com o objetivo de integrar, articular e adequar políticas, programas e ações indutoras da transição agroecológica e da produção orgânica e de base agroecológica, contribuindo para o desenvolvimento sustentável e a qualidade de vida da população, por meio do uso sustentável dos recursos naturais e da oferta e consumo de alimentos saudáveis.

A viabilidade econômica dos alimentos orgânicos encontra-se em considerável ascensão (PADUA; SCHLINDWEIN; GOMES, 2013), mas ainda existe a necessidade de conceder maior incentivo e visibilidade às experiências orgânicas já existentes e estimular as políticas públicas fortalecedoras da agricultura orgânica nacional, com o intuito de ampliar o diálogo com a sociedade e demonstrar os benefícios e vantagens provenientes da produção orgânica (MORAIS; OLIVEIRA, 2017).

O arcabouço de regulamentações (exemplos: Instrução Normativa nº 007 de 31 de dezembro de 1999, Lei nº 10.831 de 2003, Decreto 6.323 de 2007, dentre outras) utilizado na administração do sistema de produção orgânica no Brasil, possuem as bases de classificação dos procedimentos permitidos, tolerados e proibidos (MARINI *et al.*, 2016; SILVA; SILVA, 2016; MORAIS; OLIVEIRA, 2017; SAMBUICHI *et al.*, 2017). Assim, as normas e regulamentações vigentes auxiliam a garantia de qualidade dos sistemas de produção e do

produtor, protegendo o consumidor contra qualquer irregularidade que possa comprometer a integridade da produção orgânica (MORAIS; OLIVEIRA, 2017).

2.2.2 Certificação de produtos orgânicos no Brasil

A quantidade de estabelecimentos agrícolas orgânicos no Brasil que possuem certificação ainda é tida como sendo baixa (MORAIS; OLIVEIRA, 2017), isto porque, a certificação é vista como um processo complicado para os produtores que, frequentemente, não conhecem os meios e nem possuem os recursos necessários para sua concretização (MEDAETS; FONSECA, 2005; MOOZ; SILVA, 2014; MORAIS; OLIVEIRA, 2017). Outro aspecto relevante é o custo gerado pelo processo da certificação, que diversas vezes em decorrência do baixo volume de produção acaba inviabilizando a unidade de produção (MOOZ; SILVA, 2014).

De acordo com Mooz e Silva (2014) a certificação orgânica é um processo de auditoria de origem e trajetória de produtos agrícolas e industriais, desde sua fonte de produção até o ponto final de venda ao consumidor. Segundo Marini *et al.* (2016) com a certificação é possível atestar um procedimento de verificação da conformidade do produto ou do processo em função de padrões estabelecidos, através da avaliação de todas as atividades indispensáveis para a determinação a cerca do cumprimento de requerimentos específicos, garantindo-se assim, que um produto atenda determinados padrões desejados.

Para que um produto seja reconhecido legalmente como orgânico, ele deve respeitar algumas exigências legais de certificação (GOMES; FRINHANI, 2017; MORAIS; OLIVEIRA, 2017). Assim, o processo de certificação orgânica busca garantir um produto/processo de qualidade aos consumidores (SOUZA; MACHADO; DALCIN, 2015; MORAIS; OLIVEIRA, 2017). Atualmente no Brasil existem duas vertentes para as condições de entrada no mercado de certificação de orgânicos: a certificação para o mercado nacional e a certificação para o mercado internacional (MUÑOZ *et al.*, 2016; MORAIS; OLIVEIRA, 2017).

O Decreto nº 6.323 de 2007 (BRASIL, 2008b) possibilita que a certificação da produção orgânica a nível nacional seja efetuada por meio de Organismos de Certificação da Conformidade Orgânica constituídos como pessoas jurídicas, de direito público ou privado, com ou sem fins lucrativos, previamente credenciados junto ao MAPA, no âmbito do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica (SisOrg).

Todos os produtos orgânicos brasileiros, com exceção dos que se originam da venda direta por agricultores familiares, devem ser identificados por meio do Selo orgânico SisOrg, cujo objetivo é facilitar ao consumidor identificar os produtos orgânicos, reforçando a garantia, de acordo com os regulamentos técnicos da produção orgânica (BRASIL, 2008a).

Um aspecto que deve ser verificado é que no selo orgânico SisOrg deve vir a especificação do sistema de avaliação da qualidade orgânica utilizado, como mostra a Figura 2.5 (Instrução Normativa 18 de 2014; BRASIL, 2008a; MAPA, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2016), podendo ter a versão colorida, preto e cinza ou preto e branco (BRASIL, 2014).

Figura 2.5 – Selos Federais do SisOrg para produtos orgânicos no Brasil versão colorida.



Fonte: MAPA (2009).

Com o selo é possível identificar os produtos orgânicos em que a avaliação da conformidade foi realizada por organismos credenciados pelo MAPA (MAPA, 2009; SILVA; MELO; MELO, 2016), atestando que o produtor adota criteriosamente as regras das entidades certificadoras à qual está associado e que o produto é cultivado sobre regras estabelecidas e fixadas, garantindo ao consumidor que o sistema de produção adotado não apresenta riscos de contaminação no alimento, a saúde do consumidor ou meio ambiente (SILVA; MELO; MELO, 2016; MORAIS; OLIVEIRA, 2017).

Os produtos orgânicos certificados devem adotar o selo, exceto no caso dos produtores que fazem a venda direta aos consumidores (MUÑOZ *et al.*, 2016). Além do selo federal SisOrg, pode vir na embalagem o selo da certificadora responsável pela certificação, ou seja, o selo dos OAC (Organismos de Avaliação da Conformidade) Orgânica, como mostra a Figura 2.6.

Figura 2.6 – Exemplo de embalagem contendo a certificação federal SisOrg e OAC orgânica.



Fonte: Autor (2016).

Das 24 certificadoras credenciadas pelo MAPA que atuam no Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica (Sistema Participativo), duas possuem sede no Ceará (CE), uma em Quixeramobim e a outra em Crateús (MAPA, 2017), enquanto dos 11 Organismo de Avaliação da Conformidade Orgânica pela certificação por auditoria (Certificadoras) não existe nenhum com sede no Ceará. De acordo com Madail, Belarmino e Bini (2011) e Castro Neto *et al.* (2010) no ano de 2006, o Ceará possuía 381.014 estabelecimentos agrícolas, dos quais 4.865 eram voltados para agricultura orgânica, mas apenas 167 possuíam certificação.

Cada país possui a própria legislação para a produção e comercialização de produtos orgânicos, devendo ser analisado pelo produtor cada aspecto, caso ele deseje vender os seus produtos no exterior, buscando uma certificação que atenda as exigências do mercado comprador (BRASIL, 2008b; MADAIL; BELARMINO; BINI, 2011; MEDAETS; FONSECA, 2005; WILLER; LERNOUD, 2016; WILLER; LERNOUD, 2017; MORAIS; OLIVEIRA, 2017).

Conforme BRASIL (2008) alguns produtos destinados exclusivamente à exportação precisam estar de acordo com certas exigências do país importador que, diversas vezes, não fazem parte ou são até proibidas pela regulamentação brasileira, e nestes casos, seus rótulos não recebem o Selo do SisOrg, e devem conter a seguinte informação: PRODUTO EXCLUSIVO PARA EXPORTAÇÃO (BRASIL, 2008a). Vale ressaltar que independentemente do mecanismo de certificação, todos os produtos devem ser cadastrados junto ao MAPA (SEBRAE, 2017).

O certificado do produtor pode ser retirado pela certificadora, que tem a autonomia para tal ação, caso seja descumprida as normas da legislação vigente (MORAIS; OLIVEIRA, 2017). Desta forma, se um produto agrícola vendido ou rotulado como orgânico

contém qualquer agrotóxico detectável ou outro resíduo não orgânico ou substância natural proibida, o correto é investigar e determinar se o programa de certificação orgânica foi violado, pois os alimentos que contêm resíduos em níveis que são maiores que a contaminação ambiental residual inevitável, não podem ser vendidos ou rotulados como produtos orgânicos (BENBROOK; BAKER, 2014).

Mesmo havendo leis que regulamentam os produtos orgânicos, muitos oportunistas veem na sustentabilidade e agricultura orgânica uma possibilidade de ganhar dinheiro fácil, e com isso, simulam estar vendendo produtos nem um pouco orgânicos, quando na verdade, fazem uso excessivo de agrotóxicos ou, até mesmo, compram esses produtos em feiras convencionais (GOMES; FRINHANI, 2017).

2.3 Pimentão (*Capsicum annuum* L.)

O pimentão originou-se na região tropical sul-americana centrada no que é hoje a Bolívia (RIVERA *et al.*, 2016). Ele é encontrado principalmente em zonas tropicais e úmidas da América Central e do Sul (GIUFFRIDA *et al.*, 2013; MOKHTAR *et al.*, 2016; JADON *et al.*, 2016), e cultivado em locais como Brasil (JADON *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017), Peru, Bolívia, Costa Rica, México, Europa, China, Índia (JADON *et al.*, 2016), Israel, Holanda, Bélgica, Reino Unido, Canadá (FRANS *et al.*, 2017) e Paquistão (ALI; KHAN; ASHFAQ, 2017). O pimentão não é um legume, mas sim uma fruta (GIUFFRIDA *et al.*, 2013; RIVERA *et al.*, 2016; SHUKLA *et al.*, 2016; MOKHTAR *et al.*, 2016; LAMA *et al.*, 2016). Outros termos utilizados para o pimentão são hortaliça não folhosa (ANVISA, 2016) e hortaliça-fruto (VÉRAS *et al.*, 2015), porém um termo mais correto é fruto (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015).

Os frutos do pimentão apresentam três formatos típicos: retangular, cônico e quadrado (MAROUELLI; SILVA, 2012). Também conhecido como pimenta sino (*bell pepper*) ou pimenta doce (*sweet pepper*) (SHUKLA *et al.*, 2016), ele possui cor verde escuro que muda para tons amarelos e vermelhos durante os estágios de maturação (GOMES *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2016). No Brasil, o pimentão é consumido principalmente na forma de fruto verde (MAROUELLI; SILVA, 2012; TRECHA; LOVATTO; MAUCH, 2017). Para Pereira, Pinheiro e Carvalho (2013), apesar de o pimentão verde continuar sendo o mais importante em volume comercializado, os pimentões vermelhos e amarelos, com sabor mais

suave e melhor digestibilidade, aos poucos conquistam novos consumidores, embora sejam mais caros.

De acordo com as diretrizes da Direção da Saúde e Segurança Alimentar da Comissão Europeia (DG SANTE), os pimentões são classificados no grupo de *commodities* de "alto teor de água", juntamente com vegetais frutificantes/cucurbitáceas (SANTE, 2017). O pimentão é um membro da família Solanaceae (GIUFFRIDA *et al.*, 2013; JADON *et al.*, 2016; RIVERA *et al.*, 2016; MOKHTAR *et al.*, 2016; SHUKLA *et al.*, 2016), considerado um dos vegetais mais populares (JADON *et al.*, 2016; SHUKLA *et al.*, 2016).

Os pimentões são bastante nutritivos (JADON *et al.*, 2016; LAMA *et al.*, 2016; MAHMOOD *et al.*, 2017), por constituir uma rica fonte de ácido fólico (JADON *et al.*, 2016; ALI; KHAN; ASHFAQ, 2017), cálcio (PEREIRA; PINHEIRO; CARVALHO, 2013; JADON *et al.*, 2016; MARDANI-TALAEI *et al.*, 2017), vitamina A, vitamina B6 (JADON *et al.*, 2016; MARDANI-TALAEI *et al.*, 2017; ALI; KHAN; ASHFAQ, 2017), vitamina E (BOGUSZ JÚNIOR *et al.*, 2017; ALI; KHAN; ASHFAQ, 2017) e vitamina C (PEREIRA; PINHEIRO; CARVALHO, 2013; DAOOD *et al.*, 2014; JADON *et al.*, 2016; LAMA *et al.*, 2016; BOGUSZ JÚNIOR *et al.*, 2017; MARDANI-TALAEI *et al.*, 2017; ALI; KHAN; ASHFAQ, 2017). A concentração de vitamina C no pimentão varia cerca de 76 a 243 mg por 100 g, e aumenta à medida que as frutas amadurecem (LAMA *et al.*, 2016), e quando maduro o pimentão é excelente fonte de vitamina A (PEREIRA; PINHEIRO; CARVALHO, 2013).

Além disso, os pimentões são uma boa fonte de antioxidantes (DAOOD *et al.*, 2014; LAMA *et al.*, 2016; MARDANI-TALAEI *et al.*, 2017), como polifenóis (DAOOD *et al.*, 2014; LAMA *et al.*, 2016) e carotenóides (PEREIRA; PINHEIRO; CARVALHO, 2013; DAOOD *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2014; MOKHTAR *et al.*, 2016; DOGAN; SELCUK; ERKAN, 2016; BOGUSZ JÚNIOR *et al.*, 2017). Estas substâncias possuem potenciais propriedades funcionais (MOKHTAR *et al.*, 2016) que podem reduzir o risco de desenvolver vários tipos de doenças degenerativas e crônicas, como por exemplo, o câncer (GOMES *et al.*, 2014; LAMA *et al.*, 2016). Todavia, os níveis destes compostos bioativos costumam variar de acordo com o genótipo, estágio de maturidade e condições durante o crescimento e pós-colheita (BOGUSZ JÚNIOR *et al.*, 2017).

O pimentão é uma fruta bastante valiosa no mundo (GIUFFRIDA *et al.*, 2013; RIVERA *et al.*, 2016; SHUKLA *et al.*, 2016; MOKHTAR *et al.*, 2016; FRANS *et al.*, 2017), sendo cultivado e consumido em quase todo o Brasil (MOURA; GUIMARÃES; LIMA, 2015; NUNES JÚNIOR *et al.*, 2017), e está entre os dez vegetais com maior importância econômica

e social (NUNES JÚNIOR *et al.*, 2017). Embora o pimentão seja uma planta de verão, ele é produzido também no inverno com o uso de cultivo em estufa (PEREIRA; PINHEIRO; CARVALHO, 2013). Ele é usado de forma elevada no mundo culinário devido a sua cor intensa (GOMES *et al.*, 2014; BOGUSZ JÚNIOR *et al.*, 2017) e forte sabor (GOMES *et al.*, 2014; BOGUSZ JÚNIOR *et al.*, 2017), uma combinação de doçura e picância com uma textura crocante, podendo ser consumido cru ou cozido (JADON *et al.*, 2016), e amplamente utilizado como corante alimentar natural quando estão na fase madura (GIUFFRIDA *et al.*, 2013; MOKHTAR *et al.*, 2016; JADON *et al.*, 2016) e também como ingrediente em medicina (SCHOR *et al.*, 2017).

No Brasil e em outros países, o pimentão vermelho é considerado como um dos vegetais mais importantes em termos de volume de produção e valor comercial (GOMES *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2016), sendo utilizado para produção de páprica e corantes naturais (MAROUELLI; SILVA, 2012). O pimentão é cultivado geralmente em campo aberto nas regiões onde as temperaturas são elevadas, pois sob tais condições ele se desenvolve melhor e é mais bem produzido, mas em regiões Sudeste e Sul do Brasil, o cultivo predominante é em casa de vegetação ou estufas, por causa das baixas temperaturas e das geadas (TRECHA; LOVATTO; MAUCH, 2017). Estima-se que o volume total comercializado de pimentão no ano de 2016 foi de 554.903,97 toneladas (CNA, 2017).

O pimentão vendido no mercado cearense é proveniente dos municípios de Guaraciaba do Norte, São Benedito, Tianguá, Ubajara, Ipu, Limoeiro do Norte e Pena Forte, sendo que uma parcela também é oriunda do Espírito Santo e São Paulo (CEASA - CE, 2017). No Ceará o pimentão é valorizado não somente em razão da forte participação na culinária doméstica e empresarial, mas também em decorrência do aspecto social que exhibe no local de produtividade (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007).

Mesmo existindo uma grande variedade de pimentões, cerca de 60 tipos, entre híbridos e cultivares, a preferência dos consumidores cearenses está centrada nos pimentões verdes e, tradicionalmente, nos de formato cônico, embora o pimentão verde quadrado tenha boa aceitabilidade nos supermercados de Fortaleza (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007). A produção orgânica do pimentão surge, simultaneamente, como uma tendência de oportunidade de negócio e um grande desafio para os produtores (GUIMARÃES, 2013).

2.3.1 Pragas e tratos culturais

Um dos principais problemas enfrentados por produtores de pimentão no país é a susceptibilidade às pragas e doenças, decorrente da diversidade climática dos locais de produção ser muito grande e pelo fato do cultivo ser de forma intensiva em estufas ou em campo aberto, gerando perdas significativas na produção e grandes prejuízos (AZEVEDO *et al.*, 2006; MOURA; GUIMARÃES; LIMA, 2015).

A cultura do pimentão é alvo de grande número de aplicações de agrotóxicos visando o controle das infestações (MOURA, 2015; MOURA; GUIMARÃES; LIMA, 2015), principalmente de compostos que apresentam elevada toxicidade, amplo espectro de ação e não são registrados para o controle de pragas nessas culturas (MOURA, 2015), aumentando problemas de resíduos desses compostos e os riscos de intoxicação dos consumidores (MOURA, 2015; MOURA; GUIMARÃES; LIMA, 2015).

Apesar dos avanços tecnológicos incorporados no cultivo convencional do pimentão, os insetos e as doenças ainda são problemas na produção e pós-colheita (TRECHA; LOVATTO; MAUCH, 2017). Dentre as doenças que afetam o plantio de pimentão estão as viroses (AZEVEDO *et al.*, 2006; MOURA, 2015; SHUKLA *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2015), os ácaros, as tripses (AZEVEDO *et al.*, 2006; MOURA, 2015; SHUKLA *et al.*, 2016), o oídio (fungo) (AZEVEDO *et al.*, 2006; PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015), a antracnose (fungo), a murcha bacteriana, murcha de fitóftora (AZEVEDO *et al.*, 2006; VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007; PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015) e os nematoides (MOURA, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015).

A alta qualidade do pimentão é ameaçada por uma doença conhecida como apodrecimento interno da fruta, que foi encontrada na produção de pimentão em todo o mundo, sendo causada principalmente por membros de fungos das espécies *Fusarium lactis* (FLASC) e por uma menor extensão por *Fusarium oxysporum* e *Fusarium proliferatum* (FRANS *et al.*, 2017). A perda de rendimento devido à infestação combinada de ácaros e tripses é estimada em cerca de 50%, onde a aplicação de agrotóxicos é a forma mais utilizada nas infestações por vírus (SHUKLA *et al.*, 2016). Uma variedade de inseto que danifica o pimentão durante o seu crescimento é o pulgão verde do pêssego (*Myzus persicae*), cujo tratamento consiste principalmente na utilização de inseticidas sintéticos (MARDANI-TALAEI *et al.*, 2017).

As duas principais ameaças das plantas do pimentão cultivadas em estufa são o oídio em pó (PM) e o vírus da murcha manchada do tomate (TSWV) (SCHOR *et al.*, 2017). Os fungos do oídio promovem acentuada desfolha (BLAT *et al.*, 2005; PEREIRA; PINHEIRO; CARVALHO, 2013), como consequência, os frutos ficam expostos à queima pela radiação solar, e a planta produz menor número de frutos e com tamanho reduzido (PEREIRA; PINHEIRO; CARVALHO, 2013). O oídio causado pelo fungo *Oidiopsis taurica*, pode resultar em desfolha de até 75% e perdas de até 40% na produção, sendo o único entre os oídios que tem hábito de crescimento interno (BLAT *et al.*, 2005).

O *Oidiopsis taurica* promove um crescimento branco pulverulento característico na face inferior das folhas mais velhas, que com o progresso da doença acaba afetando as folhas jovens (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013). A ocorrência frequente de oídio, bem como a inexistência de cultivares resistente e ingredientes ativos registrados junto ao MAPA para seu controle, muitos produtores de pimentão utilizam agrotóxicos sistêmicos de forma indevida, propiciando a contaminação dos frutos por resíduos, que maioria das vezes não garante o controle satisfatório da doença (PEREIRA; PINHEIRO; CARVALHO, 2013).

No Estado do Ceará, as doenças que ocorrem mais comumente são antracnose, murcha-de-fitóftora e mancha-bacteriana, onde as duas últimas são decorrentes das condições de elevada umidade na região produtora (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007). A antracnose (*Colletotrichum* spp.) é altamente destrutiva, causa perdas severas em pimentão cultivado durante períodos chuvosos e quentes, podendo atingir todos os estágios de desenvolvimento da planta, até os frutos após a colheita, onde a forma mais comum da antracnose são as lesões circulares, de coloração escura e alaranjada, como mostra a Figura 2.7 (AZEVEDO *et al.*, 2006). Ela afeta toda a parte aérea da planta, porém, os danos mais significativos ocorrem nos frutos (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013).

Figura 2.7 – Frutos de pimentão com antracnose.

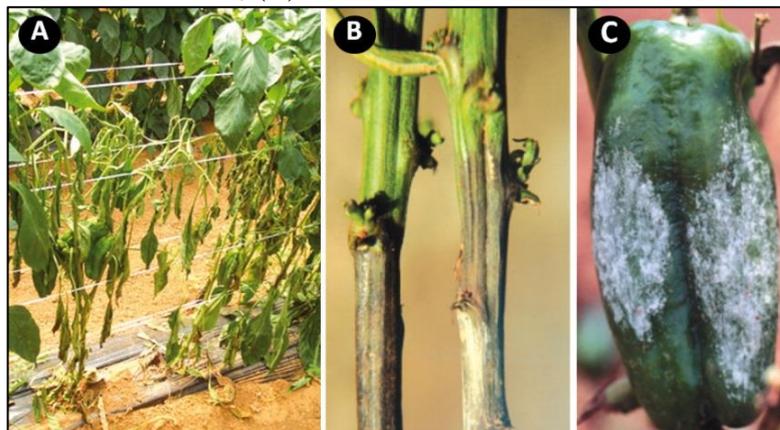


Fonte: Pereira, Carvalho e Pinheiro (2013).

Apesar dos sintomas da antracnose poderem ocorrer tanto durante o desenvolvimento da cultura no campo quanto na pós-colheita, somente os frutos exibem sintomas típicos (FRANÇA *et al.*, 2015). No Brasil, a maioria das descrições de antracnose em pimentões indica o fungo *Colletotrichum gloeosporioide* como o responsável pela doença (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007; FRANÇA *et al.*, 2015), apesar de outras espécies do mesmo gênero também poderem causar a doença, em geral, resultam na redução direta da qualidade e quantidade da produção (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007). Em um ataque severo, até 100% dos frutos podem ser afetados, ocasionando perda total para o produtor (AZEVEDO *et al.*, 2006; VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007). Há muitos anos, o método de controle da antracnose do pimentão no Brasil mais difundido é a aplicação de fungicidas (FRANÇA *et al.*, 2015).

Em regiões muito úmidas a murcha-de-fitóftora (*Phytophthora* spp.) é uma importante doença do pimentão, podendo ser causada por três espécies de pseudofungos, o *Phytophthora infestans*, o *Phytophthora nicotianae* e o *Phytophthora capsici*, que em geral, são agressivos e de difícil controle, onde o último é o mais comumente encontrado (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007). Ela pode afetar as mudas ainda em sementeira ou plantas adultas no campo (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013). O sintoma mais imediato do ataque dessa doença é o aparecimento de plantas murchas (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007), principalmente nas horas mais quentes do dia (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007; PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015), como pode ser visto na Figura 2.8 (A).

Figura 2.8 – Sintoma do ataque de *Phytophthora capsici* em pimentão, (A) plantas murchas; (B) apodrecimento do caule; (C) fruto recoberto com o micélio branco do fungo.



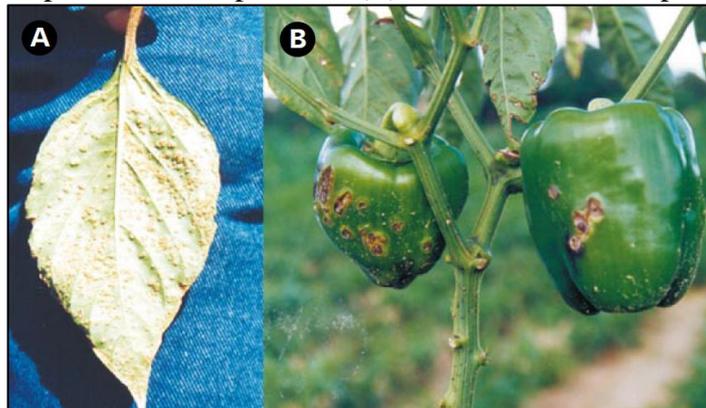
Fonte: Adaptado de Viana, Freire e Parente (2007); Pereira, Carvalho, Pinheiro (2013).

A doença ocasiona, comumente, uma podridão úmida no colo e raízes como mostra a Figura 2.8 (B), que resulta na murcha e, posteriormente, a seca e morte das plantas, mas dependendo do estágio de desenvolvimento, pode ser que a planta infectada não seque, contudo os frutos poderão murchar, ficando inúteis à comercialização (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007; PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013). Em um ambiente de umidade muito elevada, o fungo pode desenvolver em abundância micélio de coloração branca sobre os ramos e frutos, gerando manchas encharcadas nas folhas, ramos e frutos (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007). A Figura 2.8 (C) apresenta o fruto do pimentão recoberto com o fungo.

Em regiões úmidas, ou com períodos de umidade e temperatura elevadas, a pústula ou mancha-bacteriana (*Xanthomonas* spp.) é a mais importante dentre as bacterioses do pimentão (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007), onde a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* é considerada a espécie mais de cor verde-escura e com aspecto encharcado (PEREIRA *et al.*, 2015), que, ao crescerem, se tornam pardas e depois necrosam (Figura 2.9 A), podendo ocorrer um grande número de lesões e, conseqüentemente, as folhas caem com facilidade (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007).

Tanto em ambiente protegido quanto no campo, a mancha-bacteriana pode causar danos significativos nas folhas, provocando perda da produção e da qualidade dos frutos (MOREIRA *et al.*, 2015). Já nos frutos, as lesões são inicialmente esbranquiçadas e depois com os centros escurecidos (PEREIRA *et al.*, 2015), circundadas por um halo castanho escuro (Figura 2.9 B), onde a bactéria é capaz de diminuir sensivelmente a produção devido à depreciação causada ao fruto, impedindo sua comercialização (VIANA; FREIRE; PARENTE, 2007).

Figura 2.9 – Sintoma do ataque de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* em pimentão, (A) folha de pimentão com pústulas; (B) frutos com cancrós pronunciados.



Fonte: Viana, Freire e Parente (2007).

Um estudo realizado por JARDIM e CALDAS (2012) sobre os resultados do PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos) da ANVISA, de 2001 a 2010, mostrou que o pimentão era a cultura com a maior porcentagem de irregularidades. O pimentão foi o primeiro na lista de alimentos mais contaminados por agrotóxicos OFs entre 2010 a 2012 (ANVISA, 2011, 2013), mas no período de 2013 a 2015, as amostras de pimentão analisadas mostraram uma diminuição significativa desse grupo químico (ANVISA, 2016).

2.4 Gestão Ambiental (GA)

Segundo Barbieri (2011) a Gestão Ambiental (GA) pode ser entendida como diretrizes e atividades administrativas e operacionais realizadas com o objetivo de obter efeitos positivos sobre o meio ambiente, tanto reduzindo, banindo ou compensando os danos causados pelas ações humanas, quanto evitando que eles surjam. Ao examinar o entendimento de GA é importante rever o conceito de Desenvolvimento Sustentável, que visa identificar o aumento dos problemas ambientais e de sua relação com as questões socioeconômicas, perante a necessidade de garantir um meio ambiente saudável para as gerações futuras (MORAES *et al.*, 2018).

A forma de gerenciar o uso dos recursos é o alicerce que pode acentuar ou minimizar os impactos, onde a GA fornece um conjunto de procedimentos para gerir ou administrar uma organização na sua interação com o meio ambiente (MATTOS, 2009). As unidades de produção agrícola precisam introduzir a GA em suas atividades, incorporando uma variável ambiental junto à produção, para permitir usar de forma mais adequada os recursos naturais (ZAMBERLAN *et al.*, 2014).

Os reservatórios ambientais, incluindo o solo e a água, foram contaminados continuamente por agrotóxicos utilizados para fins agrícolas (ARIAS *et al.*, 2014), e a GA surgiu como uma forma de evitar o processo degradador e impactante ao meio ambiente, causado pelo uso indiscriminado de agrotóxicos (MATTOS, 2009), que pode chegar até os seres humanos através de resíduos dos agrotóxicos em alimentos, água contaminada e pelo ar (MORAES *et al.*, 2018).

A conscientização ambiental da população, em conjunto com a GA, vem crescendo em combinação com outras preocupações sobre a segurança dos alimentos, gerando

cada vez mais o questionamento sobre as práticas da agricultura moderna (MATTOS, 2009). De acordo com Chowdhury *et al.* (2013) alguns vegetais costumam conter mais de um resíduo, especialmente aqueles que são altamente sensíveis às pragas e, portanto, podem exigir múltiplas aplicações sucessivas de agrotóxicos. As mudanças na percepção do consumidor em relação à qualidade e segurança dos alimentos resultaram na exigência de melhores práticas agrícolas, o que levou a transparência e rastreabilidade dos agrotóxicos usados em diversas aplicações (RAI *et al.*, 2016).

O poder público deve fazer uso do poder de comando e controle, ou seja, estabelecendo padrões, bem como verificando se estes padrões estão sendo respeitados (NASCIMENTO, 2012), e apesar do mundo rural ter algumas especificidades, a legislação ambiental é uma só (DAL FORNO, 2017), onde o poder público possui o poder de penalizar, corrigir e incentivar medidas ambientalmente justas, e que, além disso, façam parte de seu interesse econômico (NASCIMENTO, 2012).

2.5 Ecotoxicologia dos agrotóxicos

O uso de agrotóxicos é propagado na agricultura em todo o mundo, porém poucos países estabeleceram programas de vigilância de intoxicação da vida selvagem (BERNY, 2007; KÖHLER; TRIEBSKORN, 2013). Ecotoxicologia trata da conexão entre os poluentes químicos (naturais ou sintéticos), o ambiente em que são espalhados e a biota naquele ambiente (STÜTZER; GUIMARÃES, 2003; CARVALHO; PIVOTO, 2011). A ecotoxicologia dos agrotóxicos do ponto de vista ambiental pode ser estabelecida através de estudos que determinam o comportamento ambiental do produto quanto à biodegradabilidade, sorção (adsorção/dessorção) e mobilidade (CARVALHO; PIVOTO, 2011).

Dados relativos à taxa em que as substâncias ativas dos agrotóxicos se dissipam nas plantas são importantes para uma gama de diferentes avaliações de risco (LEWIS; TZILIVAKIS, 2017), mas muitos dados sobre agrotóxicos permanecem dispersos e/ou não disponíveis publicamente, onde deficiências estão inevitavelmente associadas à pesquisa sobre incidentes, decorrentes da dificuldade em discriminar entre envenenamento e outras causas de morte e as limitações da detecção analítica de agrotóxicos em carcaças de animais (BERNY, 2007; KÖHLER; TRIEBSKORN, 2013). Os dados tendem a ser altamente flexíveis, sendo dependente não apenas do comportamento físico-químico da substância ativa,

mas também do tipo de matriz vegetal, forma geral da planta (por exemplo, hábitos de frutificação), textura (por exemplo, presença de ceras) (LEWIS; TZILIVAKIS, 2017)

Köhler e Triebkorn (2013) fizeram um belíssimo trabalho referente à ecotoxicologia dos agrotóxicos na vida silvestre, mostrando que apesar de muitas vezes sabermos o modo de ação de um agrotóxico nas espécies-alvo, ainda não entendemos o impacto total dos efeitos colaterais indesejados sobre a vida silvestre, particularmente em níveis mais altos de organização biológica, como populações, comunidades e ecossistemas. Köhler e Triebkorn (2013) relatam que durante os anos mais recentes, o aumento mais substancial na taxa de publicações na literatura foi referente aos organofosforados, que exibem propriedades de disrupção tireoidiana em anfíbios, peixes, roedores e aves, além de prejudicar as funções metabólicas, como termorregulação, ingestão de água e / ou alimentos e comportamento em vertebrados, dentre outros problemas.

Os agrotóxicos devem ser bem estudados, para que seus riscos potenciais possam ser muito bem estabelecidos, onde medidas para mitigar seus possíveis impactos devem ser minuciosamente determinadas por meio de ações regulatórias e técnicas (STÜTZER *et al.*, 2003; CARVALHO; PIVOTO, 2011).

2.6 Monitoramento de agrotóxicos em alimentos

O monitoramento de agrotóxicos no meio ambiente é uma ferramenta de suma importância na caracterização e no gerenciamento dos riscos ambientais resultantes do uso desses produtos em condições reais (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009), como também uma forma de medida na minimização do risco potencial da contaminação por agrotóxicos em humanos (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; BAKIRCI *et al.*, 2014) e para ajudar no cumprimento da legislação (MASIÁ *et al.*, 2016). Conforme o Decreto Federal Brasileiro nº 4.074 de 2002, o monitoramento de agrotóxicos também pode fazer parte da avaliação no processo de registro de novos produtos, ou ainda, da reavaliação dos produtos em utilização.

O monitoramento e a avaliação dos impactos do uso dos agrotóxicos devem ser vistos como atividades vitais para assegurar a sustentabilidade dos sistemas de produção agropecuários que utilizam tais insumos (GOMES; BARIZON, 2014), desempenhando um papel muito importante para garantir a conformidade com os regulamentos (BLANKSON *et al.*, 2016), assim como, garantindo que as aplicações destes insumos sejam feitas de acordo

com as BPA propostas (PORTOLÉS *et al.*, 2014; CABRERA *et al.* 2016; BLANKSON *et al.*, 2016) e o produto seja seguro para o consumidor (PORTOLÉS *et al.*, 2014; CHUNG, 2018). Se BPA forem aplicadas de forma eficiente, a quantidade de resíduos de agrotóxicos ficará abaixo do nível máximo de resíduos correspondente (CHUNG, 2018).

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos atua como uma prática essencial na garantia da segurança alimentar (JOKANOVIĆ, 2012; MELO *et al.*, 2012; CABRERA *et al.* 2016; MUÑOZ *et al.*, 2017) e prevenção da contaminação através da cadeia alimentar (MELO *et al.*, 2012; MUÑOZ *et al.*, 2017). Existem três pilares importantes na legislação que garantem o controle dos resíduos de agrotóxicos através da cadeia alimentar: (i) produtos autorizados; (ii) limites máximos de resíduos (LMR) e (iii) diretrizes dos métodos analíticos (MASIÁ *et al.*, 2016).

Ações governamentais e também do setor privado passaram a estabelecer uma maior importância em relação à análise de resíduos de agrotóxicos, onde existe uma pressão crescente para o aperfeiçoamento do desempenho analítico, demandando um aumento da eficiência através da diminuição do custo e do tempo das análises (PRESTES *et al.*, 2009). O monitoramento de resíduos químicos nos alimentos é necessário para assegurar que a exposição humana aos agrotóxicos (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009; PRESTES *et al.*, 2009; BAKIRCI *et al.*, 2014; CHIESA *et al.*, 2016), principalmente pela ingestão dietética, não exceda os níveis toleráveis (CHIESA *et al.*, 2016).

Segundo a WHO, em média, 30% da dieta consiste em frutas e vegetais (LEMOS *et al.*, 2016; QUIJANO *et al.*, 2016), sendo consumidos principalmente crus ou semi-processados (LEMOS *et al.*, 2016), e conseqüentemente, espera-se que eles contenham maiores níveis de resíduos de agrotóxicos (CHOWDHURY *et al.*, 2013; QUIJANO *et al.*, 2016; LEMOS *et al.*, 2016) em comparação com outros grupos de alimentos de origem animal (QUIJANO *et al.*, 2016). Os agrotóxicos têm a capacidade de penetrar no interior das folhas e polpas do vegetal, e mesmo após uma lavagem e retirada de cascas e folhas externas, não é possível eliminar os resíduos de agrotóxicos de suas partes internas (ANVISA, 2013, 2014).

Um pré-requisito para a obtenção de resultados de alta qualidade em um programa de fiscalização e monitoramento é o desenvolvimento de métodos e técnicas analíticas sensíveis (CHOWDHURY *et al.*, 2013; ZAINUDIN *et al.*, 2015; FARAJZADEH *et al.*, 2016), seletivas e reprodutíveis (ZAINUDIN *et al.*, 2015). Assim, com o intuito de controlar e monitorar resíduos, as metodologias analíticas devem identificar e quantificar com precisão a

concentração de qualquer substância presente em amostras, geralmente em níveis muito baixos, e eles devem ser capazes de determinar a quantidade de possíveis compostos em uma análise (FRENICH, ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014), onde os métodos multiresíduos tornaram-se mais populares nos últimos anos porque podem ser usados para a determinação de uma ampla gama de compostos em um processo analítico (BARGAŃSKA; ŚLEBIODA; NAMIEŚNIK, 2014).

Em iniciativa conjunta a FAO e WHO criaram o *Codex Alimentarius* através grupos de especialistas que estabeleceram o Índice de Ingestão Diária Aceitável (IDA) e os LMRs para cada agrotóxico, onde até agora o *Codex* estabeleceu LMRs para cerca de 218 agrotóxicos (e para numerosas combinações de agrotóxicos/*commodities*) disponíveis em um banco de dados público (MASIÁ *et al.*, 2016). Assim, ao estabelecer programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos durante vários anos consecutivos é possível conhecer o perfil dos resíduos existentes, e assim, promover a garantia de qualidade, com foco na educação dos agricultores, controle da venda de agrotóxicos, manejo integrado de pragas e aumento da agricultura orgânica (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017).

Muitos países realizam continuamente programas de gestão de resíduos em alimentos de origem vegetal, origem animal, grãos de cereais e alimentos para bebês (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017), onde cada país determina sua forma de monitoramento (BENBROOK; BAKER, 2014; YU *et al.*, 2016). Os programas de monitoramento em alimentos implementados no Brasil são realizados pelo MAPA e pelo Ministério da Saúde através da ANVISA (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017), e vêm sendo implementados desde 2001 com o objetivo de avaliar a qualidade dos alimentos e implementar ações de controle de resíduos de agrotóxicos (JARDIM; CALDAS, 2012; SOUSA *et al.*, 2013b).

Atualmente no mercado existem dois monitoramentos de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal, que possuem o objetivo de avaliar o cumprimento dos LMRs nacionais: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC/VEGETAL), coordenado pelo MAPA e o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela ANVISA (JARDIM; CALDAS, 2012; LEMOS *et al.*, 2015). Dentre os dois o PARA é o que possui maior abrangência tanto nos estados (inclui o Ceará), quanto nas análises, quantidades e tipos de amostras analisadas (JARDIM; CALDAS, 2012; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017), por isso é mais abordado no item 2.6.4.

No entanto, quando comparados aos programas de controle internacional, o programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos alimentos no Brasil não estima a realidade da exposição crônica decorrente do consumo, não gerando dados consistentes para comparação ao longo de um período (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017). O resumo dos resultados do PARA é periodicamente publicado no site da ANVISA (JARDIM; CALDAS, 2012; ANVISA, 2017), e aqueles do PNCRC são publicados no diário oficial do governo (Diário Oficial da União - DOU) (JARDIM; CALDAS, 2012; MAPA, 2018).

2.6.1 Métodos multiresíduos

Em virtude do grande número de agrotóxicos no mercado, o uso de métodos capazes de analisar um grande número de agrotóxicos em uma única análise (multiresíduos - MRs) é atualmente a abordagem mais comum (LÓPEZ *et al.*, 2014; GRIMALT *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2017; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; SRIVASTAVA *et al.*, 2017). No método MRs é feita a análise simultaneamente de diferentes ingredientes ativos de agrotóxicos em uma mesma amostra, sendo ainda capaz de detectar diversos metabólitos (ANVISA, 2016).

Nas últimas décadas, desenvolvimentos analíticos significativos foram alcançados na análise de resíduos de agrotóxicos e, em muitos casos, o foco foi colocado no preparo das amostras e na detecção analítica, o que permitiu que os Limites Máximos de Resíduos (LMR) se tornassem cada vez mais rigorosos nos produtos alimentares (JOKANOVIĆ, 2012). O desenvolvimento de métodos MRs possibilitou a análise de um grande número de substâncias com altos percentuais de recuperação (exatidão) dos analitos e a remoção dos possíveis interferentes da amostra, além de boa precisão, robustez, redução do trabalho técnico e o do uso de solventes (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, a tendência tem sido que os métodos analíticos se tornem mais rápidos (KOWALSKI; LUPO; COCHRAN, 2014; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016; MACHADO *et al.*, 2017) e simples (KOWALSKI; LUPO; COCHRAN, 2014; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016), mas ao mesmo tempo detectem níveis mais baixos (KOWALSKI; LUPO; COCHRAN, 2014; GOLGE; KABAK, 2015b; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016), além de serem mais sensíveis (GOLGE; KABAK, 2015b; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016) e mais precisos na identificação e quantificação de analitos em matrizes complexas (por exemplo, produtos alimentares) e que sejam confiáveis (TUZIMSKI; REJCZAK, 2016).

A utilização de métodos MRs surge como uma forma mais comum e eficiente de realizar análises de resíduos de agrotóxicos em centenas de diferentes compostos, sendo possível medir uma faixa de LMR de 0,01 a 10 mg.kg⁻¹ (GRIMALT *et al.*, 2016). O método MRs é a mais reconhecida e utilizada técnica para monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos, sendo adotada por países como Alemanha, Austrália, Canadá, Estados Unidos, Holanda, dentre outros (ANVISA, 2013, 2014, 2016).

A fim de determinar recomendações que equilibram a qualidade dos dados, bem como tempo e investimentos financeiros, tanto o preparo da amostra como estratégias de calibração são aspectos importantes que devem ser levados em consideração em um método MR (KOWALSKI; LUPO; COCHRAN, 2014). Métodos rápidos de análise MR são essenciais para simplificar e minimizar os custos da preparação da amostra (MORRISON *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2017), reduzindo os consumíveis e os resíduos gerados (MORRISON *et al.*, 2016). O método MR favorece um monitoramento rápido e eficiente (ANVISA, 2013, 2014, 2016), em virtude do aumento da produtividade do laboratório (ANVISA, 2013, 2014, 2016; LOZANO *et al.*, 2016) pela diminuição significativa do tempo de análise, reduzindo os custos (ANVISA, 2013, 2014, 2016).

Além disso, as naturezas e estruturas variadas de agrotóxicos requerem diferentes abordagens de pré-tratamento, o que acaba aumentando o trabalho de análise e diminui a produtividade laboratorial (XU *et al.*, 2017). Assim, em alguns casos, ainda é necessário desenvolver métodos simples de resíduo para a análise de um agrotóxico ou alguns agrotóxicos da mesma família química (GRIMALT *et al.*, 2016).

O método QuEChERS revolucionou o modo de análise MR de (BARRIGA *et al.*, 2016; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016; RAI *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2016; RIZZETTI *et al.*, 2016), pois se mostrou adequado para análises de resíduos em larga escala em uma grande variedade de matrizes (BARRIGA *et al.*, 2016; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016; MACHADO *et al.*, 2017), garantindo resultados exatos, precisos e baixos limites de detecção para uma grande variedade de compostos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; RIZZETTI *et al.*, 2016). Este método de pré-tratamento é muito flexível (LI *et al.*, 2017b; WANG *et al.*, 2017) e amplamente aplicado na determinação de vários resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas (GOLGE; KABAK, 2015a; GIACINTI *et al.*, 2016; HONG *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017b, ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; XU *et al.*, 2017).

Existe uma necessidade clara em desenvolver métodos rápidos para a determinação multiresíduos dos agrotóxicos mais utilizados, com o intuito de monitorar

resíduos de agrotóxicos nos alimentos, incluindo OFs, e garantir não só a segurança alimentar, mas também o cumprimento das BPA (CABRERA *et al.* 2016; LI *et al.*, 2017b).

2.6.2 Limite máximo de resíduos (LMRs)

Com o intuito de garantir o consumo seguro dos alimentos pela população, foram estabelecidas diferentes diretrizes em todo o mundo, restringindo a ocorrência de resíduos de agrotóxicos nos alimentos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LI *et al.*, 2014; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2017), e assim, governos e agências fixaram LMRs para os alimentos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; BAKIRCI; LI *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2015; STACHNIUK; FORNAL, 2016; RIZZETTI *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2017; CHUNG, 2018), onde os LMRs são especificados pela legislação federal de cada país (OSHITA; JARDIM, 2012), e para cada analito e matriz (BRITO *et al.*, 2002; REBELO *et al.*, 2016). O intervalo de segurança de cada ingrediente ativo de agrotóxico para cada cultura agrícola também é estabelecido por legislação (OSHITA; JARDIM, 2012).

O LMR é a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim (metabólitos e coadjuvantes) que permanece oficialmente nos alimentos, em virtude da aplicação correta em uma fase específica, desde sua produção até o consumo (OSHITA; JARDIM, 2012; BARBOSA *et al.*, 2013; BAKIRCI; LEMOS *et al.*, 2016; MASIÁ *et al.*, 2016; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017). Portanto, os valores de LMR representam a concentração máxima do resíduo de agrotóxico que é legalmente permitido em produtos alimentares (WALORCZYK, 2014; BAKIRCI *et al.*, 2014), e assim, possam ser legalmente comercializados (LEMOS *et al.*, 2016). O LMR é expresso em partes do agrotóxico (em peso), afim ou seus resíduos por milhão de partes de alimento (em peso) (ppm ou mg.kg^{-1}) (BRASIL, 2002).

Os LMRs limitam os tipos e a quantidade de agrotóxicos que podem estar legalmente presentes em alimentos, de acordo com os padrões determinados por vários órgãos reguladores, visando minimizar a exposição do consumidor a ingestão de agrotóxicos nocivos ou desnecessários em todo o mundo (OSHITA; JARDIM, 2012; WALORCZYK, 2014; BAKIRCI *et al.*, 2014), bem como promover BPA no uso de agrotóxicos (WALORCZYK, 2014). Os LMRs não são limites toxicológicos porque não representam a quantidade máxima de substância ativa que pode prejudicar a saúde dos consumidores (LEMOS *et al.*, 2016). Para o LMR de determinado ingrediente ativo em um alimento ser estabelecido de forma correta,

além do intervalo de segurança proposto, é preciso levar em conta as condições edafoclimáticas, pragas presentes no ambiente, indicações de dose e forma de aplicação, sendo esse conjunto de fatores denominado de BPA (FERMAM; ANTUNES, 2009).

Normalmente os limites estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* são usados quando não existem limites estabelecidos para um produto no país, sendo que também podem ser aplicados em produtos similares (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017). Os LMRs são estabelecidos para cada agrotóxico e exigidos para cada cultura alimentar, considerando-se o IDA (FERMAN; ANTUNES, 2009), após ser demonstrado que os resíduos são seguros para os consumidores, e com base na avaliação rigorosa de cada agrotóxico legalmente autorizado (MASIÁ *et al.*, 2016), sendo o LMR utilizado como base para o cálculo da exposição e avaliação do risco alimentar (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017).

No Brasil, a ANVISA é a responsável por estabelecer os LMRs (QUEIROZ; FERRACINI; ROSA, 2012; OSHITA; JARDIM, 2012; REBELO *et al.*, 2016; FOOD SAFETY BRAZIL, 2018), usando dados de toxicidade de cada composto (BARBOSA *et al.*, 2013; LEMOS *et al.*, 2016; REBELO *et al.*, 2016; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017), sendo estabelecidos somente os LMRs para as culturas vegetais *in natura* (FOOD SAFETY BRAZIL, 2018). Atualmente existem 518 ingredientes ativos de uso autorizado no Brasil, onde cada um possui sua respectiva monografia contendo um compilado de informações, com nome comum e químico, classe de uso, classificação toxicológica e dados agrônômicos, tais como as culturas agrícolas com uso autorizado, e seus respectivos LMRs vigentes (ANVISA, 2017).

Para Lemos *et al.* (2016) um valor acima do LMR de um agrotóxico em um produto não implica necessariamente a existência de um risco para a saúde, que poderia ser avaliado por outros parâmetros, como o IDA, mas em um estudo com amostragens estatisticamente significativas, um grande número de amostras que excedem o LMR pode indicar um risco potencial para a saúde e a necessidade de avaliação dos riscos para a saúde.

As metodologias analíticas para a determinação de substâncias tóxicas em alimentos devem ser capazes de quantificar resíduos em concentrações muito baixas, assim como identificá-los de maneira inequívoca, garantindo que os LMRs sejam respeitados (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

2.6.3 Índice de Ingestão Diária Aceitável (IDA)

O IDA é um parâmetro de segurança utilizado para estabelecer os LMRs (DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008; FERMAM; ANTUNES, 2009; ANVISA, 2016; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017). O IDA permite estimar a carga de resíduos que podem ser ingeridas em relação ao peso corporal ao longo da vida sem riscos à saúde, obtidos através de estudos toxicológicos (GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017). O IDA é a quantidade máxima que ingerida diariamente durante toda a vida, parece não apresentar risco significativo à saúde em relação aos conhecimentos atuais, sendo expressa em miligrama (mg) do agrotóxico por quilograma (kg) de peso corpóreo ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ p.c.) (FERMAM; ANTUNES, 2009; ANVISA, 2016).

Assim como os LMRs, o IDA é estipulado para cada ingrediente ativo de agrotóxico, e determinada com base em estudos nas propriedades físico-químicas, metabólicas, farmacológicas (FERMAM; ANTUNES, 2009) e toxicológicas (FERMAM; ANTUNES, 2009; ANVISA, 2016) do agrotóxico, proveniente dos estudos efetuados com animais de laboratórios e executados com procedimentos reconhecidos em nível internacional (FERMAM; ANTUNES, 2009). No Brasil, a ANVISA é órgão responsável por estabelecer o IDA de cada ingrediente ativo de agrotóxico para cada cultura (QUEIROZ; FERRACINI; ROSA, 2012).

Em uma pesquisa realizada por Meira (2016) em escolas de São Paulo, na qual dos 272 agrotóxicos estudados, foram encontrados 9 acima do IDA estabelecida pela ANVISA, onde a maioria dos agrotóxicos foram classificados como muito tóxicos, com 3 compostos no grupo de OFs (o acefato, a diazinona e o terbufós). Em outra pesquisa feita por (GERAGE, 2016), na região Nordeste, dos 283 agrotóxicos considerados na pesquisa, 62 compostos excederam o valor do IDA estabelecida pela ANVISA, dentre estes compostos foram encontrados os OFs clorpirifós e dissulfotom (GERAGE, 2016).

A Tabela 2.4 apresenta os valores do IDA em relação as suas respectivas agências reguladoras. Para o Brasil os valores foram obtidos a partir das monografias autorizadas de cada ingrediente ativo (IA) publicadas no site da ANVISA (ANVISA, 2017), os valores no âmbito internacional foram obtidos nos seus respectivos sites (CODEX ALIMENTARIUS, 2016; EC, 2017; EPA, 2016).

Tabela 2.4 – Valores do IDA e suas respectivas agências reguladoras.

Agrotóxico	ANVISA (mg.kg⁻¹ p.c)	Codex Alimentarius (mg.kg⁻¹ p.c)	EC (mg.kg⁻¹/dia)	EPA (mg.kg⁻¹/dia)
Clorpirifós	0,0100	0,0100	0,0010	0,0030
Diclorvós	-	0,0040	0,00008	
Dissulfotom	0,0003	0,0003	-	0,0010
Etoprofós	0,0004	0,0004	0,0004	0,0003
Fenclorfós	-	-	-	
Protiofós	-	-	-	0,0001

Fonte: CODEX ALIMENTARIUS (2016), EPA (2016), ANVISA (2017), EC (2017).

2.6.4 Programas de Análise de Resíduos em Alimentos

Uma vez que os agrotóxicos são um dos grupos mais perigosos de compostos químicos devido às suas propriedades tóxicas, persistência no meio ambiente e capacidade de bioacumulação, a inspeção rigorosa dos resíduos nos alimentos pelos órgãos estaduais apropriados ou outras instituições é considerada de grande importância (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015).

Com o objetivo de estruturar um serviço para avaliar a qualidade dos alimentos e implementar ações de controle de resíduos, em 2001 foi criado o Projeto de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, que se transformou em programa através da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 119 de 19 de maio de 2003, e passou a ser desenvolvido anualmente no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) (ANVISA, 2011, 2013, 2014, 2016). A criação do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) permitiu que o país tivesse uma noção mais clara dos níveis de agrotóxicos presentes em seus produtos agrícolas (ANVISA, 2006).

De acordo com o PARA de 2016, o programa conta com a participação de 27 Unidades Federativas envolvidas na amostragem e na tomada de ações após a divulgação dos resultados, onde as análises são realizadas por quatro Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen GO, MG, RS e PR) e por um laboratório privado contratado por processo licitatório.

O PARA monitora periodicamente diversos alimentos *in natura* com a finalidade de investigar a presença de agrotóxicos, e assim, promover a saúde da população brasileira (QUEIROZ; FERRACINI; ROSA, 2012). Com o PARA é possível verificar se os alimentos comercializados no varejo apresentam níveis de resíduos de agrotóxicos dentro dos LMR estabelecidos pela ANVISA e que estão publicados em monografia específica para cada

agrotóxico; conferir se os agrotóxicos utilizados estão devidamente registrados no país e se foram aplicados somente nas culturas para as quais foram autorizados (ANVISA, 2013, 2014); estimar a exposição da população a resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal e, conseqüentemente, avaliar o risco à saúde dessa exposição (ANVISA, 2014,). Desta forma, o PARA ajuda na segurança alimentar (ANVISA, 2014, 2016), prevenindo intoxicações agudas ou crônicas que podem surgir da exposição dietética indevida aos agrotóxicos (OSHITA; JARDIM, 2012; ANVISA, 2014), possibilitando ainda traçar um diagnóstico da utilização de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal abrangidos pelo programa (ANVISA, 2013, 2014).

A escolha dos alimentos monitorados pelo PARA baseia-se nos dados de consumo obtidos na Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) (ANVISA, 2013, 2014; 2016; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017) realizada pelo IBGE (ANVISA, 2016), na disponibilidade dos alimentos nos supermercados das diferentes unidades da Federação (ANVISA, 2013, 2014, 2016) e nos agrotóxicos com maior índice de detecção nos alimentos (ANVISA, 2016), onde o cronograma de amostragem é aprovado antecipadamente no decorrer das reuniões nacionais do Programa (ANVISA, 2013, 2014, 2016).

Os PARAs confirmam porque o país fica no topo do consumo de agrotóxicos principalmente para a produção de *commodities*, pois são encontrados resíduos em quantidades maiores do que as recomendadas por lei, além de substâncias não autorizadas em alimentos consumidos diariamente pela população brasileira (JARDIM; CALDAS, 2012; GERAGE, MEIRA; SILVA, 2017).

O PARA mostra que ainda persiste o uso de agrotóxicos de uso banido no Brasil, como por exemplo, o clorpirifós (ANVISA, 2009, 2010, 2013, 2016; TRECHA; LOVATTO; MAUCH, 2017). Os resíduos de alguns agrotóxicos não recomendados e de uso restrito também podem ser encontrados em frutas e vegetais devido a fontes indiretas, como culturas adjacentes, solo e águas de irrigação (LORENZ *et al.*, 2014).

O PARA recomenda que os consumidores adquiram alimentos certificados e, desta forma, rastreáveis até o produtor rural, e que ele adote as BPA, com o intuito de reduzir a consumo de resíduos de agrotóxicos e evitar danos à saúde (ANVISA, 2013, 2014, 2016). Segundo o PARA de 2016, das detecções irregulares por grupo químico, as amostras analisadas que apresentaram agrotóxicos do grupo dos OFs, das 4.824 estudadas, 3.088 foram regulares e 1.736 irregulares, o que representa 35,98% de detecções.

2.6.4.1 Pimentão no PARA

As análises de pimentão começaram em 2008, cujos resultados foram divulgados no PARA de 2009, sendo encontrado um elevado número de amostras com IAs não autorizados (ANVISA, 2009; JARDIM; CALDAS, 2012), mas eram permitidas na cultura do tomate, indicando um desvio de uso dos produtos, e assim, devido a similaridade botânica, e a incidência de pragas, bem como de doenças entre as culturas, foi sugerido a urgente necessidade da análise da grade de IA autorizados para a cultura do pimentão, para que fosse determinada uma ação imediata na adoção das BPAs no cultivo desta cultura (ANVISA, 2009). Os resultados insatisfatórios descrevem as amostras que apresentaram IA de agrotóxicos acima do LMRs autorizado ou resíduos de IAs não permitidos para uma determinada cultura (ANVISA, 2009).

Como pode ser visto na Tabela 2.5, o número de amostras analisadas de pimentão aumentou com o decorrer dos anos, mas o número de amostras insatisfatórias ainda permaneceu alto, onde o número de agrotóxicos não autorizados identificados aumentou consideravelmente ao longo dos anos. O clorpirifós foi encontrado nas amostras insatisfatórias desde o início das análises de agrotóxicos nos pimentões. Em 2010, o pimentão foi a cultura que apresentou o maior número de amostras com resultados insatisfatórios (91,8%) (MOURA, 2015; ANVISA, 2011). O uso indiscriminado de agrotóxicos em pimentão permaneceu alto no PARA 2011/2012 depois da análise de vários lotes em todo o Brasil, onde 90,0% das amostras dos frutos tiveram resultados insatisfatórios (ANVISA, 2013).

De acordo com o PARA relativo ao ano de 2016, os agrotóxicos acefato, clorpirifós e carbendazim foram os que apresentaram maior índice de detecções irregulares, sendo que apresentaram maior número de detecções para as quais não existem LMR estabelecido, onde dos agrotóxicos detectados em concentrações iguais ou superiores a $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$, das 243 amostras de pimentão analisadas, em 46 (18,9%) foi detectado o clorpirifós e em uma (0,46%) foi detectado o diclorvós.

Tabela 2.5 - Porcentagem de amostras de pimentão insatisfatórias nos últimos anos no PARA.

Ano referente	Ano de publicação	Nº de amostras analisadas	Total de amostras insatisfatórias (%)	NA	Amostras com clorpirifós	Nº de Amostras coletadas no CE	Nº de amostras insatisfatórias no CE
2008	2009	101	64,36	18	-	-	-
2009	2010	165	80,0	107	23	6	5
2010	2011	146	91,8	124	30	6	5
2011	2013	213	90,0	178	30	9	8
2012	2013	-	-	-	-	-	-
2013	2016	-	-	-	-	-	-
2014	2016	243	88,9	214	46	*	*
2015	2016	-	-	-	-	-	-

Fonte: ANVISA (2009, 2010, 2011, 2013, 2016).

(-) análises não realizadas, (*) não informado.

2.7 Preparo de amostras para extração de resíduos de agrotóxicos

A análise de contaminantes ambientais pode ser desafiadora devido à grande quantidade de substâncias químicas potenciais que requerem monitoramento, onde os atuais esforços de triagem tendem para a análises químicas multiclasse e multirresíduo (MORRISON *et al.*, 2016), onde o estágio de preparação da amostra é considerado um dos passos mais importantes para a análise de alimentos (COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; RIZZETTI *et al.*, 2016; PIRSAHEB *et al.*, 2017), evitando resultados errôneos (FENIK; TANKIEWICZ; BIZIUK, 2011; COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; RIZZETTI *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2017). Assim, a preparação da amostra desempenha um papel essencial para a análise de resíduos de agrotóxicos, incluindo a remoção de interferentes e a pré-concentração do analito, onde geralmente, a extração pode definir o uso de duas fases imiscíveis para separar as espécies-alvo de uma fase para a outra (KAILASA; WU; HUANG, 2013).

As matrizes de alimentos são extremamente complexas (MIN *et al.*, 2012; FRENICH, ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014; HAN *et al.*, 2016; MUÑOZ *et al.*, 2017) e possuem inúmeros componentes com diferentes propriedades físicas e químicas (HAN *et al.*, 2016). Além disso, os agrotóxicos pertencem a diferentes grupos químicos com diversidade em propriedades físico-químicas (ARIAS *et al.*, 2014; RAI *et al.*, 2016; SRIVASTAVA *et al.*, 2017), sendo importante considerar essas propriedades do analito, como a baixa estabilidade de agrotóxicos específicos durante a extração da amostra, caráter iônico ou alta polaridade, onde os novos agrotóxicos são mais polares, pois estes têm menos impacto no meio ambiente (GRIMALT *et al.*, 2016). O preparo da amostra é constantemente a parte mais crítica na análise de resíduos de agrotóxicos (KAILASA; WU; HUANG, 2013; CHOWDHURY *et al.*, 2013; SAPAHIN; MAKAHLEH; SAAD, 2015) em virtude das diversas substâncias extraídas (CHOWDHURY *et al.*, 2013).

O preparo da amostra precisa extrair os analitos das matrizes complexas (PRESTES *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2014; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; HAN *et al.*, 2016; PIRSAHEB *et al.*, 2017; MUÑOZ *et al.*, 2017), bem como ser capaz de promover o enriquecimento (concentração) dos analitos de interesse (KAILASA; WU; HUANG, 2013; PRESTES *et al.*, 2009; ARIAS *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; FARAJZADEH *et al.*, 2016), e minimizar a quantidade de componentes interferentes da matriz no extrato final (LI *et al.*, 2014; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; HAN *et al.*, 2016; PIRSAHEB *et al.*, 2017; MUÑOZ *et*

al., 2017; LI *et al.*, 2014), gerando uma amostra apropriada para análise quantitativa (MORRISON *et al.*, 2016). Diversas técnicas de preparação de amostras são usadas na análise de agrotóxicos e a seleção do método apropriado irá depender da complexidade e da natureza da matriz, das propriedades dos analitos e das técnicas analíticas disponíveis (TUZIMSKI; REJCZAK, 2016).

Mesmo com melhorias tecnológicas em ferramentas analíticas, o pré-tratamento antes da análise instrumental é fundamental para evitar interferências durante a análise dos analitos (MIN *et al.*, 2012). A complexidade do tratamento da amostra está ligada aos potenciais interferências da matriz e à técnica de separação utilizada (GRIMALT *et al.*, 2016). Além disso, a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes de alimentos é um desafio, principalmente por causa da baixa concentração dos analitos (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; MIN *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2013b; BANDEIRA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; (FRENICH, ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014; RIZZETTI *et al.*, 2016; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017) e as grandes quantidades de substâncias interferentes que podem ser co-extraídas juntamente com os analitos e, na maioria das vezes, prejudicam os resultados da análise (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; BANDEIRA *et al.*, 2014; RIZZETTI *et al.*, 2016). Para Słowik-Borowiec (2015) a seleção do procedimento adequado de preparação da amostra desempenha um papel fundamental na prevenção do efeito matriz (item 2.8.1).

Os passos críticos na determinação de resíduos de contaminantes nos alimentos são a extração e a limpeza da amostra (CHIESA *et al.*, 2016). A preparação da amostra pode ser tediosa, de custo excessivo e consumir grandes quantidades de solventes (SAPAHIN; MAKAHLEH; SAAD, 2015; MORRISON *et al.*, 2016). Os métodos convencionais de extração de amostras para resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas exigem muitas quantidades de solventes, demasiada mão-de-obra (RAI *et al.*, 2016; WU, 2017), oferecem poucas taxas de recuperação, geração de grandes quantidades de resíduos que podem levar à intoxicação humana e a carcinogenicidade (WU, 2017), tendência a formar emulsão, co-extração de compostos interferentes, bem como dificuldade em usar uma ampla faixa de polaridade de agrotóxicos para extraí-los em um único passo de extração (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; RAI *et al.*, 2016).

2.7.1 QuEChERS

O método QuEChERS foi desenvolvido por Anastassiades *et al.* (2003) com a finalidade de simplificar a preparação da amostra. Atualmente, ele é uma das técnicas mais comuns de preparo de amostras para análise de agrotóxicos (CABRERA *et al.* 2016; MUÑOZ *et al.*, 2017; GIACINTI *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2017; UCLÉS *et al.*, 2017). O método QuEChERS tornou-se um dos métodos de preparo de amostras mais comuns para a extração de agrotóxicos, tanto em alimentos de origem vegetal (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; FRENICH, ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014; SILVA *et al.*, 2014a; CABRERA *et al.* 2016; GIACINTI *et al.*, 2016; MORRISON *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017; CLOUTIER *et al.*, 2017; GUEDES *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2018) quanto de origem animal (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; WANG *et al.*, 2017).

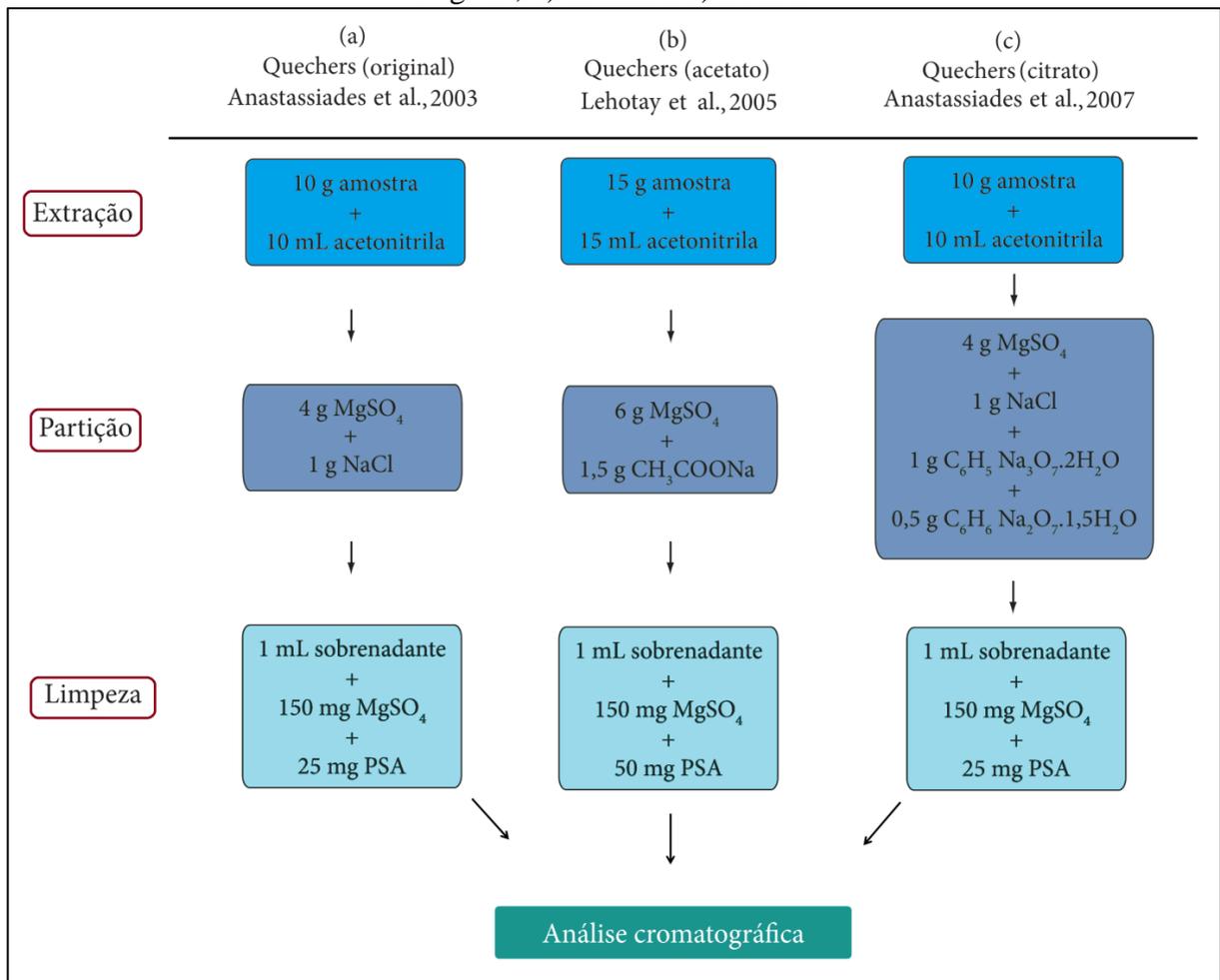
O método tornou-se popular devido ao uso mínimo de etapas analíticas tradicionais, solventes e vidrarias (HE *et al.*, 2015; GRIMALT *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2017; CLOUTIER *et al.*, 2017). Este procedimento foi amplamente aceito, sendo um método muito útil na extração de agrotóxicos multirresíduo (TUZIMSKI; REJCZAK, 2016; BARRIGA *et al.*, 2016; RIZZETTI *et al.*, 2016; RAI *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2017) e multiclassas em produtos alimentares (TUZIMSKI; REJCZAK, 2016; RIZZETTI *et al.*, 2016; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; RAI *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2017), tanto que foi aceito por muitas agências reguladoras devido às suas vantagens de flexibilidade, robustez e alto grau de seletividade e sensibilidade na análise rotineira de agrotóxicos em produtos alimentares (RAI *et al.*, 2016; ZOCCALI *et al.*, 2017).

A partir da abordagem original do QuEChERS foram feitos ajustes que levaram a dois métodos oficiais: o primeiro publicado pela AOAC (Associação de Químicos Analíticos Oficiais) com o uso de um tampão de acetato (AOAC *Official Method* 2007.01) e o segundo publicado pelo Comitê Europeu de Normalização, baseado no uso de um tampão de citrato [CEN, Método Padrão UNE-EN 15662] (CEN2008) (OSHITA; JARDIM, 2012; CERQUEIRA; CALDAS; PRIMEL, 2014; RESTREPO *et al.*, 2014; COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014; GÓMEZ-ALMENAR; GARCÍA-MESA, 2015; GOLGE; KABAK, 2015b; HE *et al.*, 2015; GRIMALT *et al.*, 2016; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016; ZOCCALI *et al.*, 2017; WU, 2017). Cada uma possui suas próprias modificações de acordo com a matriz e analitos a serem estudados (RESTREPO *et al.*, 2014).

As modificações são testadas para melhorar o método (LEHOTAY; MÁSTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005; LI *et al.*, 2016; UCLÉS *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017b) e consequentemente aumentar o número de agrotóxicos que possam ser determinados (UCLÉS *et al.*, 2017). O método QuEChERS baseia-se em três etapas: extração, partição e limpeza (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; MUÑOZ *et al.*, 2017; DONG *et al.*, 2017). A Figura 2.10 apresenta o esquema dos estágios das principais versões do método QuEChERS.

O método original (Figura 2.10a) envolve a extração com ACN (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; GOLGE; KABAK, 2015b; HAN *et al.*, 2016; RIZZETTI *et al.*, 2016; GRIMALT *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017b; URBAN; LESUEUR, 2017), seguida de uma partição provocada pela adição da mistura de sais (MgSO_4 e NaCl) (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; LI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014; RIZZETTI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017b; URBAN; LESUEUR, 2017) e por fim uma limpeza usando extração de

Figura 2.10 – Esquema dos estágios das principais versões do método QuEChERS: a) original; b) acetato e c) citrato.



Fonte: Adaptado de Prestes, Adaime e Zanella (2011).

fase sólida dispersiva (d-SPE) (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; LI *et al.*, 2013; GOLGE; KABAK, 2015b; HAN *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2016; GRIMALT *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017) com uma amina primária secundária (PSA) (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; LEE *et al.*, 2016; GRIMALT *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017).

As frutas e os vegetais apresentam um pH natural que varia entre 2,5 e 6,5, onde uma faixa de pH entre 4 e 5 proporciona boas recuperações (> 70%) para agrotóxicos sensíveis ao meio ácido, além de garantir estabilidade para aqueles agrotóxicos sensíveis ao meio alcalino (PRESTES *et al.*, 2009). Desta forma, as modificações foram feitas principalmente em relação ao pH, usando condições de tamponamento relativamente forte com acetato, e outra em condições mais fracas de tamponamento com citrato (COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014). O ajuste do pH está relacionado à presença de co-extrativos na fase orgânica, visto que uma maior presença de gordura e ácidos graxos é observada quando a extração é efetuada em meio ácido (PRESTES *et al.*, 2009).

O principal objetivo do uso do tampão é ampliar a aplicabilidade da abordagem a agrotóxicos específicos, que sofrem ionização (ZOCCALI *et al.*, 2017) e/ou degradação durante a extração, dependendo do pH da matriz (PRESTES *et al.*, 2009; ZOCCALI *et al.*, 2017). Normalmente, os agrotóxicos são estáveis em pH ácido, todavia alguns compostos podem apresentar baixos percentuais de recuperação, em virtude de estarem protonados e solubilizados na fase aquosa, não sendo recuperados na etapa de partição (PRESTES *et al.*, 2009).

No QuEChERS acetato o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição do acetato de sódio, enquanto que no QuEChERS citrato é usado uma mistura de citrato de sódio diidratado com hidrogenocitrato sesquihidratado como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0 - 5,5) (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). O acetato de sódio está presente de forma natural em várias frutas e vegetais, logo, a utilização deste tampão evita que novos reagentes sejam utilizados e que aconteçam interferências indesejáveis (PRESTES *et al.*, 2009).

As modificações foram introduzidas no método original com o objetivo de melhorar as recuperações de alguns agrotóxicos problemáticos ou para a análise de matrizes complexas (MIN *et al.*, 2012). Além disso, modificações de d-SPE também foram sugeridas através do uso de vários sorventes, como octadecilsilano (C18) e negro de carbono grafitizado (GCB – Graphitized Carbono Black), bem como diferentes combinações (CERQUEIRA; CALDAS; PRIMEL, 2014).

Com o QuEChERS é possível a análise de agrotóxicos em matrizes complexas (FRENICH, ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014; LEE *et al.*, 2016; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016; DONG; XIAO, 2017). Este método possibilita obter alta recuperação (OSHITA; JARDIM, 2012; LORENZ *et al.*, 2014; BARGAŃSKA; ŚLEBIODA; NAMIEŚNIK, 2014; LI *et al.*, 2014; DONG *et al.*, 2017; UCLÉS *et al.*, 2017) de uma ampla faixa de agrotóxicos (LI *et al.*, 2014; DONG *et al.*, 2017; UCLÉS *et al.*, 2017) com diferentes polaridades e volatilidades em uma grande variedade de matrizes (LI *et al.*, 2014; UCLÉS *et al.*, 2017).

Andrascikova e Hrouzkova (2013) deduziram que a escolha do método QuEChERS é dependente da interação matriz/analito, não havendo um único método apropriado para todos os agrotóxicos no que se refere a recuperação e sensibilidade. Contudo, segundo os autores, em termos de linearidade, o método citrato mostrou ser o mais adequado.

O método QuEChERS apresenta várias vantagens em comparação com os métodos de extração convencionais, como simplicidade (LI *et al.*, 2013; LORENZ *et al.*, 2014; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017), baixo custo (MIN *et al.*, 2012; LORENZ *et al.*, 2014; HOU *et al.*, 2014; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017), flexibilidade (JAHANMARD; ANSARI; FEIZI, 2016), resultados com alta precisão (BARRIGA *et al.*, 2016), robustez (LEHOTAY *et al.*, 2007), alto grau de seletividade (JAHANMARD; ANSARI; FEIZI, 2016) e sensibilidade (JAHANMARD; ANSARI; FEIZI, 2016) alto rendimento (ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017), alta eficiência de extração (HOU *et al.*, 2014), garante excelente limpeza de extratos (BARGAŃSKA; ŚLEBIODA; NAMIEŚNIK, 2014), pode isolar efetivamente os analitos de uma matriz (DONG *et al.*, 2017), e remover melhor os co-extratos do extrato bruto (LORENZ *et al.*, 2014; DONG *et al.*, 2017), onde muitas dessas vantagens são resultado da combinação com a análise em CG -EM (KO *et al.*, 2014).

Quando o método de preparação QuEChERS é combinado com CG-EM, ele fornece análises com boa sensibilidade e seletividade (LI *et al.*, 2017b), permitindo a determinação rápida e concreta de agrotóxicos e seus resíduos nos alimentos (BARRIGA *et al.*, 2016). Como qualquer outro método, o QuEChERS também apresenta desvantagens, como baixo fator de enriquecimento (RAI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017), e a perda de agrotóxicos OFs durante a fase de limpeza (CUNHA; FERNANDES, 2011; RAI *et al.*, 2016). Nos tópicos seguintes serão abordados a extração, partição e limpeza levando-se em consideração o método QuEChERS-citrato que foi escolhido para ser utilizado nesta tese.

2.7.1.1 Extração

O pré-tratamento da amostra para extrair e concentrar os analitos das matrizes complexas é um passo importante para a análise de agrotóxicos (LU *et al.*, 2013). Apesar dos avanços nas técnicas de separação e detecção, a extração ainda é o alicerce do processo analítico (FRENICH, ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014). Porém, isolar os analitos de todos os co-extrativos (interferentes) presentes na matriz é um processo bastante complexo, principalmente devido à decorrência da semelhança físico-química entre os analitos e os interferentes presentes na matriz (BANDEIRA *et al.*, 2014).

A seletividade do procedimento de extração é muito importante, pois através dela é possível obter boas recuperações para uma ampla gama de substâncias (PRESTES *et al.*, 2009; CHOWDHURY *et al.*, 2013). A extração com solvente é o método (JOKANOVIĆ, 2012; WALORCZYK, 2014) mais utilizado na análise de resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas (WALORCZYK, 2014), sendo que o tipo de matriz e as propriedades dos compostos alvo (DONG *et al.*, 2017), como a polaridade dos agrotóxicos, tem um grande impacto na extração de agrotóxicos dos alimentos (MIN *et al.*, 2012; XIAN *et al.*, 2016). O solvente de extração apropriado deve ser escolhido de acordo com o princípio de que a substância similar é mais provável que seja dissolvida (XIAN *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2017). Na extração de agrotóxicos de amostras sólidas, o solvente de extração deve ter uma alta capacidade de dissolução dos possíveis agrotóxicos presentes e boa permeabilidade na matriz (ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017).

As características da matriz, bem como as propriedades dos compostos alvo também devem ser levadas em consideração (XIAN *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2017). Outros fatores que devem ser observados, é que o solvente de extração deve apresentar seletividade durante a extração, a partição e a limpeza (*clean-up*), além de possuir a capacidade de extrair um amplo espectro de agrotóxicos com diferentes polaridades, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo, segurança, e nem tão menos importante levar em consideração a legislação ambiental (PRESTES *et al.*, 2009).

Conforme as estruturas e polaridades químicas, os agrotóxicos são facilmente solúveis em solventes orgânicos como *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, metanol e ACN (LU *et al.*, 2013). Uma vez que existe um grande número de substâncias interferentes existentes em vegetais, tais como açúcar, pigmentos, cera e proteínas, que também são facilmente solúveis na ACN e influenciam adversamente a sensibilidade e

contaminam o instrumento, é preciso a seleção de um solvente de extração adequado é particularmente importante (LU *et al.*, 2013).

Além da escolha do solvente (PRESTES *et al.*, 2009), outro ponto fundamental no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo é a escolha da quantidade de amostra, que seja a menor possível, mas que garanta representatividade estatística ao resultado final (LEHOTAY *et al.*, 2007; PRESTES *et al.*, 2009), sendo as 10 g utilizada no método QuEChERS-citrato uma quantidade ideal quando comparada a quantidades de 15 a 100 g normalmente utilizadas em outros métodos multirresíduo (PRESTES *et al.*, 2009).

A ACN é considerada o solvente mais adequado para a extração de muitos resíduos de agrotóxicos e proporciona maiores recuperações com o mínimo de co-extrativos das matrizes (LEE *et al.*, 2016). A ACN é o solvente mais usado (PRESTES *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2016) por causa de sua capacidade de promover a extração em uma única fase quando em contato com a matriz (PRESTES *et al.*, 2009), polaridade intermediária (LI *et al.*, 2016) e miscibilidade adequada com água (PRESTES *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2017), o que permite a penetração na fração aquosa das amostras (WANG *et al.*, 2017), podendo ser facilmente separada da água presente na amostra por adição de sais (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017) e centrifugação (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Além disso, em relação a outros solventes, como álcoois, a ACN não extrai tantos materiais interferentes como lipídios (PRESTES *et al.*, 2009; ANASTASSIADES *et al.*, 2003; RAI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017), ceras e pigmentos (PRESTES *et al.*, 2009; ANASTASSIADES *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017). Geralmente, a ACN tem potencial para extrair uma ampla gama de agrotóxicos (PRESTES *et al.*, 2009; ANASTASSIADES *et al.*, 2003; BASTOS *et al.*, 2012; RAI *et al.*, 2016) com diferentes polaridades (PRESTES *et al.*, 2009; BASTOS *et al.*, 2012; RAI *et al.*, 2016).

A extração com ACN possui a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporcionar a separação das fases aquosa e orgânica (SCHENCK *et al.*, 2008; PRESTES *et al.*, 2009). Quando comparada a outros solventes de extração como acetato de etila e acetona, a ACN apresenta problemas por possuir grande volume de expansão durante vaporização no cromatógrafo a gás e considerável toxicidade (PRESTES *et al.*, 2009).

Apesar da ACN poder fornecer altas recuperações para os agrotóxicos com uma ampla gama de polaridades, a extração com solvente não satisfaz o requisito de análise devido

a muitas substâncias co-extraídas, sendo necessário a combinação com um passo de limpeza para purificar a solução extraída (LU *et al.*, 2013).

Na execução do método QuEChERS-citrato são adicionados 10 mL do solvente, resultando em uma relação de 1,0 g de amostra por 1,0 mL de solvente, sem levar em consideração a etapa de evaporação, onde este valor é considerado baixo ao verificar outros métodos de extração, nos quais a relação entre amostra e solvente é de 2 a 5 g por 1,0 mL no extrato final. Com a instrumentação analítica disponível atualmente, esta relação é considerada apropriada já que valores de LD entre 10 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ são obtidos para a maioria dos agrotóxicos comumente analisados (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

2.7.1.2 Partição (*salting out*)

Outra parte da etapa de extração é a partição (*salting out*) (TUZIMSKI; REJCZAK, 2016; LI *et al.*, 2017b), que é feita via d-SPE (GRIMALT; DEHOUCK, 2016; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017). O sorvente é escolhido com a finalidade de reter componentes indesejados da matriz e possibilitar que os analitos de interesse permaneçam na fase orgânica (TUZIMSKI; REJCZAK, 2016).

Após a extração inicial com ACN, ocorre a adição do sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) (LI *et al.*, 2014; WALORCZYK, 2014; LI *et al.*, 2017b) e cloreto de sódio (NaCl) (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2014; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; LI *et al.*, 2017b) para induzir a separação em um camada aquosa e uma camada orgânica (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; LI *et al.*, 2017b), ou seja, a separação do extrato da água (LI *et al.*, 2014) e aumentar a recuperação dos agrotóxicos (GRIMALT; DEHOUCK, 2016). Este passo é a combinação de uma extração e uma partição líquido-líquido (LI *et al.*, 2017b).

O MgSO_4 anidro é usado como agente de secagem (SURMA *et al.*, 2017), promovendo a partição líquido-líquido da água presente na amostra (KO *et al.*, 2014). Ele possui maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009), sendo capaz de reduzir o volume da fase aquosa (PRESTES *et al.*, 2009; CERQUEIRA; CALDAS; PRIMEL, 2014) e sua hidratação é uma reação altamente exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40

e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, o que favorece a extração, principalmente dos compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; CERQUEIRA; CALDAS; PRIMEL, 2014). Segundo Oshita e Jardim (2012) a etapa de remoção de água gera um extrato final de menor polaridade, facilitando a precipitação de co-extrativos ou interferentes polares, e assim, permitindo a injeção direta do extrato final no CG.

O NaCl é adicionado para favorecer a transferência de compostos polares para a fase orgânica, e assim, obter maiores percentuais de recuperação desses analitos (PRESTES *et al.*, 2009). A adição do NaCl pode diminuir a solubilidade dos analitos e beneficiar a separação de fases (LI *et al.*, 2013) e aumentar a força iônica da fase aquosa e, portanto, aumentar as recuperações (WANG *et al.*, 2017). Quando a quantidade de NaCl é excessivamente grande, a viscosidade da solução da amostra aumenta, enfraquecendo a transferência do analito para o solvente de extração (LI *et al.*, 2013).

Melhores percentuais de recuperação para analitos polares são obtidos dependendo da natureza do solvente usado na etapa de partição, já que a adição dos sais reduz a solubilidade destes compostos na fase aquosa, assim como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009).

A diferença de polaridade das duas fases irá influenciar diretamente a partição de agrotóxicos entre as duas fases (LI *et al.*, 2017b). Para ajustar a porcentagem de água na fase orgânica, e assim, ajustar a polaridade das duas fases é feita a adição de quantidades adequadas de MgSO₄ e NaCl (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2017b). Deve haver uma adequação entre as quantidades de NaCl e MgSO₄, uma vez que o aumento na concentração de NaCl pode resultar em uma diminuição na recuperação de compostos polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003), pois quanto mais NaCl é adicionado ao sistema, mais completa se torna a separação de fases e menos água permanece na fase orgânica, que se torna menos polar e, portanto, menos sujeita à compostos polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

O MgSO₄ induz maior particionamento de agrotóxicos relativamente polares do que o NaCl e outros sais, além de remover mais água dos extratos finais, mas também provoca a partição de co-extrativos da matriz polar para fase orgânica, o que gerou a necessidade da adição de um pouco de NaCl (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2016).

Agrotóxicos sensíveis ao meio básico e ácido requerem um pH especial, portanto o pH é um parâmetro muito importante (PRESTES *et al.*, 2009; LORENZ *et al.*, 2014; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017). A otimização do pH é necessário

para melhorar a sensibilidade do método aumentando os níveis de detecção e recuperação (LORENZ *et al.*, 2014). O tamponamento é uma consideração relevante para obtenção de altas recuperações de uma maior variedade de agrotóxicos independentemente do pH da amostra (GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2014). Com o uso de um tampão durante a extração a maioria das frutas e vegetais pode ser estudada (PORTOLÉS *et al.*, 2014).

O método QuEChERS-citrato utiliza uma mistura de citrato de sódio dihidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado para estabelecer o efeito tamponante (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). A adição dos sais de tampão de citrato gera valores de pH entre 5,0 e 5,5 (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017), que corresponde a uma faixa que permite uma extração quantitativa e a proteção de compostos alcalinos e ácidos (ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017).

2.7.1.3 Limpeza (*clean-up*)

A complexidade da matriz da amostra pode provocar dificuldades na quantificação de agrotóxicos, sendo fundamental a realização de uma etapa de limpeza do extrato obtido, (PRESTES *et al.*, 2009; BASTOS *et al.*, 2012; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2014; MORRISON *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2017), uma vez que a presença de co-extrativos pode afetar a resposta do sistema cromatográfico (CHOWDHURY *et al.*, 2013; CERQUEIRA; CALDAS; PRIMEL, 2014; WALORCZYK, 2014; MORRISON *et al.*, 2016; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016; MUÑOZ *et al.*, 2017) e atrapalhar a quantificação (MORRISON *et al.*, 2016). Os co-extrativos podem co-eluir com os analitos alvo e obstruir o sistema de CG-EM (CHOWDHURY *et al.*, 2013).

A limpeza reduz os co-extrativos (PRESTES *et al.*, 2009; ARIAS *et al.*, 2014; KO *et al.*, 2014; CABRERA *et al.* 2016; MUÑOZ *et al.*, 2017; DONG *et al.*, 2017; URBAN; LESUEUR, 2017), diminuindo o efeito matriz (PINHO *et al.*, 2012; CERQUEIRA; CALDAS; PRIMEL, 2014; COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014; KOWALSKI; LUPO; COCHRAN, 2014; FRENICH, ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014; CABRERA *et al.* 2016; MUÑOZ *et al.*, 2017) e a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2009; ARIAS *et al.*, 2014; COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014), além de melhorar o desempenho cromatográfico (URBAN; LESUEUR, 2017), ajudando na quantificação dos analitos (ARIAS *et al.*, 2014), pois melhora os limites de detecção e evita sobreposições de picos (KO *et al.*, 2014). Além disso, a limpeza promove

a robustez e a confiabilidade dos resultados (PRESTES *et al.*, 2009; CERQUEIRA; CALDAS; PRIMEL, 2014; MUÑOZ *et al.*, 2017) obtidos pelo sistema cromatográfico, visto que componentes não-voláteis (GRUPTA, 2006; PRESTES *et al.*, 2009) ou polares (GRUPTA, 2006) presentes na matriz podem ficar retidos no conjunto injetor-insensor (GRUPTA, 2006; PRESTES *et al.*, 2009) e também na coluna cromatográfica, modificando a resposta do sistema (PRESTES *et al.*, 2009). Deste modo, uma limpeza eficaz promove uma vida útil maior para os insensores, tanto quanto para as colunas cromatográficas, diminuindo assim, a contaminação do sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2009).

Os procedimentos de limpeza da amostra têm sido um constante desafio, sendo que o método QuEChERS tem sido aplicado com sucesso para uma grande variedade de produtos alimentares (LI *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2013b; RESTREPO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014b; PAZ *et al.*, 2015; GOLGE; KABAK, 2015a; GOLGE; KABAK, 2015b; GUEDES *et al.*, 2016; DONG; XIAO, 2017; CUNHA; OLIVEIRA; FERNANDES, 2017; GIACINTI *et al.*, 2017; ROMANELLI *et al.*, 2017).

No método QUEChERS a etapa de limpeza envolve a metodologia d-SPE baseada nos princípios da SPE (extração em fase sólida), mas a fase sólida é adicionada diretamente ao extrato sem condicionamento, e a limpeza é facilmente realizada por agitação e centrifugação (PRESTES *et al.*, 2009; GRIMALT; DEHOUCK, 2016).

Uma vez que a limpeza ocorre após o processo de extração, não ocorre melhora na eficiência de extração, ela apenas diminui a interferência no equipamento devido à remoção dos co-extrativos da matriz (MORRISON *et al.*, 2016). Para Cabrera *et al.* (2016) a principal vantagem da d-SPE é a versatilidade no estabelecimento de novos métodos, uma vez que permite o uso de diferentes quantidades e/ou misturas de sorventes. Atualmente, o d-SPE é a principal forma selecionada para realizar a limpeza (GRIMALT; DEHOUCK, 2016; URBAN; LESUEUR, 2017, ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; UCLÉS *et al.*, 2017). Nos Estados Unidos, os limites regulamentares para concentrações de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais geralmente se enquadram na faixa $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, onde é utilizado tipicamente a abordagem QuEChERS com a limpeza d-SPE (LI *et al.*, 2016).

Uma porção do extrato é purificada (PRESTES *et al.*, 2009; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016) no método QuEChERS usando sorventes como a PSA, o C18 e o GCB (BASTOS *et al.*, 2012; HOU *et al.*, 2014; GIACINTI *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2017; SURMA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017). Além disso, é utilizado MgSO_4 anidro (GIACINTI *et al.*, 2016; ŁOZOWICKA;

RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017) para a eliminação de água (CABRERA *et al.* 2016; GIACINTI *et al.*, 2016), gerando um extrato final de menor polaridade, e assim, facilitando a precipitação de co-extrativos polares (PRESTES *et al.*, 2009). O uso adequado de sorvente (s) é fundamental para a remoção de interferências da matriz, que podem afetar negativamente o desempenho cromatográfico (LI *et al.*, 2014). Para obtenção de extratos mais limpo no passo de limpeza do D-SPE tem sido feito o uso de diferentes quantidades ou novas combinações de materiais (ZOCCALI *et al.*, 2017).

A PSA é o principal sorvente usado com o intuito de remover gorduras (CABRERA *et al.* 2016; RIZZETTI *et al.*, 2016; SURMA *et al.*, 2017), pigmentos (GUEDES *et al.*, 2016; CABRERA *et al.* 2016; RIZZETTI *et al.*, 2016; SURMA *et al.*, 2017), ácidos orgânicos polares (GRIMALT; DEHOUCK, 2016; CABRERA *et al.* 2016; RIZZETTI *et al.*, 2016; SURMA *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2017), ácidos graxos (ARIAS *et al.*, 2014; MORRISON *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017; MUÑOZ *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2017; URBAN; LESUEUR, 2017), açúcares (MORRISON *et al.*, 2016; GRIMALT; DEHOUCK, 2016; CABRERA *et al.* 2016; RIZZETTI *et al.*, 2016; SURMA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; MUÑOZ *et al.*, 2017; DONG *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2017; URBAN; LESUEUR, 2017), carboidratos (RESTREPO *et al.*, 2014; MUÑOZ *et al.*, 2017), pigmentos polares (MORRISON *et al.*, 2016) e outros co-extrativos que formam ligações de hidrogênio (MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004; MUÑOZ *et al.*, 2017), sem reter os agrotóxicos (WANG *et al.*, 2017).

A PSA é normalmente usada com o intuito de remover impurezas polares em decorrência de sua forte interação com alguns pigmentos polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2017). Ele pode atuar tanto como uma fase polar (WANG *et al.*, 2017; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017) quanto como um permutador de ânions fraco (MORRISON *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017) com a capacidade de remover muitos co-extrativos das matrizes (WANG *et al.*, 2017; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017). Os grupos amino secundários e primários presentes na PSA lhe conferem uma estrutura bidentada (OSHITA; JARDIM, 2012; PRESTES *et al.*, 2009; RIZZETTI *et al.*, 2016), o que resulta em um alto efeito quelante (PRESTES *et al.*, 2009; OSHITA; JARDIM, 2012; ARIAS *et al.*, 2014; RIZZETTI *et al.*, 2016), responsável pela forte retenção de ácidos gordurosos (PRESTES *et al.*, 2009; RIZZETTI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017) e outros compostos polares presentes na matriz (PRESTES *et al.*, 2009; RIZZETTI *et al.*, 2016).

O uso de PSA pode causar algumas preocupações, especialmente para as recuperações de certos agrotóxicos (ZAINUDIN *et al.*, 2015), já que compostos com características ácidas podem ser retidos, diminuindo as taxas de recuperação (ARIAS *et al.*, 2014). A adição de PSA aumenta o pH dos extratos, atingindo valores acima de 8 (oito), o que pode comprometer a estabilidade de alguns agrotóxicos ao meio básico (ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; UCLÉS *et al.*, 2017), isso ocorre devido a hidrolização desses agrotóxicos, tornando necessário usar ácido fórmico após a etapa de limpeza para reduzir o pH, um passo adicional indesejável (UCLÉS *et al.*, 2017). A adição de ácido ao solvente de extração pode causar um aumento considerável na resposta do detector, supostamente bloqueando os locais ativos no revestimento do *liner*, evitando adsorção e/ou diminuindo a degradação do agrotóxico nos solventes e extratos da matriz (VALLES *et al.*, 2012).

O C18 é utilizado para adsorção de compostos não polares (LI *et al.*, 2014; HOU *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015; GRIMALT; DEHOUCK, 2016; JIANG *et al.*, 2017; DONG; XIAO, 2017; URBAN; LESUEUR, 2017), como lipídios (WALORCZYK, 2014; GRIMALT; DEHOUCK, 2016; DONG; XIAO, 2017; WANG *et al.*, 2017; SURMA *et al.*, 2017; UCLÉS *et al.*, 2017; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017), amido, açúcar e outras interferências (ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017), pigmentos e componentes aromáticos (XIAN *et al.*, 2016; DONG; XIAO, 2017), sendo utilizado para melhorar a eficiência da limpeza em amostras com $\geq 2\%$ de gordura (CABRERA *et al.* 2016).

O GCB possui excelente retenção de moléculas com estruturas planares, em função disso é muito útil na limpeza de matrizes pigmentadas (LI *et al.*, 2014), sendo usado para limpeza adicional com a finalidade de remover esteroides (LI *et al.*, 2014; GRIMALT; DEHOUCK, 2016; SURMA *et al.*, 2017), clorofila (BASTOS *et al.*, 2012; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; SURMA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017) e carotenoides (CABRERA *et al.* 2016; MUÑOZ *et al.*, 2017). A clorofila é uma interferência problemática na análise de agrotóxicos por causa de suas características não voláteis (CABRERA *et al.* 2016), mas o GCB permite a remoção da mesma, melhorando a seletividade (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015). De acordo com Prestes *et al.* (2009), apesar da clorofila não interferir diretamente na análise cromatográfica dos agrotóxicos, ela fica retida no insersor do injetor, aumentando a necessidade de troca deste e das manutenções da coluna cromatográfica.

O GCB pode reter alguns agrotóxicos coplanares (por exemplo, hexaclorobenzeno) (HAN *et al.*, 2016) e planares (LI *et al.*, 2014; ŁOZOWICKA;

RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017). Uma forte retenção de agrotóxicos planares pode ocorrer por causa da grande área de superfície com grupos altamente polares o que favorece a formação de ligações de hidrogênio, que promove forte retenção de agrotóxicos planares, resultando em baixas recuperações (WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; KOLBERG *et al.*, 2011; CABRERA *et al.* 2016). Assim, aumentar a quantidade de GCB pode causar a perda desses agrotóxicos, por isso, é difícil conseguir simultaneamente uma boa limpeza e uma recuperação satisfatória destes agrotóxicos com limpeza por PSA e GCB (LI *et al.*, 2014).

Os parâmetros úteis para avaliar a eficácia do passo de limpeza são o efeito matriz e a recuperação (ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017). A escolha adequada dos sorventes é fundamental para eliminar as interferências da matriz, ao mesmo tempo em que assegura boas recuperações dos analitos alvo (WALORCZYK, 2014).

2.8 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos é realizado por meio de uma extração (OSHITA; JARDIM, 2012; WALORCZYK, 2014), seguida de limpeza (WALORCZYK, 2014), e associada a uma técnica analítica instrumental (OSHITA; JARDIM, 2012), para obtenção de maior seletividade e detectabilidade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). A cromatografia é uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008) e pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; WALORCZYK, 2014; BLANKSON *et al.*, 2016).

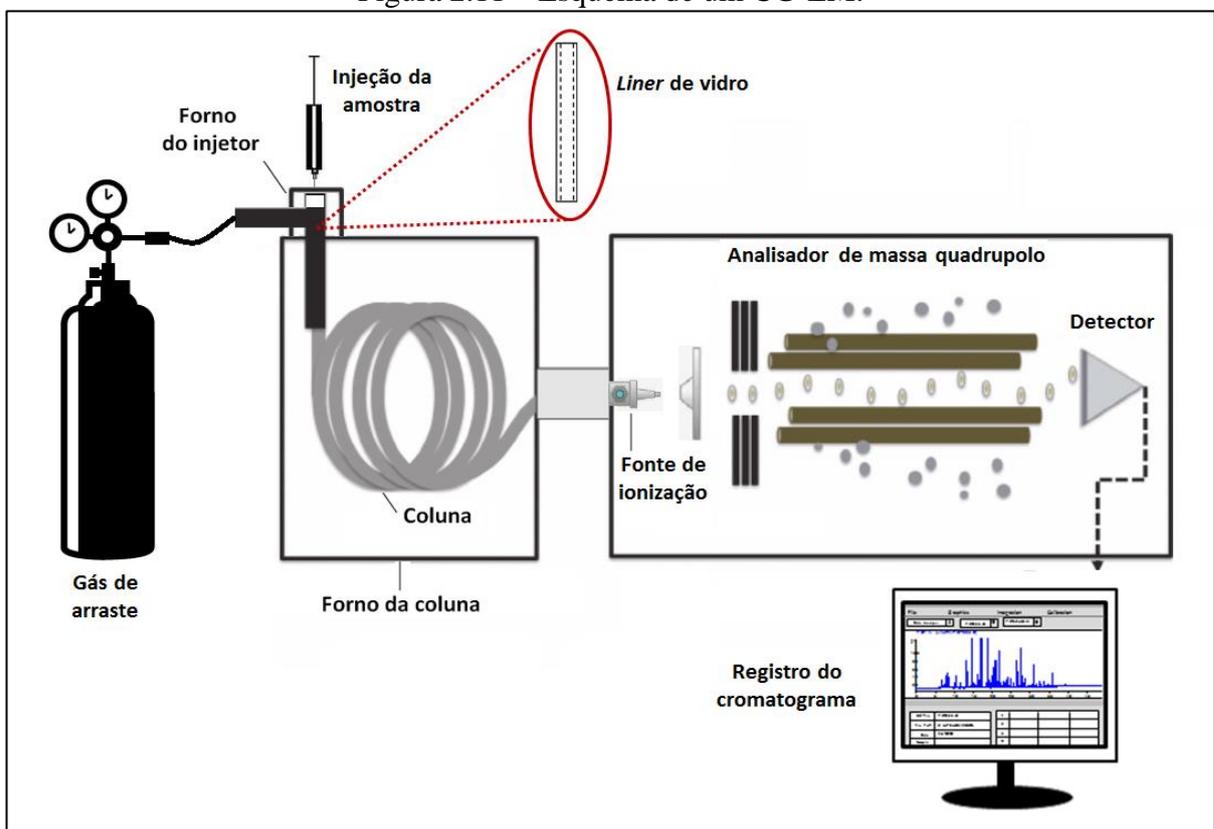
A CG se destaca na química analítica pela capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e de alimentos (RIBANI *et al.*, 2004). A CG já vem sendo aplicada a décadas na análise multirresíduo de agrotóxicos (OSHITA; JARDIM, 2012; QUEIROZ; FERRACINI; ROSA, 2012; WALORCZYK, 2014; JAHANMARD; ANSARI; FEIZI, 2016; WU, 2017) e seus metabólitos em frutas e vegetais (PIRSAHEB *et al.*, 2017), uma vez que possui um excelente poder de resolução, facilitando a análise de diversos analitos numa mesma amostra (OSHITA; JARDIM, 2012).

A EM é uma das formas de detecção mais comumente acopladas à CG na análise de resíduos de agrotóxicos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; SHARMA *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2013a; LORENZ *et al.*, 2014; GIACINTI *et al.*, 2017). Para Chiaradia,

Collins e Jardim (2008) a combinação da CG com a EM é relativamente simples, pois as características de funcionamento do CG são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do EM. Segundo Stachniuk e Fornal (2016) EM é uma técnica analítica chave que permite a identificação de vários grupos de compostos químicos, incluindo os agrotóxicos. De acordo com Chiaradia, Collins e Jardim (2008) o acoplamento de um cromatógrafo a EM combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da EM (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CUI *et al.*, 2016).

A Figura 2.11 apresenta o esquema de um CG-EM, onde o gás de arraste mais comum é o hélio, embora o argônio, o nitrogênio e o hidrogênio também possam ser empregados (SKOOG *et al.*, 2005). A CG acoplada ao EM se destaca devido ao alto poder de separação (SHARMA *et al.*, 2010), sensibilidade (SHARMA *et al.*, 2010; QUEIROZ; FERRACINI; ROSA, 2012; BLANKSON *et al.*, 2016), seletividade (SHARMA *et al.*, 2010; QUEIROZ; FERRACINI; ROSA, 2012; MASIÁ *et al.*, 2016; BLANKSON *et al.*, 2016; WU, 2017), capacidade de identificação e quantificação de agrotóxicos (SHARMA *et al.*, 2010), melhora da precisão dos resultados em termos qualitativos e quantitativos (WU, 2017).

Figura 2.11 – Esquema de um CG-EM.



Fonte: Autor (2018).

O CG-EM permite a identificação seletiva e rotineira de muitas espécies de agrotóxicos em baixos níveis (QUEIROZ; FERRACINI; ROSA, 2012; KAILASA; WU; HUANG, 2013; RIZZETTI *et al.*, 2016), como por exemplo, partes por trilhão (ppt) ou concentrações mais baixas (KAILASA; WU; HUANG, 2013). Com a EM é possível atingir baixos limites de quantificação na ordem de ppm (requisitos regulatórios) e a especificidade adicional necessária ao analisar simultaneamente vários analitos (CUI *et al.*, 2016), fazendo com que a CG-EM seja comumente usada quando se deseja analisar a conformidade de amostras com os limites máximos de resíduos (LMRs), uma vez que esta técnica fornece informações tanto qualitativas quanto quantitativas (SAVANT *et al.*, 2010). A CG-EM tem sido uma das diferentes tecnologias relatadas para a determinação de agrotóxicos OFs (SHARMA *et al.*, 2010; XIN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017a).

Todo EM constitui-se de três componentes básicos: uma fonte de íons, um analisador, onde ocorre a separação dos íons de acordo com sua relação (m/z) e um detector no qual os íons são contados (STACHNIUK; FORNAL, 2016). No acoplamento da EM é obtido o cromatograma de massas constituído de todos os íons produzidos pelo EM ou apenas pelos íons de interesse (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). O cromatograma com todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas é chamado de cromatograma de íons totais (CIT) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STACHNIUK; FORNAL, 2016), fornecendo o espectro de massa completo a partir do intervalo m/z predefinido (STACHNIUK; FORNAL, 2016).

As formas de ionização mais empregadas no acoplamento CG-EM, são a ionização por impacto de elétrons (IE) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009; WALORCZYK, 2014) e a ionização química (IQ) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009), onde a IE é, de longe, a mais popular, pois fornece um grande número de íons, que permitem a identificação da substância em análise (LANÇAS, 2009).

A alta sensibilidade e seletividade, capacidade de detectar muitos agrotóxicos de várias classes químicas em matrizes muito complexas em uma única corrida (STACHNIUK; FORNAL, 2016), faz com que a CG-EM com IE seja uma das técnicas mais frequentemente empregadas para a análise de agrotóxicos multirresíduos em alimentos (PORTOLÉS *et al.*, 2014; STACHNIUK; FORNAL, 2016; GUEDES *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2017) para estudos estruturais, onde o uso de H₂ ou He como fase móvel não interfere na formação de íons de interesse (LANÇAS, 2009).

Para um analito ser analisado em CG, ele deve possuir não apenas uma volatilidade considerável (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008; STACHNIUK; FORMAL, 2016) em temperaturas abaixo de 350 a 400 ° C, (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008), ou ser passível de derivatização para garantir sua volatilidade (STACHNIUK; FORMAL, 2016), mas também precisa ser capaz de suportar altas temperaturas sem se degradar e não reagir com outros compostos presentes no sistema de CG (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008).

Assim, a CG-EM é adequada para análise de compostos voláteis (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; JAHANMARD; ANSARI; FEIZI, 2016), semivoláteis, de baixa polaridade, baixa massa molecular (LANÇAS, 2009) e termicamente estáveis nas temperaturas relativamente elevadas usadas no processo de separação cromatográfica, que são requisitos necessários para que compostos sejam ionizados por meio de IE e IQ (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

As opções convencionais de injeção da amostra em um CG são *split*, *splitless*, *splitless* pulsada e *cold on-column* (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008). A injeção a quente com (*split*) ou sem divisão de fluxo (*splitless*) é uma das técnicas mais empregadas na injeção da amostra na CG (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008; PINHO *et al.*, 2009), devido à facilidade de operação (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008). A injeção *splitless* é utilizada apenas em análises quantitativas de analitos traços (HARRIS, 2001; HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008; HARRIS, 2010) Nesse tipo de injeção ocorre a vaporização da amostra no injetor aquecido logo após sua introdução no sistema (PINHO *et al.*, 2009). A principal limitação da injeção *splitless* é que ela sofre da potencial degradação térmica e adsorção de analitos susceptíveis que podem resultar tanto no aumento da resposta induzida pela matriz quanto na sua diminuição (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008).

A CG-EM quadrupolo é um dos instrumentos mais comuns na análise de agrotóxicos em alimentos (HE *et al.*, 2015; GUEDES *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2017) devido ao custo relativamente baixo quando comparado à outros equipamentos (CAMINO-SÁNCHEZ *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2013a; RESTREPO *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2017; MASIÁ *et al.*, 2016). O CG (*liners* e pré-colunas) e o EM (fonte) devem ser submetidos a manutenção regular, para garantir que a sensibilidade e a reprodutibilidade do método permaneçam altas (GIACINTI *et al.*, 2017).

2.8.1 Efeito matriz

A determinação dos resíduos de agrotóxicos nas matrizes de alimentos é um desafio devido a sua complexidade (COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; RIZZETTI *et al.*, 2016; WU, 2017), propriedades químicas diversas, baixa concentração de analitos e a grandes quantidades de substâncias interferentes que podem ser co-extraídas com os analitos (COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014; WILKOWSKA; BIZIUK, 2011; RIZZETTI *et al.*, 2016).

A determinação de resíduos de agrotóxicos em nível de traço pode ser prejudicada muitas vezes devido à interferência da matriz (FREITAS; LANÇAS, 2009; KO *et al.*, 2014; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015), pois em uma amostra real, durante o processo de extração com solvente, várias substâncias podem ser capturadas e co-extraídas (PRESTES *et al.*, 2009; ROMANELLI *et al.*, 2017; WU, 2017), e mesmo após a limpeza ainda podem ficar alguns resíduos de co-extrativos da matriz (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008; CHOWDHURY *et al.*, 2013), que acabam gerando quantificação imprecisa, diminuição da robustez do método, baixa detecção do analito e até mesmo resultados falsos positivos ou negativos (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008), afetando até mesmo o limite de detecção (PRESTES *et al.*, 2009; ROMANELLI *et al.*, 2017; WU, 2017). Alguns exemplos dessas substâncias são compostos como açúcares, pigmentos, proteínas (WU, 2017), materiais gordurosos, ceras, dentre outros (KO *et al.*, 2014).

Assim, os procedimentos de preparação da amostra ainda são um obstáculo ao desenvolvimento de um método analítico eficiente (SILVA *et al.*, 2017), pois os constituintes ou co-extrativos presentes na amostra (REBELO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017) podem ser responsáveis por propiciar a imprecisão e/ou a inexatidão na quantificação dos analitos como os agrotóxicos (SILVA *et al.*, 2017). Esse tipo de interferência é conhecido como efeito matriz (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; SILVA *et al.*, 2017; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017), e pode diminuir ou aumentar o sinal analítico detectado (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2014; GIACINTI *et al.*, 2016; CHATTERJEE *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; LI *et al.*, 2017b; ALCÂNTARA *et al.*, 2018).

Embora o surgimento de novos métodos e ferramentas analíticas ocorra de forma contínua, o efeito matriz ainda é uma das maiores dificuldades na análise de resíduos de agrotóxicos, influenciando de forma desfavorável a determinação quantitativa e qualitativa do

analito, especialmente na análise de amostras complexas (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018). O efeito matriz pode afetar a exatidão (GIACINTI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017), a precisão (GUEDES *et al.*, 2016; GIACINTI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017), diminuir a robustez do método, gerar resultados falsos positivos ou falsos negativos (GIACINTI *et al.*, 2016) e até mesmo afetar o limite de detecção (PRESTES *et al.*, 2009; ROMANELLI *et al.*, 2017; PANUWET *et al.*, 2016; WU, 2017).

Em uma amostra real, mesmo após a limpeza ainda ficam alguns resíduos de co-extrativos da matriz (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008; CHOWDHURY *et al.*, 2013), que acabam gerando quantificação imprecisa, diminuição da robustez do método, baixa detecção do analito e até mesmo resultados falsos positivos ou negativos (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008).

Os compostos presentes na matriz podem competir com o analito em estudo (GRIMALT *et al.*, 2016), podendo serem identificados como um analito que não está realmente presente, ou serem confundidos com o analito e eluir no mesmo tempo de retenção, causando a cobertura/mascaramento do pico do analito (WALORCZYK 2014; CHATTERJEE *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2017), resultando no comprometimento da seletividade e especificidade do método (GRIMALT *et al.*, 2016). O efeito matriz é amplamente descrito como sendo uma das principais fontes de erro na análise multirresíduo em CG-EM (PAZ *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2017; GUEDES *et al.*, 2016).

2.8.1.1 Efeito Matriz na Quantificação de Agrotóxicos por CG

O efeito matriz depende da amostra (PINHO *et al.*, 2009; (FRENICH, ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; ALCÂNTARA *et al.*, 2018), do procedimento de extração, da técnica de determinação (FRENICH, ROMERO-GONZÁLEZ; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, 2014), do tipo de co-extrativo (ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017), concentração do analito (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017) e das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos (polaridade, peso molecular, estabilidade térmica, temperatura de ebulição, etc.) (SÁNCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2005; POOLE, 2007; PINHO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018), podendo ocorrer interações entre os analitos e co-extrativos da matriz (REBELO *et al.*, 2016), bem como

interação com componentes do CG (PRESTES *et al.*, 2009). De acordo com Stachniuk e Fornal (2016) o efeito matriz é significativamente mais típico em matrizes mais complexas.

Na CG o efeito matriz pode ser causado pelo número e tipos de sítios ativos localizados no *liner* (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015; CHATTERJEE *et al.*, 2016) e na coluna (PRESTES *et al.*, 2009), estrutura química do analito (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015) (capacidade de ligação de hidrogênio) e condições do instrumento (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015; PANUWET *et al.*, 2016), concentração, quantidade e tipo de matriz (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015 YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015), temperatura de injeção e tempo de interação (PRESTES *et al.*, 2009), mas o efeito matriz ocorre principalmente por causa de interações entre os analitos e os sítios ativos do *liner* (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; SOUSA *et al.*, 2013a; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015).

Os sítios ativos se referem a grupos silanóis livres e metais potencialmente presentes na superfície de revestimentos do *liner* (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2003; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015; PANUWET *et al.*, 2016), mesmo em *liners* de vidro de alta qualidade (PANUWET *et al.*, 2016).

A injeção a quente com ou sem divisão de fluxo (*split/splitless*) é uma das técnicas mais empregadas na injeção da amostra na CG (PINHO *et al.*, 2009), porém esta técnica é a mais propensa ao efeito matriz devido às condições de temperatura elevada, na qual os sítios ativos do *liner* tendem a promover adsorção dos analitos ou mesmo catalisar processos de degradação térmica dos agrotóxicos (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2003; PINHO *et al.*, 2009).

O efeito matriz no CG é observado quando uma diferença considerável na resposta cromatográfica é obtida entre os padrões preparados no solvente e aqueles preparados no extrato da matriz (SOUSA *et al.*, 2013a). Embora os agrotóxicos sejam injetados na presença de matriz, pode ocorrer o aumento (SOUSA *et al.*, 2013a; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015; COSTA; CALDAS;

PRIMEL, 2014; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2014; GIACINTI *et al.*, 2016; CHATTERJEE *et al.*, 2016; PANUWET *et al.*, 2016; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017) ou a diminuição da resposta cromatográfica (SOUSA *et al.*, 2013a; COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2014; GIACINTI *et al.*, 2016; CHATTERJEE *et al.*, 2016; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017), através de interações entre os agrotóxicos e co-extrativos da matriz, por meio da ionização na interface do EM, levando a erros de medição (REBELO *et al.*, 2016).

A eluição de impurezas voláteis com o mesmo tempo de retenção do analito pode resultar em múltiplas consequências desfavoráveis, o mais pronunciado sendo (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2003):

- (i) o pico do analito é mascarado, gerando um resultado falso negativo;
- (ii) a impureza é confundida como sendo o analito, que na realidade está ausente, resultando em falso positivo;
- (iii) o sinal do detector aumenta, causando a superestimação do resultado;
- (iv) extinção do sinal do detector, gerando subestimação do resultado, onde este problema é grave para o detector de fotometria de chama (FPD) clássico, mas melhoria significativa é fornecida pela FPD pulsada.

É importante avaliar os efeitos da matriz na análise de resíduos de agrotóxicos utilizando o método CG, uma vez que os efeitos da matriz podem variar substancialmente com as diferentes matrizes e as propriedades dos agrotóxicos alvos, gerando imprecisão inesperada de resultados qualitativos e quantitativos (HOU *et al.*, 2014).

2.8.1.2 Aumento da Resposta Cromatográfica

O aumento da resposta cromatográfica, que é mais comum na análise de CG (COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014), ocorre devido a competição dos compostos da matriz com os sítios ativos da coluna (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; MASTOVSKÁ; LEHOTAY; ANASTASSIADES, 2005; SOUSA *et al.*, 2013a; COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015; GIACINTI *et al.*, 2017) ou do *liner* (SOUSA *et al.*, 2013a; COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015; GIACINTI *et al.*, 2017). O aumento induzido pela matriz é um fenômeno comumente encontrado na análise por CG de agrotóxicos em alimentos (SCHENCK; LEHOTAY, 2000). O efeito matriz positivo é

evidenciado quando a inclinação da curva padrão no extrato é maior do que no solvente puro (SOUSA *et al.*, 2012).

O aumentando do sinal, em comparação com a injeção em solvente puro, ocorre principalmente pelo fato dos co-extrativos da matriz tenderem a também bloquear os sítios ativos (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008; HOU *et al.*, 2014; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; PANUWET *et al.*, 2016; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017). O bloqueio de sítios ativos impede a degradação térmica/adsorção do analito alvo (PANUWET *et al.*, 2016), fazendo com que os analitos alvo sejam eluídos mais rapidamente (HAN *et al.* 2016; PANUWET *et al.*, 2016) e com uma forma de pico mais nítida devido a diminuição das interações entre eles e os locais ativos (PANUWET *et al.*, 2016; ALCÂNTARA *et al.*, 2018), e assim, mais partículas do analito chegam ao detector (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018).

Normalmente, os compostos propensos ao realce cromatográfico induzido por matriz são analitos termolábeis ou polares, e são capazes de fazer ligações de hidrogênio (SCHENCK; LEHOTAY, 2000; HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2003; PANUWET *et al.*, 2016), mas compostos não polares, como por exemplo, piretróides, também podem sofrer tal realce (PANUWET *et al.*, 2016).

2.8.1.3 Diminuição da Resposta Cromatográfica

A supressão da resposta cromatográfica, que é menos comum na análise de CG, ocorre quando os agrotóxicos interagem e co-eluem com os compostos da matriz (COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014) durante o mesmo tempo de retenção (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015), e como os compostos da matriz não estão no nível de traço (COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014), pode ocasionar a cobertura/mascaramento do pico do analito (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015), aumentando o sinal de base do cromatograma e, conseqüentemente, produzindo uma supressão do sinal cromatográfico do agrotóxico (COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014). O efeito matriz negativo é evidenciado quando a inclinação da curva padrão no extrato é menor do que a curva padrão no solvente puro (SOUSA *et al.*, 2012).

A resposta também pode ser diminuída se os componentes não voláteis da matriz se acumularem no *liner* do injetor e/ou na coluna (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; GIACINTI *et al.*, 2017), criando sítios ativos adicionais também podem ser formados a

partir de co-extrativos não voláteis que se depositam na entrada do sistema cromatográfico durante repetidas análises (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015).

Na análise de CG, os analitos (semi) polares ou termicamente sensíveis podem se decompor nos locais ativos no *liner* e coluna, dando perdas e formas de pico distorcidas (HOU *et al.*, 2014). Os componentes da matriz também podem se acumular no *liner* e criar sítios ativos capazes de reagir com os analitos, diminuindo a quantidade do analito que chega ao detector (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015; GIACINTI *et al.*, 2017).

2.8.1.4 Atenuação do efeito matriz

Em comparação com padrões de calibração em solvente puro (YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015; GIACINTI *et al.*, 2017), o aumento do sinal (YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015; GIACINTI *et al.*, 2016; CHATTERJEE *et al.*, 2016) leva a uma superestimação das concentrações de agrotóxicos que refletem a adsorção de componentes da matriz co-extraída no injetor e na coluna, já a diminuição do sinal, leva a uma subestimação das concentrações de agrotóxicos que refletem adsorção de analito nos locais ativos do injetor, coluna e/ou detector (GIACINTI *et al.*, 2016; CHATTERJEE *et al.*, 2016).

Vários métodos foram propostos para corrigir o efeito matriz (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; PANUWET *et al.*, 2016; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017), incluindo o uso de protetores de analitos (PINHO *et al.*, 2012; GUEDES *et al.*, 2016; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; DONG *et al.*, 2017), otimização dos parâmetros de injeção (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017) e separação (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015), padrões internos marcados isotopicamente (LI *et al.*, 2017b), calibração por adição de padrão (PINHO *et al.*, 2012; PANUWET *et al.*, 2016; STACHNIUK; FORNAL, 2016; REBELO *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017b), calibração por adição de padrão interno (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; REBELO *et al.*, 2016; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017) e calibração combinada à matriz (STACHNIUK; FORNAL, 2016; GRIMALT *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2017;

REBELO *et al.*, 2016; GIACINTI *et al.*, 2016; RIZZETTI *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2016; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; LI *et al.*, 2017b).

Amostras complexas com baixa concentração dos analitos possuem maior efeito matriz e demandam o uso da calibração combinada à matriz, uma vez que ela garante maior precisão, tornando alguns métodos capazes de determinar maior quantidade de analitos (REBELO *et al.*, 2016). A calibração combinada à matriz é conhecida como a maneira mais eficaz e precisa para lidar com os efeitos da matriz na detecção de agrotóxicos em matrizes complexas (SHEN *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2017). Como na utilização de protetores de analitos, a calibração combinada à matriz mascara os sítios ativos no sistema de CG (SŁOWIK-BOROWIEC, 2015)

A calibração combinada à matriz é uma abordagem prática e razoavelmente eficaz usada para compensar os efeitos da matriz nos métodos CG-EM para análise de resíduos de agrotóxicos (GIACINTI *et al.*, 2016), principalmente por ser um método relativamente barato, simples (GUEDES *et al.*, 2016), e gerar resultados confiáveis na quantificação dos resíduos de agrotóxicos (COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014), sendo por isso, o método usado majoritariamente (BAKIRCI *et al.*, 2014; STACHNIUK; FORMAL, 2016; GRIMALT *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2017; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017).

A calibração combinada à matriz é gerada pela adição de soluções padrão aos extratos da matriz sem resíduo do analito (YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015; STACHNIUK; FORMAL, 2016), mas as limitações incluem indisponibilidade frequente de amostra sem analitos alvo (KOWALSKI; LUPO; COCHRAN, 2014; YUDTHAVORASIT; MEECHAROEN; LEEPIPATPIBOON, 2015) e comportamento dependente de cada tipo de amostra. Antes da obtenção dos padrões desejados de precisão e exatidão dos dados laboratoriais, o efeito matriz deve ser caracterizado e controlado (PANUWET *et al.*, 2016).

Ao trabalhar com amostras de alimentos muitos métodos usam o QuEChERS para diminuir o efeito matriz (SAMPAIO *et al.*, 2013), bem como o uso do preparo de padrões usando uma matriz apropriada em vez de solvente puro, com o intuito de evitar recuperações baixas ou altas dos analitos (ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017). Não existe uma técnica de extração única e métodos de limpeza que eliminem completamente o efeito da matriz, mas as metodologias QuEChERS são aplicadas em muitos laboratórios, com bons resultados e altas recuperações, em várias extrações de matrizes complexas como: solo, amostras biológicas e alimentos (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2014).

Valores de efeito matriz entre -20 e 20% podem ser considerados insignificantes, pois essa variabilidade está próxima dos valores do CV da repetibilidade (FERRER *et al.*, 2011; LOZANO *et al.*, 2012; WALORCZYK, 2014; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; SANTE, 2017; RIZZETTI *et al.*, 2016).

2.9 Validação de métodos analíticos

O primeiro nível e primeira ferramenta de garantia da qualidade de um sistema de qualidade laboratorial é a validação de um procedimento analítico (MAPA, 2011b). Ao realizar o desenvolvimento de um método para análise de agrotóxicos é preciso sempre incluir a validação do método, sobretudo se for aplicado a uma matriz e não somente a estudos com soluções padrão (BRITO *et al.*, 2002). Um dos objetivos da validação é verificar a precisão do método de quantificação escolhido, uma vez que os métodos de quantificação são propensos a erros (KRUBE *et al.*, 2015).

Na validação é feito uma avaliação para prever a eficiência de um método desenvolvido, adaptado ou implementado (BRITO *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2008). Assim, por meio da validação, é possível garantir que um método gere informações confiáveis e interpretáveis (BRITO *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade (INMETRO), a validação é necessária sempre que um método existente for modificado ou quando um método totalmente novo for desenvolvido (INMETRO, 2003). A validação do método permite provar que um método analítico é aceitável para a finalidade pretendida (HARRIS, 2010). Assim, um processo de validação bem estabelecido e documentado disponibiliza para as agências reguladoras comprovações de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método é um processo longo, que requer um grande número de experimentos analíticos, bem como cálculos estatísticos (RIBEIRO *et al.*, 2008). Ela precisa avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder, e assim, demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (BRITO *et al.*, 2003; MAPA, 2011a). As medições químicas devem mostrar qualidade através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade (RIBANI *et al.*, 2004; MAPA, 2011a), pois dados analíticos não confiáveis podem causar decisões graves e prejuízos financeiros irremediáveis (RIBANI *et al.*, 2004). É importante que os efeitos da matriz sejam

investigados e conduzidos durante a validação e implementação de um método, pois podem resultar em medições imprecisas dos analitos (PANUWET *et al.*, 2016).

Os parâmetros estudados na validação certificam que o modelo proposto é confiável e atende às especificações impostas pela indústria e órgãos de fiscalização nacionais e internacionais (BRAGA; POPPI, 2004). Os parâmetros analíticos normalmente usados para validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (RIBANI *et al.*, 2004). Dependendo da técnica analítica empregada ou com o protocolo de validação a ser seguido, a estimativa destes parâmetros pode variar (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Para permitir que os laboratórios tenham livre escolha de métodos, e conseqüentemente, instigar o desenvolvimento contínuo dos métodos analíticos, a DG SANTE fornece orientação para os laboratórios na validação de métodos de análise de resíduos de agrotóxicos nos alimentos e alimentos para animais (GRIMALT; DEHOUCK, 2016). No Brasil, a ANVISA e o INMETRO são os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos (RIBEIRO *et al.*, 2008), verificando a competência dos laboratórios de ensaios, bem como disponibilizando guias e manuais para o procedimento de validação (RIBANI *et al.*, 2004).

Além do uso de métodos oficiais, laboratórios desenvolvem e validam seu próprio método para a análise de resíduos de agrotóxicos, uma vez que dependendo da técnica analítica adotada, podem ser utilizadas abordagens diferentes para o tratamento das amostras (GRIMALT; DEHOUCK, 2016). Porém, mesmo ao usar a mesma técnica, diferentes configurações ou equipamentos podem ser selecionados, tornando difícil alcançar um método analítico universalmente aceito (GRIMALT; DEHOUCK, 2016). Na literatura existem muitas aplicações que foram validadas com sucesso para um grande número de agrotóxicos em matrizes complexas (GIACINTI *et al.*, 2016; CLOUTIER *et al.*, 2017; DONG; XIAO, 2017; DONG *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2017; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; MACHADO *et al.*, 2017; PIRSAHEB *et al.*, 2017; SRIVASTAVA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; WU, 2017; ZOCCALI *et al.*, 2017). Segundo Brito *et al.* (2003) deve-se salientar que o método pode ser considerado validado, apesar de alguns parâmetros não se enquadrarem nos limites estabelecidos na literatura, mas que sejam conhecidos criteriosamente e, portanto, adequados aos objetivos do estudo a ser realizado.

2.9.1 Seletividade

A seletividade é a primeira etapa no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação, pois outras figuras de mérito como linearidade, exatidão e precisão poderão ser comprometidas caso a seletividade não seja atestada (RIBANI *et al.*, 2004).

De acordo com MAPA (2011) a seletividade é a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analito (s) particular (es) em mistura (s) ou matriz (es) sem a interferência de outros componentes de comportamento similar (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, entre outras). Assim, um método instrumental que possui seletividade é capaz de avaliar, de forma inequívoca, os analitos na presença de componentes que podem interferir na determinação de uma amostra complexa (RIBANI *et al.*, 2004; ZAINUDIN *et al.*, 2015). A análise de um analito deve utilizar técnicas confirmatórias, já que substâncias diferentes podem resultar em respostas semelhantes em determinadas condições (BRITO *et al.*, 2003), onde com a seletividade é possível garantir que o pico de resposta é exclusivamente do analito (RIBANI *et al.*, 2004).

A seletividade de um método analítico pode ser feita pela comparação entre os sinais (resposta instrumental) do composto de interesse na matriz sem a presença do analito, com a resposta obtida na matriz com uma quantidade conhecida do analito (padrão) (MAPA, 2011b). Todavia, detectores modernos (arranjo de diodos ou espectrômetro de massa) também permitem avaliar a seletividade (MAPA, 2011b; RIBANI *et al.*, 2004; GUEDES *et al.*, 2016).

Nos procedimentos cromatográficos é preciso adotar as precauções necessárias para assegurar a resolução e adequada separação (pureza) dos picos cromatográficos (MAPA, 2011a), como por exemplo, testes de resolução de pico para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente, que pode ser feito através do uso do detector de EM (MAPA, 2011a; GUEDES *et al.*, 2016). Assim, a EM acoplada à cromatografia pode ser altamente seletiva, (MAPA, 2011b), pois possibilita estimar a seletividade por meio da comparação do espectro do pico obtido na separação em relação ao de um padrão (MAPA, 2011b; RIBANI *et al.*, 2004), garantindo uma indicação da presença do composto puro (RIBANI *et al.*, 2004) através do grau de similaridade. O aumento da seletividade e melhora da sensibilidade podem ser alcançados com o uso do modo CIE na CG-EM, onde a presença do analito na amostra é detectada pela análise do espectro de massa do mesmo (GUEDES *et al.*, 2016).

2.9.2 Linearidade

A linearidade reflete a capacidade de um método em fornecer resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma dada faixa analítica (BRITO *et al.*, 200; RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008; MAPA, 2011a ; MAPA, 2011b), em que a equação matemática que representa esta dependência é denominada curva analítica ou curva de calibração (RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008), que podem ser adequadamente ajustadas pela equação de uma reta (função afim) (MAPA, 2011b). Assim, a linearidade corresponde ao ajuste da curva de calibração (RIBEIRO *et al.*, 2008).

No gráfico de calibração é feita a suposição de que a resposta instrumental está linearmente relacionada com a concentração do padrão (BRITO *et al.*, 2003). Assim, um número suficiente de calibradores (soluções-padrão) deve ser usado para definir de forma apropriada esta relação entre a concentração e a resposta (BRITO *et al.*, 2003), sendo necessário no mínimo cinco valores compreendidos no intervalo definido (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; MAPA, 2011b), para que sejam obtidos dados estatísticos de intersecção, da equação de regressão linear, o coeficiente de correlação ou de determinação, bem como a concentração estimada dos calibradores (BRITO *et al.*, 2003).

As curvas de calibração podem ser elaboradas de três formas (MAPA, 2011b): curva de calibração do analito em solução, curva de calibração da matriz branca fortificada ou curva de calibração do extrato da matriz branca fortificado. Para fazer a quantificação é necessário conhecer a relação entre a resposta medida e a concentração do analito, onde a equação da reta que relaciona as duas variáveis é dada pela equação (2.1) (INMETRO, 2017):

$$y = ax + b \tag{2.1}$$

Onde:

y: resposta medida (sinal instrumental como absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x: concentração;

a: coeficiente angular (inclinação da curva analítica = sensibilidade);

b: coeficiente linear (intersecção com o eixo y, quando x = 0).

Uma vez conhecidos os coeficientes a e b , eles poderão ser usados para prever a concentração da espécie de interesse em amostras a partir do seu sinal analítico (RIBEIRO *et al.*, 2008). O método dos mínimos quadrados é usado para fazer o ajuste de qualquer equação matemática, onde a melhor curva fornece o menor valor para a soma quadrática dos resíduos obtidos entre o sinal analítico medido e o sinal analítico predito, para um conjunto de n pontos experimentais (RIBEIRO *et al.*, 2008).

A regressão linear é usada para estimar os coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de pontos experimentais, que além dos coeficientes de regressão a e b , também fornece o coeficiente de correlação R (RIBANI *et al.*, 2004). A linearidade pode ser demonstrada pelo R do gráfico analítico (BRITO *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2008), onde o ideal é obter um valor estatisticamente igual a 1 (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Valores relativamente pequenos de R estão relacionados com um ajuste não linear entre valores de x e y , enquanto um ajuste linear com $R=1$ mostra que todos os pontos da curva estão em cima de uma reta com inclinação positiva (RIBEIRO *et al.*, 2008). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2017).

O R é a adequação do ajuste da curva (RIBEIRO *et al.*, 2008), sendo um bom indicativo do quanto uma reta pode ser considerada adequada como modelo matemático (INMETRO, 2017), onde as seguintes considerações podem ser feitas em relação à linearidade de um gráfico (BRITO *et al.*, 2003):

$R = 1$ (correlação perfeita)

$0,91 < R < 0,99$ (correlação fortíssima)

$0,61 < R < 0,91$ (correlação forte)

$0,01 < R < 0,30$ (correlação fraca)

$R = \text{zero}$ (correlação nula)

Muitas vezes é difícil detectar visualmente os desvios da linearidade, bem como o R pode frequentemente gerar uma medida superficial da correlação (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2017). Assim, os testes estatísticos são úteis para julgar as diferenças numéricas resultantes de erros aleatórios inevitáveis de todas as medidas ou dos erros sistemáticos, uma vez que os resultados experimentais raramente concordam exatamente com aqueles previstos por um modelo teórico (SKOOG *et al.*, 2005).

A ausência de teste pode levar a erros significativos durante a quantificação de resíduos de agrotóxicos (GUEDES *et al.*, 2016). A linearidade pode ser verificada através de testes estatísticos de significância da regressão linear através do teste- F (variância) e dos parâmetros de calibração por meio do teste- t de Student (médias) (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2017). O teste- t é uma ferramenta estatística usada com frequência para comparar resultados de diferentes experimentos (HARRIS, 2010). Ele requer que os desvios padrão dos conjuntos de dados comparados sejam iguais, onde o teste- F é utilizado para avaliar essa (SKOOG *et al.*, 2005). A comparação estatística é utilizada para determinar o efeito matriz através da inclinação da curva de calibração dos agrotóxicos no solvente e no extrato da matriz (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2014).

2.9.2.1 teste- F

O teste- F é empregado na análise de regressão linear (SKOOG *et al.*, 2005), podendo ser aplicado no caso de comparar apenas duas curvas (PINHO *et al.*, 2012). Ele é baseado na hipótese nula de que as variâncias das duas curvas consideradas são iguais, ou seja, que as quantidades numéricas que estão sendo comparadas são de fato similares, e deste modo, verificar se as curvas são significativamente diferentes uma da outra (SKOOG *et al.*, 2005).

O teste- F é comparado com o valor de F obtido a partir de uma tabela estatística, onde os valores de F ao considerar um intervalo de confiança de 95%, onde se $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ para 95% de confiança, a regressão linear é significativa, porém, se $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, não existe relação linear entre os eixos x e y , mesmo com um bom valor de R (SKOOG *et al.*, 2005). O grau de liberdade (GL) de cada curva de calibração é dado por: $GL = N - 2$, N é o número de pontos de curva (LIGIERO *et al.*, 2009; HARRIS, 2010; GUEDES *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2017).

2.9.2.2 Teste de Student (teste- t)

O teste- t é usado quando existe um número pequeno de resultados, onde também é usada a hipótese nula (SKOOG *et al.*, 2005). O teste- t é importante para avaliar a significância estatística dos coeficientes a e b das curvas de calibração (GUEDES *et al.*, 2016). O teste de significância dos parâmetros de calibração das curvas é baseado no teste de

hipótese aplicando o parâmetro t de Student (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002; GOMES *et al.*, 2017). Os desvios para os coeficientes angulares e lineares das equações de regressão são usados para avaliar a significância estatística de um parâmetro, onde o valor de t_{calc} (valor de t calculado) é obtido através da razão entre o valor de cada parâmetro e o seu respectivo desvio (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002).

O teste- t é comparado com o valor de t obtido a partir de uma tabela estatística, onde $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$ com um nível de confiança de 95%, o parâmetro é significativo e deve ser mantido na equação da reta, mas se $t_{\text{tabelado}} > t_{\text{calculado}}$, o parâmetro de calibração não é significativo devendo ser excluído (SKOOG *et al.*, 2005, BARBOSA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2017).

2.9.3 Precisão

A precisão é a estimativa da dispersão de resultados provenientes de ensaios independentes que são repetidos em uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições estabelecidas (INMETRO, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2008; MAPA, 2011b), avaliando a proximidade entre várias medidas realizadas na mesma amostra (BRITO *et al.*, 2003). Através da precisão é possível descrever a reprodutibilidade de um resultado, onde sua medição será precisa se ao repetir uma medida várias vezes os valores estiverem de acordo uns com os outros (SKOOG *et al.*, 2005; HARRIS, 2010).

A precisão em validação de métodos pode ser expressa de três formas diferentes: precisão intermediária (ou reprodutibilidade interna ou reprodutibilidade intralaboratorial), reprodutibilidade e repetitividade (BRITO *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2003; ANVISA, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2008; MAPA, 2011b). A precisão intermediária é demonstrada pela variação entre resultados obtidos em dias diferentes pelo mesmo laboratório ou em um mesmo dia, enquanto a reprodutibilidade é avaliada em diferentes laboratórios, em diversas localidades do mundo, utilizando o mesmo conjunto de amostras, sendo que os dois tipos usam ensaios de recuperação (BRITO *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2003).

A repetitividade define a precisão dos resultados obtidos em medições sucessivas de uma mesma amostra (INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008), realizadas nas mesmas condições de medição, conhecidas como condições de repetitividade, que são efetuadas com o mesmo procedimento (INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004), dentro do mesmo laboratório, por um mesmo analista e com a mesma instrumentação (BRITO

et al., 2002; BRITO *et al.*, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008) sob mesmas condições e com repetições em curto espaço de tempo (BRITO *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Outro tipo de precisão é a instrumental, que não deve ser confundida com repetitividade, na qual são feitas injeções sequenciais repetidas da mesma amostra, normalmente 10 ou mais vezes, onde a média dos valores da área do pico ou altura do pico é usada para determinação da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) de todas as injeções (RIBANI *et al.*, 2004). A precisão é expressa quantitativamente através do desvio padrão (INMETRO, 2003; BRITO *et al.*, 2003) ou do DPR (INMETRO, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2008), onde o DPR é também conhecido como coeficiente de variação (CV) (BRITO *et al.*, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008). Quanto menor o CV mais preciso é um conjunto de medições (HARRIS, 2010).

O valor máximo aceitável para o CV irá depender da metodologia empregada, da concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método (ANVISA, 2003). Nos métodos de análise de traços ou impurezas são admissíveis CVs de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI *et al.*, 2004). Em análise de resíduos de agrotóxicos considera-se que o método é preciso quando os CVs possuem valores menores que 20% (BRITO *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2003), devido aos baixos níveis de concentração (BRITO *et al.*, 2002).

2.9.4 Exatidão

A exatidão constitui a chave para o propósito da validação (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2003), sendo a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico (BRITO *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2008) e correlaciona-se com o erro absoluto de uma medida (RIBEIRO *et al.*, 2008). Ela é definida como a proporção da quantidade do analito, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e susceptível de ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004). A precisão expressa o erro total incluindo erro sistemático (veracidade) e erro aleatório (repetibilidade e precisão intermediária) para cada nível de concentração (CHEVALLIER *et al.*, 2015).

A exatidão pode ser determinada através do cálculo do erro absoluto ou relativo (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2008). A

Conferência Internacional sobre Harmonização-ICH (1996) determina que devem ser feitos ensaios em triplicata para três níveis de concentração, onde a ANVISA também adotada esta recomendação (RIBANI *et al.*, 2004). As formas mais usadas para examinar a exatidão de um método são: materiais de referência certificados (MRCs) (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008; MAPA, 2011b), comparação do método proposto com um método de referência (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004), adição de padrão (RIBANI *et al.*, 2004; ELLISON; THOMPSON, 2008) e ensaios de recuperação (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Os MRCs são ferramentas valiosas para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para melhorar as medições e o controle de qualidade em laboratórios analíticos (TOLOSA; CASSI; HUERTAS, 2018). Eles são materiais de referência que possuem um certificado indicando o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada (RIBANI *et al.*, 2004). Quando disponíveis, os MRCs são os materiais de avaliação favoritos, por estarem rigorosamente associados com padrões internacionais (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2003) e por apresentarem características semelhantes às das amostras (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2001).

Os MRCs são disponibilizados por organismos reconhecidos e confiáveis, como: LGC (“*Laboratory of the Government Chemist*” - UK), NIST (“*National Institute of Standards and Technology*” - USA), USP, FAPAS (“*Food Analysis Performance Assessment Scheme*” - UK), etc. (RIBANI *et al.*, 2004). A análise com MRC é a opção preferencial para fornecer evidências do desempenho do método, mas MRCs com os níveis apropriados de analitos raramente estão disponíveis (SANTE, 2017). O alto custo dos MRCs e a abrangência limitada de matrizes e analitos restringem seu uso (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2003).

A exatidão também pode ser estabelecida através da comparação dos valores obtidos pelo método proposto com valores obtidos para as mesmas amostras com outro método validado (método com exatidão e precisão avaliadas) (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004), avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência (RIBANI *et al.*, 2004). Nem sempre se encontra método de referência preexistente, impossibilitando a utilização desse tipo de proposta (BRITO *et al.*, 2003).

A adição de padrão é usada quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem o analito, por exemplo, a análise de β -caroteno em amostras de mamão, nas quais este analito sempre estará presente (RIBANI *et al.*, 2004). A principal desvantagem desse método é o fato de ser altamente trabalhoso e consumir tempo (pessoal e aparato), já que vários acréscimos precisam ser feitos e, geralmente, o ajuste da concentração adicional é necessário durante a condução das análises, não sendo um método econômico (KRUIVE *et al.*, 2015). A adição de padrão não corrige o efeito de matriz "translacional", que ocorre quando a linha de base a partir da qual o sinal analítico deve ser medido é afetada pela matriz, também conhecido como um efeito de linha de base ou plano de fundo, sendo independente da concentração do analito e ocorrendo mesmo quando o analito está ausente (ELLISON; THOMPSON, 2008).

2.9.4.1 Ensaios de recuperação

O ensaio de recuperação figura como o método mais usado para validação de processos analíticos (BRITO *et al.*, 2003). As medições de recuperação são as mais comuns em virtude da dificuldade em da obtenção de MRCs (que, para certas aplicações, nem existem) (RIBANI *et al.*, 2004). De acordo com MAPA (2011) caso não haja MRC disponível, a determinação da recuperação deve ser feita por meio da matriz branca fortificada, e na falta de uma matriz branca pode-se usar uma amostra de ensaio com baixa concentração do analito. Segundo o MAPA (2011) não se deve confundir a recuperação com a eficiência de extração ou de digestão da amostra, pois a recuperação mede a tendência total do procedimento analítico e, portanto, é uma expressão de sua veracidade.

O objetivo da recuperação é corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos provenientes dos efeitos de extração ou digestão, bem como das perdas advindas de todas as etapas do trajeto analítico realizados até a leitura da resposta instrumental, como por exemplo, limpeza (*clean-up*), diluições ou pré-concentração, derivatizações, secagens, etc. (MAPA, 2011b). O erro sistemático ocorre pela perda do analito em razão da baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (entre outros) (BRITO *et al.*, 2003).

Na recuperação é realizada a "fortificação" da amostra, ou seja, adição de soluções com diferentes concentrações conhecidas do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (BRITO *et al.*, 2003). A concentração em que o analito é

adicionado na amostra controle é chamada de “nível de fortificação”, que depende do propósito do estudo a ser realizado (BRITO *et al.*, 2002). Para Ribani *et al.* (2004) a limitação do procedimento de recuperação é que o analito acrescentado não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra, podendo provocar, por exemplo, na presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione melhor detecção, resultando em avaliações excessivamente otimistas da recuperação.

Os ensaios de recuperação são expressos em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz em um determinado número de ensaios (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). A exatidão deve ser examinada em três níveis de concentração, alta, intermediária e baixa, e no mínimo com determinações em triplicata (RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008; ANVISA, 2003), uma vez que a eficiência do método varia em função da concentração do analito, onde na maioria das vezes, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração, podendo haver uma diferenciação substancial da recuperação a altas e baixas concentrações (RIBANI *et al.*, 2004).

Apesar dos intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estarem entre 70 e 120%, com DPR de até $\pm 20\%$ (BRITO *et al.*, 2002; ANVISA, 2003; BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; MAPA, 2011b; CERQUEIRA; CALDAS; PRIMEL, 2014; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017), dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2004; CERQUEIRA; CALDAS; PRIMEL, 2014). Um intervalo padrão prático de 60-140% pode ser usado para recuperações individuais na análise de rotina (MAPA, 2011b; SANTE, 2017; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; ZOCCALI *et al.*, 2017).

2.9.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, em uma amostra em determinadas condições experimentais (BRITO *et al.*, 2003; ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito, que pode ser medida na amostra conforme condições experimentais estipuladas (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). O LD e o LQ podem ser calculados através de três formas diferentes: método visual,

método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

No método visual o LD é estipulado utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre sinal analítico e ruído pela visualização da menor concentração visível (detectável), onde este procedimento também pode ser realizado por meio do instrumento utilizando parâmetros de detecção no método de integração, enquanto para o LQ considera-se a menor concentração visível (quantificável) (RIBANI *et al.*, 2004).

O método da relação sinal-ruído somente pode ser aplicado em metodologias analíticas que mostram o ruído da linha de base, onde é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do analito na matriz e a matriz isenta do analito (branco), para que possa ser estabelecida uma concentração mínima na qual o analito pode ser facilmente detectado (LD) ou quantificado (LQ) (RIBANI *et al.*, 2004). O LD é equivalente a concentração do analito que produz relação sinal/ruído igual a 3 (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004), já o LQ a relação sinal/ruído equivale a 10 (RIBANI *et al.*, 2004).

No método baseado nos parâmetros da curva analítica é usada a curva na matriz (RIBANI *et al.*, 2004), onde no cálculo do LD ou LQ é usada a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica e a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação (RIBANI *et al.*, 2004), outra forma, é o uso do desvio padrão da amostra que apresenta resultado de menor quantidade do analito (ANVISA 2003; HUBER, 2003; SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011). Este método proporciona melhores resultados ao nível de traços, e quando o branco não gera sinal, pode-se adotar para o valor de “s” o desvio padrão do menor nível da curva analítica (INMETRO, 2017).

Tanto o LD quanto o LQ podem sofrer alterações devido às condições cromatográficas, sendo que picos maiores acabam por aumentar a relação sinal-ruído, originando resultados de LD e LQ mais baixos. Assim, a melhor forma para resolver o problema do cálculo do LD e LQ é usar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, pois ele é estatisticamente mais confiável, sendo que a concentração correspondente ao LQ deve estar contida na curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho, os experimentos realizados foram executados no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em parceria com o Laboratório de Análises de Traços (LAT) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.1 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- ✓ Acetonitrila (ACN) 99,9% grau UV/HPLC/Espectroscópico (TEDIA);
- ✓ n-hexano 97% grau UV/HPLC/Espectroscópico (VETEC);
- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q UV3[®] (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Amina primária secundária (PSA) com tamanho de partículas de 40 μm (Sigma Aldrich, 50 g);
- ✓ Negro de carbono grafitizado (GCB) (Sigma Aldrich, 50 g);
- ✓ Citrato de sódio tribásico P. A. (Vetec, 500 g);
- ✓ Sulfato de magnésio anidro P. A. (Vetec, 500 g);
- ✓ Cloreto de Sódio (NaCl) P. A. (Sigma Aldrich, 500 g);
- ✓ Hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado 99% P. A. (Sigma Aldrich, 50 g);
- ✓ Detergente faixa neutra (pH 6,5 a 7,5);
- ✓ Frascos de vidro (vial) com capacidade de 2 mL;
- ✓ Gás hélio (He): usado como fase móvel (99,99%);
- ✓ Mix padrão analítico de 6 agrotóxicos OFs (clorpirifós, diclorvós, dissulfotom, etoprofós, fenclorfós e protiofós) $2,0 \times 10^6 \mu\text{g.L}^{-1}$ em *n*-hexano:acetona (9:1) (Sigma-Aldrich);
- ✓ Tubos para centrífuga, tipo Falcon, capacidades 15 e 50 mL de fundo cônico, em plástico polipropileno;
 - ✓ Tubos de *ependorf*;
 - ✓ Pipeta graduada, juntamente com pêra;
 - ✓ Becker;
 - ✓ Espátula;
 - ✓ Micropipeta automática.

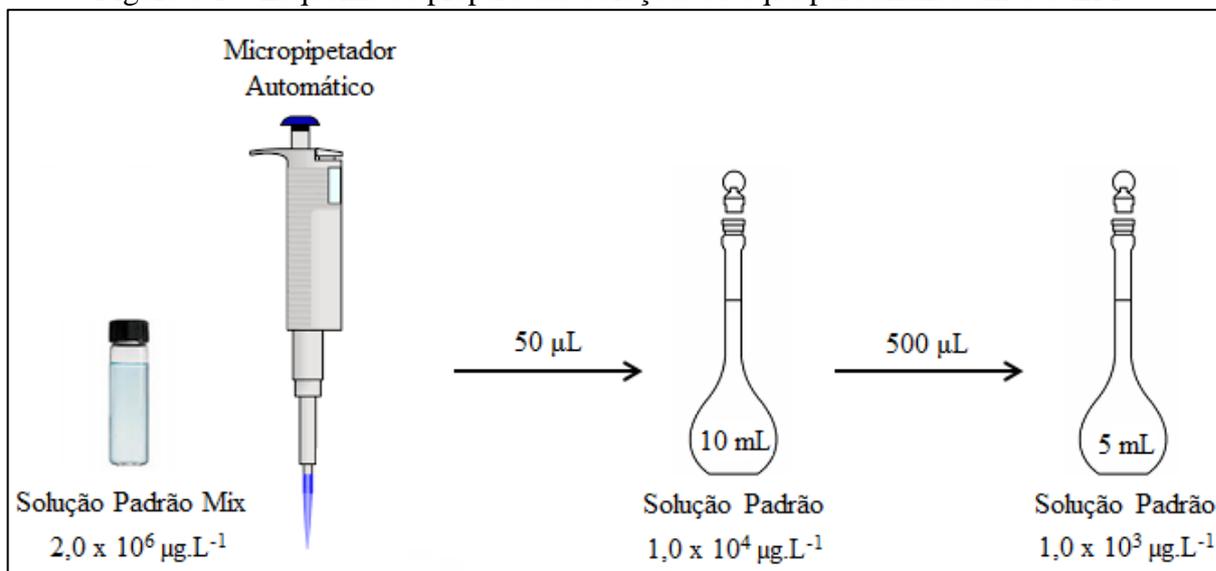
3.2 Limpeza das vidrarias

Para lavagem das vidrarias, foram utilizados detergente faixa neutra (pH 6,5 a 7,5), água destilada e água ultra purificada em sistema Milli-Q. No processo de secagem das vidrarias foi adotada a exposição das mesmas ao ar livre.

3.3 Preparo das soluções estoque para análise em CG-EM

A partir da solução padrão mix dos OFs ($2,0 \times 10^6 \mu\text{g.L}^{-1}$) foi preparada a solução padrão estoque dos agrotóxicos. Inicialmente, transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL um volume de 50 μL da solução padrão mix e aferiu-se volume o final com *n*-hexano, com a finalidade de obter uma solução de $1,0 \times 10^4 \mu\text{g.L}^{-1}$. Em seguida, transferiu-se para um balão volumétrico de 5 mL, um volume de 500 μL da solução de $1,0 \times 10^4 \mu\text{g.L}^{-1}$ e aferiu-se o volume final com *n*-hexano, obtendo-se uma solução padrão estoque de trabalho de concentração igual a $1,0 \times 10^3 \mu\text{g.L}^{-1}$. As transferências dos volumes para os balões volumétricos foram realizados com o auxílio de micropipetador automático. O esquema deste procedimento pode ser visualizado através da Figura 3.1.

Figura 3.1 – Esquema do preparo das soluções estoque para análise em CG-EM.



Fonte: Autor (2018).

3.4 Preparo das soluções padrão e obtenção das curvas analíticas

Com o intuito de posterior verificação de possíveis componentes da amostra que possam interferir positivamente ou negativamente no sinal referente aos agrotóxicos analisados no estudo, foram construídas curvas de calibração no solvente e na matriz. Em decorrência das diferentes sensibilidades dos analitos em estudo, optou-se por trabalhar em uma ampla faixa de concentração, utilizando soluções padrão desde 0,015 a 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, totalizando-se 11 pontos. As soluções padrão preparadas para o estudo foram de 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

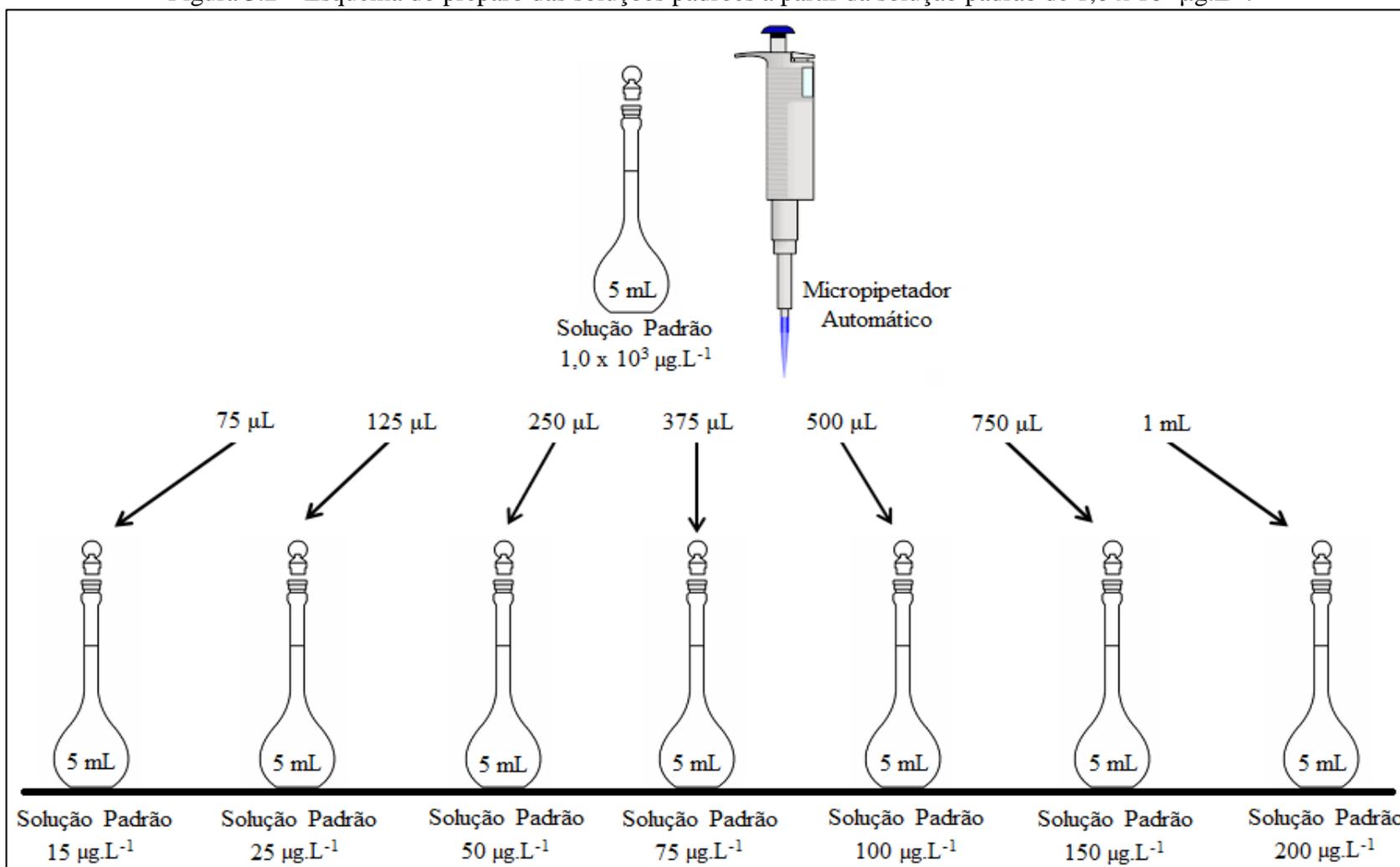
3.4.1 Curva analítica no solvente

A Figura 3.2 mostra o esquema de preparo das soluções padrões de 15 a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para construção da curva analítica no solvente através de transferências de alíquotas da solução estoque de $1,0 \times 10^3 \mu\text{g.L}^{-1}$, preparada de acordo com o item 4.3. Já a Figura 3.3, apresenta o preparo dos padrões de concentrações mais elevadas (250 a 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$) a partir da solução de $1,0 \times 10^4 \mu\text{g.L}^{-1}$ (item 4.3). Os padrões foram injetados no CG-EM em triplicatas.

3.4.2 Curva analítica na matriz

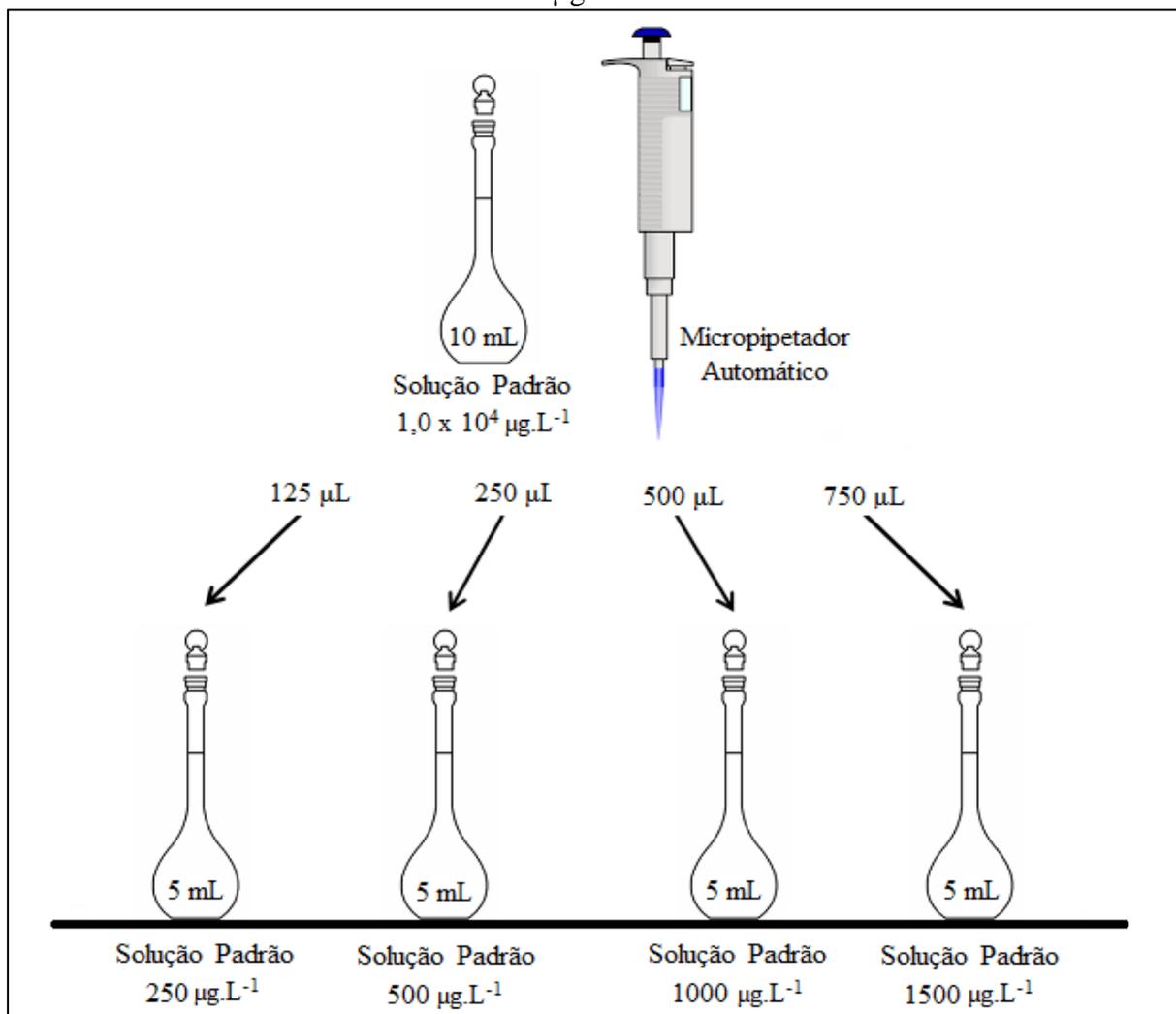
3.4.2.1 Procedimento de extração e limpeza pelo método QuEChERS-citrato

Para Prestes *et al.* (2009) uma das possibilidades de se obter amostras sólidas homogêneas é através do corte das amostras em pedaços menores seguido de processamento em homogeneizadores. Assim, a amostra de pimentão orgânico, incluindo as sementes, foi previamente triturada, com o auxílio de um processador doméstico (liquidificador caseiro) como mostra a Figura 3.4, e armazenada em um recipiente de vidro previamente limpo de acordo com o item 3.2.

Figura 3.2 – Esquema do preparo das soluções padrões a partir da solução padrão de $1,0 \times 10^3 \mu\text{g.L}^{-1}$.

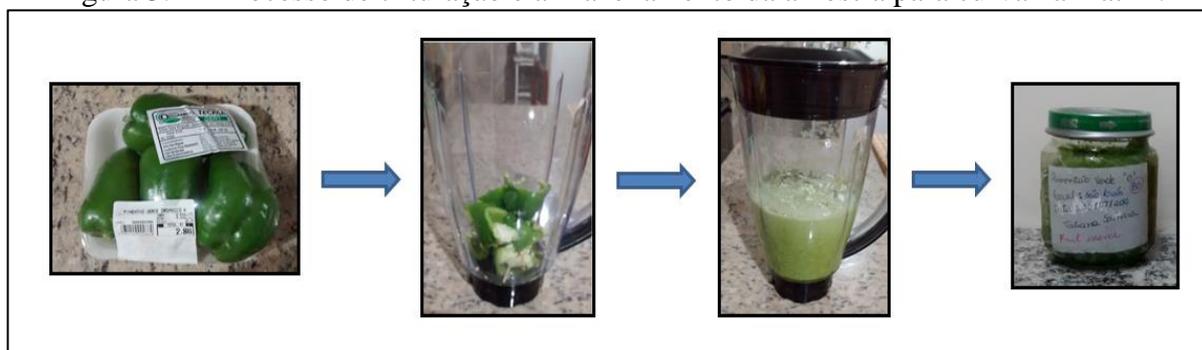
Fonte: Autor (2018).

Figura 3.3 – Esquema do preparo das soluções padrões a partir da solução padrão de $1,0 \times 10^4 \mu\text{g.L}^{-1}$.



Fonte: Autor (2018).

Figura 3.4 – Processo de trituração e armazenamento da amostra para curva na matriz.



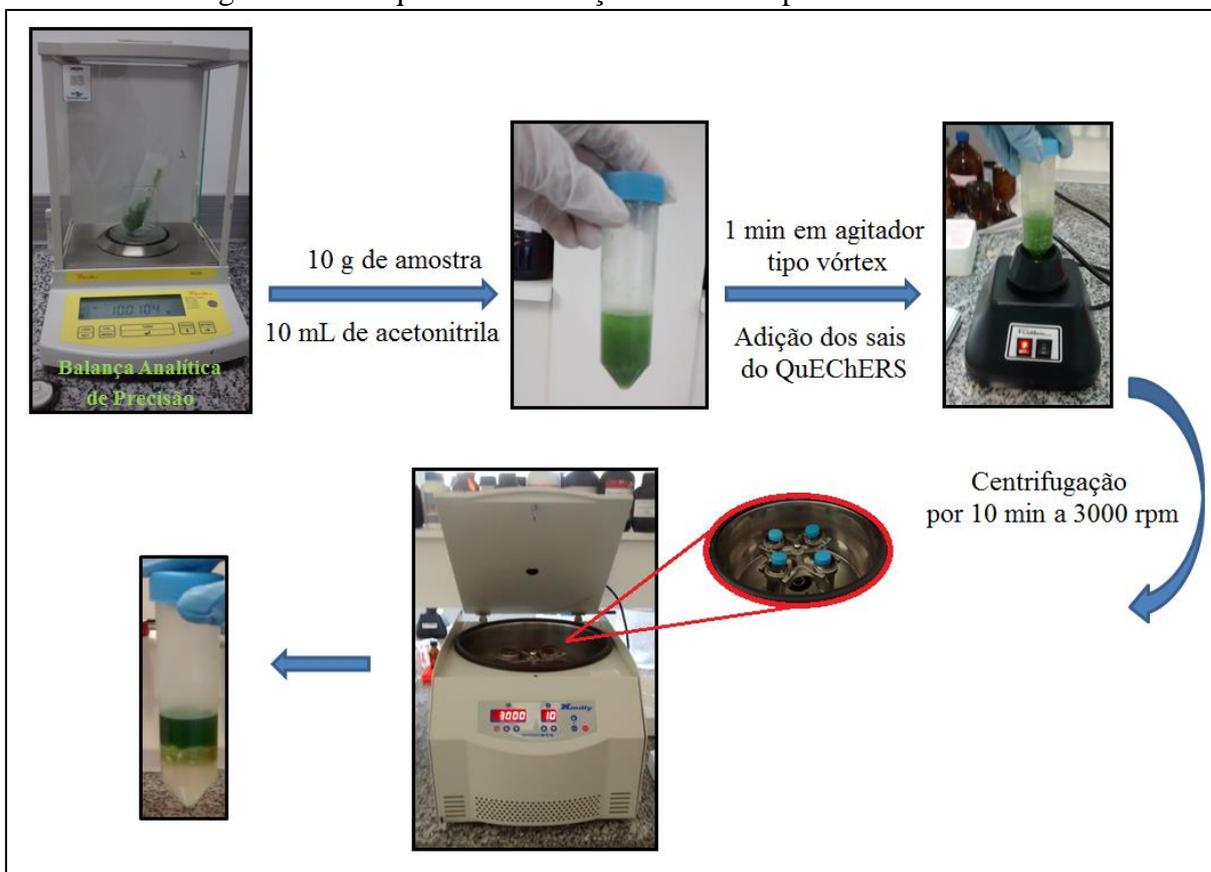
Fonte: Autor (2018).

O método QuEChERS-citrato, oficialmente designado [CEN, Método Padrão UNE-EN 15662] (CEN2008) (OSHITA; JARDIM, 2012; CERQUEIRA; CALDAS;

PRIMEL, 2014; RESTREPO *et al.*, 2014; COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014; GÓMEZ-ALMENAR; GARCÍA-MESA, 2015; GOLGE; KABAK, 2015a; GOLGE; KABAK, 2015b; HE *et al.*, 2015; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016; ZOCCALI *et al.*, 2017; WU, 2017), foi utilizado como procedimento de preparo da amostra por ser bastante eficiente na extração de agrotóxicos em matrizes vegetais.

A Figura 3.5 esquematiza o processo de obtenção do extrato primário para construção da curva na matriz, onde foram pesados 10 g de amostra em um tubo Falcon com capacidade de 50 mL e em seguida adicionou-se 10 mL de ACN (grau cromatográfico) de acordo com a proporção descrita pelo método (1,0 mL de ACN para 1,0 g de amostra), seguida de agitação por 1 minuto em agitador vórtex. Após a agitação, adicionou-se a mistura de sais denominada QuEChERS (4,0 g de sulfato de magnésio anidro; 1,0 g de cloreto de sódio; 1,0 g de citrato de sódio tribásico e 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado), este processo foi realizado lentamente, sendo que à medida que a adição era realizada procedia-se com a agitação em vórtex, evitando assim, que houvesse a formação de nódulos. Em seguida centrifugou-se por 10 minutos a 3000 rpm (rotação por minuto).

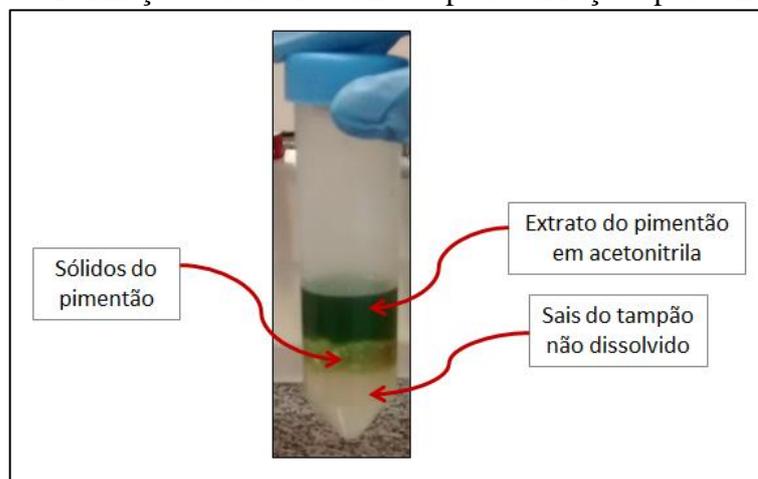
Figura 3.5 – Esquema da obtenção do extrato primário da matriz.



Fonte: Autor (2018).

A centrifugação foi usada com o intuito de separar completamente a fase trifásica, como pode ser vista na Figura 3.6.

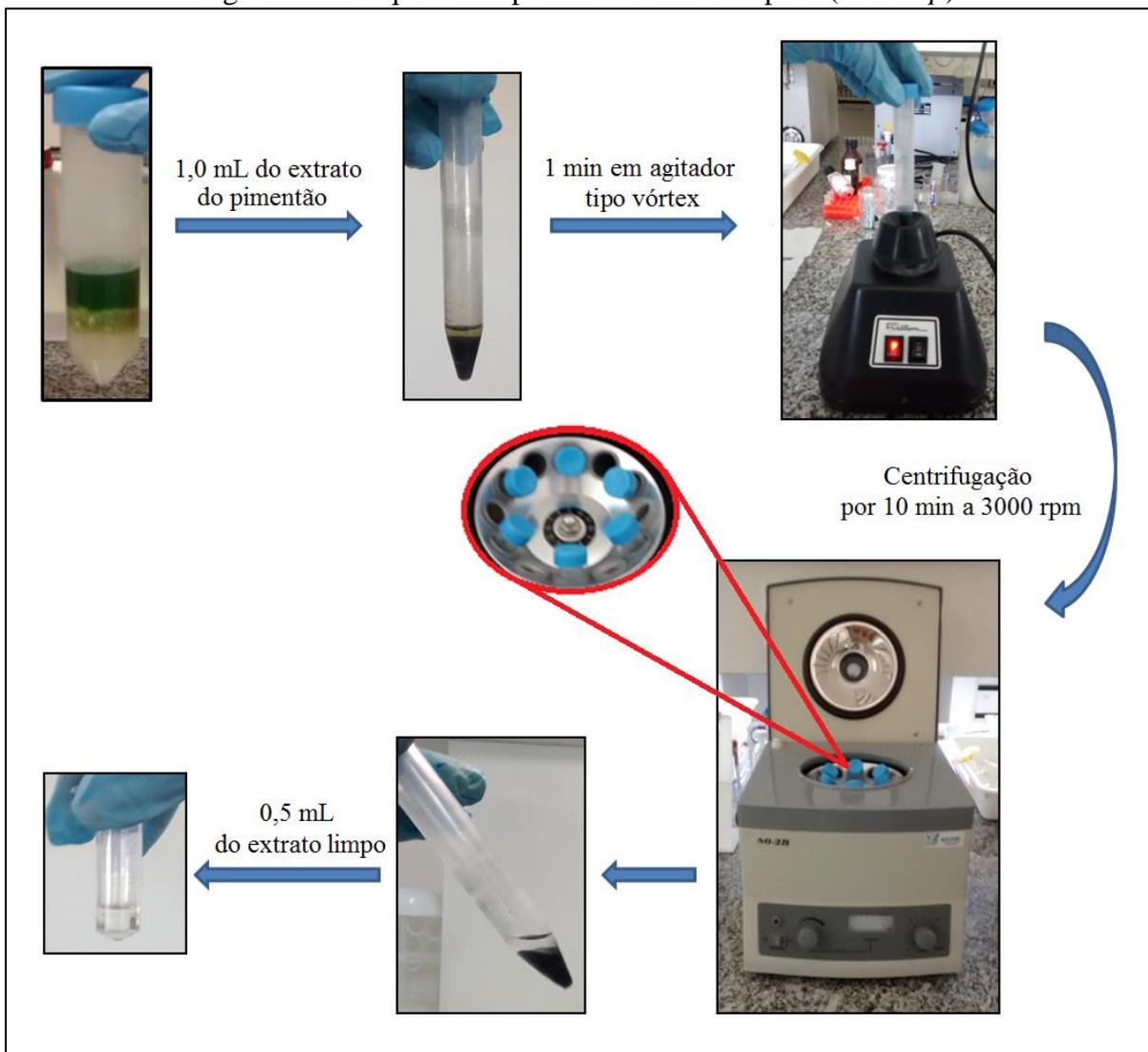
Figura 3.6 – Formação das três fases na etapa de extração após centrifugação.



Fonte: Autor (2018).

A Figura 3.7 mostra o procedimento de limpeza do extrato (*clean-up*), efetuado logo após a etapa de extração, onde uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para um tubo Falcon de capacidade de 15 mL, o qual continha 150 mg de $MgSO_4$ anidro, 150 mg de PSA e 50 mg de GCB. Para promover a dispersão dos adsorventes no extrato primário da matriz foi realizada uma agitação por 1 min, em seguida centrifugou-se por 10 minutos a 3000 rpm (rotação por minuto), onde 0,5 mL do extrato foi transferido para um tubo de *eppendorf*.

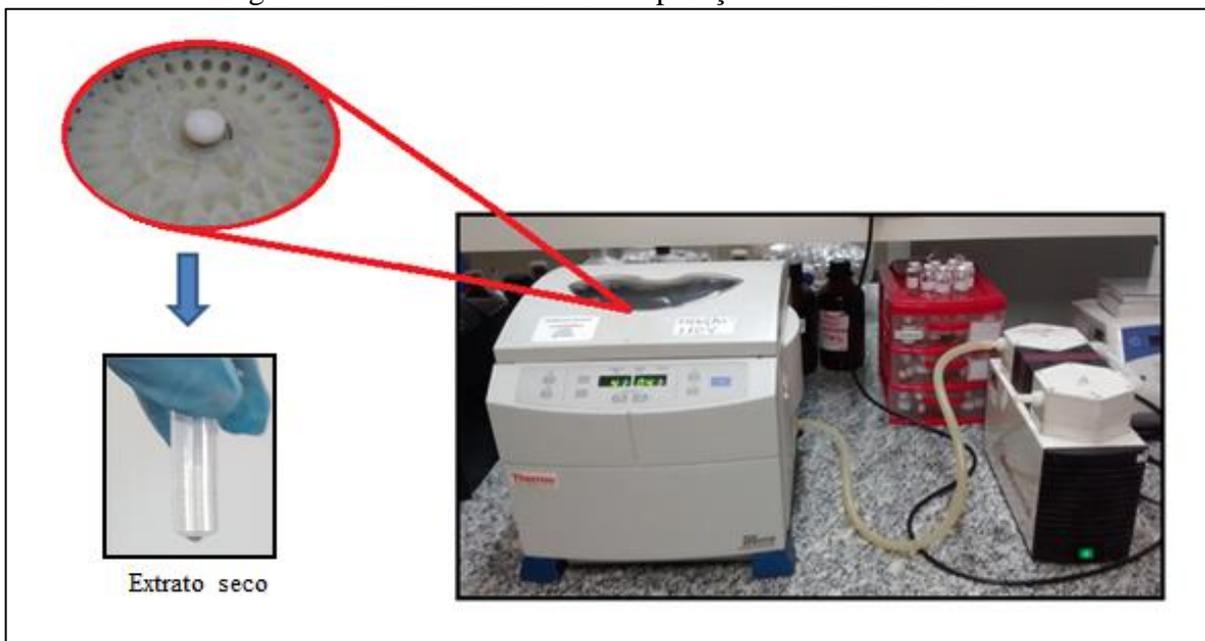
No entanto, o extrato final apresenta-se em ACN, que não é adequada para análise em cromatografia a gás no modo *splitless*, decorrência de seu grande volume de expansão durante a vaporização (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004; LEHOTAY; MÁSTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005; PRESTES *et al.*, 2009; HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008; BASTOS *et al.*, 2012; GUEDES *et al.*, 2016), o que pode vir a interferir nos detectores seletivos e favorecer a degradação de alguns agrotóxicos (LEHOTAY; MÁSTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005; HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008; BASTOS *et al.*, 2012), bem como sobrecarregar o liner (HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008). Por isso, após o processo de *clean-up*, extrato foi evaporado e o solvente substituído, por *n*-hexano (soluções padrões), mais adequado à CG (PRESTES *et al.*, 2009; BASTOS *et al.*, 2012), através de uma etapa de ressuspensão, e também com a finalidade de manter o extrato final mais parecido com a soluções padrões.

Figura 3.7 – Esquema do procedimento de limpeza (*clean-up*).

Fonte: Autor (2018).

A Figura 3.8 mostra a centrífuga a vácuo modelo SpeedVac (Marc & Therc) utilizada para o procedimento de evaporação de 0,5 mL do extrato que foi transferido para um tubo de *ependorf* depois da limpeza. O extrato permaneceu 1 h e 20 min à temperatura de 40 °C. A Figura 3.8 mostra a centrífuga a vácuo modelo SpeedVac (Marc & Therc) utilizada para o procedimento de evaporação de 0,5 mL do extrato que foi transferido para um tubo de *ependorf* depois da limpeza. O extrato permaneceu 1h e 20min à temperatura de 40 °C.

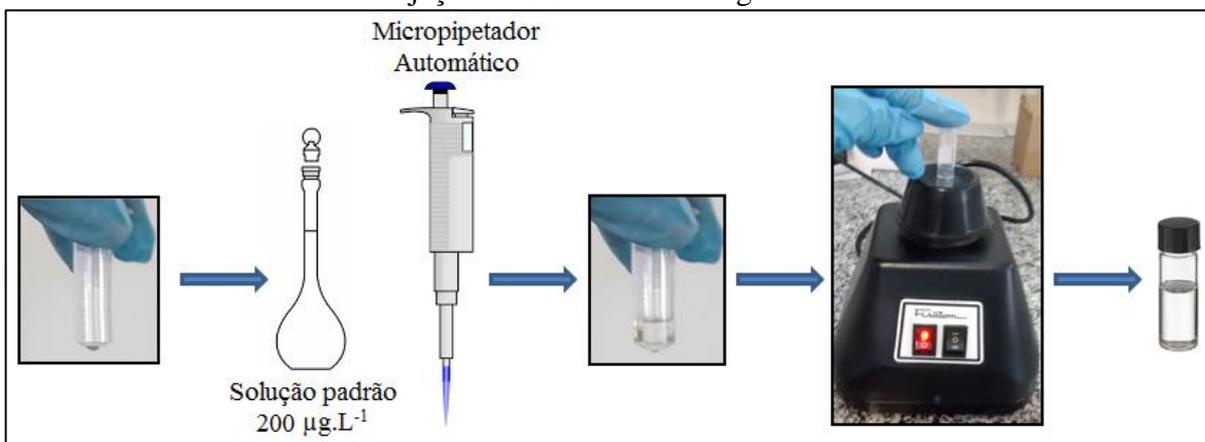
Figura 3.8 – Procedimento de evaporação do solvente ACN.



Fonte: Autor (2018).

Em seguida, como apresentado na Figura 3.9, foi realizada a adição de 0,5 mL de cada uma das 11 soluções padrões preparadas anteriormente, agitada no vórtex durante 1 min e transferida para um vial para posterior injeção no sistema cromatográfico. O procedimento da Figura 3.9 foi realizado em 11 *ependorfs*, com o intuito de preparar 11 níveis de concentração dos agrotóxicos na matriz do pimentão. As amostras foram injetadas no CG-EM em triplicatas.

Figura 3.9 – Procedimento de ressuspensão para obtenção do extrato de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ para injeção no sistema cromatográfico.



Fonte: Autor (2018).

3.4.2.2 Efeito matriz

É importante que os efeitos da matriz sejam investigados e gerenciados durante a validação e implementação de um método, pois podem levar a medições imprecisas de compostos alvo (PANUWET *et al.*, 2016). Para avaliar a existência do efeito matriz no extrato de pimentão nas análises por CG-EM foram construídas as curvas de calibração no solvente e na matriz. O cálculo do efeito matriz foi realizado através da equação (3.1), mediante comparação dos coeficientes angulares obtidos pelas duas curvas de calibração (MAPA, 2011b; ARIAS *et al.*, 2014; PIZZUTTI *et al.*, 2016; GUEDES *et al.*, 2016; GIACINTI *et al.*, 2016; GIACINTI *et al.*, 2017; ZOCCALI *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018):

$$(\%) \text{ efeito matriz} = \frac{(b_m - b_s) \times 100}{b_s} \quad (3.1)$$

Onde:

b_m = coeficiente angular da curva na matriz;

b_s = coeficiente angular da curva no solvente.

3.5 Condições cromatográficas

O método cromatográfico foi desenvolvido no sistema CG (modelo HP7890B, Agilent) acoplado a um Espectrômetro de Massa quadrupolo (5977A, Agilent). A Figura 3.10 mostra o equipamento utilizado no estudo. O gás de arraste usado foi o gás hélio (99,99%) na vazão de 1,0 mL.min⁻¹, coluna capilar HP5-S da Agilent com dimensões de 30 m x 0,25 mm d.i. (diâmetro interno) e 0,25 µm de espessura de filme da fase estacionária com composição 5% fenil e 95% polidimetilsiloxano (não polar). O injetor operou no modo *splitless* (sem divisão de fluxo) e o espectrômetro de massa no modo de ionização por impacto de elétrons (IE) a 70 eV, com fonte de íons a 240 °C e temperatura da linha de transferência de 240°C.

Foram realizados três testes para atingir uma programação mais adequada, com o intuito de obter a separação ideal dos picos dos agrotóxicos em estudo, onde primeiro foi injetado 1,0 µL da solução padrão de 1,0 x 10³ µg.L⁻¹ com a Temperatura do Injetor (TI) mantida a 170 °C, depois foi injetado 3,0 µL da solução padrão de 1,0 x 10³ µg.L⁻¹ com a Temperatura do Injetor (TI) mantida a 240 °C, e por último foi injetado 5,0 µL da solução

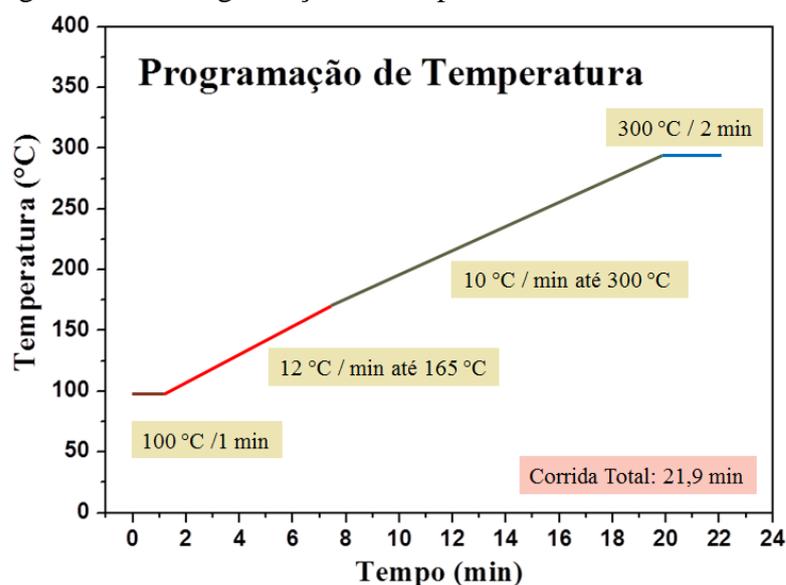
padrão de $1,0 \times 10^3 \mu\text{g.L}^{-1}$ com a Temperatura do Injetor (TI) mantida a $240 \text{ }^\circ\text{C}$. A programação de temperatura foi: temperatura inicial de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 min, seguindo com aquecimento de $12 \text{ }^\circ\text{C/min}$ até $165 \text{ }^\circ\text{C}$, aumentando-se a temperatura com aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ até $300 \text{ }^\circ\text{C}$ permanecendo por 2 min., equivalente a um tempo de corrida de 21,9 minutos, como mostra a Figura 3.11. Essas condições foram escolhidas de acordo com o estudo de Lu *et al.* (2013) e Alcântara *et al.* (2018).

Figura 3.10 – CG-EM utilizado no estudo (EMBRAPA - Fortaleza).



Fonte: Autor (2018) – 21/06/2016.

Figura 3.11 – Programação de temperatura utilizado no estudo.



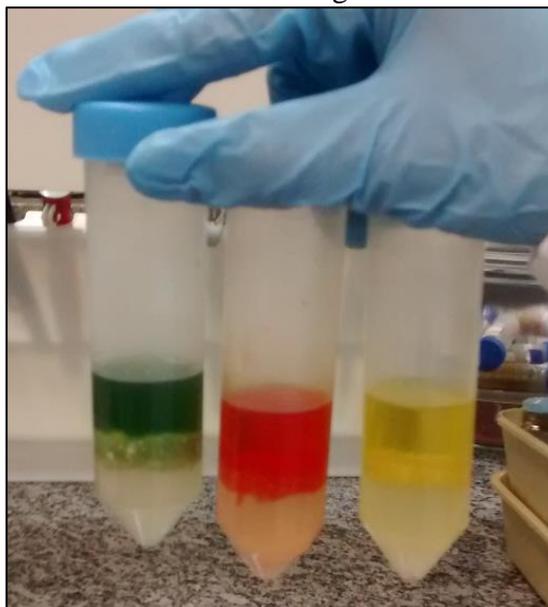
Fonte: Autor (2018).

3.6 Amostragem

Com o intuito de realizar uma análise qualitativa e quantitativa dos agrotóxicos em estudo, foram comprados aleatoriamente pimentões orgânicos (verdes - comercialmente mais comuns) e não orgânicos (três cores diferentes: vermelho, amarelo e verde) na cidade de Fortaleza-CE. Das amostras coletadas, 18 eram não orgânicas (6 verdes, 6 vermelhos e 6 amarelos) e 7 orgânicas (verdes – comercialmente mais comuns). O Quadro 3.1 mostra os pontos de coleta das amostras analisadas.

A Figura 3.12 apresenta os três tipos de pimentão não orgânicos (verde, vermelho e amarelo) após a etapa de extração, seguida pela centrifugação para as amostras, mostrando a separação completa da fase trifásica.

Figura 3.12 – Formação das três fases na etapa de extração após centrifugação para as amostras não orgânicas.



Fonte: Autor (2018).

Quadro 3.1 – Pontos de coleta das amostras analisadas.

Amostras						
Não orgânica			Orgânica			
Local	Bairro	Data de coleta	Local	Bairro	Data de coleta	Selo
NP1	Parquelândia	09/06/2016	OP1	Parquelândia	05/08/2016	TECPAR CERT
NP2	Centro	09/06/2016	OP2	Centro	23/08/2016	Fruit Essence
NP3	Aldeota	22/06/2016	OP3	Joaquim Távora	23/08/2016	TECPAR CERT
NP4	Água Fria	09/06/2016	OP4 e OP5	Dionísio Torres	03/08/2016	-
NP5	Joaquim Távora	09/06/2016	OP6	Cidade dos Funcionários	08/03/2016	TECPAR CERT
NP6	Dionísio Torres	22/06/2016	OP7	Cambeba	02/08/2016	-

Fonte: Autor (2018).

NP1: não orgânica ponto 1, OP1: orgânica ponto 1, (-) não possui marca, são lojas específicas de produtos orgânicos.

3.7 Parâmetros de validação do método CG-EM

A validação do método analítico compreendeu o estudo dos parâmetros de: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), de acordo com as recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e contaminantes em alimentos (MAPA, 2011b). Para este estudo foi usada uma amostra orgânica de pimentão adquirida no supermercado São Luíz na Avenida Oliveira Paiva, Cidade dos Funcionários da marca TECPAR CERT.

3.7.1 Seletividade

A análise foi realizada através do cromatograma de íons totais (CIT) no modo Scan, monitorando uma ampla gama de íons (40 – 400 m/z). Através do cromatograma de íons extraídos (CIE), foram selecionados os principais fragmentos do espectro de massa de cada analito (um de quantificação e dois de confirmação) para obter o cromatograma apenas do composto de interesse, melhorando a sensibilidade e seletividade. Além disso, observou-se a similaridade do espectro de massa de cada composto com o espectro do padrão presente na biblioteca do programa Agilent MassHunter Qualitative Analysis.

3.7.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de correlação R obtido da regressão linear dos coeficientes da curva de calibração na matriz (ANVISA, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2017), que haviam sido preparadas conforme subitem 3.4.1 e 3.4.2, respectivamente. Com o intuito de um bom ajuste linear da faixa de concentração analisada considerou-se a aproximação do coeficiente de correlação com 1 (um). Também foram feitos testes estatísticos para conferir a significância da regressão linear e dos parâmetros de calibração da curva escolhida para quantificação dos analitos nas amostras reais (GOMES *et al.*, 2017; BARBOSA *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018). Os testes foram realizados através de cálculos estatísticos do desvio padrão dos valores do coeficiente angular (a) e linear (b), e dos desvios verticais (no eixo y) segundo as equações

(3.2), (3.3) e (3.4), respectivamente (SKOOG *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018):

$$s_a^2 = \frac{s_y^2 n}{D} \quad (3.2)$$

$$s_b^2 = \frac{s_y^2 \sum(x_i^2)}{yD} \quad (3.3)$$

$$s_y^2 = \frac{\sum(d_i^2)}{n - 2} \quad (3.4)$$

Onde:

s_a = Desvio padrão do coeficiente angular;

s_b = Desvio padrão do coeficiente linear;

s_y = Desvio padrão no eixo y;

x_i = Valores individuais de x;

n = número total de pontos da curva;

d_i = Desvio vertical de cada ponto;

D = Determinante dada da seguinte forma:

$$\begin{vmatrix} \sum(x_i^2) & \sum x_i \\ \sum x_i & n \end{vmatrix}$$

Após obtenção dos valores de S_a , S_b e S_y , utilizou-se o teste- t para os parâmetros de calibração e o F -teste para a análise de regressão linear, através das equações (3.5) e (3.6) (SKOOG *et al.*, 2005, GOMES *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018), onde o F -teste foi calculado usando a ferramenta PROJ.LIN do Microsof Excel® (SKOOG *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018):

$$t_{\text{calc},a} = \frac{a - \alpha}{s_a} \quad (3.5)$$

$$t_{\text{calc},b} = \frac{b - \beta}{s_b} \quad (3.6)$$

Onde:

$t_{\text{calc},a}$ = valor de t calculado para o coeficiente angular;

$\alpha = 1$ (é o coeficiente angular teórico);

$t_{\text{calc},b}$ = valor de t calculado para o coeficiente linear;

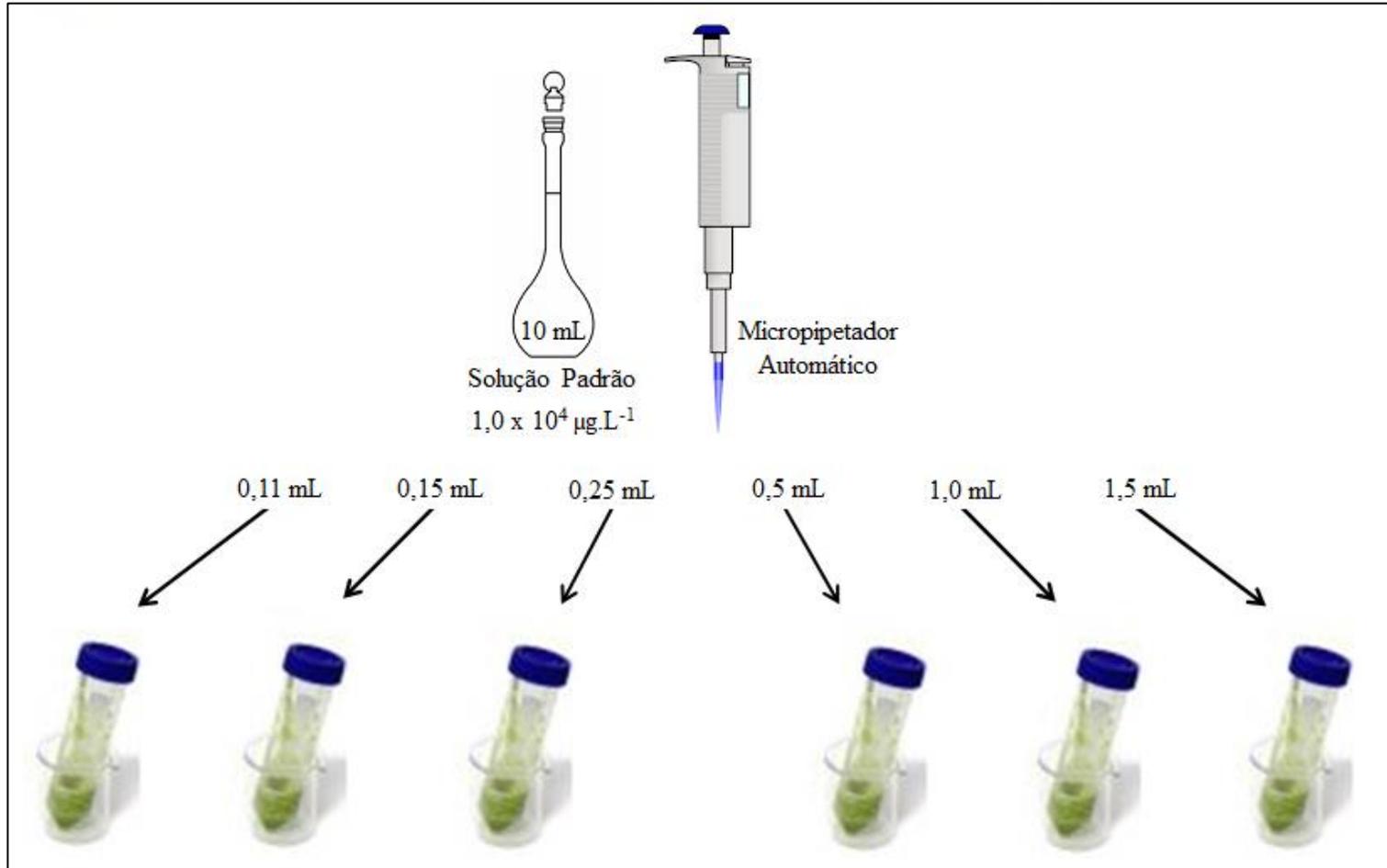
$\beta = 0$ (é o coeficiente linear teórico).

Para avaliar a significância estatística dos parâmetros de regressão a e b , modelos obtidos experimentalmente para as curvas de calibração, é preciso compará-los com valores teoricamente esperados, com $\alpha = 1$ e $\beta = 0$ (BRITO *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2017). O parâmetro é significativo e deve ser mantido na equação da reta se $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$ com um nível de confiança de 95%, mas se $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, o parâmetro de calibração não é significativo devendo ser excluído (SKOOG *et al.*, 2005, BARBOSA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018). Da mesma forma, se $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ para 95% de confiança, a regressão linear é significativa, caso contrário, se $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, não existe relação linear entre os eixos x e y , mesmo com um bom valor de R (SKOOG *et al.*, 2005, BARBOSA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018).

3.7.3 Exatidão

Os estudos de exatidão foram executados por meio de ensaios de recuperação realizados com triplicata biológica em seis níveis de fortificação da amostra orgânica de pimentão (ANVISA, 2003), cujas injeções no CG-EM foram em duplicata para cada triplicata. Os níveis de fortificação foram de 110, 150, 250, 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. O modo de preparo das amostras para recuperação seguiu o mesmo procedimento do item 4.4.2, a diferença foi que aos 10 g de amostra foram adicionados quantidades adequadas da solução padrão $1,0 \times 10^4 \mu\text{g.L}^{-1}$ para fazer a fortificação juntamente com a ACN. A Figura 3.13 mostra a parte que foi modificada, onde posteriormente acrescentou-se um volume de ACN até completar 10 mL, correspondendo a 9,89, 9,85, 9,75, 9,5, 9,0 e 8,5 mL.

Figura 3.13 – Adição da solução padrão $1,0 \times 10^4 \mu\text{g.L}^{-1}$ para recuperação.



Fonte: Autor (2018).

Para o cálculo da porcentagem (%) recuperada utilizou-se a equação (3.7) (BRITO *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2003; MAPA, 2011b; CUI *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2017; ALCÂNTARA *et al.*, 2018), usada quando a recuperação é obtida a partir de fortificações de matriz branca (MAPA, 2011b; ALCÂNTARA *et al.*, 2018):

$$(\%) \text{Recuperação} = \frac{(C_f - C_i) \times 100}{C_a} \quad (3.7)$$

Onde:

C_f = Concentração do analito na amostra contaminada intencionalmente;

C_i = Concentração do analito na amostra não contaminada intencionalmente;

C_a = Concentração adicionada.

3.7.4 Precisão

A precisão foi efetuada pelo método da repetitividade: mesmo analista, mesmo equipamento e num mesmo dia, realizando 10 injeções da solução padrão de $1,0 \times 10^3 \mu\text{g.L}^{-1}$ no sistema cromatográfico (ALCÂNTARA *et al.*, 2018). Posteriormente, o CV para cada analito foi calculado através das áreas obtidas (RIBANI *et al.*, 2004; ALCÂNTARA *et al.*, 2018), utilizando a equação (3.8) (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008; ALCÂNTARA *et al.*, 2018):

$$(\%) \text{CV} = \frac{S}{M} \times 100 \quad (3.8)$$

Onde:

S = desvio-padrão das várias medidas;

M = média das várias medidas.

3.7.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram estimados usando a curva na matriz através do método baseado no desvio padrão de uma amostra com

concentração mais baixa do analito (ANVISA, 2003; HUBER, 2003; SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011), como mostram as equações (3.9) e (3.10):

$$LD = \frac{3.3 \times S_n}{m} \quad (3.9)$$

$$LQ = \frac{10 \times S_n}{m} \quad (3.10)$$

Onde:

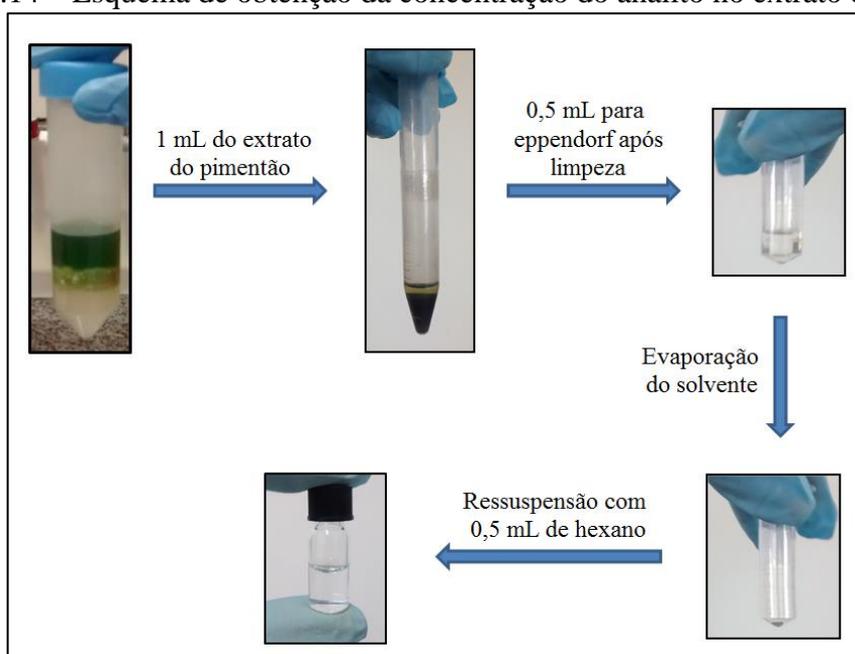
S_n = desvio padrão da amostra que apresentou resultado de menor quantidade do analito;

m = coeficiente angular da curva de calibração.

3.8 Conversão da relação massa/volume ($\mu\text{g.L}^{-1}$) para relação massa/massa (mg.kg^{-1})

Depois da obtenção dos resultados a partir da curva de calibração, é preciso fazer uma padronização para que fiquem de acordo com unidades estabelecidas pelas legislações. Como demonstrado na Figura 3.14, durante o procedimento do método QuEChERS, o resíduo é ressuspensão com o mesmo volume que foi evaporado. Assim, a concentração do analito adquirida após tratamento dos dados através da curva calibração é aquela do extrato primário.

Figura 3.14 – Esquema de obtenção da concentração do analito no extrato em $\mu\text{g.L}^{-1}$.



Fonte: Autor (2018).

Com a concentração do analito no extrato primário em $\mu\text{g.L}^{-1}$ e aplicando a equação (3.11), é possível obter a concentração estimada do analito no pimentão em mg.kg^{-1} (ALCÂNTARA *et al.*, 2018).

$$C_F = \frac{C_{\text{ext}}(\mu\text{g L}^{-1}) \times V (\text{L})}{m_a(\text{Kg}) \times 1000} [\text{mg Kg}^{-1}] \quad (3.11)$$

Onde:

C_F = Concentração do analito na amostra (mg/Kg);

C_{ext} = Concentração do analito no extrato em $\mu\text{g.L}^{-1}$;

V = Volume do extrato em litros (10 mL do extrato primário = 0,01 L);

m_a = Massa de amostra pesada (cerca de 0,01 kg);

1000 = Fator de conversão de ' μg ' para ' mg '.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise cromatográfica por CG-EM

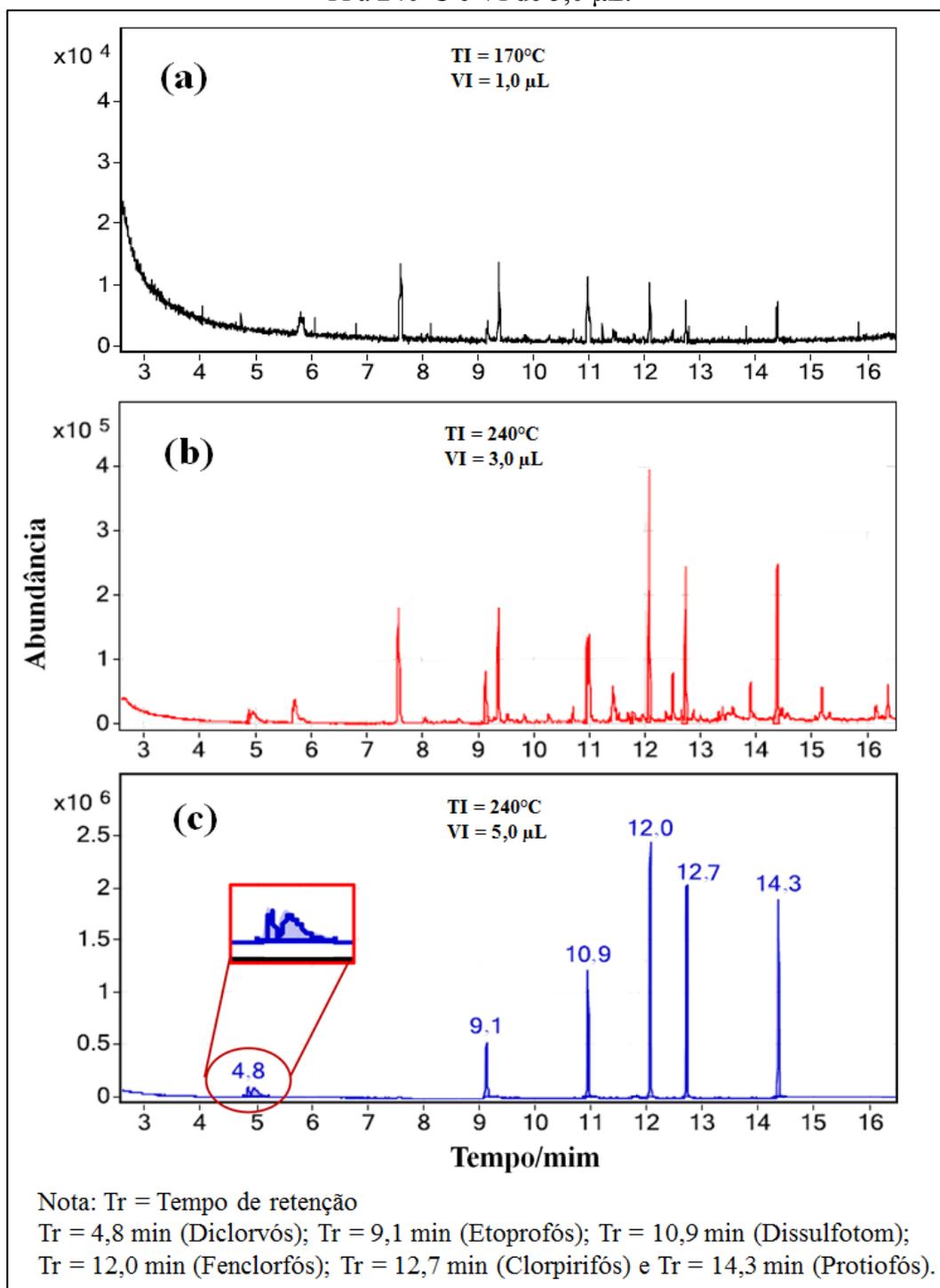
A injeção no modo *splitless* (sem divisão de fluxo), foi utilizada por ser mais indicada para a determinação de compostos em concentração de níveis traço (HARRIS, 2001; SKOOG *et al.*, 2005; HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008; HARRIS, 2010; BAI *et al.*, 2017), que representa concentrações abaixo de 0,01 % na amostra (SKOOG *et al.*, 2005; HARRIS, 2010), mas pode ocasionar a perda de componentes menos voláteis (HARRIS, 2010). Assim, foram realizados testes para encontrar as melhores condições cromatográficas, uma vez que as mesmas podem influenciar na separação e identificação dos agrotóxicos (GUEDES *et al.*, 2016; ALCÂNTARA *et al.*, 2018).

Como os analitos estudados possuem propriedades físico-químicas distintas uns dos outros, a otimização dos parâmetros cromatográficos ajuda a obter uma melhor eficiência de separação, bem como evitar a degradação dos agrotóxicos. Além disso, um agrotóxico pode influenciar na determinação do outro (PINHO *et al.*, 2012). Através da otimização dos parâmetros cromatográficos é possível aumentar a resposta instrumental (SABIN *et al.*, 2011), onde um dos fatores que determina o aumento de sensibilidade é o sistema de injeção (SABIN *et al.*, 2011; PINHO *et al.*, 2012). Assim, foram feitos testes de otimização da temperatura de injeção (TI) e do volume de injeção (VI). Os testes com a TI e o VI ajudam a verificar o volume de expansão apropriado, minimizando a ocorrência do fenômeno denominado *backflash*, que ocorre quando o volume de solvente expandido na fase gasosa excede o volume efetivo do *liner* (SABIN *et al.*, 2011; BAI *et al.*, 2017). A escolha errada das configurações de volume de injeção pode levar a separações ineficazes e picos com formatos ruins (BAI *et al.*, 2017).

Inicialmente foi testada uma TI de 170°C com VI de 1,0 µL como mostra o cromatograma da Figura 4.1a, nessas condições os picos relacionados aos agrotóxicos aparecem com baixa intensidade e pouca resolução, dificultando a identificação dos analitos. Ao aumentar a TI para 240°C e o VI para 3,0 µL, ocorre uma melhora na intensidade dos picos cromatográficos, porém a resolução ainda não está adequada para identificação e quantificação dos agrotóxicos, como pode ser visto na Figura 4.1b. As condições escolhidas para o estudo dos seis agrotóxicos OFs nas amostras de pimentão orgânicas e não orgânicas foram TI a 240°C com VI de 5,0 µL, como mostra a Figura 4.1c, uma vez que se mostraram

mais viáveis na separação e detecção dos analitos, com picos simétricos e com alta resolução cromatográfica. A eluição de todos os agrotóxicos ocorreu em um tempo menor do que 15 minutos.

Figura 4.1 – Cromatogramas de íons totais (CIT) obtidos após injeção de 1 μL do mix de $1,0 \times 10^3 \mu\text{g.L}^{-1}$ no modo Scan (a) TI a 170°C e VI de 1,0 μL , (b) TI a 240°C e VI de 3,0 μL e (c) TI a 240°C e VI de 5,0 μL .



Fonte: Autor (2018).

É possível observar a formação de dois picos que indicam o diclorvós. Alguns agrotóxicos OFs (por exemplo, metamidofós e ometoato) tendem a mostrar o pico deformado (cauda) através da interação ou adsorção em locais ativos na entrada do injetor ou da fase estacionária durante a separação em CG (CHAMKASEM *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2015). Metamidofós e ometoato possuem uma alta polaridade, onde ao observar a polaridade (K_{ow}) do diclorvós na Tabela 2.3, ele é o agrotóxico mais polar dentre os seis agrotóxicos estudados, indicando que agrotóxicos com maior polaridade tendem a sofrer deformação do pico. Essa cauda costuma ser obtida para o primeiro composto de eluição, podendo ser explicado pela espessura inadequada do filme que reveste a coluna cromatográfica para um composto relativamente volátil ou um desajuste de polaridade com a fase estacionária (HALLOUM *et al.*, 2017).

A elevada TI (240°C) também pode estar degradando o diclorvós que apresenta ponto de degradação (PD) de 190°C e pressão de vapor (PV) de 2100 mPa a 25°C (maior volatilidade), ocasionando a presença dos dois picos. Mesmo assim, como será visto adiante, ele mostrou boa sensibilidade e seletividade, sendo possível fazer uma identificação do diclorvós.

4.2 Aplicação do método QuEChERS-citrato no preparo das amostras

A extração com ACN, seguida da adição do sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl) induziu a separação em uma camada aquosa e uma camada orgânica como mostrado anteriormente na Figura 3.6. O $MgSO_4$ anidro promoveu a partição líquido-líquido da água presente na amostra, onde foi observado um aquecimento logo após a adição dos sais. Esse aquecimento é relativo à sua reação altamente exotérmica de hidratação que resulta no aquecimento entre 40 e 45°C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, principalmente dos compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009; CERQUEIRA; CALDAS; PRIMEL, 2014).

A porção purificada usando a PSA, o GCB, o $MgSO_4$ e o NaCl promoveu a limpeza do extrato, como evidenciado na Figura 3.7, através da mudança de coloração do extrato final para incolor. O método de extração mostrou-se eficiente, mesmo após a adição da etapa de evaporação da ACN e posterior resuspensão do extrato em solvente *n*-hexano.

4.3 Seletividade

A seletividade da CG-EM pode ser ajustada pela seleção de íons moleculares e de fragmentos apropriados para evitar interferências de materiais co-extraídos da amostra (ALDER *et al.*, 2006). O CIE de cada analito a partir do CIT pode ser obtido graças a detectores modernos como o EM, bastando apenas selecionar o fragmento exato do espectro de massa do analito alvo, gerando assim, ganho de seletividade e sensibilidade (ALDER *et al.*, 2006; CAJKA; HAJŠLOVÁ; MASTOVSKA, 2008; ALCÂNTARA *et al.*, 2018), uma vez que um espectro de massa obtido sob as condições de CIE pode ser interpretado para fornecer informações estruturais (CAJKA; HAJŠLOVÁ; MASTOVSKA, 2008).

Para análise dos dados obtidos na CG-EM foi usado o programa Agilent Mass-Hunter (*Qualitative Analysis* B.06.00), onde o primeiro passo foi restringir os critérios de pesquisa da biblioteca no programa para reduzir o número de candidatos prováveis, minimizando as possibilidades de falsos positivos e negativos relatados pelo software. Ao usar o modo CIE foram selecionados três fragmentos: íon de quantificação, íon de identificação e íon de confirmação. O íon de quantificação é o pico de maior intensidade, também conhecido como pico base (CAJKA; HAJŠLOVÁ; MASTOVSKA, 2008; LU *et al.*, 2013; Domínguez *et al.*, 2014), o íon de quantificação foi selecionado considerando que é um fragmento de alto peso molecular (Domínguez *et al.*, 2014), onde o espectro é geralmente normalizado para a abundância (intensidade) deste pico (isto é, sua intensidade é atribuída a 100%) (CAJKA; HAJŠLOVÁ; MASTOVSKA, 2008).

A Tabela 4.1 apresenta os fragmentos utilizados para obtenção do CIE dos agrotóxicos estudados neste trabalho, bem como os de dois outros estudos com diferentes matrizes, onde os fragmentos escolhidos para gerar o CIE de cada composto foram escolhidos tomando como base os usados por Lu *et al.* (2013) e Alcântara *et al.* (2018). A escolha da faixa de 40 – 400 m/z, para o monitoramento dos agrotóxicos neste trabalho, foi realizada de forma que todos os agrotóxicos estudados apresentassem os fragmentos correspondentes aos dois trabalhos usados como orientação.

Lu *et al.* (2013) determinou simultaneamente 73 agrotóxicos (organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides), usando 6 tipos diferentes de solventes para extração, dentre eles a ACN, em frutas e vegetais frescos através de análises em CG-EM/EM, fazendo uso de uma coluna DB-5MS da J&W Scientific Folsom (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), onde a determinação qualitativa dos analitos foi baseada em pares de íons característicos e

tempo de retenção, usando o modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM). Apenas os íons de confirmação foram diferentes do trabalho de Lu *et al.* (2013).

Alcântara *et al.* (2018) fez a determinação simultânea de 8 agrotóxicos organofosforados no sapoti através de análises em CG-EM, fazendo uso de uma coluna HP5-S da Agilent (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), onde a determinação qualitativa e quantitativa dos analitos foram baseadas na escolha de fragmentos para obter o CIE a partir do CIT no modo Scan. Alcântara *et al.* (2018) selecionou os fragmentos de acordo com o pico base, o segundo fragmento mais intenso e o correspondente ao íon molecular para cada agrotóxico estudado. Nesta Tese foi feito o uso do mesmo procedimento de Alcântara *et al.* (2018), onde as únicas diferenças do trabalho foram a matriz escolhida, no caso, o pimentão e a quantidade de agrotóxicos, que foram seis.

Tabela 4.1 – Fragmentos utilizados para obtenção do CIE de cada agrotóxico.

Agrotóxico	Fragmentos (<i>m/z</i>)		Fragmentos (<i>m/z</i>)	
	Esta Tese		Lu <i>et al.</i> (2013)	
	CG-EM (Pimentão)	CG-EM/EM (Pimenta vermelha)	CG-EM (Sapoti)	
Clorpirifós	97, 197 ^a , 349	97, 197 ^a , 314	97, 197 ^a , 351	
Diclorvós	109 ^a , 185, 220	109 ^a , 185, 79	109 ^a , 185, 221	
Dissulfotom	88 ^a , 97, 274	88 ^a , 89, 186	88 ^a , 97, 274	
Etoprofós	97, 158 ^a , 242	139, 158 ^a , 200	97, 158 ^a , 242	
Fenclorfós	125, 285 ^a , 320	79, 285 ^a , 320	125, 285 ^a , 320	
Protiofós	162 ^a , 267, 344	113 ^a , 267, 309	162 ^a , 267, 345	

Fonte: Autor (2018).

(^a) íon de quantificação.

O CIT dos seis agrotóxicos estudados é apresentado na Figura 4.2 (a), onde é possível observar que não existe uma seletividade adequada, havendo comprometimento da resolução dos picos dos agrotóxicos devido à presença de outros picos de vários componentes da matriz. Ao usar o CIE, a informação espectral referente a um único agrotóxico pôde ser obtida, e o espectro experimental foi comparado com o espectro disponível no programa Agilent Mass-Hunter (*Qualitative Analysis B.06.00*). Todos os CIE exibiram picos de tempo de retenção similares aos padrões, bem como apresentaram diferenças inferiores ao limite máximo de 0,1 min, em conformidade com a diretriz SANTE da União Européia (SANTE, 2017; Hakme *et al.*, 2017).

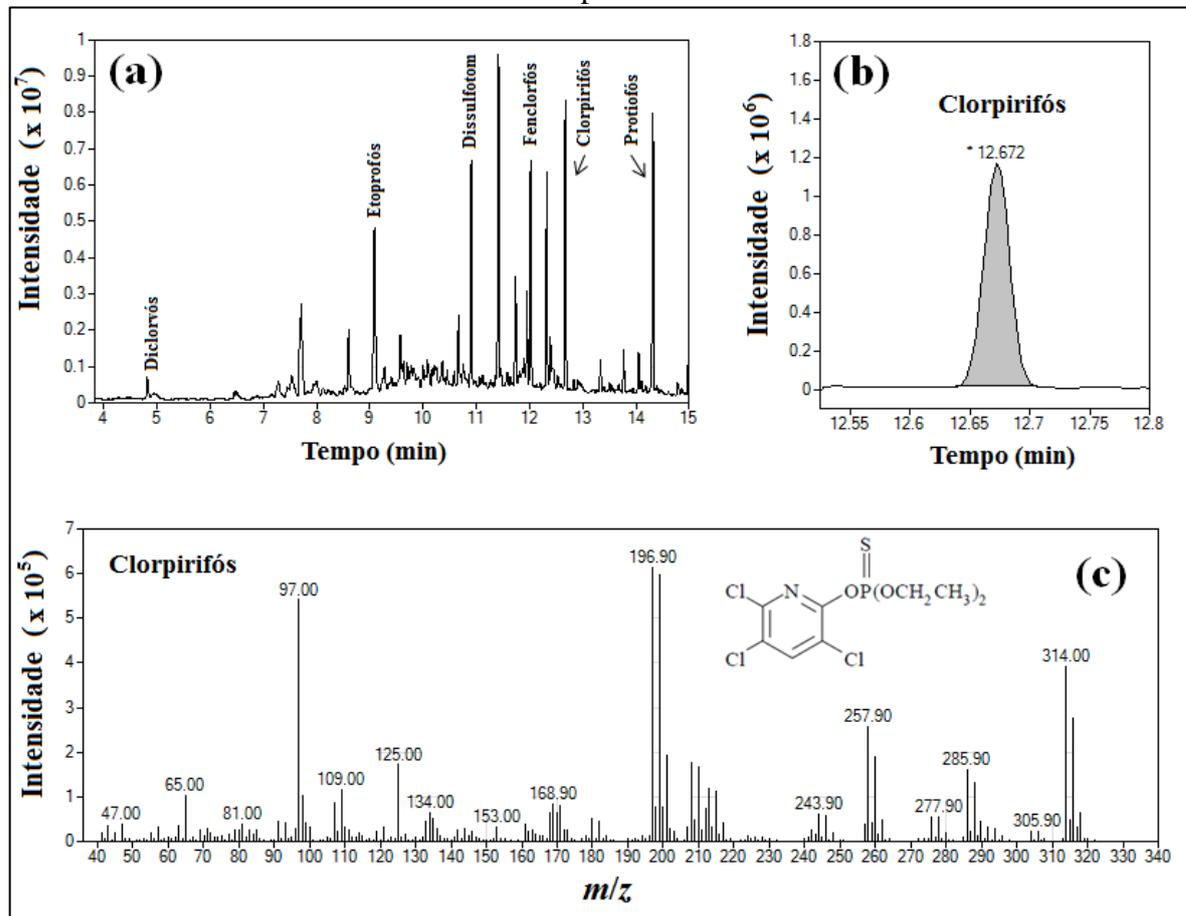
A Figura 4.2 (b) mostra o CIE do clorpirifós, em que ao selecionar os seus respectivos fragmentos houve um ganho de seletividade para o composto, possibilitando a comparação com o espectro de massa do clorpirifós fornecido pela biblioteca de dados do programa Agilent Mass-Hunter (*Qualitative Analysis B.06.00*), como apresentado na Figura 4.2 (c).

Ao analisar a Figura 4.2 (c), nota-se que o íon molecular ou de confirmação do clorpirifós não foi similar ao trabalho de Lu *et al.* (2013). Isso ocorreu porque em alguns casos a fragmentação pode ser muito extensa, deixando pouco ou nenhum vestígio de um íon molecular, o que torna a determinação da massa molecular difícil ou mesmo impossível. Em tais casos, as técnicas de ionização suaves (como ionização química) são tipicamente aplicadas levando a uma formação aprimorada do íon molecular (pseudo) (CAJKA; HAJŠLOVÁ; MASTOVSKA, 2008). Assim, a transição que gerou sinal mais intenso (corresponde ao íon produto mais abundante) foi utilizada para análise de quantificação (GOLGE; HEPSAG; KABAK, 2018) e a menos intensa para confirmação.

Os CIE obtidos para cada agrotóxico no extrato de pimentão, bem como seus respectivos espectros de massa são apresentados na Figura 4.3, onde foram selecionando os principais fragmentos do espectro de massa de cada analito (um íon de quantificação e dois de identificação) com o intuito de obter o cromatograma apenas para um composto de interesse.

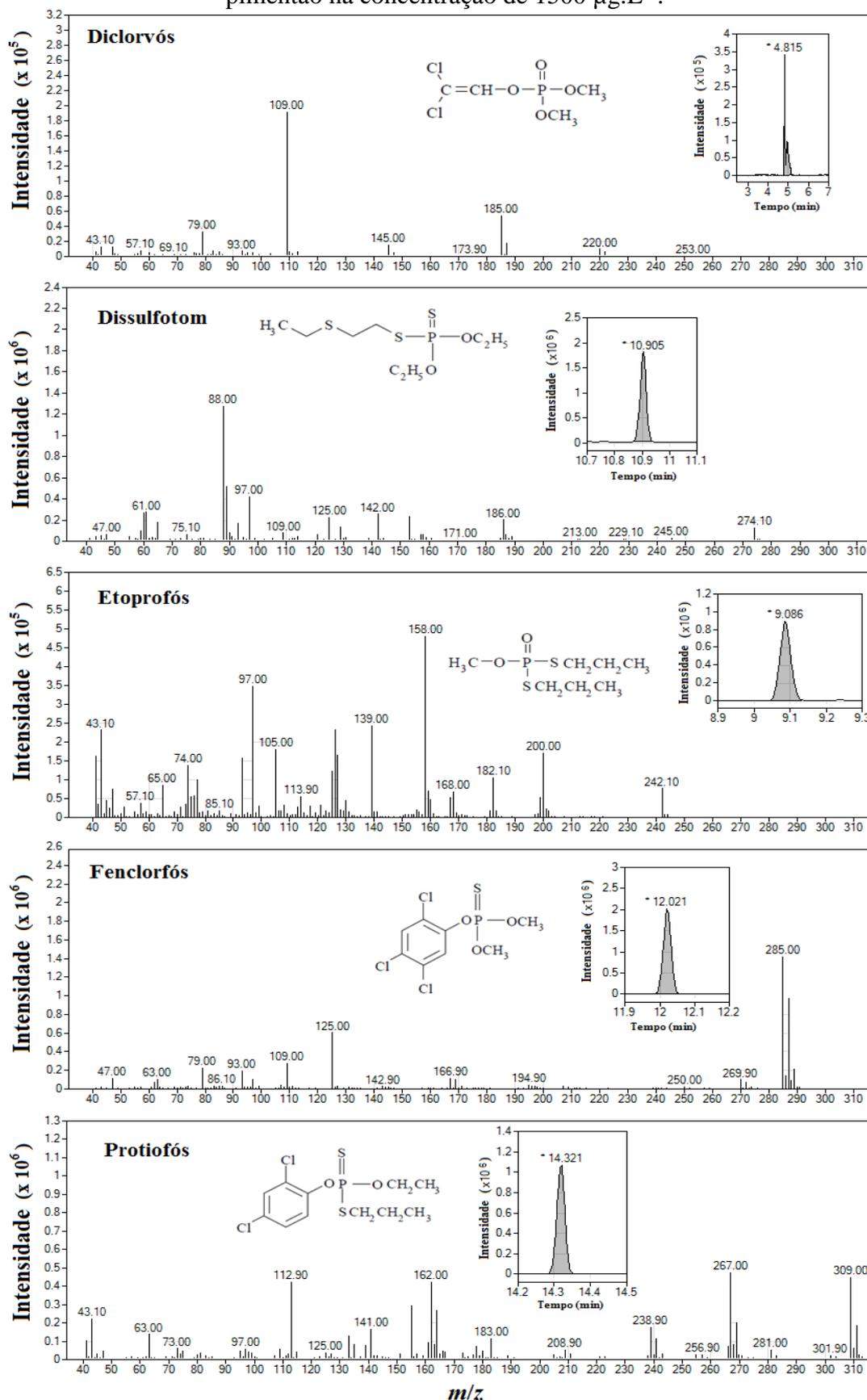
Ao utilizar a ferramenta cromatograma de IE, o método mostrou-se seletivo para cada agrotóxico e apresentou uma melhora da sensibilidade. Essa ferramenta foi utilizada para a construção de curvas de calibração na matriz, para análise qualitativa e quantitativa nas amostras reais.

Figura 4.2 – (a) CIT no modo Scan dos agrotóxicos na matriz do pimentão em concentração de $1500 \mu\text{g.L}^{-1}$, (b) Cromatograma de IE para o clorpirifós e (c) Espectro de massa do clorpirifós.



Fonte: Autor (2018).

Figura 4.3 – Espectros de massa e cromatogramas de IE de cada agrotóxico na matriz do pimentão na concentração de $1500 \mu\text{g.L}^{-1}$.



Fonte: Autor (2018).

4.4 Efeito matriz

Apesar do efeito matriz não poder ser totalmente eliminado (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2014; PANUWET *et al.*, 2016), estratégias de minimização ou compensação devem ser minuciosamente avaliados como parte de qualquer desenvolvimento e validação de método analítico (PANUWET *et al.*, 2016). Assim, é importante que os efeitos da matriz sejam investigados e gerenciados durante a validação e implementação de um método, pois podem levar a medições imprecisas de compostos alvo (PANUWET *et al.*, 2016).

O estudo do efeito matriz também foi realizado devido ao modo de injeção *splitless* usado nas análises, que é mais propenso ao efeito matriz, promovendo adsorção dos analitos ou mesmo catalisando processos de degradação térmica dos agrotóxicos (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2003; PINHO *et al.*, 2009). Além disso, mesmo o uso de técnicas cromatográficas acopladas à EM produzirem métodos muito confiáveis para a determinação de agrotóxicos, as interferências da matriz podem disputar com o analito de interesse e danificar a seletividade e especificidade do método, aumentando ou diminuindo o sinal do analito (GRIMALT; DEHOUCK, 2016; GUEDES *et al.*, 2016).

Apesar do método de adição de padrão melhorar a quantificação dos compostos vulneráveis ao efeito matriz, essa abordagem não foi usada por requer muito trabalho extra, e ainda poder levar a vários erros, visto que o efeito da matriz é dependente da concentração (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003). Os padrões internos marcados isotopicamente (deuterados) não foram utilizados por correr o risco de não se comportarem da mesma forma que os compostos na matriz (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008), serem muito caros, e possuírem uma carga adicional de desenvolvimento de condições analíticas para muitos vários compostos (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003).

A quantificação de agrotóxicos exigiu uma calibração combinada à matriz para evitar que interferências pudessem mascarar a determinação correta dos agrotóxicos (GÓMEZ-ALMENAR; GARCÍA-MESA, 2015; GONZÁLEZ-CURBELO *et al.*, 2017; BALSEBRE *et al.*, , 2018), onde o sinal do analito é influenciado pela natureza complexa da amostra e pelas propriedades dos co-extrativos (tamanho da molécula, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc.) (PINHO *et al.*, 2009; GUEDES *et al.*, 2016; ALCÂNTARA *et al.*, 2018). Quando a concentração de um agrotóxico em uma amostra é aproximadamente o LMR ou é detectado um agrotóxico não aprovado, a calibração

combinada à matriz pode ser benéfica para uma quantificação mais precisa (WALORCZYK, 2014).

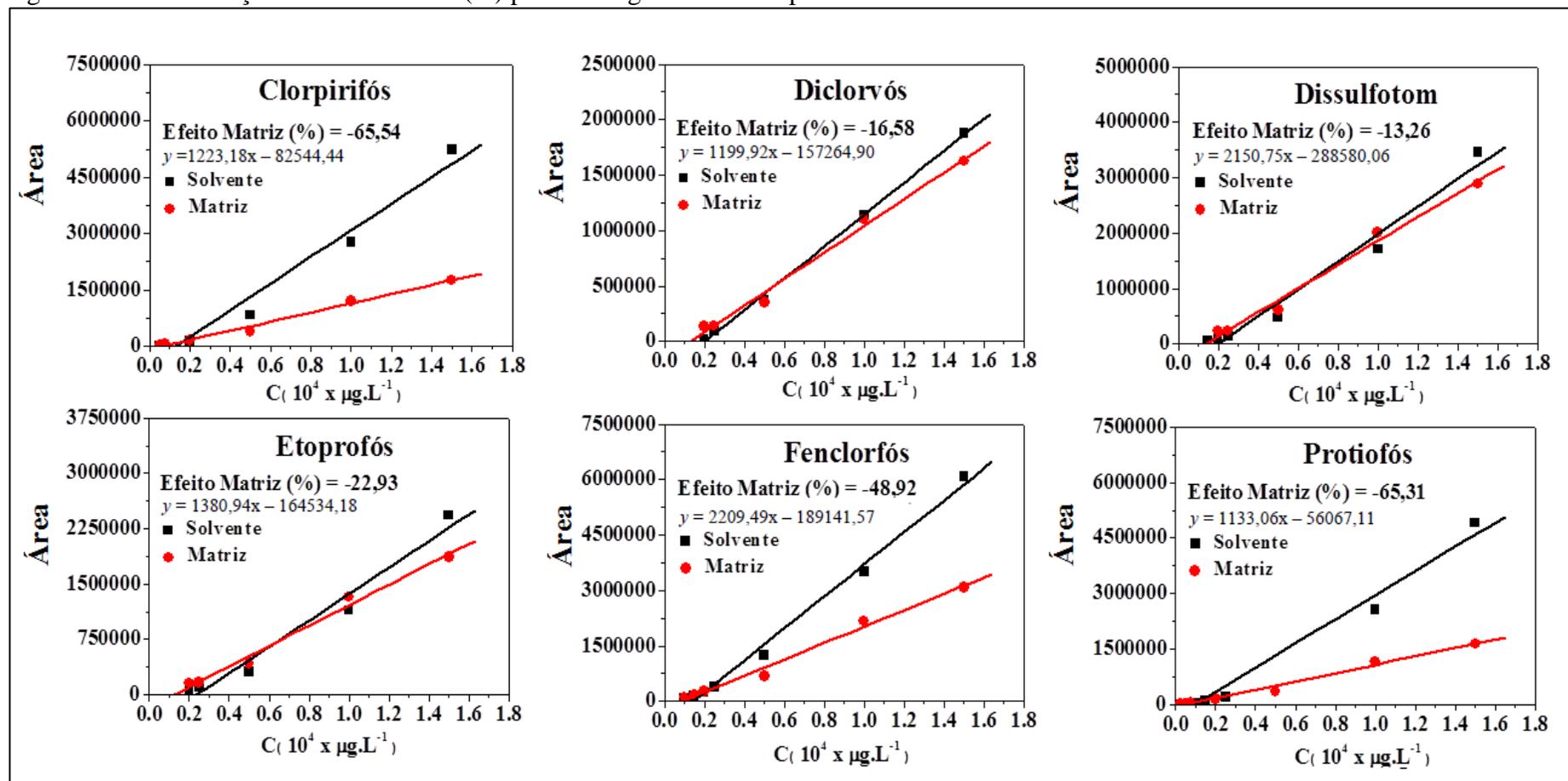
Assim, com o intuito de reduzir o efeito da matriz sobre a determinação quantitativa e melhorar a precisão da concentração das amostras reais, foram adicionadas uma série de soluções padrão no pimentão orgânico, variando de 15 - 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com o intuito de criar uma curva de calibração combinada à matriz (WU, 2017). Os padrões baseados no solvente também foram analisados, e desta forma, proceder com a avaliação dos efeitos da matriz (HE *et al.*, 2015), onde os CIE de cada agrotóxico foi integrado para obter as áreas dos picos e possibilitar a construção das curvas de calibração, tanto na matriz quanto no solvente, como mostra a Figura 4.4.

Segundo Poole (2007) a resposta observada no detector para alguns agrotóxicos organofosforados separados por cromatografia gasosa depende das propriedades da matriz estudada. Ao analisar as curvas analíticas na Figura 4.4, foram observados efeitos de matriz para metade dos agrotóxicos estudados, uma vez que existem diferenças de inclinação entre as curvas fortificadas no solvente e no extrato da matriz. Os valores negativos correspondem à resposta cromatográfica diminuída do analito na presença do extrato em relação à resposta no solvente (SOUSA *et al.*, 2012; MORAIS; COLLINS; JARDIM, 2018).

Segundo Guedes *et al.* (2016) valores negativos geralmente indicam reações com o analito (consumo de analito, adsorção em colunas cromatográficas, etc). Portanto, pode ter acontecido a adsorção dos agrotóxicos e componentes da matriz no *liner*, na coluna ou no detector (HAJŠLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2000; HAJŠLOVÁ; CAJKA, 2008; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; GIACINTI *et al.*, 2017), outra possibilidade é que os agrotóxicos podem ter interagido e co-eluído com compostos da matriz, e como esses compostos da matriz não estão no nível de traços, o ruído da linha de base do cromatograma aumenta, produzindo uma supressão do sinal do agrotóxico (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2014). Assim, o efeito matriz negativo pode resultar dos compostos co-extraídos da matriz, geralmente estarem em maiores quantidades do que os analitos de interesse (GIACINTI *et al.*, 2017).

Normalmente, os OFs são mais propensos ao aumento cromatográfico induzido pela matriz por serem termicamente lábeis (compostos químicos pouco estáveis) (PANUWET *et al.*, 2016), polares ou capazes de fazer ligação de hidrogênio (PANUWET *et al.*, 2016; BALSEBRE *et al.*, 2018).

Figura 4.4 – Distribuição do efeito matriz (%) para os 6 agrotóxicos em pimentão.



Fonte: Autor (2018).

Para Rutkowska, Łozowicka e Kaczyński (2018) a variação do efeito matriz depende de vários fatores, como as propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, a própria matriz e as interações entre elas. Os agrotóxicos com estruturas polares, por exemplo, grupos funcionais fosfato, têm maior probabilidade de se ligar e reagir com superfícies de vidro (*liner*) e metal (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003; KWON *et al.*, 2018; RUTKOWSKA; ŁOZOWICKA; KACZYŃSKI, 2018) num estado gasoso aquecido, do que os pesticidas não polares, por exemplo, agrotóxicos clorados (KWON *et al.*, 2018).

Os efeitos de matriz positiva são mais fortes para as moléculas de agrotóxicos com grupos funcionais específicos, como organofosfato ($-P=O$) e compostos hidroxilados ($-OH$) (GIACINTI *et al.* 2017; KWON *et al.*, 2018; BALSEBRE *et al.*, 2018; RUTKOWSKA; ŁOZOWICKA; KACZYŃSKI, 2018). Porém, diclorvos e etoprofos com um grupo ($-P=O$) são mais sensíveis ao efeito matriz negativo (POOLE, 2007; COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014).

Lemos *et al.* (2015) analisou OFs em pimentão verde por CLAE-EM/EM (Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa com triplo quadrupolo), usando o método QuEChERS-acetato, onde o diclorvos apresentou efeito matriz de -71,3% e o etoprofos -447,0%. Kemmerich *et al.* (2015) analisou 81 agrotóxicos em pimentão (não especifica a cor), por CLUE-EM/EM (Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massa com triplo quadrupolo), usando o método QuEChERS-citrato, em que o etoprofos apresentou efeito matriz com valor positivo (valor não especificado).

Clorpirifós, disulfotom, fenclorfos e protiofos têm um grupo ($-P=S$) que não é tão suscetível ao efeito matriz positivo (POOLE, 2007; COSTA; CALDAS; PRIMEL, 2014). Apesar disso, o clorpirifós é tipicamente sensível ao efeito matriz positivo (GIACINTI *et al.*, 2016; GIACINTI *et al.*, 2017). Liu *et al.* (2016) analisou pimentão verde, por CG-EM, usando o método QuEChERS com algumas otimizações, onde o clorpirifós apresentou valor de efeito matriz positivo de 23.

Além disso, a natureza da amostra também pode influenciar a intensidade do efeito da matriz, pois compostos como lipídios, pigmentos e outros componentes com alta massa molar podem ainda estar presentes, mesmo após a limpeza da amostra. De acordo com González-Curbelo *et al.* (2017) a influência da matriz é tão importante quanto a natureza do agrotóxico. Tal característica pode ser observada através da Tabela 4.2 ao analisar os dados de Alcântara *et al.* (2018), cuja diferença em relação a esta Tese consiste apenas na matriz

estudada (sapoti). A Tabela 4.2 evidencia a importância do estudo do efeito matriz, pois ao comparar os valores, somente o diclorvós apresentou efeito matriz negativo no sapoti, além de ser um valor maior quando comparado ao encontrado para o pimentão.

Tabela 4.2 – Comparação do efeito matriz (%) para os 6 agrotóxicos em pimentão.

Agrotóxico	Esta Tese (%)	Alcântara <i>et al.</i> (2018) (Sapoti) (%)
Clorpirifós	-65,54	39
Diclorvós	-16,58	-59
Dissulfotom	-13,26	218
Etoprofós	-22,93	204
Fenclorfós	-48,92	106
Protiofós	-65,31	47

Fonte: Autor (2018).

A supressão do sinal (efeito negativo) com valores entre $\pm 20\%$ e 0% são considerados leves, entre $\pm 50\%$ e $\pm 20\%$ são médios, enquanto superiores a $\pm 50\%$ são classificados como fortes (CAMINO-SÁNCHEZ *et al.*, 2011; LEMOS *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016). Neste estudo (CG-EM usando o método QuEChERS-citrato), clorpirifós e protiofós foram os agrotóxicos que apresentaram efeito matriz forte, já etoprofós e fenclorfós mostram efeito matriz médio, enquanto diclorvós e dissulfotom apresentaram efeito matriz leve, mas como os valores estão entre $\pm 20\%$, podem ser considerados insignificantes, já que essa variabilidade está próxima dos valores de CV da repetitividade (FERRER *et al.*, 2011; LOZANO *et al.*, 2012; WALORCZYK, 2014; SŁOWIK-BOROWIEC, 2015; SANTE, 2017; RIZZETTI *et al.*, 2016).

Tanto o efeito matriz quanto a recuperação dependem do sistema de detecção utilizado (ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017). Łozowicka, Rutkowska e Jankowska (2017) mostraram que na análise em CG, o detector EM/EM apresentou efeitos de matriz menores, apresentando supressão ou aumento na faixa de -25% a 74% , ao contrário do $\mu\text{EC/NP}$ (detector de captura de microelétrons acoplado a um detector de nitrogênio-fósforo) (-45% a 96%).

Segundo Li *et al.* (2017b) quase todos os co-extrativos causam aumento ou supressão do sinal, assim, o efeito matriz deve ser considerado para obter resultados quantitativamente precisos. Diante dos resultados obtidos para o efeito matriz no pimentão, as

curvas da calibração combinada à matriz foram usadas para determinar a linearidade, equação linear, coeficiente de correlação e dados estatísticos são apresentados nos itens 4.4.1 e 4.4.2.

Assim, percebe-se que a análise no CG-EM pode ser influenciada pelas condições cromatográficas, tipo de equipamento, modo de monitoramento, tipo de matriz, bem como pelo tipo de agrotóxico em estudo.

4.5 Linearidade

A linearidade foi avaliada usando a curva de calibração combinada à matriz. As curvas de calibração ($y = ax + b$) foram calculadas através de regressão linear dos mínimos quadrados usando as concentrações (eixos x) e áreas dos picos (eixos y) (WU, 2017). A Tabela 4.3 mostra as curvas de calibração e o coeficiente de correlação dos agrotóxicos. Pode-se observar que todas as curvas possuem um valor de coeficiente de correlação (R) adequado de acordo com as diretrizes da ANVISA que preconizam valores acima de 0,99 (ANVISA, 2003), sendo o valor mais baixo de 0,9937 para o protiofós.

Tabela 4.3 – Curvas de calibração e coeficiente de correlação (R) dos agrotóxicos.

Agrotóxico	Equação linear	Coefficiente de correlação (R)	Número de pontos da curva	Faixa de trabalho ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Clorpirifós	$y = 1223,18x - 82544,44$	0,9947	6	50 - 1500
Diclorvós	$y = 1199,92x - 157264,90$	0,9959	5	200 - 1500
Dissulfotom	$y = 2150,75x - 288580,06$	0,9946	5	200 - 1500
Etoprofós	$y = 1380,94x - 164534,18$	0,9945	5	200 - 1500
Fenclorfós	$y = 2209,49x - 189141,57$	0,9947	6	100 - 1500
Protiofós	$y = 1133,06x - 56067,11$	0,9937	7	25 - 1500

Fonte: Autor (2018).

Mesmo todos os valores de R estando de acordo com os órgãos reguladores, este não deve ser o único parâmetro utilizado como critério de aceitação de linearidade da regressão, pois para um valor R de 0,99, é possível a existência de 2% de erro de ajuste do modelo. Assim, testes estatísticos foram realizados para verificar a significância da regressão linear e dos parâmetros da curva (NASCIMENTO *et al.*, 2017; PIMENTEL; NETO, 1995).

4.5.1 Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão)

O F -teste foi aplicado para verificar a veracidade da curva analítica. Esse teste foi efetuado apenas na curva da matriz, já que esta foi utilizada para a análise dos agrotóxicos nas amostras reais devido ao fato de ocorrência de efeito matriz. A Tabela 4.4 mostra os valores referentes ao teste estatístico.

Como o $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, existe uma relação linear altamente significativa entre as variáveis x e y para todos os agrotóxicos na matriz do pimentão. Geralmente, quando a regressão é significativa, ocorre um elevado valor de $F_{\text{calculado}}$, uma vez que a variação nos valores de y , decorrentes da relação linear, provavelmente será maior que os resíduos (somatório dos desvios ou somatório dos erros) (SKOOG *et al.*, 2005).

Tabela 4.4 – Teste de linearidade das curvas analíticas preparadas na matriz, considerando nível de significância de 95% para o valor de F_{tabelado} .

Agrotóxico	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}	teste- F
Clorpirifós	1223,18	6,39	significante
Diclorvós	1199,92	9,28	significante
Dissulfotom	2150,74	9,28	significante
Etoprofós	1380,94	9,28	significante
Fenclorfós	2209,49	6,39	significante
Protiofós	3549,90	5,05	significante

Fonte: Autor (2018).

4.5.2 Teste de significância dos parâmetros de calibração

Para eliminar os erros quantitativos da curva de calibração é necessário realizar um ajuste, porque valores negativos para o coeficiente linear (b) geralmente indicam reações com os analitos (consumo do analito, adsorção em colunas cromatográficas, etc.) e com um alto valor positivo indicam um processo de contaminação (ruído de fundo, contaminação na preparação da amostra, etc.). Assim, espera-se que as linhas de regressão obtidas para a curva de calibração ($y = ax + b$) passem pela origem (ponto 0,0) (LIGIERO *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2017). Aplicou-se o teste- t para os coeficientes obtidos na curva da matriz, onde os valores de $t_{\text{calculado}}$ dos parâmetros e o valor crítico tabelado $t_{\text{crítico}}$, com nível de confiança de 95%, são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Resultados do teste estatístico de significância para os parâmetros da curva de calibração.

Agrotóxico	S_a	$t_{\text{calc},a}$	S_b	$t_{\text{calc},b}$	GL	$t_{\text{GL};95\%}$	teste- t	Curva de calibração corrigida
Clorpirifós	63,33	19,30	48697,29	1,70	4	2,78	$t_{\text{calc},a} > t_{\text{crítico}}$ $t_{\text{calc},b} < t_{\text{crítico}}$	$y=1223,18x$
Diclorvós	62,77	19,10	53278,23	2,95	3	3,18	$t_{\text{calc},a} > t_{\text{crítico}}$ $t_{\text{calc},b} < t_{\text{crítico}}$	$y=1199,92x$
Dissulfotom	130,20	16,51	110516,17	2,61	3	3,18	$t_{\text{calc},a} > t_{\text{crítico}}$ $t_{\text{calc},b} < t_{\text{crítico}}$	$y=2150,75x$
Etoprofós	83,63	16,50	70983,74	2,32	3	3,18	$t_{\text{calc},a} > t_{\text{crítico}}$ $t_{\text{calc},b} < t_{\text{crítico}}$	$y=1380,94x$
Fenclorfós	114,46	19,29	88321,86	2,14	4	2,78	$t_{\text{calc},a} > t_{\text{crítico}}$ $t_{\text{calc},b} < t_{\text{crítico}}$	$y=2209,49x$
Protiofós	56,00	19,86	40582,25	1,38	5	2,57	$t_{\text{calc},a} > t_{\text{crítico}}$ $t_{\text{calc},b} < t_{\text{crítico}}$	$y=1133,06x$

Fonte: Autor (2018). $t_{\text{calc},a}$: valor de t calculado para o coeficiente angular; $t_{\text{calc},b}$: valor de t calculado para o coeficiente linear; GL: grau de liberdade; $t_{\text{GL};95\%}$: teste- t com nível de confiança de 95%.

De acordo com os resultados, os coeficientes lineares não apresentam significância estatística ($t_{\text{cal}, b} < t_{\text{crítico}}$), e o parâmetro b pode ser excluído da equação ($y = ax + b$) para o cálculo das concentrações dos analitos, proporcionando maior confiabilidade dos resultados (LIGIERO *et al.*, 2009; HARRIS, 2010; GUEDES *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2017). Como os resultados da análise estatística de significância dos parâmetros de regressão mostraram que todas as inclinações são significativas, pois $t_{\text{calc}, a} > t_{\text{crítico}}$, as equações da curva que devem ser usadas nos cálculos das concentrações dos analitos são apresentadas na última coluna da Tabela 4.5.

O teste- t de Student foi utilizado a fim de reduzir erros durante a quantificação dos resíduos dos agrotóxicos. Assim, as curvas de calibração corrigidas são as que devem ser usadas para a quantificação dos agrotóxicos nas amostras reais, e assim, evitar erros.

4.6 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD é o critério crucial para a aceitação de qualquer método de extração de resíduos de agrotóxicos (RAI *et al.*, 2016). O LD representa as menores concentrações dos agrotóxicos no pimentão que o método é capaz de detectar, enquanto o LQ é a menor concentração que o método é capaz de quantificar com confiabilidade.

Os valores calculados para o LD e LQ de cada agrotóxico na matriz do pimentão são mostrados na Tabela 4.6. Eles foram convertidos para relação massa/massa (mg.kg^{-1}) para possibilitar a comparação com os LMRs da EC.

Tabela 4.6 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para os seis agrotóxicos, com os respectivos LMRs da EC para o pimentão.

Agrotóxico	LD (mg.kg^{-1})	LQ (mg.kg^{-1})	^a LMRs da EC (mg.Kg^{-1})
Clorpirifós	0,003	0,009	0,010
Diclorvós	0,035	0,117	0,010
Dissulfotom	0,039	0,130	0,010
Etoprofós	0,028	0,094	0,050
Fenclorfós	0,008	0,027	0,010
Protiofós	0,002	0,006	0,010

Fonte: Autor (2018). (^a) EC (2017)

Ao levar em consideração os valores do LMR da EC para o pimentão, o método poderia ser aplicado na determinação do clorpirifós, etoprofós, fenclorfós e protiofós, uma vez que tais agrotóxicos apresentaram valores de LD inferiores ao estabelecido, mas somente poderia ser aplicado na quantificação do clorpirifós e protiofós, pois apresentaram valores de LQ inferiores ao estabelecido.

Quando uma substância não é autorizada para um determinada cultura a metodologia analítica empregada deve possuir um Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) de $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$, sendo que a tomada de ação é o LQ do método (Lemos *et al.*, 2015; BRASIL, 2016), onde novamente analisando o LQ, clorpirifós e protiofós foram os agrotóxicos que apresentaram valores abaixo do estabelecido, podendo-se empregar o método na determinação de resíduos desses agrotóxicos não permitidos para essa cultura.

Como mostra o Quadro 2.2, nenhum dos agrotóxicos analisados nesta Tese é autorizado para ser usado na cultura de pimentão no Brasil, mas como eles ainda são autorizados para outros tipos de culturas, o uso inadequado ainda é persistente, trazendo sérios problemas para o meio ambiente e para a saúde humana. Ao analisar a Tabela 2.1, é possível notar que em relação à saúde humana eles são extremamente tóxicos (dissulfotom e etoprofós), altamente tóxicos (clorpirifós, diclorfós e protiofós) ou medianamente tóxico (fenclorfós). O Quadro 2.1 mostra que para o meio ambiente eles podem ser altamente perigosos (dissulfotom e etoprofós), muito perigosos (clorpirifós, diclorfós e protiofós) ou perigoso (fenclorfós). Köhler e Triebkorn (2013) relataram que os agrotóxicos OFs causam sérios problemas quando entram em contato com os animais através do meio ambiente.

A tabela 4.7 apresenta alguns artigos publicados que analisaram um ou mais dos agrotóxicos estudados nesta Tese. Deve ser ressaltado que os valores de LD e LQ dependem da instrumentação e das condições analíticas utilizadas (LORENZ *et al.*, 2014). As análises de pimentão verde feitas por Lemos *et al.* (2015) foram em CLAE-EM/EM usando o método QuEChERS-acetato. Kemmerich *et al.* (2015) analisou pimentão (não especifica a cor) por CLUE-EM/EM, usando o método QuEChERS-citrato. Liu *et al.* (2016) analisou pimentão verde, por CG-EM, usando o método QuEChERS com algumas otimizações. Golge, Hepsag e Kabak (2018) analisaram pimentão verde por CL-EM/EM (Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa com triplo quadrupolo), usando o método QuEChERS-acetato.

Tabela 4.7 – Artigos publicados que analisaram um ou mais dos agrotóxicos estudados nesta Tese.

Agrotóxico	Esta Tese (2018)		Lemos <i>et al.</i> (2015)		Kemmerich <i>et al.</i> (2015)		Liu <i>et al.</i> (2016)		Golge, Hepsag e Kabak (2018)	
	(pimentão verde)		(pimentão)		(pimentão)		(pimentão)		(pimentão verde)	
	LD (mg.kg ⁻¹)	LQ (mg.kg ⁻¹)	LD (mg.kg ⁻¹)	LQ (mg.kg ⁻¹)	LD (mg.kg ⁻¹)	LQ (mg.kg ⁻¹)	LD (mg.kg ⁻¹)	LQ (mg.kg ⁻¹)	LD (mg.kg ⁻¹)	LQ (mg.kg ⁻¹)
Clorpirifós	0,003	0,009	-	-	-	-	*	0,01	0,002	0,008
Diclorvós	0,035	0,117	1,05 x 10 ⁻³	2,11 x 10 ⁻³	-	-	-	-	0,001	0,004
Dissulfotom	0,039	0,130	-	-	-	-	-	-	-	-
Etoprofós	0,028	0,094	1,43 x 10 ⁻³	2,86 x 10 ⁻³	1,43 x 10 ⁻³	2,86 x 10 ⁻³	-	-	-	-
Fenclorfós	0,008	0,027	-	-	-	-	-	-	-	-
Protiofós	0,002	0,006	-	-	-	-	-	-	0,003	0,011

Fonte: Autor (2018). (*) não especificado, (-) não analisado.

Ao comparar os valores de LD e LQ obtidos nesta Tese com os de outros trabalhos, nos quais todos utilizaram o método QuEChERS no preparo das amostras, é notório que a cromatografia líquida possui valores menores, o que não desmerece o uso da CG-EM, visto que cada técnica possui seu valor agregado ao equipamento utilizado. O valor de LD encontrado para o protiofós nesta Tese é menor do que o obtido no trabalho de Golge, Hepsag e Kabak (2018), que usou CL-EM/EM, sendo que o LQ é ainda menor.

Apesar de Liu *et al.* (2016) ter analisado somente um dos agrotóxicos estudados nesta Tese, no caso, o clorpirifós, percebe-se que o método aqui validado possui um LQ próximo ao relatado por tal literatura, que usou a CG-EM.

4.7 Exatidão e Precisão

O processo de fortificação procura simular condições reais, não interferindo significativamente nas interações que ocorrem na própria amostra, mas isso nem sempre é possível, visto que a solução de fortificação é preparada com solventes orgânicos, geralmente não presentes na matriz, tentando usar volume reduzido de solução de fortificação e condições que alterem o mínimo possível a amostra (BRITO *et al.*, 2003).

Para evitar erros quantitativos, a calibração combinada à matriz foi utilizada para calcular as recuperações dos analitos (HE *et al.*, 2015). Foram estudados três níveis de fortificação e, para cada nível foram feitas triplicatas. A Tabela 4.8 mostra os agrotóxicos estudados em termos de recuperação média (%) e precisão de cada agrotóxico com o respectivo desvio padrão relativo DPR (%).

De acordo com os critérios estabelecidos por SANTE (2017), os valores de porcentagem de recuperação variando entre 70 - 120% com uma repetibilidade associada $DPR \leq 20\%$ são considerados satisfatórios para métodos multirresíduos, mas um intervalo de padrão prático de 60 - 140% pode ser usado para recuperações individuais em análises de rotina. É importante considerar que a precisão depende do nível de concentração do analito na amostra; e intervalos mais altos de porcentagens de recuperação podem ser aceitos (50 a 120% com uma precisão de $\pm 15\%$) nos casos em que o analito está em níveis residuais ou há uma matriz complexa (RIBANI *et al.*, 2004). A recuperação média (%) nas amostras de pimentão variou de 36,73 a 153,99 %, com DPR (%) variando de 0,08 a 13,47%. Por se tratar de uma amostra complexa e resíduos de agrotóxicos, tais valores são aceitáveis.

Tabela 4.8 - Exatidão em termos de recuperação com desvio padrão relativo (DPR) e repetitividade da precisão instrumental em termos do coeficiente de variação (CV).

Agrotóxico	0,11 (mg.kg ⁻¹)		0,15 (mg.kg ⁻¹)		0,25 (mg.kg ⁻¹)		Precisão (CV/%)
	Recuperação Média (%)	DPR (%)	Recuperação Média (%)	DPR (%)	Recuperação Média (%)	DPR (%)	
Clorpirifós	105,90	1,17	69,98	0,89	50,20	3,26	7,02
Diclorvós	133,13	1,95	131,36	2,41	81,55	13,47	9,35
Dissulfotom	153,99	3,41	119,95	7,13	84,41	5,28	16,84
Etoprofós	152,39	3,03	125,20	0,08	81,17	3,33	10,94
Fencorfós	99,91	1,82	76,14	0,99	53,04	5,64	5,63
Protiofós	64,16	1,29	50,99	1,35	36,73	3,63	8,05

Fonte: Autor (2018).

Pode existir uma diferença substancial nas recuperações a altas e baixas concentrações, onde na maioria das vezes a dispersão dos resultados costuma aumentar com a diminuição da concentração do analito (RIBANI et al., 2004), onde houve um aumento das recuperações em relação a diminuição da concentração de fortificação, sendo que a porcentagem de recuperação foi melhor na menor concentração (0,15 mg.kg⁻¹). Savant *et al.* (2010) analisou uva e manga através de CG-EM/EM, cujo método de extração foi realizado com etil acetado com limpeza das amostras com d-SPE (extração em fase sólida dispersiva), o agrotóxico diclorvós também apresentou diminuição da recuperação com o aumento da fortificação.

Para Poole (2007), tanto a quantidade como o tipo de matriz afetam a recuperação, e mesmo as tendências gerais permanecendo verdadeiras, os agrotóxicos individuais podem mostrar aumentos divergentes na recuperação com as mesmas condições instrumentais. Sapahin, Makahleh e Saad (2015) investigaram o efeito de diferentes pesos da amostra (0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 g) nas recuperações, onde as recuperações aumentaram à medida que a massa da amostra diminuiu, sendo que as melhores recuperações foram obtidas quando foi utilizada 0,5 g de amostra. Neste trabalho foram utilizadas 10g de amostra. Para Sun (2010), a recuperação incomum (muito alta / baixa) está frequentemente relacionada diretamente à instabilidade dos analitos. A diminuição na recuperação com o aumento do nível de fortificação pode estar relacionada à perda do analito, uma vez que as amostras de maior fortificação são analisadas posteriormente.

Segundo Sousa *et al.* (2013) as taxas de recuperação aparentemente mais elevadas podem ser observadas em análises de agrotóxicos mais polares. Tuzimski e Rejczak (2016) obtiveram valores médios mais baixos de recuperação para alguns agrotóxicos apolares, como por exemplo, bromopropilato, com valor de $K_{ow} = 2,51 \times 10^5$. Ao observar a polaridade (K_{ow}) na Tabela 2.3, o diclorvós é o agrotóxico mais polar seguido por etoprofós, dissulfotom, clorpirifós, fenclorfós e protiofós. Os valores de recuperação realmente foram maiores para os agrotóxicos mais polares, sendo exceção somente o diclorvós para tal característica, onde o mesmo deveria apresentar o maior valor de recuperação, como mostra a Tabela 4.8.

Sapahin, Makahleh e Saad (2015) também sugerem que baixas recuperações podem estar relacionadas à baixa polaridade dos agrotóxicos, e também provavelmente devido ao alto peso molecular, dificultando a extração no processo de fortificação em amostras reais. Ao observar o peso molecular na Tabela 2.2, o diclorvós é o agrotóxico que possui menor peso molecular, seguido por etoprofós, dissulfotom, fenclorfós e protiofós e

clorpirifós. Na Tabela 4.8 é possível observar que diclorvós e protiofós não se encaixaram com este aspecto.

Em métodos de análise de traços ou impurezas, a precisão em termos de CV de até 20% é aceitável, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI *et al.*, 2004; SANTE, 2017). Morais, Collins e Jardim (2018) estudaram alguns fatores que podem influenciar na recuperação de agrotóxicos em pimentão verde, usando o método QuEChERS-citrato com algumas modificações no preparo das amostras, onde o GCB influenciou positivamente a limpeza dos extratos, o que minimizou os efeitos da matriz, proporcionando coeficientes de variação inferiores a 20% para todos os pesticidas estudados. Os resultados para a precisão dos agrotóxicos no pimentão apresentaram valores inferiores a 20%, mostrando que o método proposto é preciso.

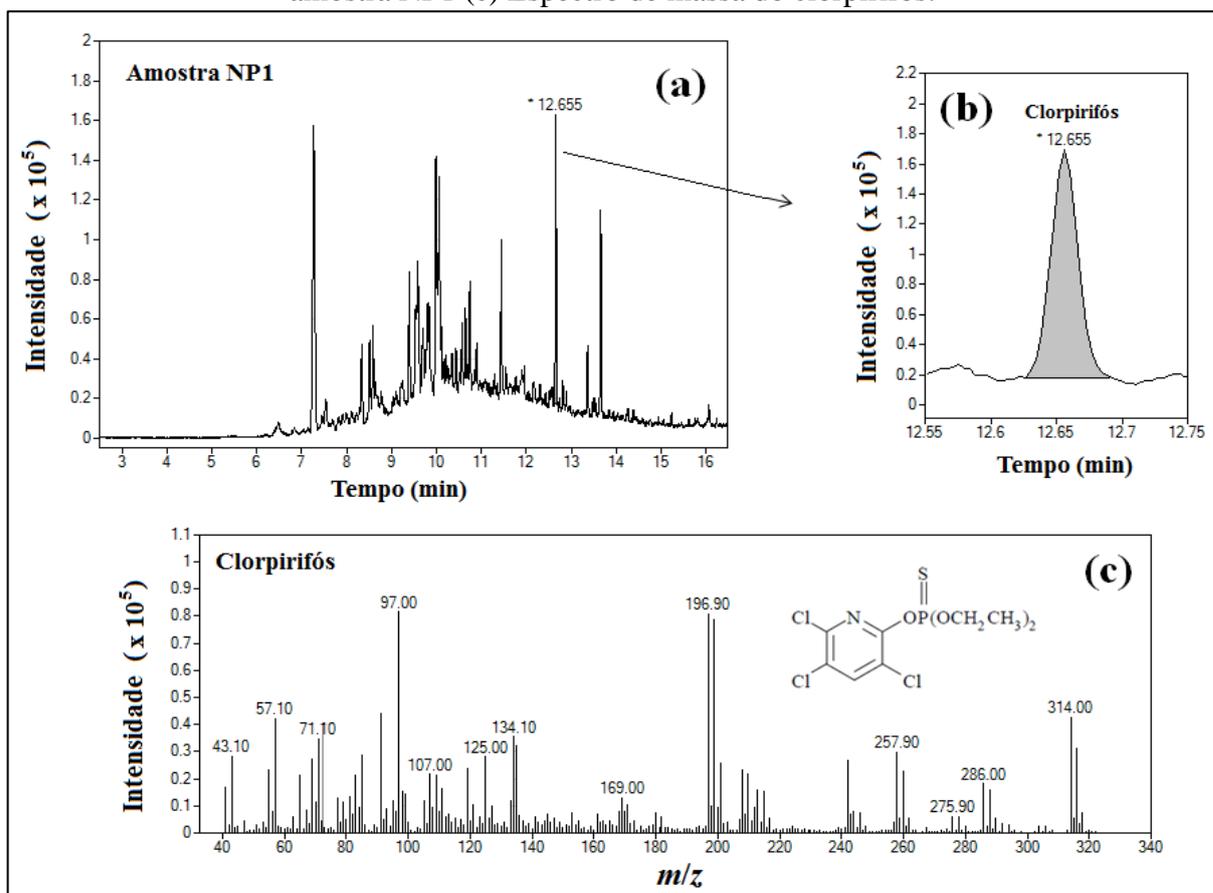
4.8 Análises qualitativas e quantitativas de amostras de pimentão da cidade de Fortaleza-CE

O método desenvolvido foi aplicado na análise de amostras de pimentão (orgânico e não orgânico) de diferentes supermercados de Fortaleza – CE, como descrito no item 4.6, a fim de monitorar clorpirifós e protiofós. O método QuEChERS/CG-EM foi aplicado em 7 amostras orgânicas (todas verdes) e 18 não-orgânicas (6 verdes, 6 vermelhas e 6 amarelas).

Das amostras analisadas apenas uma não orgânica verde (NP1) apresentou contaminação pelo clorpirifós. A Figura 4.5 (a) apresenta o CIE da mostra NP1, indicando a presença do clorpirifós, onde a Figura 4.5 (b) apresenta de forma mais evidente a presença desse agrotóxico, enquanto a Figura 4.5 (c) mostra o espectro de massa referente ao clorpirifós, confirmando a existência do mesmo na amostra analisada.

O valor encontrado na amostra de pimentão contaminada com clorpirifós foi de 0,177 mg.Kg⁻¹, correspondendo à um valor 17,7 vezes maior do que o LMRs permitido para cultura do pimentão pela EC (0,010 mg.kg⁻¹), como mostrado na Tabela 4.6. O clorpirifós é um dos agrotóxicos que é frequentemente utilizado no cultivo de frutas e vegetais, sem necessariamente ser autorizados para uso em algumas culturas (LORENZ *et al.*, 2014). Esse agrotóxico é comumente detectado em análises de alimentos *in natura* (BRASIL, 2010; BRASIL, 2013; GUEDES *et al.*, 2016; CHOWDHURY *et al.*, 2013; QUIJANO *et al.*, 2016; BLANKSON *et al.*, 2016; ANVISA, 2017), principalmente em pimentão (BRASIL, 2011; BRASIL, 2013; ANVISA, 2017).

Figura 4.5 – (a) Cromatograma de IE da amostra NP1, (b) Zoom do cromatograma de IE da amostra NP1 (c) Espectro de massa do clorpirifós.



Fonte: Autor (2018).

Na Tabela 4.9 são apresentados os valores do IDA para os agrotóxicos escolhidos para estudo, bem como suas respectivas agências reguladoras. A EC apresenta os valores mais restritivos para o clorpirifós, a EPA é a única que possui valor de IDA para o protiofós.

Tabela 4.9 – Valores do IDA e suas respectivas agências reguladoras.

Agrotóxico	ANVISA	<i>Codex Alimentarius</i>	EC	EPA
	(mg.kg ⁻¹ p.c./dia)	(mg.kg ⁻¹ p.c./dia)	(mg.kg ⁻¹ p.c./dia)	(mg.kg ⁻¹ p.c./dia)
Clorpirifós	0,0100	0,0100	0,0010	0,0030
Diclorvós	-	0,0040	0,00008	
Dissulfotom	0,0003	0,0003	-	0,0010
Etoprofós	0,0004	0,0004	0,0004	0,0003
Fenclorfós	-	-	-	
Protiofós	-	-	-	0,0001

Fonte: CODEX ALIMENTARIUS (2016), EPA (2016), ANVISA (2017), EC (2017).

p.c: peso corpóreo.

A amostra contaminada pesava 0,19 kg, onde ao fazer uma simples regra de três com o valor encontrado, o mesmo equivale a uma contaminação de 0,034 mg de clorpirifós. Analisando o IDA do clorpirifós de acordo com a EC (0,001 mg.kg⁻¹ p.c/dia) na Tabela 4.9, que é a mais restritiva para tal agrotóxico, novamente usando a regra de três, uma pessoa que pesa 30 kg (por exemplo, uma criança) pode ingerir até 0,030 mg deste agrotóxico por dia. Ao usar o valor estabelecido pela ANVISA (0,01 mg.kg⁻¹ p.c/dia), que é similar ao do *Codex Alimentarius*, o valor da ingestão diária do clorpirifós aumenta para 0,30 mg.

Considerando que um agrotóxico, mesmo em quantidades traço, como já mencionado várias vezes no decorrer da Tese, pode trazer graves problemas para a saúde humana, o interessante é tomar como base os valores estabelecidos pela EC, que até mesmo possui valores de LMRs para cultura do pimentão. Assim, uma criança que pesa 30 kg, já atingiria quase que totalmente o valor estabelecido para ingestão diária do clorpirifós, caso comesse estes 0,19 kg de pimentão. Lembrando que a mesma criança poderia estar passando desse valor, se a mesma comesse, por exemplo, batata no mesmo dia, visto que tal cultura usa de forma autorizada o clorpirifós, como apresentado no Quadro 2.2.

O efeito tóxico do clorpirifós pode ser potencializado em vista da exposição simultânea de resíduos de agrotóxicos que possuem o mesmo mecanismo de ação tóxica, sendo preciso levar em consideração a exposição a múltiplos resíduos de agrotóxicos presentes nos diferentes alimentos ingeridos em uma refeição, durante o dia ou ao longo da vida, como já vem sendo desenvolvido na Europa (ANVISA, 2016). Assim, é recomendado optar por alimentos rotulados com identificação do produtor, o que pode facilitar o compromisso dos produtores em relação à qualidade dos seus produtos e à adoção de BPA (ANVISA, 2014, 2013).

Um dos problemas do uso indiscriminado e ilegal de um ou mais agrotóxicos em culturas para as quais eles não estão autorizados é o aumento do risco dietético para os consumidores que ingerem o alimento contaminado, onde o próprio trabalhador pode estar incluso, visto que esse uso não é levado em consideração no cálculo do IDA e que este risco se agrava à medida que o agrotóxico é identificado em um maior número de alimentos comercializados (ANVISA, 2011).

As altas concentrações de agrotóxicos acima LMRs podem comprometer a saúde do consumidor se forem superiores ao limite de segurança, ou seja, o IDA (DOMÉNECH; MARTORELL, 2017). A ingestão alimentar representa a principal fonte de exposição de agrotóxicos em bebês e crianças, podendo ser responsável pelo aumento dos riscos para a

saúde em comparação com adultos (LU *et al.*, 2010), pois consomem relativamente mais por Kg de peso corporal em relação aos adultos (GOLGE; KABAK, 2015b).

O clorpirifós é um ingrediente ativo bastante conhecido na agricultura devido a seu amplo espectro de atuação (inseticida, formicida e acaricida), sendo indicado pelas legislações para aplicações em diversas culturas (UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE DATABASE, 2016; SHUKLA *et al.*, 2016). De acordo com os PARA de 2013 e 2014, a presença de agrotóxicos não autorizados, em parte, pode ser explicada pelo fato de haver poucas demandas de registro pelas empresas de agrotóxicos para culturas consideradas de baixo retorno econômico (ANVISA, 2014, 2013). Às vezes, os resíduos detectados não obrigatoriamente são provenientes do uso deliberado do agrotóxico, podendo ser resultante de contaminações ambientais, tais como: deriva de pulverização no campo, plantio de culturas em áreas tratadas anteriormente com agrotóxicos, transferência de resíduos de fungicidas pós-colheita ou reguladores de crescimento aplicados em outras culturas alocadas no mesmo local de armazenamento, entre outras possibilidades (USDA, 2016; ANVISA, 2016).

5 CONCLUSÃO

As condições cromatográficas otimizadas na CG-EM demonstraram ser satisfatórias na separação dos agrotóxicos (com boa resolução) em um tempo de corrida menor que 15 minutos. Nessas condições, o método mostrou-se seletivo e sensível quando utilizado o recurso do CIE para os agrotóxicos em estudo.

O método QuEChERS-citrato ajuda a manter um maior tempo de vida tanto do *liner* quanto da coluna, pois gera um extrato limpo. Para este estudo, todos os agrotóxicos mostraram a supressão do sinal induzida pela matriz, onde o efeito matriz foi mais significativo ($> 20\%$) para quatro agrotóxicos: clorpirifós (-65,54), protiofós (-65,31), fenclorifós (-48,92) e etoprofós (-22,93). O efeito matriz mostrou-se depende da natureza da matriz, onde os resultados indicaram que o grau de supressão do sinal variou com o tipo de agrotóxico.

Cada agrotóxico exibiu boa linearidade no intervalo de concentração estudado, com valores de R maiores que 0,99, onde os testes estatísticos mostraram um bom ajuste linear entre os pontos da curva na matriz, sendo que os coeficientes lineares não apresentaram significância estatística. Os agrotóxicos protiofós e o clorpirifós mostraram-se os mais sensíveis para o método proposto, apresentando os mais baixos valores de LQ, que também foram os únicos que tiveram valores abaixo do LMR da EC.

Houve uma diminuição das recuperações em relação ao aumento da concentração de fortificação, sendo encontrados melhores valores de recuperação na menor concentração de 0,11 mg.kg⁻¹ para o clorpirifós, fenclorifós e protiofós, enquanto para o diclorvós, dissulfotom e etoprofós foi na concentração de 0,15 mg.kg⁻¹. O método desenvolvido para a análise de seis agrotóxicos OFs em amostras de pimentão (orgânico e não orgânico) mostrou-se eficiente para análise de clorpirifós e protiofós.

Apenas uma das amostras não orgânicas apresentou contaminação (NP1), mas é aconselhável realizar estudos de monitoramento da exposição aos agrotóxicos na população brasileira, principalmente quanto às implicações toxicológicas, e considerando os grupos mais vulneráveis. O monitoramento pelas agências brasileiras está dando resultado, razão pela qual a contaminação vem diminuindo e que apenas uma amostra foi irregular. No entanto, este composto não deve estar presente, uma vez que não é permitido o uso na cultura do pimentão, implicando tanto na contaminação dos consumidores quanto do meio ambiente.

REFERÊNCIAS

AKTAR, W. Organic Food and Pesticides: Myth and Reality. **Journal of Information, Intelligence, and Knowledge**, v. 06, p. 273-294, 2014.

ALCÂNTARA, D. B. *et al.* Organophosphorus Pesticide in Sapodilla (*Manilkara zapota*) Fruit. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 2180-2188, 2018.

ALDER, L. *et al.* Residue Analysis of 500 High Priority Pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS?. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 838-865, 2006.

ALENCAR, G. V. D. *et al.* Percepção ambiental e uso do solo por agricultores de sistemas orgânicos e convencionais na Chapada da Ibiapaba, Ceará. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 51, p. 217-236, 2013.

ALI, Q.; KHAN, M. T. I.; ASHFAQ, M. Resource use efficiency and return to scale analysis in off-season capsicum bell pepper production in Punjab, Pakistan. **Advances in Environmental Biology**, v. 10, p. 113-119, 2017.

AMARAL, E. H. **Resíduos de agrotóxicos organofosforados: validação de método de cromatografia a gás e quantificação em produtos agrícolas**. 2007. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimento) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

AMARANTE JUNIOR, O. P. *et al.* Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cadernos de pesquisa (São Luis)**, v. 12, n. 1/2, p. 116-131, 2001.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 00, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 163-184, 2003.

ANDRAŠČÍKOVÁ, M.; HROUZKOVÁ, S. A comparative study of three modifications of the QuEChERS method for determination of endocrine disrupting pesticide residues in lemon matrices by fast GC-MS. **Analytical Methods**, v. 5, 1374-1384, 2013.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução nº899, de 29 de maio de 2003**, que revoga a Resolução nº 475 e dispõe sobre validação de métodos analíticos e bioanalíticos e determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Brasília, DF, 02 jun. 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista Saúde Pública**, v. 40, p. 361-3, 2006.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. **Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008**, 2009.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. **Relatório de atividades de 2010**, 2011.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. **Relatório de atividades de 2011 e 2012**, 2013.

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

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. **Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 A 2015**, 2016.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Monografias de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: 14 set. 2017.

ARIAS, J. L. O. *et al.* Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 66-75, 2014.

AZEVEDO, C. P. *et al.* Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas. **Comunicado técnico 35**, Embrapa, 2006.

BAI, L. *et al.* Pseudo-absolute quantitative analysis using gas chromatography–vacuum ultraviolet spectroscopy—a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 953, p. 10-22, 2017.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed., Bookman: Porto Alegre, 2002.

BAKIRCI, G. T. *et al.* Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey. **Food Chemistry**, v. 160, p. 379-392, 2014.

BALSEBRE, A. *et al.* Matrix solid-phase dispersion associated to gas chromatography for the assessment in honey bee of a group of pesticides of concern in the apicultural field. **Journal of Chromatography A**, v. 1567, p. 47-54, 2018.

BANDEIRA, G. T. *et al.* Determinação de resíduos de agrotóxicos em leite bovino empregando método QuEChERS modificado e GC-MS/MS. **Química Nova**, v. 37, p. 900-907, 2014.

BARBIERI, J. C. **Gestão Ambiental Empresarial: conceitos, modelos e instrumentos**. 3. ed. atual e ampliada. São Paulo: Saraiva, 2011.

BARBOSA, P. G. A. **Desenvolvimento de método analítico para determinação multirresíduo de agrotóxicos em abacaxi utilizando as técnicas QuEChERS e CG-EM.** 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

BARBOSA, P. G. A. *et al.* Statistical Analysis for Quality Adjustment of the Analytical Curve for Determination of Pesticide Multiresidue in Pineapple Samples. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 466-478, 2017.

BARGAŃSKA, Z.; ŚLEBIODA, M.; NAMIEŚNIK, J. Determination of Pesticide Residues in Honeybees using Modified QUEChERS Sample Work-Up and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 19, p. 2911-2924, 2014.

BARRIGA, R. E. O. *et al.* Determination of organochlorine pesticides in organic quinoa grains (*Chenopodium quinoa* Willd.) by GC- μ ECD, using the QuEChERS method. **Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research**, v. 18, p. 19-26, 2016.

BARROS NETO, B. D.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, 856-865, 2002.

BARROS, H. D. F. Q. *et al.* Simultaneous extraction of edible oil from avocado and capsanthin from red bell pepper using supercritical carbon dioxide as solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 315-320, 2016.

BASTOS, L. H. P. *et al.* Implementação de método analítico para determinação de resíduos de organofosforados em leite por cromatografia a gás com detector fotométrico de chama. **Química Nova**, v. 35, p. 1657-1663, 2012.

BASTOS, L. H. P. *et al.* Monitoramento de resíduos de agrotóxicos da classe dos organofosforados por CG-DFC em amostras de leite fluído e em pó. **Química Nova**, v. 38, 178-184, 2015.

BENBROOK, C. M.; BAKER, B. P. Perspective on Dietary Risk Assessment of Pesticide Residues in Organic Food. **Sustainability**, v. 06, p. 3552-3570, 2014.

BERNY, P. Pesticides and the intoxication of wild animals. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, p. 93-100, 2007.

BESIL, N. *et al.* Negative chemical ionization gas chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry and automated accurate mass data processing for determination of pesticides in fruit and vegetables. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, 6327-6343, 2015.

BLANKSON, G. K. *et al.* Contamination levels of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in vegetables marketed in Accra, Ghana. **Food Control**, v. 68, p. 174-180, 2016.

BLAT, S. F. *et al.* Reação de acessos de pimentão e pimentas ao oídio (*Oidiopsis taurica*). **Horticultura Brasileira**, v. 23, p. 72-75, 2005.

BOGUSZ JÚNIOR, S. *et al.* Brazilian Capsicum peppers: capsaicinoid content and antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 217-224, 2017.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, 10-15, 2012.

BRAGA, J. W. B., POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, p. 1004-1011, 2004.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, 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 fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 jul. 1989. Seção 1, p. 11459, 1989.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 007, de 31 de dezembro de 1999**. Dispõe sobre normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 maio 1999. Seção 1, p. 11, 1999.

BRASIL. **Decreto Federal nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 jan. 2002. Seção 1, p. 1, 2002.

BRASIL. **Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003**. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 dez. 2003. Seção 1, p. 8, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mecanismos de controle para a garantia da qualidade orgânica**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Agroecologia. – Brasília: Mapa/ACS, 2008a.

BRASIL. **Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007**. Regulamenta a Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 dez. 2008. Seção 1, p. 2. 2008b.

BRASIL. Diário Oficial da União. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **PNCRC/VEGETAL, 2009-2010**, Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 22, de 8 de setembro de 2010. Nº 174. Seção 1, 10 de set. 2010.

BRASIL. Diário Oficial da União. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **PNCRC/VEGETAL, 2010-2011**, Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 40, de 11 de novembro de 2011. Nº 219. Seção 1, 16 de nov. 2011.

BRASIL. **Decreto Nº 7.794, de 20 de agosto de 2012**. Institui a Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 ago. 2012. Seção 1, p. 4, 2012.

BRASIL. Diário Oficial da União. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **PNCRC/VEGETAL, 2011-2012**, Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 4, de 7 de janeiro de 2013. Nº 1. Seção 1, 4 de jan. 2013.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 18, de 20 de junho de 2014**. Instituir o selo único oficial do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade Orgânica, e estabelecer os requisitos para a sua utilização. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2014. Seção 1, p. 3, 2014.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 11, de 25 de julho de 2016**. Fica definido, na forma desta Instrução Normativa, o cronograma de execução do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal para o ano de 2016. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 julho 2016. Seção 1, p. 02, 2016.

BRITO, N. M. *et al.* Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de agrotóxicos mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 155-168, 2002.

BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CABRERA, L. C. *et al.* Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 39, p. 1945-95, 2016.

CAJKA, T.; HAJŠLOVÁ, J.; MASTOVSKA, K. **Mass Spectrometry and Hyphenated Instruments in Food Analysis**. Em: Handbook: Food Anal. Instrum., Taylor & Francis Group, LLC, 2008.

CAMINO-SÁNCHEZ, F. J, *et al.* UNE-EN ISO/IEC 17025: 2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 427-440, 2011.

CARNEIRO, F. F. *et al.* **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: Expressão Popular, 2015.

CARVALHO, N. L.; PIVOTO, T. S. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. **Revista Monografias Ambientais**, v. 2, 176-192, 2011.

CARVALHO, R. D. E.; BARBOSA, F. H. F. Resíduos de agrotóxicos organofosforados e ditiocarbamatos presentes na cultura de tomate consumidos no estado de Minas Gerais nos anos de 2006, 2007 e 2008: avaliação da exposição humana. **REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA**, v. 13, p. 171-190, 2013.

CEASA – CE (Centrais de Abastecimento do Ceará). **2017 inicia com equilíbrio nos preços da Ceasa**. Disponível em: < <http://www.ceasa-ce.com.br/index.php/noticias/43998-2017-inicia-com-equilibrio-nos-precos-da-ceasa-> >. Acesso em: 28 out. 2017.

CEQUIER, E. *et al.* Development of an ion-pair liquid chromatography–high resolution mass spectrometry method for determination of organophosphate pesticide metabolites in large-scale biomonitoring studies. **Journal of Chromatography A**, v. 1454, p. 32-41, 2016.

CERQUEIRA, M. B. R.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. **Journal of Chromatography A**, v. 1336, p. 10-22, 2014.

CHAMKASEM, N. C. *et al.* Analysis of 136 Pesticides in Avocado Using a Modified QuEChERS Method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 2315-2329, 2013.

CHATTERJEE, N. S. *et al.* Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1-8, 2016.

CHEVALLIER, E. *et al.* Simultaneous determination of 31 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation based on the accuracy profile. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 35-41, 2015.

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

CHIESA, L. M. *et al.* The occurrence of pesticides and persistent organic pollutants in Italian organic honeys from different productive areas in relation to potential environmental pollution. **Chemosphere**, v. 154, p. 482-490, 2016.

CHOWDHURY, M. A. Z. *et al.* Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography-mass spectrometry. **Food Control**, v. 34, p. 457-465, 2013.

CHUNG, S. W. How effective are common household preparations on removing pesticide residues from fruit and vegetables: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 2857-2870, 2018.

CLOUTIER, P. L. *et al.* QuEChERS extraction for multi-residue analysis of PCBs, PAHs, PBDEs and PCDD/Fs in biological samples. **Talanta**, v. 165, p. 332-338, 2017.

CNA (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil). **Mapeamento e quantificação da cadeia de hortaliças**. Brasília - DF: CNA, 2017.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide residues in food and feed**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/pesticides>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide Index**. Disponível em: < <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/> > Acesso em: 11 março. 2016.

COSTA, F. P.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in canned and fresh peach. **Food Chemistry**, v. 165, p. 587-593, 2014.

COSTA, V. I. B.; MELLO, M. S. C.; FRIEDRICH, K. Exposição ambiental e ocupacional a agrotóxicos e o linfoma não Hodgkin. **SAÚDE DEBATE**, v. 41, p. 49-62, 2017.

COSTA, L. G. Organophosphorus compounds at 80: some old and new issues. **Toxicological Sciences**, v. 162, p. 24-35, 2017.

CUI, L. *et al.* Simultaneous quantitation of trace level hydrazine and acetohydrazide in pharmaceuticals by benzaldehyde derivatization with sample 'matrix matching' followed by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1462, p. 73-79, 2016.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7748-7757, 2011.

CUNHA, S. C.; OLIVEIRA, C.; FERNANDES, J. O. Development of QuEChERS-based extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of bisphenol A and tetrabromobisphenol A in seafood: fish, bivalves, and seaweeds. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 409, p. 151-160, 2017.

D' AGOSTINHO, A.; FLUES, M. Determinação do coeficiente de distribuição (K_d) de benzo (a) pireno em solo por isotermas de sorção. **Química Nova**, v. 29, p. 657, 2006.

DAL FORNO, M. A. R. **Fundamentos em gestão ambiental**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2017.

DAOOD, H. G. *et al.* Carotenoid and antioxidant content of ground paprika from indoor-cultivated traditional varieties and new hybrids of spice red peppers. **Food Research International**, v. 65, p. 231-237, 2014.

DOGAN, A.; SELCUK, S.; ERKAN, M. Comparison of pesticide-free and conventional production systems on postharvest quality and nutritional parameters of peppers in different storage conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 207, p. 104-116, 2016.

DOMÉNECH, E.; MARTORELL, S. Assessment of safety margins of exposure to non-genotoxic chemical substances in food. **Food Control**, v. 79, p. 01-09, 2017.

DOMÍNGUEZ, A. M. *et al.* Analysis of tomato matrix effect in pesticide residue quantification through QuEChERS and single quadrupole GC/MS. **CHILEAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH**, v. 74, p. 148-156, 2014.

DONG, W. *et al.* Matrix Effects in Detection of Phthalate Esters from Wheat by a Modified QuEChERS Method with GC/MS. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 3166-3180, 2017.

DONG, H.; XIAO, K. Modified QuEChERS combined with ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine seven biogenic amines in Chinese traditional condiment soy sauce. **Food Chemistry**, v. 229, p. 502-508, 2017.

DUBUGRAS, M. T. B.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, E. **Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos**. Curso de sensibilização. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2008.

EC (EUROPEAN COMMISSION). **EU Pesticides database**. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

ELLISON, S. L.; THOMPSON, M. Standard additions: myth and reality. **Analyst**, v. 133, p. 992-997, 2008.

EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Pesticides**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>>. Acesso em: 07 mar. 2017.

FARAJZADEH, M. A. *et al.* Application of elevated temperature-dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides residues in aqueous samples followed by gas chromatography-flame ionization detection. **Food Chemistry**, v. 212, p. 198-204, 2016.

FENIK, J.; TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 814-826, 2011.

FERMAM, R. K. S.; ANTUNES, A. M. S. Uso de defensivos agrícolas, limites máximos de resíduos e impacto no comércio internacional: estudo de caso. **Revista de economia e Agronegócio**, v. 7, p. 197-214, 2009.

FERRER, C. *et al.* Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7634-7639, 2011.

FOOD SAFETY BRAZIL. **Como consultar os agrotóxicos que podem ser utilizados nos alimentos e quais os limites máximos**. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/como-consultar-os-agrotoxicos-que-podem-ser-utilizados-nos-alimentos-e-quais-os-limitesmaximos/>>. Acesso em: 03 mar. 2018.

FRANÇA, G. S. *et al.* Controle pós-colheita da antracnose do pimentão pela levedura *Rhodotorula glutinis*. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 451-459, 2015.

FRANS, F. *et al.* Environmental effects on growth and sporulation of *Fusarium* spp. causing internal fruit rot in bell pepper. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, p. 875 – 883, 2017.

FREITAS, S. S.; LANÇAS, F. M. Matrix effects observed during pesticides residue analysis in fruits by GC. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3698-3705, 2009.

GALLI, A. *et al.* Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de agrotóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 29, 105-112, 2006.

GERAGE, J. M. **Exposição aos resíduos de agrotóxicos por meio do consumo alimentar da população brasileira**. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

GERAGE, J. M.; MEIRA, A. P. G.; SILVA, M. V. da. Food and nutrition security: pesticide residues in food. **Nutrire**, v. 42, p. 01-09, 2017.

GHOTBADINI-BAHRAMAN, N.; SHEIBANI, A.; SHISHEHBORE, M. R. Off-line coupling of QuEChERS sample preparation to ion mobility spectrometry for the determination of chlorpyrifos residue in pistachio oil. **International Journal for Ion Mobility Spectrometry**, v. 20, p. 41-45, 2017.

GIACINTI, G. *et al.* Matrix-Matching as an Improvement Strategy for the Detection of Pesticide Residues. **Journal of Food Science**, v. 81, p. 342-350, 2016.

GIACINTI, G. *et al.* Evaluation and prevention of the negative matrix effect of terpenoidson pesticides in apples quantification by gaschromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1483, p. 08-19, 2017.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. **Talanta**, v. 79, p. 109-128, 2009.

GIUFFRIDA, D. *et al.* Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination . **Food Chemistry**, v. 140, p. 794-802, 2013.

GOLGE, O.; KABAK, B. Evaluation of QuEChERS sample preparation and liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry method for the determination of 109 pesticide residues in tomatoes. **Food Chemistry**, v. 176, p. 319-332, 2015a.

GOLGE, O.; KABAK, B. Determination of 115 pesticide residues in oranges by high-performance liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry in combination with QuEChERS method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 86-97, 2015b.

GOLGE, O.; HEPSAG, F.; KABAK, B. Health risk assessment of selected pesticide residues in green pepper and cucumber. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 51-64, 2018.

GOMES, L. M. M. *et al.* Inclusion complexes of red bell pepper pigments with β cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt. **Food Chemistry**, v. 148, p. 428-436, 2014.

GOMES, M. A. F.; BARIZON, R. R. M. Panorama da contaminação ambiental por agrotóxicos e nitrato de origem agrícola no Brasil: cenário 1992/2011. **Embrapa Meio Ambiente-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

GOMES, C. L. *et al.* Allergenic Fragrances Analysis in Brazilian Perfumes by Headspace Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Detector (HS-SPME-GC-MS). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 2136-2145, 2017.

GOMES, C. V.; FRINHANI, F. D. M. D. alimentação saudável como direito humano à saúde: uma análise das normas regulamentadoras da produção de alimentos orgânicos. **Leopoldianum**, v. 43, p. 73-93, 2017.

GÓMEZ-ALMENAR, M. C; GARCÍA-MESA, J. A. Determination of pesticide residues in olives by liquid extraction surface analysis followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Grasas y Aceites**, v. 66, p. 01-10, 2015.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. A. *et al.* Use of ammonium formate in QuEChERS for high-throughput analysis of pesticides in food by fast, low-pressure gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1358, p. 75-84, 2014.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. A. *et al.* Dissipation kinetics of organophosphorus pesticides in milled toasted maize and wheat flour (gofio) during storage. **Food Chemistry**, v. 229, p. 854-859, 2017.

GRIMALT, S.; DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1433, p. 1-23, 2016.

GRIMALT, S.; DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1433, p. 01-23, 2016.

GUEDES, J. A. C. *et al.* Matrix effect in guava multiresidue analysis by QuEChERS method and gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 199, p. 380-386, 2016.

GUIMARÃES, J. W. A. **Produção orgânica irrigada e rentabilidade do pimentão amarelo sob diferentes ambientes e dosagens de biofertilizante**. 2013. 102 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

GUPTA, R.C. **Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compound**. Elsevier Academic Press, 2006.

HAJŠLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticides residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v.1000, p. 181-197, 2000.

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

HAIŠLOVÁ, J.; CAJKA, T. Gas chromatography in food analysis. Em: **Handbook of Food Analysis Instruments**, Taylor & Francis Group, LLC, 2008.

HAKME, E. *et al.* Non-target evaluation of contaminants in honey bees and pollen samples by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 184, p. 1310-1319, 2017.

HALLOUM, W. *et al.* APCI as an innovative ionization mode compared with EI and CI for the analysis of a large range of organophosphate esters using GC-MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, p. 54-61, 2017.

HAN, L. *et al.* Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1449, p. 17-29, 2016.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2010.

HE, Z. *et al.* Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry-based method. **Food Chemistry**, v. 169, p. 372-380, 2015.

HONG, J. *et al.* Fundamental study of a novel membrane filtration cleanup method for pesticide analysis in agricultural products. **Food Control**, v. 64, p. 1-9, 2016.

HOU, X. *et al.* A multi-residue method for the determination of pesticides in tea using multi-walled carbon nanotubes as a dispersive solid phase extraction absorbent. **Food Chemistry**, v. 153, p. 121-129, 2014.

HOU, R. *et al.* Novel use of PVPP in a modified QuEChERS extraction method for UPLC-MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides in tea matrices. **Analytical Methods**, v. 7, p. 5521-5529, 2015.

HUBER, W. Basic calculations about the limit of detection and its optimal determination. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 08, p. 213-217, 2003.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). **Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas**. Brasília: Ibama/Diqua, 2017.

IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements). **The IFOAM NORMS for Organic Production and Processing - Version 2014**, 2014.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia). **DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos - Documento de caráter orientativo**. Revisão 01, 2003.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia). **DOQ-CGCRE-008 Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos: Documento de caráter orientativo**. Revisão 06, 2017.

JADON, K. S. *et al.* Management of blight of bell pepper (*Capsicum annuum* var. *grossum*) caused by *Drechslera bicolor*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 1020-1029, 2016.

JAHANMARD, E.; ANSARI, F.; FEIZI, M. Evaluation of Quechers sample preparation and GC mass spectrometry method for the determination of 15 pesticide residues in tomatoes used in salad production plants. **Iranian journal of public health**, v. 45, 230-238, 2016.

JALALI, N. *et al.* Electrophysiological changes in patients with acute organophosphorous pesticide poisoning. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 108, p. 251-255, 2011.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, p. 996-1012, 2009.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food e Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, p. 607-616, 2012.

JIANG, Z. *et al.* Determination of hymexazol in 26 foods of plant origin by modified QuEChERS method and liquid chromatography tandem-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 228, p. 411-419, 2017.

JOKANOVIĆ, M. **The Impact of Pesticides**. 1^a ed. USA: AcademyPublish.org®, 2012.

KAILASA, S. K.; WU, H. F.; HUANG, S. D. Recent Developments on Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticides in Wastewater. Em: **Waste Water-Treatment Technologies and Recent Analytical Developments**. InTech, 2013.

KAZEMI, M. *et al.* Organophosphate pesticides: a general review. **Agricultural Science Research Journals**, v. 2, p. 512-522, 2012.

KERLE, E. A.; JENKINS, J. J.; VOGUE, P. A. **Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection**. EM 8561-E, Oregon State University, Published January 1994, Reprinted April 2007, 1994.

KEMMERICH, M. *et al.* Optimization by Central Composite Design of a Modified QuEChERS Method for Extraction of Pesticide Multiresidue in Sweet Pepper and Analysis by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 08, p. 728-739, 2015.

KIRA, O.; LINKER, R.; DUBOWSKI, Y. Estimating drift of airborne pesticides during orchard spraying using active Open Path FTIR. **Atmospheric Environment**, v. 0, p. 264-270, 2016.

KO, A. Y. *et al.* Development of a simple extraction and oxidation procedure for the residue analysis of imidacloprid and its metabolites in lettuce using gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 148, p. 402-409, 2014.

KOLBERG, D. I. *et al.* Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC-MS. **Food chemistry**, v. 125, p. 1436-1442, 2011.

KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. **Science**, v. 341, p. 759-765, 2013.

KOWALSKI, J.; LUPO, S.; COCHRAN, J. Mitigating Matrix Effects: Examination of Dilution, QuEChERS, and Calibration Strategies for LC-MS/MS Analysis of Pesticide Residues in Diverse Food Types, **Restek**, v. xxx, p. 1-22, 2014.

KRUVE, A. *et al.* Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29-44, 2015.

KWON, H. *et al.* Compensation for matrix effects in GC analysis of pesticides by using cucumber extract. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 5481-5489, 2018.

LAMA, K. *et al.* Nutritional qualities and aroma volatiles of harvested red pepperfruits stored at suboptimal temperatures. **Scientia Horticulturae**, v. 213, p. 42-48, 2016.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 27-46, 2013.

LEE, Y. J. *et al.* Detection of three herbicide, and one metabolite, residues in brown rice and rice straw using various versions of the QuEChERS method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 210, p. 442-450, 2016.

LEHOTAY, S. J. *et al.* Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 595-614, 2005.

LEHOTAY, S. J. *et al.* Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 485-520, 2007.

LEMOS, M. F. *et al.* Monitoring of organophosphorous pesticide residues in samples of banana, papaya, and bell pepper. **Química Nova**, v. 38, p. 268-273, 2015.

LEMOS, J. *et al.* Risk assessment of exposure to pesticides through dietary intake of vegetables typical of the Mediterranean diet in the Basque Country. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 49, p. 35-41, 2016.

LEWIS, K.; TZILIVAKIS, J. Development of a data set of pesticide dissipation rates in/on various plant matrices for the Pesticide Properties Database (PPDB). **Data**, v. 2, p. 1-8, 2017.

LI, N. *et al.* A modified QuEChERS method for the determination of some herbicides in yogurt and milk by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v.105, p. 219-228, 2013.

LI, Y. F. *et al.* Determination of multiple pesticides in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic nanoparticles and gas chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1361, p. 77-87, 2014.

LI, W. *et al.* Measurement of pyrethroids and their environmental degradation products in fresh fruits and vegetables using a modification of the quick easy cheap effective rugged safe (QuEChERS) method. **Talanta**, v. 151, p. 42-50, 2016.

LI, D. *et al.* Molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of trace trichlorfon and monocrotophos residues in fruits. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 1284-1292, 2017a.

LI, J. *et al.* Simultaneous determination of 35 ultra-trace level organophosphorus pesticide residues in Sanjie Zhentong capsules of traditional Chinese medicine using ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 40, p. 999-1009, 2017b.

LIGIERO, C. B. P. *et al.* Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. **Química Nova**, v. 32, p. 1338-1341, 2009.

LIU, M. *et al.* Multiresidue determination of 29 pesticide residues in pepper through a modified QuEChERS method and gas chromatography–mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 30, p. 1686-1695, 2016.

LÓPEZ, M. G. *et al.* Evaluation and validation of an accurate mass screening method for the analysis of pesticides in fruits and vegetables using liquid chromatography–quadrupole-time of flight–mass spectrometry with automated detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1373, p. 40-50, 2014.

LORENZ, J. G. *et al.* Multivariate Optimization of the QuEChERS-GC-ECD Method and Pesticide Investigation Residues in Apples, Strawberries, and Tomatoes Produced in Brazilian South. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1583-1591, 2014.

LORENZ, J. G. **Otimização e validação dos métodos quecherscg/ecd e hs-spme-cg/ms para análise de agrotóxicos em maçã, morango e tomate**. 2015. 123 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

LOZANO, A. *et al.* Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: validation and pilot survey in real samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 109-122, 2012.

LOZANO, A. *et al.* Miniaturisation and optimisation of the Dutch mini-Luke extraction method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 192, p. 668-681, 2016.

ŁOZOWICKA, B.; RUTKOWSKA, E.; JANKOWSKA, M. Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 7124-7138, 2017.

LU, C. *et al.* Assessing Children's Dietary Pesticide Exposure: Direct Measurement of Pesticide Residues in 24-Hr Duplicate Food Samples. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 1625-1630, 2010.

LU, D. *et al.* A fast and easy GC-MS/MS method for simultaneous analysis of 73 pesticide residues in vegetables and fruits. **Analytical Methods**, v. 05, p. 1721-1732, 2013.

LU, C. *et al.* Neonicotinoid Residues in Fruits and Vegetables: An Integrated Dietary Exposure Assessment Approach. **Environmental science & technology**, v. 52, p. 3175-3184, 2018.

MACHADO, I. *et al.* Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC-MS and LC-MS/MS using the same QuEChERS procedure. **Food Chemistry**, v. 227, p. 227-236, 2017.

MACIEL, E. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de multirésíduos para quantificação de resíduos de agrotóxicos em manga (*Mangifera indica*)**. 2005. 86f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e de Agroecossistema) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J.; ANASTASSIADES, M. Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 8129-8137, 2005.

MADAIL, J. C. M.; BELARMINO, L. C.; BINI, D. A. Evolução da produção e mercado de produtos orgânicos no Brasil e no Mundo. **RCA-REVISTA CIENTÍFICA DA AJES**, v. 2, p. xxx, 2011.

MAHMOOD, N. *et al.* Effect of biostimulants on growth, yield and quality of bell pepper cv. yolo wonder. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 54, p. 311-317, 2017.

MANGAS, I. *et al.* New insights on molecular interactions of organophosphorus pesticides with esterases. **Toxicology**, v. 376, p. 30-43, 2017.

MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). **Manual de Aplicação do Selo Oficial para Produtos Orgânicos**. Brasília-DF. 2009.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Manual de Garantia de Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em alimentos**. Brasília, 2011.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Manual de procedimentos para registro de agrotóxicos**. Brasília, 2012.

MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). **Cadastro Nacional de Produtores Orgânicos**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/cadastro-nacional-produtores-organicos> >. Acesso em: 15 set. 2017.

MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). **Regularização da Produção Orgânica**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/regularizacao-da-producao>>. Acessado em: 11 de janeiro de 2018.

MARDANI-TALAEI, M. *et al.* Impact of Chemical, Organic and Bio-Fertilizers Application on Bell Pepper, *Capsicum annuum* L. and Biological Parameters of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hem.: Aphididae). **Neotropical Entomology**, v. 46, p. 578-586, 2017.

MARINI, F. S. *et al.* Panorama da certificação de produtos orgânicos no Brasil e dos instrumentos nacionais de garantia da conformidade: uma análise a partir do Cadastro Nacional de Produtores Orgânicos. **Gaia Scientia**, v. 10, p. 574-588, 2016.

MARQUELLI, W. A.; SILVA, W. L. C. *et al.* Irrigação na cultura do pimentão. **Circular Técnica 101**, Embrapa, 2012.

MARTINS, F. I. C. C. *et al.* Method Validation Using Normal and Weighted Linear Regression Models for Quantification of Pesticides in Mango (*Mangifera indica* L.) Samples. **Chromatographia**, v. 81, p. 677-688, 2018.

MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Toxicology and Journal of Chromatography A**, v. 10408, p. 259-272, 2004.

MARGNI, M. *et al.* Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 93, p. 379-392, 2002.

MATTOS, K. M. C. **A influência do marketing ambiental na decisão dos consumidores de produtos orgânicos**. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

MEDAETS, J. P.; FONSECA, D. A. **Produção orgânica: regulamentação nacional e internacional**. IICA, Brasília (Brasil) Ministerio do Desenvolvimento Agrário, Brasília (Brasil), 2005.

MEIRA, A. P. G. **Ingestão de resíduos de agrotóxicos potencialmente contidos na dieta habitual de escolares**. 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

MELO, A. *et al.* Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas-chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1071-1077, 2012.

MELO, L. F.; Araújo, A. E. Agroecologia e nutrição no combate a produção e consumo de agrotóxicos e na promoção de hábitos alimentares mais saudáveis. **Revista Lugares de Educação**, v. 6, p. 125-138, 2016.

MIN, Z. W. *et al.* Analysis of pesticide residues in brown rice using modified QuEChERS multiresidue method combined with electrospray ionization-liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 55, p. 769-775, 2012.

MOJSAK, P.; ŁOZOWICKA, B.; KACZYŃSKI, P. Estimating acute and chronic exposure of children and adults to chlorpyrifos in fruit and vegetables based on the new, lower toxicology data. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 159, p. 182-189, 2018.

MOKHTAR, M. *et al.* Capsaicinoids and Carotenoids in *Capsicum annuum* L.: Optimization of the Extraction Method, Analytical Characterization, and Evaluation of its Biological Properties. **Food Analytical Methods**, v. 09, p. 1381-1390, 2016.

MOOZ, E. D.; SILVA, M. V. D. Cenário mundial e nacional da produção de alimentos orgânicos. **Nutrire**, v. 39, p. 99-112, 2014.

MORAIS, C. M. Q. J. **Avaliação de método enzimático para monitorar a presença de agrotóxicos organofosforados em leite bovino**. 2009. 83 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

MORAES, M. D.; OLIVEIRA, N. A. M. Produção orgânica e agricultura familiar: obstáculos e oportunidades. **Desenvolvimento Socioeconômico em Debate**, v. 3, p. 19-37, 2017.

MORAES, A. E. L. *et al.* Gestão ambiental nas organizações rurais de produção orgânica do entorno de Campo Grande - MS: o caso de uma cooperativa. Em: **Sustentabilidade e Responsabilidade Social em Foco**, Volume 2, 1ª Edição, Organização Editora Poisson – Belo Horizonte - MG : Poisson, 2018.

MORAIS, E. H. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Pesticide determination in sweet peppers using QuEChERS and LC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 249, p. 77-83, 2018.

MOREIRA, S. O. *et al.* Resistência à mancha-bacteriana e características agronômicas de linhas recombinadas de *Capsicum annuum* L. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, p. 198-204, 2015.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, p. 157-177, 2013.

MOURA, A. P. Manejo Integrado de Pragas: Estratégias e Táticas de Manejo para o Controle de Insetos e Ácaros-praga em Hortaliças. **Circular Técnica 141**, 2015.

MOURA, A. P.; GUIMARÃES, J. A.; LIMA, M. F. Guia Prático para o Reconhecimento e Monitoramento das Principais Pragas na Produção Integrada de Pimentão. **Documentos 148**, 2015.

MORRISON, S. A. *et al.* Simultaneous extraction and cleanup of high-lipid organs from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) for multiple legacy and emerging organic contaminants using QuEChERS sample preparation. **Talanta**, v. 146, p. 16-22, 2016.

MUÑOZ, C. M. G.; GÓMEZ, M. G. S., SOARES, J. P. G.; JUNQUEIRA, A. M. R. Normativa de Produção Orgânica no Brasil: a percepção dos agricultores familiares do assentamento da Chapadinha, Sobradinho (DF). **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 54, p. 361-376, 2016.

MUÑOZ, N. C. *et al.* Determination of Pesticide Residues in Golden Berry (*Physalis peruviana* L.) by Modified QuEChERS Method and Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 02, p. 320 – 329, 2017.

NASCIMENTO, L. F. **Gestão Ambiental e Sustentabilidade**. Florianópolis: Departamento de Ciências da Administração/UFSC; [Brasília]: CAPES: UAB, 2012.

NASCIMENTO, H. O. *et al.* Recent Advances in the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Sugar Cane Spirits. Em: **Advances in Chromatographic Analysis**, Avid Science, 2017.

NETO, N. C. *et al.* Produção orgânica: uma potencialidade estratégica para a agricultura familiar. **Revista Percurso**, v. 2, p. 73-95, 2010.

NUNES JÚNIOR, E. S. *et al.* Nitrogen and potassium fertigation in bell pepper cultivated in greenhouse using fertigation managements. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, p. 186-190, 2017.

OLIVEIRA-SILVA, J. J. *et al.* Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 130-135, 2001.

ORGANICSNET. **Manual de Certificação de Produtos Orgânicos**. Disponível em: <http://www.organicsnet.com.br/certificacao/manual-certificacao/>>. Acessado em: 11 de janeiro de 2018.

OSHITA, D; JARDIM, I. C. S. F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v. 04, p. 52-76, 2012.

PADUA, J. B.; SCHLINDWEIN, M. M.; GOMES, E. P. Agricultura familiar e produção orgânica: uma análise comparativa considerando os dados dos censos de 1996 e 2006. **Interações**, v. 14, n. 2, p. 225-235, 2013.

PAN, H. *et al.* Spatial distribution of organochlorine and organophosphorus pesticides in soil-groundwater systems and their associated risks in the middle reaches of the Yangtze River Basin. **Environmental geochemistry and health**, v. xxx, p. 1-13, 2017.

PANUWET, P. *et al.* Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, p. 93- 105, 2016.

PASCHOARELLI, L. C.; MENEZES, M. S. **Design e ergonomia: aspectos tecnológicos**. SciELO-Editora UNESP, 2009.

PAZ, M. *et al.* Validation of QuEChERS method for organochlorine pesticides analysis in tamarind (*Tamarindus indica*) products: Peel, fruit and commercial pulp. **Food Control**, v. 54, p. 374-382, 2015.

PAYÁ, P. *et al.* Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1697-1714, 2007.

PEDROSO, R.; NETO, R. A. **Como o K_{oc} , o pka e o K_{ow} influenciam na dinâmica de herbicidas no solo?**. Disponível em: <<https://phytusclub.com/materiais-didaticos/como-o-koc-o-pka-e-o-kow-influenciam-na-dinamica-de-herbicidas-no-solo/>>. Data de acesso: 5 de julho de 2018.

PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. Diagnose e controle alternativo de doenças em tomate, pimentão, cucurbitáceas e cenoura. **Circular técnica 121**, Embrapa, 2013.

PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B.; CARVALHO, A. D. F. Manejo do oídio em pimentão: um desafio em cultivo protegido. **Comunicado técnico 94**, Embrapa, 2013.

PEREIRA, R. B. *et al.* Guia Prático para Identificação de Doenças na Produção Integrada de Pimentão. **Documentos 149**, Embrapa, 2015.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1995.

PINHO, G. P. **Extração de agrotóxicos em amostras de tomate pelas técnicas: extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (esl-pbt) e dispersão da matriz em fase sólida (dmfs) para análise por cromatografia gasosa**. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

PINHO, G. P. *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa Matrix effect in pesticide quantification by gas chromatography. **Química Nova**, v. 32, p. 987-995, 2009.

PINHO, G. P. D. *et al.* Evaluation of pesticide adsorption in gas chromatographic injector and column. **Química Nova**, v. 35, p. 738-742, 2012.

PIRSAHEB, M. *et al.* Evaluation of abamectin, diazinon and chlorpyrifos pesticide residues in apple product of Mahabad region gardens: Iran in 2014. **Food Chemistry**, v. 231, p. 148-155, 2017.

PIZZUTTI, I. R. *et al.* Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation. **Food Chemistry**, v. 209, p. 248-255, 2016.

POOLE, C. F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 241-250, 2007.

PORTOLÉS, T. *et al.* Validation of a qualitative screening method for pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. **Analytica Chimica Acta**, v. 838, p. 76-85, 2014.

PRESTES, O. D. *et al.* QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 03, p. 51-64, 2011.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. validação de método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 35, p. 185-192, 2012.

QUIJANO, L. *et al.* Chronic cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus, carbamate and pyrethroid and pyrethrin pesticides through fruit and vegetables consumption in the region of Valencia (Spain). **Food and Chemical Toxicology**, v. 89, p. 39-46, 2016.

RAI, S. *et al.* Comparative Evaluation of QuEChERS Method Coupled to DLLME Extraction for the Analysis of Multiresidue Pesticides in Vegetables and Fruits by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 09, p. 2656-2669, 2016.

REBELO, A. M. *et al.* Simultaneous Determination of Herbicides in Rice by QuEChERS and LC-MS/MS Using Matrix-Matched Calibration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 186-193, 2016.

REICHERT, B. *et al.* Validation and application of micro flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in fruit jams. **Talanta**, v. 134, p. 415-424, 2015.

RESTREPO, A. R. *et al.* QuEChERS GC-MS validation and monitoring of pesticide residues in different foods in the tomato classification group. **Food Chemistry**, v. 158, p. 153-161, 2014.

REZG, R. *et al.* Organophosphorus pesticides as food chain contaminants and type 2 diabetes: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 345-357, 2010.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008a.

RIBEIRO, M. L. *et al.* Agrotóxicos: usos e riscos para o meio ambiente. **Holos environment**, v. 8, p. 53-71, 2008.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de saúde pública**, v. 30, p. 1360-1362, 2014.

RIVERA, A. *et al.* Assessing genetic and phenotypic diversity in pepper (*Capsicum annuum* L.) landraces from North-West Spain. **Scientia Horticulturae**, v. 203, p. 01-11, 2016.

RIZZETTI, T. M. *et al.* Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 196, p. 25-33, 2016.

ROBERTS, J. R.; REIGART, J. R. **Recognition and management of pesticide poisonings**. 6. ed., EPA, 2013.

ROMANELLI, S. *et al.* Evaluation of a QuEChERS-like extraction approach for the determination of PBDEs in mussels by immuno-assay-based screening methods. **Talanta**, v. 170, p. 540-545, 2017.

ROUSIS, N. I.; ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S. Monitoring population exposure to pesticides based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement of their urinary metabolites in urban wastewater: A novel biomonitoring approach. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 1349-1357, 2016.

RUTKOWSKA, E., ŁOZOWICKA, B., KACZYŃSKI, P. Modification of Multiresidue QuEChERS Protocol to Minimize Matrix Effect and Improve Recoveries for Determination of Pesticide Residues in Dried Herbs Followed by GC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 709-724, 2018.

SABIN, G. P. *et al.* Aumento da resposta analítica por meio da otimização do sistema de injeção sem divisão de fluxo em cromatografia gasosa empregando a lei dos gases ideais. **Química Nova**, v. 34, p. 414-418, 2011.

SAFE WORK AUSTRALIA. **Health monitoring for exposure to hazardous chemicals guide for persons conducting a business or undertaking**, 2013.

SAMBUICHI, R. H. R. *et al.* Análise da construção da Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica no Brasil. **Texto para Discussão No. 2305**. IPEA (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada), 2017.

SAMPAIO, M. R. *et al.* A method for the determination of multiclass pesticides in sugarcane juice employing QuEChERS and LC-ESI-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 5, p. 2028-2033, 2013.

SANTE. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** European Commission, Document n° SANTE/11813/2017.

SANTOS, P. R. *et al.* Desempenho de linhagens e híbridos de pimentão em dois sistemas de poda no cultivo hidropônico. **Horticultura Brasileira**, v. 35, p. 129-134, 2017.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C. *et al.* Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. **Analytical sciences**, v. 21, p. 1291-1296, 2005.

SAPAHIN, H. A.; MAKAHLEH, A.; SAAD, B. Determination of organophosphorus pesticide residues in vegetables using solid phase micro-extraction coupled with gas chromatography–flame photometric detector. **Arabian Journal of Chemistry**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2015.

SAVANT, R. H. *et al.* Multiresidue Analysis of 50 Pesticides in Grape, Pomegranate, and Mango by Gas Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1447-1454, 2010.

SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food?. **Journal of Chromatography A**, v. 868, p. 51-61, 2000.

SCHENCK, F. J. *et al.* A Rapid Multiresidue Method for Determination of Pesticides in Fruits and Vegetables by Using Acetonitrile Extraction/Partitioning and Solid-Phase Extraction Column Cleanup. **Journal of AOAC International**, v. 91, p. 422-438, 2008.

SCHENK, G. *et al.* Organophosphate-degrading metallohydrolases: Structure and function of potent catalysts for applications in bioremediation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 317, p. 122-131, 2016.

SCHOR, N. *et al.* Development of a robotic detection system for greenhouse pepper plant diseases. **Precision Agriculture**, v. 18, p. 394-409, 2017.

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). **O mercado para os produtos orgânicos está aquecido.** Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-mercado-para-os-produtos-organicos-esta-aquecido,5f48897d3f94e410VgnVCM1000003b74010aRCRD>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

SHAPIRO, G. D. *et al.* Exposure to organophosphorus and organochlorine pesticides, perfluoroalkyl substances, and polychlorinated biphenyls in pregnancy and the association with impaired glucose tolerance and gestational diabetes mellitus: The MIREC Study. **Environmental research**, v. 147, p. 71-81, 2016.

SHARMA, D. *et al.* Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. **Talanta**, v. 82, p. 1077-1089, 2010.

SHUKLA, V. R. *et al.* Persistence of Pesticides in Capsicum (*Capsicum annuum* L.) under Greenhouse and Open Field. **Pesticide Research Journal**, v. 28, p. 159-167, 2016.

SHEN, C. *et al.* Determination of 17 pyrethroid residues in troublesome matrices by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization. **Talanta**, v. 84, p. 141-147, 2011.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 02, p. 21-25, 2011.

SILVA, H. J.; SAMARAWICKREMA, N. A.; WICKREMASINGHE, A. R. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure?. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 803-806, 2006.

SILVA, R. O. *et al.* Liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry method for determination of twenty multi-class pesticide residues in cashew. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, p. 21-25, 2014a.

SILVA, R. O. *et al.* Liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry method for determination of twenty multi-class pesticide residues in cashew. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, p. 21-25, 2014b.

SILVA, Á. T. da; SILVA, S. T. da. **Panorama da agricultura orgânica no Brasil**. Segurança Alimentar e Nutricional, v. 23, 1031-1040, 2016.

SILVA, J. S.; MELO, F. V. S; MELO, S. R. S. Selo de certificação de produto orgânico: o consumidor se importa?. **Revista Alcance**, v. 23, p. xxx , 2016.

SILVA, W. B. da. Os riscos no uso indiscriminado de agrotóxicos: uma contaminação invisível. **INTESA – Informativo Técnico do Semiárido**, v. 11, p. 11-19, 2017.

SINGH, Y.; MANDAL, K.; SINGH, B. Dissipation pattern and risk assessment studies of triazophos residues on capsicum (*Capsicum annum* L.) using GLC-FPD and GC-MS. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, p. 637-644, 2015.

SINYANGWE, D. M.; MBEWE, B.; SIJUMBILA, G. Determination of dichlorvos residue levels in vegetables sold in Lusaka, Zambia. **Pan African Medical Journal**, v. 23, p. 01-07, 2016.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª ed. Norte-americana. 1 ed., São Paulo: Cengage Learning, 2005.

SŁOWIK-BOROWIEC, M. Validation of a QuEChERS-Based Gas Chromatographic Method for Multiresidue Pesticide Analysis in Fresh Peppermint Including Studies of Matrix Effects. **Food Analytical Methods**, v. 08, p. 1413-1424, 2015.

SOARES, W. L.; FREITAS, E. A. V. D.; COUTINHO, J. A. G. Trabalho rural e saúde: intoxicações por agrotóxicos no município de Teresópolis-RJ. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 43, p. 685-701, 2005.

SOUSA, F. A. *et al.* Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry**, v. 135, p. 179-185, 2012.

SOUSA, F. A. *et al.* Influence of pH and Matrix Components in the Chromatographic Response of Pesticides. **Chromatographia**, v. 76, p. 67-73, 2013a.

SOUSA, J. S. *et al.* Evaluation of an analytical methodology using QuEChERS and GC-SQ/MS for the investigation of the level of pesticide residues in Brazilian melons. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2675-2681, 2013b.

SOUZA, Â. R. L.; MACHADO, J. A. D.; DALCIN, D. Análise de estudos internacionais sobre os fatores que influenciam a decisão dos agricultores pela produção orgânica. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 8, p. 563-583, 2015.

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. In Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE). **Revista do Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, v. xxx, p. 1-9, 2006.

SRIVASTAVA, A. *et al.* Simultaneous determination of multiclass pesticide residues in human plasma using a mini QuEChERS method. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, p. 3757-3765, 2017.

STACHNIUK, A.; FORNAL, E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. **Food Analytical Methods**, v. 09, p. 1654-1665, 2016.

STÜTZER, G; GUIMARÃES, G. Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários. Em: **O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. Viçosa-Minas Gerais, 2003.

STOYTCHIEVA, M.; ZLATEV, R. Organophosphorus Pesticides Analysis. Em: **Pesticides in the Modern World – Trends in Pesticides Analysis**, 2011a.

STOYTCHIEVA, M. Organophosphorus Pesticides - Mechanisms Of Their Toxicity. Em: **Pesticides - The Impacts of Pesticide Exposure - Mechanisms Of Their Toxicity**, 2011b.

SUN, M. *et al.* Matrix deactivation: A general approach to improve stability of unstable and reactive pharmaceutical genotoxic impurities for trace analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 30-36, 2010.

SURMA, S. *et al.* Optimization of QuEChERS sample preparation method for acrylamide level determination in coffee and coffee substitutes. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 98-102, 2017.

TAVELLA, L. B. *et al.* O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, p. 06-12, 2012.

TOLOSA, I.; CASSI, R.; HUERTAS, D. A new marine sediment certified reference material (CRM) for the determination of persistent organic contaminants: IAEA-459. **Environmental Science and Pollution Research**, v. xxx, p. 1-9, 2018.

TRECHA, C. O.; LOVATTO, P. B.; MAUCH, C. R. Entraves do cultivo convencional e as potencialidades do cultivo orgânico do pimentão no Brasil. **Revista Thema**, v. 14, p. 291-302, 2017.

TUZIMSKI, T.; REJCZAK, T. Application of HPLC–DAD after SPE/QuEChERS with ZrO₂-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. **Food Chemistry**, v. 190, p. 71-79, 2016.

UCLÉS, A. *et al.* Application of zirconium dioxide nanoparticle sorbent for the clean-up step in post-harvest pesticide residue analysis. **Talanta**, v. 144, p. 51-61, 2017, 2015.

UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE DATABASE. **Pesticide Properties DataBase – PPDB**. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>>. Acesso em: out. de 2016.

URBAN, M.; LESUEUR, C. Comparing d-SPE Sorbents of the QuEChERS Extraction Method and EMR-Lipid for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH₄) in Food of Animal and Plant Origin. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 2111-2124, 2017.

USDA (United States Department of Agriculture). **Pesticide Data Program – Annual Summary, Calendar Year 2014**. 2016.

VALLES, N. B. *et al.* Determination of chlorothalonil in difficult-to-analyse vegetable matrices using various multiresidue methods. **Analyst**, v. 137, p. 2513-2520, 2012.

VÉRAS, M. L. M. *et al.* Influência da aplicação de urina de vaca em pimentão (*Capsicum annuum* L.) em função de adubos orgânicos. **Revista Agrotec**, v. 36, p. 222-228, 2015.

VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. C. O.; PARENTE, G. B. Controle das Principais Doenças do Pimentão Cultivado nas Regiões Serranas do Estado do Ceará. **Comunicado técnico 132**, Embrapa, 2007.

XIAN, Y. *et al.* QuEChERS-based purification method coupled to ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) to determine six quaternary ammonium compounds (QACs) in dairy products. **Food Chemistry**, v. 212, p. 96-103, 2016.

XIN, J. *et al.* Molecularly imprinted polymer as sorbent for solid-phase extraction coupling to gas chromatography for the simultaneous determination of trichlorfon and monocrotophos residues in vegetables. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 274-281, 2013.

XU, Y. *et al.* A strategy for the evaluation of an analytical approach for selected pesticide residues in complex agricultural product matrices - A case study of leek. **Food Chemistry**, v. 221, p. 205-213, 2017.

ZAINUDIN, B. H. *et al.* Development, validation and determination of multiclass pesticide residues in cocoa beans using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 172, p. 585-595, 2015.

ZAMBERLAN, J. F. *et al.* Produção E Manejo Agrícola: Impactos E Desafios Para Sustentabilidade Ambiental. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, edição especial, p. 95-100, 2014.

ZIVAN, O.; SEGAL-ROSENHEIMER, M.; DUBOWSKI, Y. Airborne organophosphate pesticides drift in Mediterranean climate: the importance of secondary drift. **Atmospheric Environment**, v. 127, p. 155-162, 2016.

ZIVAN, O.; BOHBOT-RAVIV, Y.; DUBOWSKI, Y. Primary and secondary pesticide drift profiles from a peach orchard. **Chemosphere**, v. 177, p. 303-310, 2017.

ZOCCALI, M. *et al.* Miniaturization of the QuEChERS Method in the Fast Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Pesticide Residues in Vegetables. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 2636-2645, 2017.

YU, F. *et al.* Determination of multi-pesticide residue in tobacco using multi-walled carbon nanotubes as a reversed-dispersive solid-phase extraction sorbent. **Journal of separation science**, v. 38, p. 1894-1899, 2015.

YU, R. *et al.* Concentrations of organophosphorus pesticides in fresh vegetables and related human health risk assessment in Changchun, Northeast China. **Food Control**, v.60, p. 353-360, 2016.

YUDTHAVORASIT, S.; MEECHAROEN, W.; LEEPIPATPIBOON, N. (2015). New practical approach for using an analyte protectant for priming in routine gas chromatographic analysis. **Food Control**, v. 48, p. 25-32, 2015.

WALORCZYK, S. *et al.* Pesticide residues determination in Polish organic crops in 2007–2010 applying gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 139, p. 482-487, 2013.

WALORCZYK, S. *et al.* Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic–tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in black currants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. **Talanata**, v. 120, p. 106-113, 2014.

WANG, J. L. *et al.* Determination of organophosphorus pesticide residues in vegetables by an enzyme inhibition method using α -naphthyl acetate esterase extracted from wheat flour. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 13, p. 267-273, 2012.

WANG, P. *et al.* Determination of flumetsulam residues in 20 kinds of plant-derived foods by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 7, p. 5772-5779, 2015.

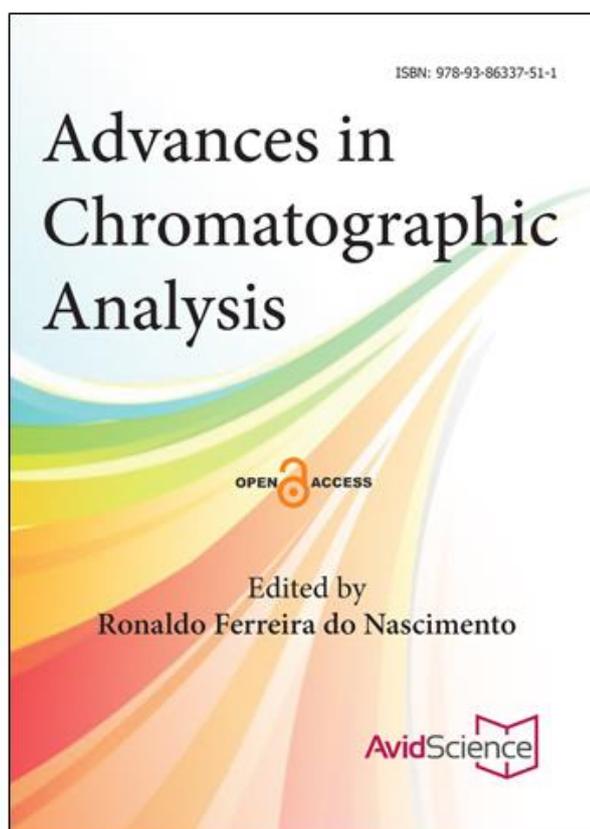
WANG, X. C. *et al.* QuEChERS followed by dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for organochlorine pesticides analysis in fish. **Talanta**, v. 162, p. 90-97, 2017.

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

WILLER, H.; LERNOUD, J. **The world of organic agriculture - Statics and emerging trends 2016**. Rheinbreitbach: IFOAM/FIBL, 2016.

WILLER, H.; LERNOUD, J. **The world of organic agriculture - Statics and emerging trends 2017**. Rheinbreitbach: IFOAM/FIBL, 2017.

WU, C. C. Multiresidue method for the determination of pesticides in Oolong tea using QuEChERS by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 229, p. 580-587, 2017.

ANEXO A – PUBLICAÇÃO DE CAPÍTULO DE LIVRO

First Published **November 13, 2017**

Chapter 5

Recent Advances in the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Sugar Cane Spirits

Hélio Oliveira do Nascimento¹, Daniel Barbosa Alcântara¹, Carlos Pedro Gonçalves do Nascimento², Pablo Gordiano Alexandre Barbosa¹, Carla Bastos Vidal¹, Vítor Paulo Andrade da Silva¹, Elisane Longhinotti¹, Patricia-Grinberg², Tatiana Sainara Maia Fernandes³ and Ronaldo Ferreira do Nascimento^{2*}

ANEXO B – PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS

ADVANCES IN APPLIED CERAMICS, 2018
<https://doi.org/10.1080/17436753.2018.1462296>

 The Institute of Materials,
Minerals and Mining

 Taylor & Francis
Taylor & Francis Group



Study of the structural and dielectric properties of ceramic obtained from residual electrocoagulation

T. S. M. Fernandes^a, R. G. M. Oliveira ^b, D. X. Gouveia^c, M. A. S. Silva ^b, A. S. B. Sombra^b and R. F. Nascimento^d

^aDepartment of Hydraulic and Environmental Engineering, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil; ^bTelecommunications and Materials Science and Engineering Laboratory (LOCEM) – Physics Department, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil; ^cIFCE – Instituto Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil; ^dDepartment of Analytical Chemistry and Physical Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180094>

Article

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-9, 2018
 Printed in Brazil - ©2018 Sociedade Brasileira de Química



Organophosphorus Pesticide in Sapodilla (*Manilkara zapota*) Fruit

*Daniel B. Alcântara,^a Mario S. O. Paz,^a Tigressa H. S. Rodrigues,^b
 Tatiana S. M. Fernandes,^c Pablo G. A. Barbosa,^a Adonay R. Loiola,^d Patricia Grinberg,^e
 Guilherme J. Zocolo,^f Edy S. de Brito^f and Ronaldo F. do Nascimento^{*a}*

^aDepartamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará,
 R. Humberto Monte S/N, Pici, 60455-700 Fortaleza-CE, Brazil

^bDepartamento de Química, Universidade Estadual Vale do Acaraú,
 Av. Universidade 850, 62040-370 Sobral-CE, Brazil

^cDepartamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Bloco 713,
 Avenida Humberto Monte S/N, Campus do Pici, 60451-970 Fortaleza-CE, Brazil

^dDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará,
 R. Humberto Monte S/N, Pici, 60455-700 Fortaleza-CE, Brazil

^eNational Research Council Canada, 1200 Montreal Rd, K1A0R6 Ottawa, Canada

^fEmbrapa Agroindústria Tropical, R. Dra Sara Mesquita, 2270, 60511 110 Fortaleza-CE, Brazil