

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS
EM TOMATE PARA FINS DE ACREDITAÇÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jonatan Vinicius Dias

Santa Maria, RS, Brasil

2014

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TOMATE PARA FINS DE ACREDITAÇÃO

Jonatan Vinicius Dias

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ionara Regina Pizzutti

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS
EM TOMATE PARA FINS DE ACREDITAÇÃO**

elaborada por
Jonatan Vinicius Dias

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

**Profª Drª Ionara Regina Pizzutti
(Orientadora)**
Universidade Federal de Santa Maria

Profª Drª Morgana Pizzolato
Universidade Federal de Santa Maria

Profª Drª Rosselei Caiél da Silva
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Santa Maria, 17 de janeiro de 2014

Para os meus pais Francisco e Inês, que fizeram o impossível para que eu pudesse realizar meus sonhos. Cada palavra desse trabalho foi escrita pensando em vocês.

“Demore o tempo que for para ver o que você quer da vida, e depois de decidir não recue ante a nenhum pretexto porque o mundo tentará te dissuadir.”

Zaratrusta

“Uma hora ou outra o destino se ajeita, as coisas se acertam, o passado é esquecido, as dores cicatrizam. Quem tem que ficar fica, o que é verdadeiro permanece, e o que não é some. Não tenha pressa, não guarde mágoas, não queira pouco...sempre queira o melhor. Espere. Aprenda a ser paciente. Aprenda a ouvir uma boa música quando a tristeza bater. Aprenda a ignorar o que te faz mal. Aprenda, sobretudo, a ter fé. Fé de que, por mais difícil que seja, o universo sempre irá conspirar a seu favor.”

Luiz Moreno

*“Para ser grande, sê inteiro:
nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
brilha, porque alta vive.”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades que colocou no meu caminho e por sempre ter me guiado em fazer as escolhas certas.

Aos meus pais Inês e Francisco. Não tenho palavras que expressem todo o amor, carinho e admiração que sinto por vocês. Obrigado por todos os ensinamentos, todo o cuidado e por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Se hoje sou o que sou é porque tenho vocês ao meu lado. Eu amo vocês.

À Prof.^a Dr^a Ionara Regina Pizzutti pela orientação nesse trabalho e por tudo que me ensinastes nesses seis anos de convivência quase diária. Agradeço por ter feito parte deste trabalho desde o início, abrindo mão do seu tempo para que fosse ao laboratório realizar a parte prática para que pudéssemos comparar resultados. Obrigado por todo conhecimento passado a mim, pela confiança em trabalhar em um projeto tão importante e pela amizade sincera que compartilhamos.

À Prof.^a Dr^a Carmem Dickow Cardoso pela coorientação e por toda a ajuda durante a minha caminhada. Agradeço por ter me incentivado desde o início a trabalhar no sistema de gestão da qualidade e por toda a ajuda e apoio na elaboração dos documentos que me eram solicitados e discussão buscando sempre a melhora do nosso SGQ. Obrigado pela amizade e confiança desde o meu início no CEPARC.

Ao Dr. André de Kok pelo acompanhamento no desenvolvimento desse trabalho e por todo o conhecimento passado através de e-mails e discussões.

À Suelen pelo carinho, companheirismo e incentivo na realização deste trabalho. Obrigado por estar sempre me impulsionando e me dando forças pra continuar e finalizar mais essa etapa. Que Deus me dê a graça de poder te ter ao meu lado por toda a minha vida. Eu te amo.

À toda a minha família pela preocupação e orações constantes durante toda minha vida acadêmica.

Aos meus mais que amigos Laís, Wagner e Karla. Sei que mesmo de longe há o incentivo de cada um para que essa conquista fosse possível. Obrigado por tudo que eu pude aprender com vocês no decorrer dos anos. É muito bom saber que vocês sempre estarão presentes, mesmo que em pensamento, apesar do tempo ou da distância.

Aos meus amigos de Jóia, em especial à Natani que mesmo nos momentos mais difíceis nunca deixou de estar presente. Obrigado por todos esses anos de amizade verdadeira que construímos. São pessoas assim que eu quero ao meu lado.

À toda equipe do CEPARC que participou direta ou indiretamente deste trabalho. Em especial à Giovana e à Bárbara por todo carinho, suporte e momentos de descontração ao longo desses dois anos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TOMATE PARA FINS DE ACREDITAÇÃO

Autor: Jonatan Vinicius Dias
Orientadora: Prof.^a Dr^a Ionara Regina Pizzutti
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de janeiro de 2014.

O desenvolvimento e validação do método analítico para determinação de 51 agrotóxicos em tomate por UPLC-MS/MS foi realizado a fim de atender ao requisito 5.4.5 (Validação de Métodos) da norma NBR ISO/IEC 17025:2005 e seguindo o documento orientativo DOQ-CGCRE-008 (Orientação sobre validação de métodos analíticos). Esse item descrito na norma é de fundamental importância para que o laboratório possa ser acreditado pelo INMETRO.

A validação do método seguiu todos os parâmetros de validação, tal como a linearidade das curvas analíticas, limites de detecção e quantificação, efeito matriz, exatidão e precisão do método. Os agrotóxicos estudados neste trabalho foram determinados por UPLC- MS/MS no modo de ionização ESI positivo.

As soluções estoque dos agrotóxicos foram preparadas em solvente orgânico compatível com a solubilidade de cada substância. Essas soluções foram preparadas por dois analistas distintos a fim de validar o preparo dessas a partir da comparação das áreas das injeções realizadas (n=7) de cada solução individual. Após avaliação, 43 das 51 soluções estudadas mostraram resultados dentro da faixa de $\pm 10\%$ demonstrando a excelente qualidade no preparo dessas soluções.

Os agrotóxicos estudados foram extraídos das amostras de tomate utilizando o método mini Luke o qual faz o uso de uma mistura 1:1: 1 (v/v/v) de acetona/éter de petróleo/diclorometano como solvente extrator. Após extração, o extrato em solvente orgânico foi evaporado e ressuspenso em solvente apropriado (metanol acidificado com 0,1% ácido acético) para análise por UPLC-MS/MS.

O estudo de fortificação e recuperação dos analitos foi realizado nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, por dois analistas, e 7 replicatas ($n=7$) para cada concentração, além das amostras “branco” (sem conter os agrotóxicos). Os limites de detecção e quantificação do instrumento e do método foram determinados, bem como a linearidade das curvas analíticas avaliadas através do coeficiente de determinação (r^2), faixa linear dinâmica de trabalho, exatidão através do estudo de fortificação e recuperação (%) dos analitos, precisão (RSD%) e efeito matriz. Dos 51 agrotóxicos estudados, 46 apresentaram recuperação média na faixa de 81 a 115 % para todas as concentrações avaliadas. Com relação à precisão, 92% dos agrotóxicos demonstraram RSD% abaixo de 18,7% na menor concentração de fortificação. O limite de quantificação do método, para 82% dos agrotóxicos, foi a concentração de fortificação mais baixa estudada (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$). O efeito matriz observado foi inferior a $\pm 20\%$ para todos os agrotóxicos avaliados, demonstrando assim que não há supressão ou aumento considerável no sinal do analito.

Para todos os agrotóxicos estudados os resultados de precisão intermediária (onde foram avaliados diferentes analistas em diferentes dias) ficaram abaixo de 20% demonstrando a repetitividade satisfatória do método proposto.

Palavras-chave: Validação. Acreditação. Agrotóxicos. Método Multirresíduo. UPLC-MS/MS.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN TOMATO FOR ACCREDITATION PURPOSE

Author: Jonatan Vinicius Dias
Advisor: Prof.^a Dr^a Ionara Regina Pizzutti
Place and Date: Santa Maria, January 17th, 2013.

The optimization and validation of an analytical method for 51 pesticides determination in tomato, using UPLC-MS/MS, was developed in order to fulfill the requirement 5.4.5 (Method Validation) of the NBR ISO/IEC 17025:2005 and following the orientation document DOQ-CGCRE-008 (Orientation of analytical methods validation). This item is very important to a laboratory to be accredited by INMETRO (Brazilian accreditation body).

The method validation was carried out following all the validation parameters, such as linearity of the analytical curves, limits of detection and quantification, matrix effects, accuracy and precision of the method. The studied compounds in this work were determined by UPLC-MS/MS in the positive ESI ionization mode.

The stock solutions of the pesticides were prepared in organic solvent compatible with the compound solubility. These solutions were prepared by two different analysts in order to validate the preparation by comparing the areas of the injections ($n=7$) of each individual solution. After evaluation, 43 from 51 studied solutions showed results between the acceptable range of $\pm 10\%$ demonstrating the satisfactory quality of solutions preparation.

The evaluated pesticides were extracted from tomatoes applying the mini Luke method with a mixture 1:1:1 (v/v/v) of each acetone/petroleum ether/dichloromethane solvent as extraction solvent. After extraction, the organic solvent extract was evaporate and reconstituted in appropriate solvent (acidified methanol with 0.1% acetic acid) for UPLC-MS/MS analysis.

The recovery experiments were done at 10, 20 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ spike levels, by two analysts in different days, and 7 replicates ($n=7$) for each spike level plus the “blank” matrix (without pesticides). The limits of detection and quantification for the instrument and method were estimated, as well as the linearity of the analytical curves evaluated based on determination coefficient (r^2), dynamic linear range, accuracy by recovery experiments (%), precision (RSD%) and matrix effect. From the 51 studied compounds, 46 showed recoveries between the range of 81 – 115% for all the evaluated spike levels. About precision, 92% of the compounds showed RSD% below 18.7% in the lowest spike level. The quantification limit of the method, for 82% from all evaluated compounds, was the lowest spike level studied ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$). The matrix effect observed was between $\pm 20\%$ for all evaluated compounds, showing that there is not considerable suppression or enhancement in the analytes signal.

For all evaluated pesticides the intermediate precision was below 20% of RSD showing the good repeatability of the method.

Key words: Validation. Accreditation. Pesticides. Multiresidue Method. UPLC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Divisão dos requisitos da direção e requisitos técnicos da NBR ISO/IEC 17025:2005	27
Figura 2 – Participação percentual dos estados produtores de tomate para processamento na safra 2012. (Fonte: MELO, 2012).....	32
Figura 3 – Fluxograma do método multirresíduo empregado para extração e análise de agrotóxicos em tomate.....	60
Figura 4 – Curvas analíticas para agrotóxico que apresentou (A) efeito matriz negativo (Teflubenzurom) e (B) efeito matriz não considerável (Etofemproxe).....	76
Figura 5 – Cromatogramas dos agrotóxicos Etofemproxe e Teflubenzurom quando analisados em solvente orgânico (A1 e B1) e em extrato da matriz (A2 e B2) na concentração de 5 ng mL ⁻¹	77
Figura 6 – Recuperações (%) para os agrotóxicos estudados nos 3 níveis de fortificação (10, 20 e 50 µg kg ⁻¹).	82
Figura 7 – Valores de RSD% para os agrotóxicos estudados nos 3 níveis de fortificação (10, 20 e 50 µg kg ⁻¹).	82
Figura 8 – Número de agrotóxicos que apresentaram o LOQm como sendo 10, 20 ou 50 µg kg ⁻¹ . n.f.r = não atendeu aos critérios estabelecidos; n.d = não detectado.....	83
Figura 9 – Cromatogramas MRM para dimetoato: 1) 1 ^a transição e 2) 2 ^a transição obtidos por UPLC-MS/MS modo ESI positivo para A) solução analítica preparada no extrato “branco” de tomate na concentração de 2 ng mL ⁻¹ ; B) extrato “branco” de tomate; C) tomate fortificado a 10 µg kg ⁻¹ ; D) tomate fortificado a 20 µg kg ⁻¹ e E) tomate fortificado a 50 µg kg ⁻¹	84
Figura 10 – Precisão intermediária avaliada através do RSD% para as três concentrações de fortificação estudadas (10, 20 e 50 µg kg ⁻¹).	90
Figura 11 – LOD e LOQ (mg kg ⁻¹), obtidos na determinação dos agrotóxicos analisados no ensaio de proficiência.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agrotóxicos selecionados para o desenvolvimento do método multirresíduo, LMR para a cultura de tomate, fornecedor do padrão de referência, pureza, data de validade, solvente utilizado no preparo da solução estoque e concentração da mesma.....	51
Tabela 2 - Parâmetros de análise do espectrômetro de massas para análise dos agrotóxicos estudados.....	57
Tabela 3 - Agrotóxicos que poderiam estar presentes na matriz de pimentão, fazendo parte de um ensaio de proficiência.	65
Tabela 4 - Diferença percentual das áreas obtidas através do preparo de soluções estoque realizado por dois analistas distintos.....	68
Tabela 5 – Dados de linearidade dos agrotóxicos estudados: equação da reta, coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear das curvas analíticas obtidas através de soluções preparadas em solvente orgânico e em extrato da matriz.	70
Tabela 6 - Valores dos LOD e LOQ, do instrumento e do método, a partir das soluções analíticas em solvente orgânico, para o desenvolvimento do método multirresíduo em tomate.	73
Tabela 7 - Valores dos LOD e LOQ, do instrumento e do método, a partir das soluções analíticas em extrato da matriz, para o desenvolvimento do método multirresíduo em tomate.	74
Tabela 8 - Efeito matriz ($n=7$) calculado para cada solução analítica dos agrotóxicos analisados por UPLC-MS/MS, para o desenvolvimento do método multirresíduo em tomate.	78
Tabela 9 - Efeito matriz calculado através da inclinação das curvas analíticas obtidas a partir das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato da matriz.	79
Tabela 10 - Média dos percentuais de recuperação e RSD% nos três níveis de fortificação estudados ($10, 20$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$) e LOQm para cada agrotóxico.	81
Tabela 11 - Resultados de precisão intermediária (RSD%) para cada agrotóxico estudado fortificados nas concentrações de $10, 20$ e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$..	86

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- API – Ionização à Pressão Atmosférica, do idioma inglês *Atmospheric Pressure Ionization*
- CGCRE – Coordenação Geral de Acreditação
- DICLA – Divisão de Acreditação de Laboratórios
- DNA – Ácido desoxirribonucleico, do idioma inglês *Deoxyribonucleic acid*
- ESI – Ionização por Eletrobulização, do idioma inglês *Electrospray Ionization*
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- GC – Cromatografia Gasosa, do idioma inglês *Gas Chromatography*
- IDA – Ingestão Diária Aceitável
- IEC – Comissão Eletrotécnica Internacional, do idioma inglês *International Electrotechnical Commission*
- ILAC – Cooperação Internacional de Acreditação de Laboratórios, do idioma inglês *International Laboratory Accreditation Cooperatio*
- INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- ISO – Organização Internacional para Padronização, do idioma inglês *International Organization for Standardization*
- LC – Cromatografia Líquida, do idioma inglês *Liquid Chromatography*
- LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do idioma inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*
- LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas tandem, do idioma inglês *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*
- LMR – Limite Máximo de Resíduos
- LOD – Limite de detecção, do idioma inglês *Limit of Detection*
- LODi – Limite de detecção do instrumento, do idioma inglês *Instrument Limit of Detection*
- LODm – Limite de detecção do método, do idioma inglês *Method Limit of Detection*
- LOQ – Limite de quantificação, do idioma inglês *Limit of Quantification*

LOQi – Limite de quantificação do instrumento, do idioma inglês *Instrument Limit of quantification*

LOQm – Limite de quantificação do método, do idioma inglês *Method Limit of Quantification*

m/z – Relação massa/carga

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRM – Monitoramento de reações múltiplas, do idioma inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS – Espectrometria de massas, do idioma inglês *Mass Spectrometry*

NBR – Norma Brasileira

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

P.I – Padrão Interno

PNCRC – Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

RBC – Rede Brasileira de Calibração

RSD – Desvio padrão relativo, do idioma inglês *Relative Standard Deviation*

SD – Desvio padrão, do idioma inglês *Standard Deviation*

SGQ – Sistema de Gestão da Qualidade

UV – Ultravioleta

UPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à espectrometria de massas tandem, do idioma inglês *Ultra performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Agrotóxicos analisados e suas respectivas classes, classificação toxicológica e grupo químico.....	101
APÊNDICE 2 - Ensaio de fortificação e recuperação	102
APÊNDICE 3 - Fórmulas estruturais dos agrotóxicos analisados. (Fonte: <i>The Pesticide Manual</i>).....	103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Objetivos	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 Acreditação de laboratórios.....	24
2.2 NBR ISO/IEC 17025:2005.....	26
2.3 Sistema de gestão da qualidade	28
2.4 Tomate	29
2.4.1 A produção de tomate no Brasil	30
2.5 Contaminação por agrotóxicos.....	33
2.6 Limites máximos de resíduos	35
2.7 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....	36
2.7.1 Cromatografia líquida (LC)	36
2.7.2 Espectrometria de massas tandem (MS/MS)	37
2.7.3 A técnica de LC-MS/MS na análise de resíduos de agrotóxicos	38
2.8 Validação de métodos analíticos.....	40
2.8.1 Linearidade e curva analítica.....	41
2.8.2 Limite de detecção e quantificação	42
2.8.3 Seletividade.....	43
2.8.4 Exatidão	43
2.8.5 Precisão	44
2.8.5.1 Repetitividade.....	44
2.8.5.2 Reprodutibilidade.....	45
2.8.5.3 Precisão intermediária	45
2.8.6 Efeito Matriz	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 Instrumentação.....	49
3.2 Materiais.....	49
3.3 Solventes e Reagentes	50
3.4 Agrotóxicos selecionados.....	50

3.5	Preparo de soluções analíticas	53
3.6	Validação das soluções estoque	54
3.7	Desenvolvimento e validação do método multirresíduo	55
3.7.1	Condições cromatográficas	55
3.7.2	Análise da pureza dos solventes e reagentes	59
3.7.3	Procedimento de extração.....	59
3.7.4	Validação do método	61
3.7.4.1	Curva analítica e linearidade	61
3.7.4.2	Efeito matriz.....	61
3.7.4.3	Limite de detecção e quantificação	63
3.7.4.4	Ensaio de fortificação e recuperação.....	64
3.7.4.5	Precisão intermediária	64
3.8	Participação em ensaio de proficiência	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	Padrão interno selecionado.....	66
4.2	Análise da pureza de solventes e reagentes.....	66
4.3	Validação do método analítico	67
4.3.1	Validação de soluções estoque.....	67
4.3.2	Curva analítica e linearidade	69
4.3.3	Limite de detecção e de quantificação	72
4.3.4	Efeito matriz	75
4.3.5	Ensaio de fortificação e recuperação.....	80
4.3.6	Precisão intermediária.....	85
4.4	Participação em ensaio de proficiência	91
5	CONCLUSÕES	93
6	REFERÊNCIAS.....	95
	APÊNDICES	101

1 INTRODUÇÃO

A acreditação oferece reconhecimento formal da competência técnica de laboratórios, proporcionando assim um meio rápido para os clientes identificarem e selecionarem serviços de ensaio e calibração. Para manter esse reconhecimento, os laboratórios são reavaliados periodicamente pelo organismo de acreditação a fim de assegurar sua contínua conformidade com os requisitos e para verificar se o seu padrão de operação está sendo mantido. (ILAC, 2011b)

A acreditação de laboratórios é muito respeitada tanto nacionalmente quanto internacionalmente como um indicador confiável de competência técnica.

Diferente da certificação pela ABNT NBR ISO 9001, a acreditação de laboratórios utiliza critérios e procedimentos elaborados especificamente para determinar a competência técnica, assegurando aos clientes que os dados de ensaio, calibração ou medição fornecidos pelo laboratório ou serviço de inspeção sejam precisos e confiáveis. (ILAC, 2011b)

Os laboratórios que desejam ser acreditados devem atender aos requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025 para a seleção de métodos de ensaio, desenvolvimento de métodos de ensaio pelo laboratório, utilização de métodos não normalizados e validação de métodos. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida.

Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas. (ABNT, 2005)

Com o aumento no uso de agrotóxicos nas mais diversas culturas e a crescente preocupação de órgãos governamentais em realizar um controle da presença destes compostos, é necessário que se tenha, cada vez mais, laboratórios com competência técnica reconhecida no que diz respeito à identificação e quantificação destas substâncias. A acreditação de laboratórios aparece nesse contexto como uma poderosa ferramenta no que diz respeito a demonstrar a competência técnica de laboratórios não somente na área de determinação de

resíduos de agrotóxicos em alimentos, mas em todas as áreas em que se faz necessário a presença de um sistema de gestão da qualidade que atue de maneira exata e eficaz a fim de demonstrar a capacidade dos laboratórios em resolver os problemas a que se propõe.

1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi validar um método analítico para determinação simultânea de 51 agrotóxicos em tomate, a fim de avaliar o desempenho do método e a conformidade do laboratório de acordo com os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025. O método desenvolvido e validado fará parte do escopo da acreditação do Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC/UFSM) junto ao INMETRO.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Acreditação de laboratórios

A acreditação de laboratórios é um meio de determinar a competência técnica de laboratórios em realizar tipos específicos de ensaios, medições e calibrações. Também fornece reconhecimento formal a laboratórios competentes, oferecendo assim um meio fácil para os clientes identificarem e selecionarem serviços de ensaio, medição e calibração confiáveis, capazes de atender suas necessidades.

Muitos países ao redor no mundo possuem uma ou mais organizações responsáveis pela acreditação dos laboratórios de seus países. A maioria desses organismos adota a ABNT NBR ISO/IEC 17025 como base para acreditar laboratórios de ensaio ou calibração. (ILAC, 2011a)

A Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) ligada ao Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) é o organismo de acreditação de organismos de avaliação da conformidade reconhecido pelo governo.

O Decreto nº 6.275, de 28 de novembro de 2007, estabelece que compete à CGCRE atuar como organismo de acreditação de organismos de avaliação da conformidade. A CGCRE é, portanto, dentro da estrutura organizacional do INMETRO, a unidade organizacional principal que tem total responsabilidade e autoridade sobre todos os aspectos referentes à acreditação, incluindo as decisões de acreditação. (INMETRO, 2011b)

A acreditação de laboratórios pela CGCRE é realizada pela Divisão de Acreditação de Laboratórios (DICLA), que realiza as atividades relacionadas à concessão e manutenção da acreditação, de acordo com os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, aplicável a laboratórios de calibração e ensaio. (INMETRO, 2011b)

A acreditação envolve uma avaliação completa de todas as partes estruturais do laboratório que contribuem na geração de dados e resultados precisos e confiáveis. Os critérios os quais os auditores se referem durante o controle de qualidade são baseados em um padrão internacional (ISO/IEC 17025:2005) o qual é aplicável a todos os laboratórios envolvidos em amostragem, desenvolvimento de

novos métodos e laboratórios de ensaio e calibração. Os organismos oficiais de acreditação usam esse padrão internacional editado pela Organização Internacional para Padronização (ISO, do inglês *International Organization for Standardization*) para assegurar os fatores que influenciem na habilidade do laboratório em gerar resultados de ensaio e calibração precisos e exatos, incluindo procedimentos de controle de qualidade adequados, qualificação, treinamento e experiência de todo o pessoal envolvido, além de manutenção e calibração adequadas de todos os equipamentos. (SAEGER, 2011)

Uma eficiente gestão do sistema de qualidade aumenta e melhora o desenvolvimento do pessoal, sua competência e disciplina. A acreditação permite ao laboratório, além de tudo, avaliar o seu desempenho tendo isso como referência para demonstrar sua competência técnica através de avaliações regulares.

Com relação à exportação de produtos para diferentes continentes e mercados exteriores, os selos de qualidade gerados por laboratórios acreditados conduzem a uma aceitação mais rápida. A acreditação de laboratórios de acordo com os requisitos da ISO/IEC 17025 favorece o estabelecimento de acordos multilaterais baseados no reconhecimento mútuo da competência técnica na realização de ensaios e calibrações. Esses sistemas de acordos internacionais fornece reconhecimento internacional à laboratórios acreditados, o que permite que seus certificados sejam mais rapidamente aceitos por mercados exteriores. A principal organização para acreditação é a Cooperação Internacional de Acreditação de Laboratórios (ILAC, do inglês *International Laboratory Accreditation Cooperation*). A ILAC é a autoridade máxima internacional em acreditação de laboratórios, com membros em todo o mundo que consistem de organismos de acreditação e organizações afiliadas. Ela está envolvida com o desenvolvimento de práticas e procedimentos de acreditação de laboratórios; promoção da acreditação como ferramenta de facilitação do comércio e mecanismos para assegurar que decisões sobre questões de saúde pública e ambientais sejam baseadas em dados confiáveis, reproduzíveis e exatos oferecendo auxílio a sistemas de acreditação em desenvolvimento e o reconhecimento internacional de instalações competentes de ensaio e calibração ao redor do mundo. (SAEGER, 2011; ILAC, 2011b)

A acreditação de laboratórios utiliza critérios e procedimentos especificamente desenvolvidos para determinar a competência técnica. Avaliadores técnicos

especialistas realizam uma avaliação completa de todos os fatores em um laboratório que afetam a produção de dados de ensaios ou calibração. Os critérios são baseados em normas internacionais que são utilizadas para avaliar laboratórios em todo o mundo. Os organismos de acreditação utilizam essas normas especificamente para avaliar fatores pertinentes à competência técnica do laboratório, incluindo a competência técnica do pessoal; validade e adequação dos métodos de ensaio; rastreabilidade de medições e calibrações à normas nacionais; adequação, calibração e manutenção de equipamentos de ensaio; ambiente de ensaio; amostragem, manuseio e transporte de itens de ensaio; garantia da qualidade de dados de ensaios e calibrações. (ILAC, 2011b)

Para que um laboratório possa ser acreditado por um organismo de acreditação é imprescindível que se tenha implementado um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ), um conjunto de regras mínimas com o objetivo de orientar cada parte da organização para que ela execute corretamente e no tempo devido suas tarefas em harmonia estando todas direcionadas para o objetivo comum da organização: a satisfação do cliente.

2.2 NBR ISO/IEC 17025

A primeira edição da ISO/IEC 17025 dos requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração publicada em 1999 surgiu pela extensa experiência na implementação de padrões anteriores (ISO/IEC Guia 25, 1990). A norma continha os requisitos necessários para os laboratórios de ensaios e calibração provarem que operavam um sistema de gestão da qualidade bem organizado e para demonstrar a sua competência técnica e habilidade em produzir resultados válidos e confiáveis. Os requisitos de gestão dessa primeira edição se referiam a outros padrões que estavam sendo utilizados no momento (ISO 9001:1994 e ISO 9002:1994). Ambos os padrões foram substituídos por um novo padrão (ISO 9001:2000) e um novo alinhamento da ISO/IEC 17025 foi necessário. Na segunda edição da ISO/IEC 17025 em 2005 alguns itens foram adaptados ou adicionados para que esta estivesse de acordo com a nova ISO 9001 de 2000, incluindo os princípios de melhoria contínua. Os organismos de acreditação que

reconhecem a competência de laboratórios de ensaio e calibração referenciam a ISO/IEC 17025:2005 como a norma para acreditação. (ABNT, 2005; SAEGER, 2011)

A ISO/IEC 17025:2005 é dividida, basicamente, em dois grupos: requisitos da direção (Item 4), que especifica os requisitos para um gerenciamento sólido, e requisitos técnicos (Item 5), que especifica os requisitos para a competência técnica para os tipos de ensaio ou calibração que o laboratório realiza (ABNT, 2005). A figura 1 apresenta as subdivisões dos requisitos da direção e técnicos. O laboratório que deseja ser acreditado deve atender a todos esses requisitos.

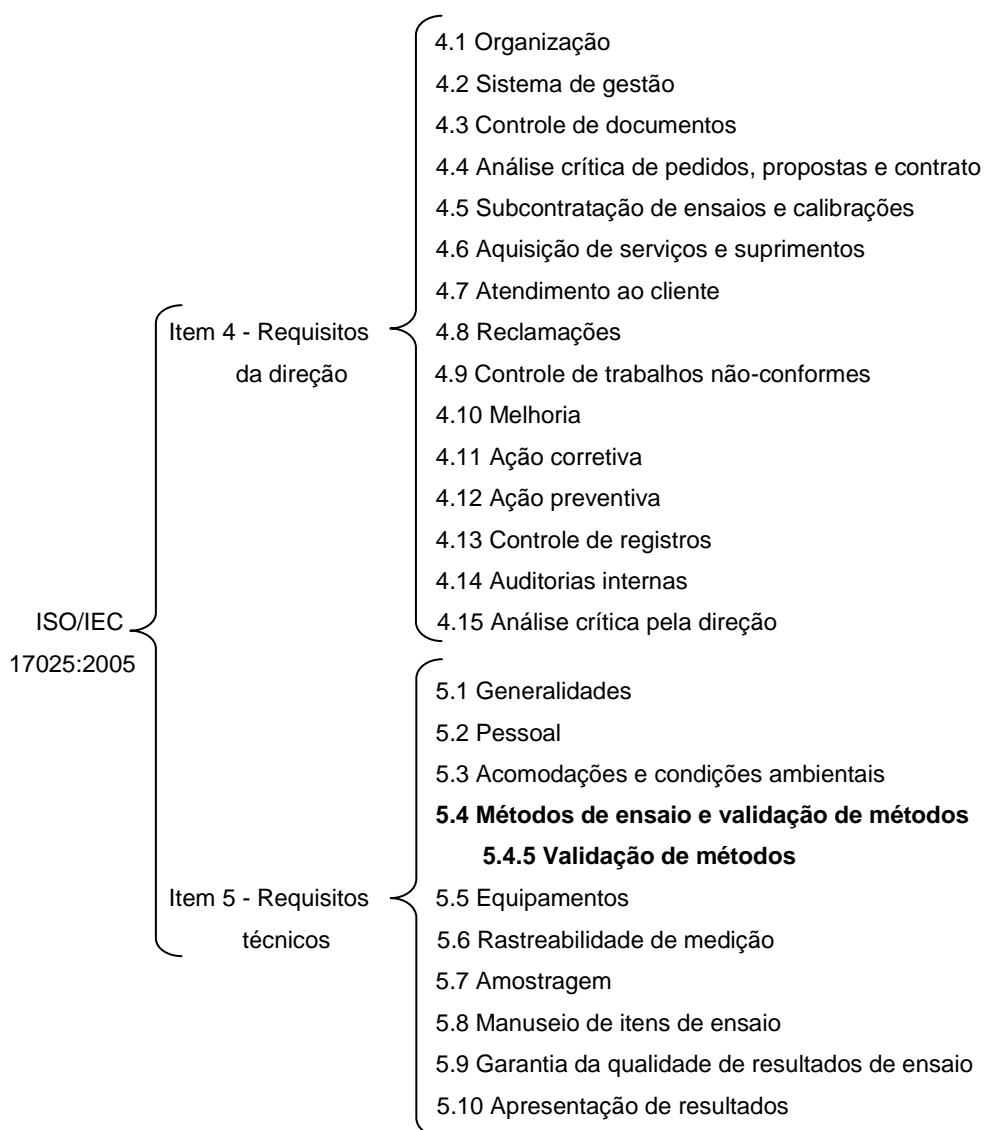


Figura 1 - Divisão dos requisitos da direção e requisitos técnicos da NBR ISO/IEC 17025:2005.

Dentre todos os requisitos abordados pela norma, o requisito 5.4 (Métodos de ensaio e validação de métodos), pertencente aos requisitos técnicos, descreve os deveres do laboratório no que diz respeito aos métodos escolhidos, bem como sua validação. Segundo esse requisito, o laboratório deve utilizar métodos e procedimentos apropriados para todos os ensaios dentro do seu escopo. Esses procedimentos devem ser documentados e seguirem instruções, normas, manuais e dados de referência aplicáveis ao laboratório. (ABNT, 2005)

O subitem 5.4.5 (Validação de métodos), pertencente ao requisito 5.4, trata a respeito da validação dos métodos que serão utilizados pelo laboratório. O laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliações e modificações de métodos normalizados. A validação deve ser abrangente a fim de atender todas as necessidades de uma determinada aplicação. A validação deve ser documentada e os dados registrados. (ABNT, 2005)

2.3 Sistema de gestão da qualidade

A gestão da qualidade pode ser definida como sendo qualquer atividade coordenada para dirigir e controlar uma organização no sentido de possibilitar a melhoria de produtos e serviços com o objetivo de garantir a completa satisfação das necessidades dos clientes relacionadas ao que está sendo oferecido, ou ainda, a superação de suas expectativas.

Um sistema de gestão da qualidade eficaz oferece muitos benefícios:

- Aumento da satisfação e lealdade dos clientes;
- Redução dos custos operacionais, através da diminuição dos custos da qualidade e aumento da eficiência, alcançado como resultado da prevenção intensificada e da correção;
- Melhoria de transferência de conhecimento dentro da empresa;
- Melhora do estado de espírito e aumento da motivação dos empregados na medida em que eles trabalham com maior eficiência.

O sistema de gestão da qualidade compreende três importantes ramos que servem de base ao propósito da acreditação: estrutura organizacional, documental e funcional.

A estrutura organizacional de uma entidade pretende definir políticas, que são a base permanente sobre a qual se constroem estratégias, se formulam planos de ação e se tomam decisões. Entre outros, fazem parte da política da qualidade de um laboratório, o cumprimento dos requisitos da norma de referência e a melhoria contínua e sustentável do sistema de gestão da qualidade, com fim na satisfação dos clientes. (ALMEIDA et al., 2006)

A estrutura documental é composta por um conjunto de documentos hierarquizados que suportam formalmente o SGQ. Esses documentos são o manual da qualidade, os procedimentos operacionais padrão e os registros. Além desses documentos, podem fazer parte do SGQ: normas de referência, especificações de clientes, certificados de calibração, entre outros. (ALMEIDA et al., 2006)

O terceiro ramo do SGQ é a estrutura funcional. Neste, podem ser identificados vários fatores que formam a base da estrutura funcional do laboratório e que influenciam diretamente a qualidade dos resultados. Fazem parte desses fatores não só os métodos e equipamentos, mas também as matérias primas e o pessoal. (ALMEIDA et al., 2006)

2.4 Tomate

Do grupo das hortaliças, o tomate é a espécie mais importante, tanto sob o ponto de vista econômico quanto social, pelo volume da produção e geração de empregos. É uma das hortaliças mais consumidas no mundo e originária dos países andinos, desde o norte do Chile até a Colômbia. (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2010a)

O Brasil é o oitavo maior produtor com cerca de 60 mil hectares cultivados e produção que atinge a 3,5 milhões de toneladas, o que significa uma média de 56 t/ha, ou seja, o dobro da média da produtividade mundial, que chega a 27 t/ha. Embora cultivado em todos os estados em maior ou menor escala, os principais produtores de tomate na safra 2012 foram Goiás (34,5 %), São Paulo (16,0%), Minas Gerais (10,8%) e Bahia (10,7%). (IBGE, 2012)

Da produção total, 70% é destinado ao mercado para consumo *in natura* e o restante é utilizado como matéria prima para industrialização, com os quais são elaborados diversos produtos, tais como estratos, pastas, molhos, sucos e outros derivados. (MAKISHIMA, 2005)

Em 2011, a safra mundial de tomate de mesa e indústria totalizou 159,02 milhões de toneladas em área cultivada de 4,73 milhões de hectares e produtividade média de 33,5 t/ha. O maior produtor mundial foi a China, com 48,5 milhões de toneladas em 0,98 milhões de hectares e produtividade de 47,8 t/ha. O Brasil produziu 4,41 milhões de toneladas em 71,4 mil hectares, colocando-se em oitavo lugar na escala mundial com produtividade média de 61,79 t/ha. (ANDRADE, 2013)

Além da importância comercial o tomate apresenta uma série de benefícios quando presente na dieta do ser humano. Estudos epidemiológicos mostraram que a ingestão de tomates e de seus produtos está associada à redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas como câncer e doenças cardiovasculares. Um estudo conduzido na Itália na década de 80 mostrou uma relação inversa entre o consumo de tomate e o risco de câncer no trato digestivo. A ingestão de tomate também foi inversamente correlacionada com o câncer colo retal, de mama e de ovário. Uma dieta rica em tomates pode reduzir o dano oxidativo às moléculas do ácido desoxirribonucleico (DNA) de leucócitos e de células da próstata, sugerindo que estes alimentos podem ser usados também no tratamento dessa doença e não apenas na sua prevenção. O tomate é uma fonte rica em vitaminas (ácido fólico, vitaminas C e D), minerais (potássio), carotenoides (betacaroteno e licopeno) e flavonoides. (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2010b)

O tomate fornece aproximadamente 20 mg de vitamina C, 220 mg de potássio e 0,015 mg de ácido fólico por 100 g. Esses valores correspondem a aproximadamente 22%, 6% e 4% da ingestão diária recomendada desses nutrientes, respectivamente. (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2010b)

2.4.1 A produção de tomate no Brasil

O tomate de mesa ou para consumo *in natura* é produzido em praticamente todas as regiões geográficas do Brasil e em épocas distintas, sob diferentes

sistemas de cultivo e diferentes níveis de manejo cultural, destacando-se como a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, sendo superada apenas pela batata. (MATOS et al., 2012)

A produção de tomate no Brasil teve início em Pernambuco, no final do século XVIII. Entretanto, esta cultura somente se desenvolveu a partir da década de 1950, no estado de São Paulo, o que levou ao processo de implantação de agroindústrias.

A expansão da cultura para outras regiões ocorreu na década de 1980, na região Nordeste, especialmente em Pernambuco e no norte da Bahia. O principal fator de atração desta atividade para esta região foram as condições climáticas favoráveis, em um período em que os produtores vislumbravam a possibilidade de cultivo do tomate durante a maior parte do ano, com o intuito de reduzir o período de ociosidade da indústria na entressafra. (DIEESE, 2010)

A partir de 1995, com o desenvolvimento de novos derivados do produto, entre eles sopas, sucos e molhos a produção industrial de tomate apresentou expansão acentuada. (DIEESE, 2010)

A produtividade média brasileira de tomate, nos segmentos de mesa e indústria, vem aumentando de forma significativa e consistente desde o início da década de 1980. Nas décadas de 1980, 1990 e 2000, os rendimentos médios foram de 30,64 t/ha, 37,14 t/ha e 53,26 t/ha, respectivamente. A produtividade média em 2010 foi de 60,49 t/ha, enquanto que em 1980 foi de apenas 30,64 t/ha o que demonstra que, em três décadas, a produtividade de tomate no Brasil cresceu em 97,5%. (MATOS et al., 2012)

Atualmente o estado que mais contribui na produção nacional de tomate para processamento é o estado de Goiás, seguido de São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco, conforme figura 2.

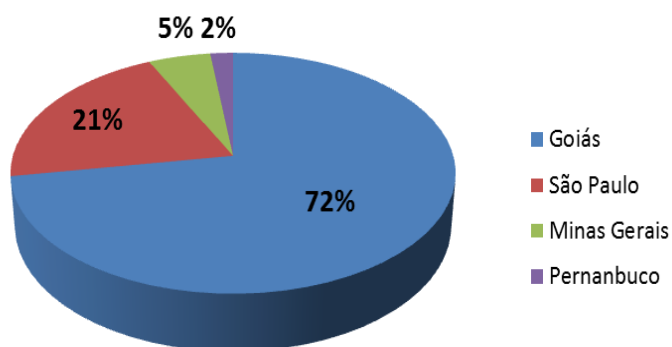


Figura 2 – Participação percentual dos estados produtores de tomate para processamento na safra 2012. (Fonte: MELO, 2012)

Com a alta no preço da cultura de mais de 120% em doze meses onde o recorde foi batido em fevereiro de 2013 (alta registrada de 20,17%) o tomate tornou-se uma cultura não tão presente na mesa dos brasileiros naquele período. Esse súbito aumento de preços ocorreu devido ao tomate ser uma das culturas mais suscetíveis às mudanças climáticas sofrendo com secas e chuvas desde metade do ano de 2011. Segundo especialistas, as safras enfrentaram problemas com seca durante a plantação, o que fez com que os frutos não tivessem a qualidade esperada. Durante a colheita, as chuvas causaram uma perda maior do produto. Esse aumento de 20,17% em fevereiro decresceu para 6,14% em março fazendo com que o preço do tomate, aos poucos, fosse voltando ao seu valor usual no decorrer do ano. (G1, 2013; TERRA, 2013)

O manejo cultural do tomate, principalmente em épocas de chuva, exige cuidados especiais, como aplicação de agrotóxicos a cada três dias, ocasionando alto investimento para os produtores. Este fato, além de promover um maior custo na produção, pode acarretar em ressurgência de pragas, aparecimento de novas pragas, ou, ainda, resistência de algumas pragas aos produtos utilizados. (REIS FILHO et al., 2009)

Os agrotóxicos recomendados para o controle das pragas do tomateiro chegam a ter período de carência de 14 a 30 dias. Em função disso, é praticamente inevitável a presença desses resíduos nos alimentos. (MAPA, 2003)

Os principais agrotóxicos utilizados na cultura de tomate na prevenção de diversas pragas são: acefato, dimetoato, imidacloprido, piriproxifem, buprofezina,

tiacloprido e carbaril. Porém outros ingredientes ativos podem ser utilizados dependendo da praga encontrada na cultura. (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2010c)

2.5 Contaminação por agrotóxicos

Os agrotóxicos compreendem um largo número de substâncias que pertencem a várias classes químicas diferentes. Eles são aplicados nas culturas em vários estágios de cultivo a fim de promover uma proteção contra pestes e durante o armazenamento pós-colheita. (HIEMSTRA; DE KOK, 2007)

O uso excessivo de agrotóxicos, a aplicação indiscriminada e a falta de critérios bem definidos na seleção de princípios ativos para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas que afetam as culturas levam à contaminação dos alimentos, solos e águas, acarretando sérios problemas como a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos e no meio ambiente, podendo afetar direta e indiretamente a saúde humana. (IMOTO, 2004)

O trabalhador rural, que manipula esses produtos no campo, é o principal grupo de risco, porém a presença desses agrotóxicos nos alimentos preocupa o consumidor e as autoridades de saúde, já que os efeitos da exposição crônica do homem aos agrotóxicos e sua importância para a saúde humana ainda não são completamente conhecidos. (IMOTO, 2004)

O Brasil ocupa, desde 2008, a preocupante posição de maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), naquele ano foram lançadas 673,9 mil toneladas desses produtos no meio ambiente. (CONSEA, 2013). Em 2010 o país detinha 19% de participação mundial no mercado de agrotóxicos, seguido dos Estados Unidos com 17%.

A extensiva utilização de agrotóxicos representa um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, especialmente naqueles com economias baseadas no agronegócio, caso do Brasil. Somente nos Estados Unidos existem mais de 18 mil produtos licenciados para uso, e a cada ano cerca de 1 bilhão de litros de agrotóxicos são aplicados na produção agrícola, residências, escolas, parques e florestas. (EPA, 2012)

Agrotóxicos aplicados abusivamente contaminam o solo e o sistema hídrico, podendo gerar danos à saúde e provocando alterações significativas nos ecossistemas. Por isso, pode-se inferir que existe uma forte relação entre o aumento de produtividade, o aumento do uso de agrotóxicos, a degradação ambiental e os danos à saúde humana. (REICHERT, 2012)

Os agrotóxicos são desenvolvidos para terem ação biocida, e por isso são potencialmente danosos para todos os organismos vivos, porém, sua toxicidade e comportamento no ambiente podem variar muito. Esses efeitos podem ser crônicos quando interferem na expectativa de vida, crescimento, fisiologia, e reprodução dos organismos e/ou podem ser ecológicos quando interferem na disponibilidade de alimentos, de habitat e na biodiversidade, incluindo os efeitos sobre os inimigos naturais das pragas e a resistência induzida aos próprios agrotóxicos. (VEIGA et. al., 2005)

A presença dos agrotóxicos nos alimentos para cada princípio ativo é determinada pela ingestão diária aceitável (IDA), que é a quantidade máxima de resíduos de agrotóxicos presentes em cada tipo de alimento permitida para ser ingerida diariamente durante toda sua vida, e que não oferece risco à saúde. (IMOTO, 2004)

Para a verificação da remanescência de resíduos de agrotóxicos em alimentos, são necessários o desenvolvimento de pesquisas para a geração de dados a fim de orientar a ação governamental e a extensão rural para a prevenção dos possíveis problemas de saúde que poderiam advir pela ingestão desses resíduos. (IMOTO, 2004)

Em 2001 foi criado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos in natura que chegam à mesa do consumidor.

Segundo resultados do PARA 2011/12, cinco ingredientes ativos não autorizados foram detectados na cultura do tomate (endossulfan, imazalil, clorpirifós, metamidofós e fenvalerato). Já para os agrotóxicos detectados acima do limite máximo de resíduos (LMR) esse número cai para três (deltametrina, fenvalerato e permetrina). (ANVISA, 2013)

Para a cultura do pimentão, segundo dados do PARA 2011/12, 23 ingredientes ativos não permitidos foram detectados na cultura do pimentão (carbendazim, endossulfam, procimidona, carbofurano, carbaril, metomil, clorpirifós, dimetoato, fentoato, metamidofós, profenofós, triazofós, beta-ciflutrina, bifentrina, cipermetrina, esfenvalerato, lambda-cialotrina, permetrina, fempropatrina, fenarimol, propargito, ciproconazol e flutriafol). Os agrotóxicos determinados acima do LMR foram 2: deltametrina e tebuconazol.

Esses dados são de fundamental importância, visto que o laboratório participou de ensaio de proficiência (uso de comparações interlaboratoriais com o objetivo de avaliar a habilidade de um laboratório em realizar um determinado ensaio) onde determinou-se resíduos de agrotóxicos em pimentão, que pertence ao mesmo grupo do tomate (matrizes com alto teor de água). Segundo o documento SANCO, os principais grupos de culturas são divididos em: culturas com alto teor de água (tomate, pimentão, alface, dentre outros), culturas com elevada acidez e alto teor de água (frutas cítricas, dentre outros), alto teor de açúcar e baixo teor de água (mel e frutas secas), alto teor de óleo e baixo teor de água (nozes, amêndoas, grãos e outros), alto teor de óleo e intermediário teor de água (abacate entre outros), alto teor de amido e/ou proteínas e baixo teor de água e gordura (vegetais secos, cereais entre outros), matrizes difíceis ou 'únicas' (cacau, café, temperos entre outros), carnes e frutos do mar, leite e derivados, ovos e gordura de origem animal ou de alimentos. (SANCO, 2013).

2.6 Limites máximos de resíduos

O risco potencial que os agrotóxicos oferecem aos consumidores, devido à uma exposição crônica diária, determinou que Limites Máximos de Resíduos (LMR) fossem estabelecidos para diferentes combinações cultura/agrotóxico. Em função disso, vários países possuem programas de monitoramento dos níveis de resíduos de agrotóxicos a fim de garantir a segurança dos alimentos.

O LMR é a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim, oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica,

desde sua produção até o consumo, expressa em miligramas do agrotóxico, afim ou seus resíduos por quilograma do alimento analisado (mg kg^{-1}). (ANVISA, 2010)

Os valores de LMR para agrotóxicos são baseados em dados de resíduos, obtidos principalmente a partir de testes supervisionados. Esses dados obtidos refletem o uso aprovado ou registrado, de acordo com as boas práticas agrícolas, e podem variar consideravelmente de região para região, por apresentarem diferentes necessidades para o controle local das infestações, resultando em diferentes quantidades e tipos de resíduos nos alimentos. (FAO)

No Brasil, dois programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal estão em andamento a fim de avaliar a concordância com os LMR estabelecidos no país: o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). (JARDIM; CALDAS, 2012)

2.7 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

2.7.1 Cromatografia líquida (LC)

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria e a espectrometria de massas. (COLLINS et al., 2010)

A cromatografia é um processo de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases imiscíveis: a fase móvel que flui sobre uma fase estacionária. Na cromatografia líquida, a separação é baseada na distribuição seletiva dos analitos entre essas duas fases. (NIESSEN, 1999)

A cromatografia líquida é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contém um grande número de substâncias. A LC utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados e emprega colunas empacotadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões e tem a capacidade de

realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade. (COLLINS et al., 2010)

2.7.2 Espectrometria de massas tandem (MS/MS)

A espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial em fornecer informações sobre massa molar, bem como a estrutura do analito. Por isso, o uso da espectrometria de massas associada à cromatografia líquida é comum, apesar do seu alto custo e necessidade de analistas altamente qualificados para a operação desses equipamentos. (COLLINS et al., 2010)

O espectrômetro de massas é um instrumento composto, basicamente, por um sistema de introdução da amostra, ionização, análise de massas, detecção dos íons gerados e processamento de dados. Após a introdução dos analitos no espectrômetro de massas, ocorre a produção de íons na fonte ionização. Esses íons são direcionados ao analisador de massas e analisados, de acordo com a sua razão massa/carga (m/z).

O acoplamento entre a cromatografia e a espectrometria de massas foi um processo demorado. O eluente proveniente da cromatografia líquida sob altas pressões não poderia entrar em contato com o espectrômetro de massas que necessita ser operado em alto vácuo. Para isso uma interface necessitaria ser criada para promover a união dessas duas poderosas técnicas: a cromatografia com um alto poder de separação e a espectrometria de massas que fornece uma série de benefícios com relação à detecção e quantificação dos analitos.

A principal estratégia adotada para este propósito foi o uso de dispositivos de transporte com simultânea eliminação do solvente.

A interface mais comum que faz a ligação entre a separação (LC) e a detecção (MS) é a ionização por eletronebulização (ESI do inglês *Electrospray Ionization*). Neste tipo de interface o eluente proveniente da cromatografia é nebulizado após passar, sob alta pressão, por um capilar. Esse capilar é protegido por um cone por onde passa uma forte corrente de nitrogênio. A combinação da alta

pressão exercida pelo nitrogênio e o aquecimento da câmara onde esses eventos acontecem promovem a evaporação do solvente orgânico proveniente da cromatografia. Além disso, as moléculas são ionizadas e, após isso, são direcionadas ao espectrômetro de massas através da aplicação de uma diferença de potencial entre a ponta do capilar e a entrada do espectrômetro.

O modo de operação MS/MS inclui dois passos adicionais entre a formação e a detecção dos íons, o isolamento de um íon precursor e em seguida sua fragmentação em íons produtos característicos, para formar um espectro completo. Por isso essa técnica é utilizada para análise de compostos alvo, onde cada um necessita sua própria condição. (PIZZUTTI, 2006)

Com o uso da espectrometria de massas tandem, a informação estrutural do analito é aumentada devido à fragmentação do íon precursor em íons produtos. O espectro formado por esses íons são característicos de cada substância, visto que cada um deles tem um padrão de fragmentação único devido ao arranjo dos átomos que formam a molécula.

Além disso, a MS/MS auxilia na eliminação de interferências provenientes da presença da matriz, visto que o alvo da análise são as massas específicas detectadas pelo espectrômetro.

2.7.3 A técnica de LC-MS/MS na análise de resíduos de agrotóxicos

Desde que a presença de resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas tornou-se evidente, tem-se conduzido uma série de ações para garantir o fornecimento seguro dos alimentos e proteger as pessoas dos resíduos nocivos destas substâncias. A análise de agrotóxicos apresenta algumas dificuldades como uma consequência da diferença de concentração entre os componentes alimentares e os agrotóxicos presentes na amostra. Por isso, faz-se necessário a aplicação de procedimentos analíticos que sejam sensíveis e seletivos o suficiente para garantir resultados seguros. (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005)

Na etapa de separação, identificação e quantificação dos resíduos de agrotóxicos em alimentos, geralmente são empregados métodos cromatográficos de análise. A cromatografia gasosa (GC) foi uma das primeiras técnicas a ser

empregada na determinação de agrotóxicos em alimentos, devido ao alto grau de desenvolvimento e especificidade de seus detectores. (JARDIM et al., 2009)

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas teve o seu maior desenvolvimento na década de 1970 e sua utilização vem crescendo de forma exponencial principalmente devido à alta seletividade e detectabilidade que proporciona. Ela tem sido utilizada em diversas áreas, como indústria de alimentos, indústria farmacêutica, cosméticos, produtos naturais, química forense, química ambiental, entre outros. Esta técnica combina o poder de separação da cromatografia com o poder de identificação da espectrometria de massas resultando em uma ferramenta analítica muito poderosa para análises qualitativas e quantitativas. (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005)

A maioria dos agrotóxicos, incluindo os não facilmente analisáveis por cromatografia gasosa, pode também ser separados por cromatografia líquida, sem a necessidade de derivatização química. A cromatografia líquida tem a vantagem da grande seletividade e variedade oferecida pelas colunas cromatográficas. Entretanto, detectores convencionais como ultravioleta (UV) não são seletivos o suficiente para análises de agrotóxicos em matrizes complexas, e detectores seletivos tal como fluorescência só podem ser utilizados quando o agrotóxico e seus derivados satisfazem certos requisitos ou propriedades específicas. (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005)

O uso de um espectrômetro de massas para a detecção de agrotóxicos separados por cromatografia líquida oferece várias vantagens. Uma das mais importantes é que pode fornecer informações sobre a composição química do analito, sendo um detector altamente sensível. (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005)

O uso da LC-MS/MS reduz a necessidade de etapas de purificação da amostra e proporciona menor chance de resultados falso-positivos e falso-negativos, resultando em uma redução no tempo de análise, bem como redução de custos. (HIEMSTRA; DE KOK, 2007)

2.8 Validação de métodos analíticos

O desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, seletivos e reprodutíveis tem sido sempre um pré-requisito para a obtenção de dados de alta qualidade em programas de fiscalização e monitoramento. Nos dias atuais, outras características dos métodos quantitativos são requeridas tais como o uso de pequenas quantidades de amostras e reagentes, abordagens mais sustentáveis, uso de solventes e reagentes que causem menos danos aos analistas, métodos mais rápidos e menos trabalhosos. (PIZZUTTI et al., 2009b)

Os métodos analíticos empregados devem ser capazes de realizar a medida da quantidade de resíduo em níveis muito baixos e devem também providenciar evidência inequívoca a fim de confirmar a identidade e a concentração de qualquer resíduo detectado. (HIEMSTRA; DE KOK, 2007)

Na área de análise de resíduos de agrotóxicos, o desenvolvimento de métodos analíticos constitui-se em uma etapa extremamente importante, onde a investigação deve sempre incluir a validação do método desenvolvido e não apenas a sua otimização, principalmente quando envolve sua aplicação em diferentes tipos de matrizes. No entanto, para a aceitabilidade dos resultados, os laboratórios devem verificar a adequação dos procedimentos propostos para validação dos métodos a serem utilizados, sejam eles já validados ou não, os quais deverão ser revalidados dentro das condições operacionais de cada laboratório. (IMOTO, 2004)

A seleção do método de análise torna-se uma etapa de fundamental importância na validação do ensaio laboratorial. Os métodos utilizados, incluindo as metodologias de amostragem, devem atender aos objetivos do trabalho e serem apropriados aos ensaios realizados. (ALBANO; RODRIGUEZ, 2009)

A adequação ao uso de métodos analíticos aplicados a ensaios rotineiros é geralmente avaliada através de estudos de validação. A validação é uma avaliação que garante que as informações geradas por um método analítico sejam confiáveis e interpretáveis sobre a amostra a que se refere. (RIGHI, 2013)

Considerando-se as diversas e inúmeras áreas que necessitam gerar dados confiáveis, é consenso que esses conceitos e definições não estão completa e rigidamente estabelecidos, mas continuam a evoluir e aprimorarem-se, no sentido de confirmar que o método proposto tem capacidade de desempenho consistente com

o que a aplicação requer, e que os dados gerados possuam a qualidade necessária, em termos de confiabilidade e rastreabilidade, entre outros, para o fim que se propõe. (DA SILVA, 2011)

Com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar:

- Métodos não normalizados;
- Métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório;
- Métodos normalizados criados fora dos escopos para os quais foram concebidos;
- Ampliações e modificações de métodos normalizados. (ABNT, 2005)

Os parâmetros de validação devem estar declarados no procedimento documentado e incluir quando aplicável: seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/recuperação, precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez. (INMETRO, 2011a)

2.8.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a habilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração. (INMETRO, 2011a)

A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto desejável na resposta. (INMETRO, 2011a)

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação 1 relaciona as duas variáveis :

$$y = a + bx \quad (1)$$

onde:

y= resposta medida;

x= concentração;

a= interseção com o eixo y, quando x=0;

b= inclinação da curva analítica (sensibilidade)

Em geral, são necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório. (INMETRO, 2011a)

2.8.2 Limite de detecção e quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. (INMETRO, 2011a)

O limite de detecção de um método é definido como a concentração mínima do analito medida e declarada com 95 ou 99% de confiança que a concentração do analito é maior que zero. (RIGHI, 2013)

O limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo de amostra. Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído. (INMETRO, 2011a)

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Na prática, corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, após averiguar se a exatidão e precisão alcançadas são satisfatórias. (INMETRO, 2011a)

2.8.3 Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito pode depender da concentração. (INMETRO, 2011a)

A seletividade é a capacidade do método de discriminação entre o analito determinado e substâncias análogas. Um método que apresenta alta seletividade é capaz de determinar o analito de forma exata mesmo em presença de interferentes provenientes da amostra. (ALBANO; RODRIGUEZ, 2009). Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.

A substância de interesse deve ter o sinal analítico isento de interferências que possam levar à confusão na identificação ou dar margem de não confiabilidade ao resultado quantitativo.

2.8.4 Exatidão

Exatidão é o grau de concordância entre os resultados de uma medição e um valor verdadeiro de um mensurando. A exatidão traduz a concordância dos valores experimentais com o valor verdadeiro. (ALBANO; RODRIGUEZ, 2009)

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação. (INMETRO, 2011a)

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método. (INMETRO, 2011a)

A recuperação (%) é calculada segundo a equação 2:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (2)$$

sendo:

C_1 = Concentração do analito determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

2.8.5 Precisão

É o termo geral utilizado para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, analisadas em condições definidas. As três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) através da equação 3:

$$\text{RSD\%} = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (3)$$

sendo:

s = estimativa do desvio padrão absoluto

x_m = valor médio determinado

2.8.5.1 Repetitividade

A repetitividade é definida como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição.

O limite de repetitividade é a máxima diferença aceitável entre duas repetições, ou seja, entre dois resultados independentes, do mesmo ensaio e no mesmo laboratório, sob as mesmas condições. (ALBANO; RODRIGUEZ, 2009)

As condições de repetitividade podem ser caracterizadas utilizando:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento de medição, utilizado nas mesmas condições;
- Mesmo local;
- Repetição em curto período de tempo.

2.8.5.2 Reprodutibilidade

Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição. A reprodutibilidade não é um componente de validação de método executado por um único laboratório, sendo obtida quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparações interlaboratoriais. (ALBANO; RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2011a)

2.8.5.3 Precisão intermediária

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna ou reprodutibilidade intralaboratorial, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como:

- Diferentes analistas;
- Diferentes equipamentos;
- Diferentes tempos.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório. (ALBANO; RODRIGUEZ, 2009). Na maioria dos casos, o valor de precisão intermediária é função do nível de

concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos após eliminação dos resultados discrepantes.

2.8.6 Efeito Matriz

Componentes presentes nas amostras (geralmente de origem natural) podem influenciar na medida da concentração do analito sem serem detectados como interferentes. Algumas técnicas analíticas são mais afetadas por estes componentes do que outras. (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005)

O efeito matriz é o efeito observado pelo aumento ou decréscimo na resposta do detector, para um determinado analito, presente no extrato da matriz, comparado com a resposta do detector para o analito em solvente orgânico. (SANCO, 2013)

A ionização a pressão atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*) utilizada em LC-MS é afetada por este efeito mais comumente no que diz respeito à supressão da resposta do detector. Este comportamento é observado, devido à coeluição de coextrativos, os quais competem com o analito por carga disponível ou, no caso da ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*), pela ocupação da superfície da gota formada alterando a proporção de íons dos analitos que irão gerar o sinal. Esse tipo de efeito é restrito à LC-MS e LC-MS/MS. (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005)

A supressão do sinal do analito é raramente total, mas ela pode ser, frequentemente, suficiente para promover um erro na medida de analitos que encontram-se em níveis baixos de concentração. (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005)

O efeito matriz pode afetar fortemente a reprodutibilidade, linearidade e precisão do método analítico e promover uma quantificação errônea das substâncias em questão. Este efeito é bastante variável e depende da natureza da amostra e devido à sua imprevisibilidade uma variação na resposta pode ser observada mesmo entre diferentes lotes de uma mesma amostra ou com o mesmo método. Apesar do mecanismo exato que rege o efeito matriz ser ainda desconhecido, é de comum consenso que os componentes coeluídos da matriz podem influenciar na intensidade do sinal em uma possível competição por cargas disponíveis ou pela ocupação da superfície da gota formada na interface. (TRUFELLI et al., 2011)

Como consequência desse efeito, ações durante o desenvolvimento do método analítico devem ser tomadas, antes da detecção pelo espectrômetro de massas, a fim de se ter uma quantificação correta. Procedimentos de purificação da amostra e separação cromatográfica mais eficiente podem reduzir a introdução de componentes oriundos da matriz no sistema analítico. (TRUFELLI et al., 2011)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de validar um método analítico que fará parte do escopo de acreditação do Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC/UFSM) segundo os requisitos da NBR ISO/IEC 17025:2005.

As amostras “branco” de tomate (sem presença dos analitos a serem determinados) foram adquiridas em supermercado da cidade de Santa Maria. Procurou-se adquirir amostras orgânicas que, segundo o produtor, são livres de agrotóxicos.

No desenvolvimento deste trabalho foi empregado o método mini Luke (extração com acetona) no procedimento de extração dos agrotóxicos em tomate. Durante o estudo, todas as soluções estoque, bem como as diluições foram preparadas por dois analistas distintos a fim de validar o preparo das soluções estoque. Já o estudo de recuperação dos analitos foi realizado por analistas diferentes, em dias diferentes, a fim de avaliar a precisão intermediária do método. Posteriormente, as amostras foram analisadas por UPLC-MS/MS no modo de ionização ESI positivo.

As condições ambientais foram controladas em todas as etapas do desenvolvimento do método cumprindo o requisito 5.3 (Acomodações e condições ambientais) da ISO/IEC 17025:2005. Foram monitoradas as condições de temperatura e umidade dos laboratórios de preparo de soluções analíticas (temperatura até 25 °C e umidade até 80%), preparo e extração das amostras (temperatura até 25 °C) e análises cromatográficas (temperatura entre 10 e 30 °C e umidade entre 20 e 80%) a fim de garantir o bom desempenho de todos os equipamentos utilizados nesse estudo. As temperaturas dos congeladores foram monitoradas (inferior a -18 °C) a fim de garantir armazenamento adequado de todas as soluções e amostras utilizadas durante o trabalho.

As vidrarias e equipamentos utilizados nesse estudo foram calibrados (quando aplicável) por companhias que possuem acreditação pela Rede Brasileira de Calibração (RBC) atendendo ao requisito 5.5 (Equipamentos) da ISO/IEC 17025:2005, garantindo assim, a confiabilidade dos dados gerados.

3.1 Instrumentação

- Cromatógrafo a líquido calibrado, sistema Acquity UPLC-MS/MS (Waters, EUA) equipado com:
 - Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de degaseificação;
 - Coluna cromatográfica BECH C₁₈, 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e 1,7 µm de tamanho de partícula (Waters, EUA);
- Detector MS triplo quadrupolo calibrado, Xevo TQS (Waters, EUA) utilizando o modo de ionização por eletronebulização (ESI), operando no modo positivo;
- Sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx e TargetLynx versão 4.1, validado;
- Gerador de Nitrogênio (Peak Scientific, EUA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore, EUA);
- Balança analítica de precisão com 4 casas decimais, calibrada (Sartorius, Alemanha);
- Balança analítica de precisão com 2 casas decimais, calibrada (Mettler, Suíça);
- Centrífuga Hareaus Varifugue (Thermo Scientific, Alemanha);
- Pipetador automático Handy Step, calibrado (Brand, Alemanha);
- Homogeneizador Ultraturrax (Polytron, Suíça);
- Homogeneizador Stephan (Stephan Machines, Holanda)

3.2 Materiais

- Tubos de Teflon®, capacidade de 250 mL;
- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueáveis, capacidade de 50 e 15 mL (Nalgene, EUA);
- Frascos de vidro para armazenamento de soluções nos volumes de 22 e 16 mL (National Scientific, EUA);

- Balões volumétricos calibrados de 5, 10 e 200 mL (Blau Brand, Alemanha ou Restek, EUA);
- Vidrarias comuns de laboratório.

3.3 Solventes e Reagentes

- Argônio 99,999% de pureza (Air Liquide, Brasil);
- Nitrogênio 99,999% de pureza (Peak Scientific, EUA);
- Metanol, acetonitrila, tolueno, acetona, éter de petróleo, diclorometano, ácido acético glacial, todos grau pesticida (J. T. Baker Chemicals, EUA ou Mallinckrodt, EUA);
- Sulfato de sódio (UCT, Inglaterra);
- Formiato de amônio (Sigma-Aldrich, Alemanha).

3.4 Agrotóxicos selecionados

Os agrotóxicos selecionados para este estudo estão descritos na Tabela 1, bem como os limites máximos de resíduos para a cultura de tomate estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fornecedor, pureza do material de referência, data de validade, solvente de preparação da solução estoque e concentração da solução estoque. Já no apêndice 1 encontram-se informações como a classe de cada agrotóxico bem como sua classificação toxicológica e grupo químico ao qual cada substância pertence.

Dos agrotóxicos selecionados para este estudo, salientam-se aqueles que têm o seu uso proibido no Brasil para todas as culturas, segundo a ANVISA: Metamidofós, Ometoato, Oxadixil, Oxamil e Triclorfom.

Tabela 1 - Agrotóxicos selecionados para o desenvolvimento do método multirresíduo, LMR para a cultura de tomate, fornecedor do padrão de referência, pureza, data de validade, solvente utilizado no preparo da solução estoque e concentração da mesma.

Agrotóxico	LMR (mg kg ⁻¹)	Fornecedor	Pureza (%)	Data de validade	Solvente	Concentração da solução estoque (mg L ⁻¹)
Acefato	0,5	Dr. Ehrenstorfer	99,0	01/2014	Tolueno	1000
Azoxistrobina	0,5	Dr. Ehrenstorfer	99,0	09/2014	Tolueno	1000
Bitertanol ¹		Dr. Ehrenstorfer	99,0	11/2014	Tolueno	1000
Buprofezina	0,5	Dr. Ehrenstorfer	99,0	04/2015	Tolueno	1000
Carbaril	0,1	Dr. Ehrenstorfer	99,0	08/2014	Acetonitrila	1000
Ciproconazol ¹		Dr. Ehrenstorfer	98,5	05/2014	Acetona	1000
Clorpirifós	0,5	Dr. Ehrenstorfer	98,5	05/2015	Tolueno	1000
Clotianidim	0,1	Dr. Ehrenstorfer	99,0	07/2014	Acetona	1000
Cresoxim metílico	0,1	Dr. Ehrenstorfer	98,0	05/2014	Tolueno	1000
Difenoconazol	0,1	Dr. Ehrenstorfer	98,7	08/2013	Tolueno	1000
Dimetoato	1,0	Dr. Ehrenstorfer	98,5	09/2014	Tolueno	1000
Dimetomorfe	0,03	Dr. Ehrenstorfer	98,0	03/2015	Tolueno	1000
Diuron ¹		Dr. Ehrenstorfer	98,0	03/2015	Tolueno	1000
Espinosade	0,1	Dr. Ehrenstorfer	94,0	11/2013	Tolueno	1000
Etofemproxe	0,5	Dr. Ehrenstorfer	98,5	11/2014	Tolueno	1000
Fenarimol ¹		Dr. Ehrenstorfer	99,0	01/2014	Tolueno	1000
Fention ¹		Dr. Ehrenstorfer	99,5	11/2013	Tolueno	1000
Fludioxonil ¹		Dr. Ehrenstorfer	98,5	01/2017	Acetona	1000
Flufenoxurom ¹		Dr. Ehrenstorfer	98,5	01/2015	Acetona	1000
Flutriafol	0,1	Dr. Ehrenstorfer	99,5	09/2013	Metanol	1000
Hexaconazol ¹		Dr. Ehrenstorfer	98,0	10/2013	Tolueno	1000
Imidacloprido	0,5	Dr. Ehrenstorfer	98,0	01/2016	Acetona	1000
Indoxacarbe	0,1	Dr. Ehrenstorfer	99,5	09/2013	Tolueno	1000
Linurom ¹		Dr. Ehrenstorfer	99,0	05/2017	Tolueno	1000
Lufenurom	0,5	Dr. Ehrenstorfer	99,0	03/2015	Tolueno	1000
Malationa	3,0	Dr. Ehrenstorfer	99,0	08/2015	Tolueno	1000
Metamidofós ²		Dr. Ehrenstorfer	98,5	07/2015	Tolueno	1000
Metidatiom ¹		Dr. Ehrenstorfer	98,5	01/2014	Tolueno	1000
Metomil	1,0	Dr. Ehrenstorfer	99,5	01/2015	Acetonitrila	1000
Metoxifenosida	0,1	Dr. Ehrenstorfer	99,0	02/2015	Metanol	1000
Ometoato ²		Dr. Ehrenstorfer	98,0	03/2014	Tolueno	1000
Oxadixil ²		Dr. Ehrenstorfer	99,5	09/2014	Acetona	1000
Oxamil ²		Dr. Ehrenstorfer	98,2	07/2014	Metanol	1000
Pencicurom ¹		Dr. Ehrenstorfer	99,5	05/2015	Tolueno	1000
Piraclostrobina	0,2	Dr. Ehrenstorfer	97,0	12/2014	Tolueno	1000
Pirimifós-metil ¹		Dr. Ehrenstorfer	99,5	10/2014	Tolueno	1000

¹ Não há informação sobre o uso ou proibição na cultura do tomate segundo a ANVISA.

² Não possuem autorização de uso para nenhuma cultura no Brasil segundo a ANVISA.

Tabela 1 - Agrotóxicos selecionados para o desenvolvimento do método multirresíduo, LMR para a cultura de tomate, fornecedor do padrão de referência, pureza, data de validade, solvente utilizado no preparo da solução estoque e concentração da mesma.

Agrotóxico	LMR (mg kg ⁻¹)	Fornecedor	Pureza (%)	Data de validade	Solvente	(conclusão)
						Concentração da solução estoque (mg L ⁻¹)
Piriproxifem	0,1	Dr. Ehrenstorfer	98,0	02/2015	Tolueno	1000
Procloráz	0,5	Dr. Ehrenstorfer	99,0	06/2015	Tolueno	1000
Profenofós	1,0	Dr. Ehrenstorfer	92,0	04/2014	Tolueno	1000
Propiconazol	0,1	Dr. Ehrenstorfer	98,0	08/2015	Tolueno	1000
Propoxur (P.I)		Dr. Ehrenstorfer	99,5	03/2015	Tolueno	1000
Tebuconazol	0,3	Dr. Ehrenstorfer	98,8	04/2015	Tolueno	1000
Teflubenzurom	0,1	Dr. Ehrenstorfer	97,5	02/2014	Acetonitrila	1000
Tiabendazol ¹		Dr. Ehrenstorfer	98,3	10/2014	Metanol	1000
Tiacloprido	0,1	Dr. Ehrenstorfer	98,5	03/2015	Acetona	1000
Tolifluanida ¹		Dr. Ehrenstorfer	98,0	03/2015	Tolueno	1000
Triadimefom ¹		Dr. Ehrenstorfer	99,0	03/2015	Tolueno	1000
Triadimenol ¹		Dr. Ehrenstorfer	99,0	02/2014	Tolueno	1000
Triclorfom ²		Dr. Ehrenstorfer	97,0	02/2015	Tolueno	1000
Trifloxistrobina	0,5	Dr. Ehrenstorfer	99,0	08/2014	Tolueno	1000
Triflumizol ¹		Dr. Ehrenstorfer	98,5	10/2015	Tolueno	1000
Zoxamida	0,1	Dr. Ehrenstorfer	96,0	08/2014	Acetonitrila	1000

¹ Não há informação sobre o uso ou proibição na cultura do tomate segundo a ANVISA.

² Não possuem autorização de uso para nenhuma cultura no Brasil segundo a ANVISA.

3.5 Preparo de soluções analíticas

As soluções estoque foram preparadas individualmente para cada agrotóxico na concentração de 1000 mg L^{-1} levando em consideração a solubilidade e a pureza de cada um deles. O material de referência de cada substância foi pesado e efetuou-se o cálculo do volume de solvente a ser adicionado para alcançar a concentração desejada levando em consideração a pureza de cada substância.

O material de referência foi pesado individualmente diretamente em frasco de vidro contendo tampa com batoque de teflon[®], com capacidade de 22 mL. Em seguida o material de referência foi dissolvido no volume calculado do solvente apropriado de acordo com a solubilidade de cada um fazendo uso de pipetador automático calibrado. O frasco foi fechado, agitado manualmente e então levado para banho de ultrassom por cerca de 5 minutos a fim de solubilizar qualquer partícula sólida remanescente.

Foi preparado 1 L de metanol acidificado com 0,1 % de ácido acético concentrado para a preparação da solução mistura, soluções das curvas analíticas de trabalho e para reconstituição do resíduo após evaporação. Para isso, 1 mL de ácido acético concentrado foi pipetado, com o uso de pipetador automático, em 999 mL de metanol grau resíduo.

Após a preparação das soluções estoque, uma mistura contendo todos os analitos foi preparada na concentração de 1 mg L^{-1} . Para isso, 200 μL de cada solução estoque foram pipetados para balão volumétrico calibrado de 200 mL já contendo um pequeno volume de metanol acidificado. Após a adição de todas as soluções estoque de cada agrotóxico o volume do balão volumétrico foi completado com metanol acidificado. Essa solução foi homogeneizada e dividida em 4 frascos de vidro âmbar contendo tampa com batoque de teflon[®], com capacidade de 50 mL.

Todas as soluções estoque, bem como as soluções diluídas e de trabalho foram armazenadas em congelador a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Qualquer solução, anterior ao uso, foi retirada do congelador com antecedência e deixada em repouso até alcançar a temperatura do laboratório de preparo de soluções o qual tem sua temperatura controlada (até $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Após, foi colocada em banho de ultrassom por 5 minutos, para então ser manuseada.

Para a confecção das curvas analíticas de trabalho, nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 5,0; 20 e 100 ng mL⁻¹, usadas para o estudo de linearidade e efeito matriz, as soluções foram preparadas a partir da solução mistura de 1 mg L⁻¹. Para a curva analítica em solvente orgânico, volumes calculados dessa solução foram adicionados em 7 balões volumétricos calibrados de 10 mL seguido da adição do padrão interno (Propoxur) na concentração de 40 ng mL⁻¹ e o volume foi completado com metanol acidificado. Essas soluções também foram utilizadas no preparo das curvas analíticas em extrato da matriz.

O método mini Luke original não faz o uso de padrões internos, porém nesse estudo optou-se por utilizá-lo a fim de indicar possíveis perdas e/ou erros durante a análise cromatográfica, pois se algum evento estiver promovendo alterações no sinal do padrão interno isso poderá afetar também os sinais dos analitos.

Para a confecção da curva analítica em extrato da matriz, a matriz de tomate foi extraída conforme procedimento de extração descrito em 3.7.3. Após essa etapa foram adicionados 6 mL do extrato “branco” em acetona/éter de petróleo/diclorometano (1:1:1) em 7 tubos de evaporação (um para cada ponto da curva analítica) e o resíduo ao final da evaporação foi ressuspensionado com 5 mL de cada uma das soluções da curva analítica em solvente. Dessa maneira, tanto a curva analítica preparada em solvente orgânico quanto aquela preparada em extrato “branco” da matriz possuem a mesma composição de solventes, bem como as mesmas concentrações.

3.6 Validação das soluções estoque

A fim de avaliar a qualidade do preparo das soluções estoque, essas foram preparadas (conforme item 3.5) por dois analistas distintos. Para isso, cada analista fez a pesagem dos materiais de referência dos agrotóxicos, realizou o cálculo do volume de solvente orgânico a ser adicionado e procedeu a solubilização da substância. Após, preparou-se uma solução mistura como descrito em 3.5 e esta foi diluída à concentração de 10 ng mL⁻¹, injetada 7 vezes cada uma em sistema UPLC-MS/MS e as áreas de cada substância foram comparadas entre si e posteriormente comparando as médias obtidas pelos dois analistas. A adequação do preparo das

soluções estoque foi avaliada através da equação 4, onde o critério de aceitação para o preparo foi que a diferença fosse entre -10 e +10%. (SANCO, 2013)

$$\text{Diferença\%} = \left(\frac{M1}{M2} - 1 \right) \times 100 \quad (4)$$

Sendo:

M1 = Média das áreas das sete injeções realizadas pelo analista 1;

M2 = Média das áreas das sete injeções realizadas pelo analista 2.

3.7 Desenvolvimento e validação do método multirresíduo

3.7.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas no sistema UPLC-MS/MS foram as seguintes:

- Para o LC:
 - Volume de injeção: 2 µL no modo *partial loop with needle overfill*.
 - Temperatura do forno da coluna: 60 °C.
 - Fase móvel A: água/formiato de amônio 0,3 g L⁻¹.
 - Fase móvel B: metanol.
 - Gradiente da fase móvel: o programa foi iniciado com 80% do eluente A e levado diretamente a 15% em 11 minutos. Manteve-se essa proporção por 1 minuto e posteriormente a composição foi levada à composição inicial (80% de A) em 0,5 minutos e manteve-se essa proporção até o final da corrida cromatográfica.
 - Vazão da fase móvel: 0,45 mL min⁻¹.
 - Tempo total de corrida: 14 minutos.
- Para o espectrômetro de massas:
 - Ionização à pressão atmosférica com ESI no modo positivo.
 - Voltagem do capilar: 3,00 kV.
 - Temperatura do gás de dessolvatação: 400 °C.

- Vazão do gás de dessolvatação: 500 L h⁻¹.
- Vazão do gás no cone de amostragem: 150 L h⁻¹.
- Vazão do gás de nebulização: 7,0 L h⁻¹.
- Vazão do gás de colisão (Ar): 0,15 mL min⁻¹.
- A voltagem do cone, bem como as energias de colisão para cada transição foram determinadas e otimizadas, para cada um dos 51 agrotóxicos analisados, através da infusão de uma solução individual de cada analito diretamente no espectrômetro de massas. Duas transições MRM (Monitoramento de reações múltiplas) foram escolhidas para cada analito, uma para quantificação e outra para confirmação. Essas informações estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros de análise do espectrômetro de massas para análise dos agrotóxicos estudados.

Agrotóxico	Íon precursor	Tempo de retenção (min)	Voltagem do cone (V)	Transição de Quantificação		Transição de Confirmação	
				Íon produto	Energia de colisão (V)	Íon produto	Energia de colisão (V)
Acefato	183,9	0,81	20	142,8	10	94,6	25
Azoxistrobina	404,1	7,10	15	372,0	16	328,9	30
Bitertanol	338,1	9,25	30	98,9	16	70,1	8
Buprofezina	306,1	10,29	20	201,0	12	115,9	16
Carbaril	219,0	5,01	30	144,9	28	126,9	22
Ciproconazol	292,1	7,64	25	70,1	18	124,9	30
Clorpirifós	350,1	10,59	25	97,0	33	197,9	19
Clotianidim	250,0	2,01	20	168,9	14	131,8	14
Cresoxim metílico	314,2	8,73	30	115,9	12	131,0	25
Difenoconazol	406,1	9,66	35	250,9	25	187,8	40
Dimetoato	230,0	2,30	20	198,8	10	124,8	22
Dimetomorfe	388,1	7,40	35	300,9	20	165,0	30
Diuron	233,0	5,80	25	72,0	18	159,9	25
Espinosade	746,5	11,63	50	142,0	31	98,1	59
Etofemproxe	394,3	12,03	20	177,0	15	106,9	43
Fenarimol	331,0	8,08	40	81,0	30	268,0	25
Fention	279,0	8,78	25	168,9	18	104,9	25
Fludioxonil	266,0	7,16	15	158,0	28	229,0	10
Flufenoxurom	489,0	10,96	30	158,0	20	141,0	40
Flutriafol	302,1	6,02	25	70,1	16	122,9	30
Hexaconazol	314,1	9,07	30	70,1	20	158,8	40
Imidacloprido	256,1	2,00	25	174,9	20	209,0	12
Indoxacarbe	528,1	9,75	30	202,9	40	217,9	25
Linurom	249,0	6,70	20	159,9	20	181,9	16
Lufenurom	511,0	10,68	25	158,0	15	141,0	40
Malationa	331,0	7,40	30	126,9	12	98,9	25
Metamidofós	141,9	0,72	30	93,9	12	124,8	14
Metidatiom	303,0	6,11	30	84,9	20	144,8	10
Metomil	162,9	1,34	15	88,0	10	105,9	10
Metoxifenosida	369,2	7,71	30	148,9	18	313,0	8
Ometoato	214,0	0,88	25	124,8	22	182,8	10
Oxadixil	279,1	3,95	20	219,0	12	132,3	25
Oxamil	237,0	1,10	15	72,0	10	90,0	10
Pencicurom	329,1	9,51	30	124,9	30	218,0	16
Piraclostrobina	388,1	9,11	25	163,0	25	193,9	12
Pirimifós metílico	306,1	9,14	30	107,9	30	67,1	40

Tabela 2 – Parâmetros de análise do espectrômetro de massas para análise dos agrotóxicos estudados.

(conclusão)

Agrotóxico	Íon precursor	Tempo de retenção (min)	Voltagem do cone (V)	Transição de Quantificação		Transição de Confirmação	
				Íon produto	Energia de colisão (V)	Íon produto	Energia de colisão (V)
Piriproxifem	322,2	10,34	25	95,9	15	184,9	23
Procloráz	376,0	9,23	20	307,9	12	70,1	25
Profenofós	372,9	10,11	30	302,6	20	127,9	40
Propiconazol	342,1	8,93	35	158,9	20	69,1	30
Propoxur (P.I)	210,1	4,57	15	110,9	12	92,9	25
Tebuconazol	308,2	8,76	30	70,1	24	124,9	40
Teflubenzurom	381,0	10,24	25	158,0	15	141,0	30
Tiabendazol	202,0	3,48	45	174,9	25	130,9	30
Tiacloprido	253,0	3,01	35	125,8	20	90,0	40
Tolifluanida	364,0	8,77	15	136,9	30	237,8	14
Triadimefom	294,1	7,69	30	69,1	20	196,9	16
Triadimenol	296,1	7,93	30	70,0	10	98,9	15
Triclorfom	256,9	2,39	25	108,8	20	126,8	18
Trifloxistrobina	409,2	9,87	25	185,9	14	145,0	40
Triflumizol	346,1	9,97	15	278,0	10	73,1	18
Zoxamida	336,0	8,80	30	186,9	25	158,9	40

3.7.2 Análise da pureza dos solventes e reagentes

A fim de avaliar a presença de possíveis contaminações nos solventes e reagentes, efetuou-se a análise dos mesmos. Para isso, o procedimento de extração foi realizado conforme descrito em 3.7.3, porém sem a presença da matriz ou adição dos analitos.

3.7.3 Procedimento de extração

O método selecionado para a extração dos agrotóxicos na matriz de tomate foi o método mini Luke baseado na extração com acetona, diclorometano e éter de petróleo difundido pelo *Food and Consumer Product Safety Authority* da Holanda. (GENERAL INSPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION, 1996). O método mini Luke é uma miniaturização do método de Luke original desenvolvido em 1975 (LUKE et al., 1975). A miniaturização desse método possibilitou a redução da quantidade de amostra bem como de solventes utilizados.

As amostras de tomate foram homogeneizadas (após retirada do pedúnculo seguindo instruções do documento SANCO, 2013), em homogeneizador Stephan e 15 gramas ($\pm 1\%$) foram pesadas em tubos de teflon com capacidade de 250 mL. Após pesagem, adicionou-se 30 mL de acetona e a mistura foi homogeneizada em homogeneizador ultraturrax durante cerca de 20 segundos a 15000 rpm. Sulfato de sódio (15 g) foi adicionado e a amostra foi submetida à homogeneização em ultraturrax por mais 20 s. Em seguida, 30 mL de éter de petróleo e 30 mL de diclorometano foram adicionados e após homogeneização em ultraturrax por outros 20 segundos as amostras foram centrifugadas durante 3 minutos a 20 °C a 3600 rpm. Após centrifugação, 1,2 mL do extrato foram transferidos para tubos de evaporação e levado a banho de água inicialmente a 45 °C sendo a temperatura elevada à 65 °C até próximo à secura (a secura completa ocorreu à temperatura ambiente). Ao final, o resíduo foi ressuscendido em 1 mL de metanol acidificado contendo o padrão interno (Propoxur) na concentração de 40 ng mL⁻¹ a fim de que tanto as amostras quanto as soluções das curvas analíticas possuíssem a mesma concentração do padrão interno antes da injeção no sistema cromatográfico. Esse

procedimento de evaporação e reconstituição em metanol acidificado foi realizado a fim de que houvesse uma troca de solventes não apropriados para análise por LC-MS/MS (diclorometano e éter de petróleo) para solvente apropriado para a técnica (metanol). A figura 3 mostra o fluxograma do procedimento de análise empregado.

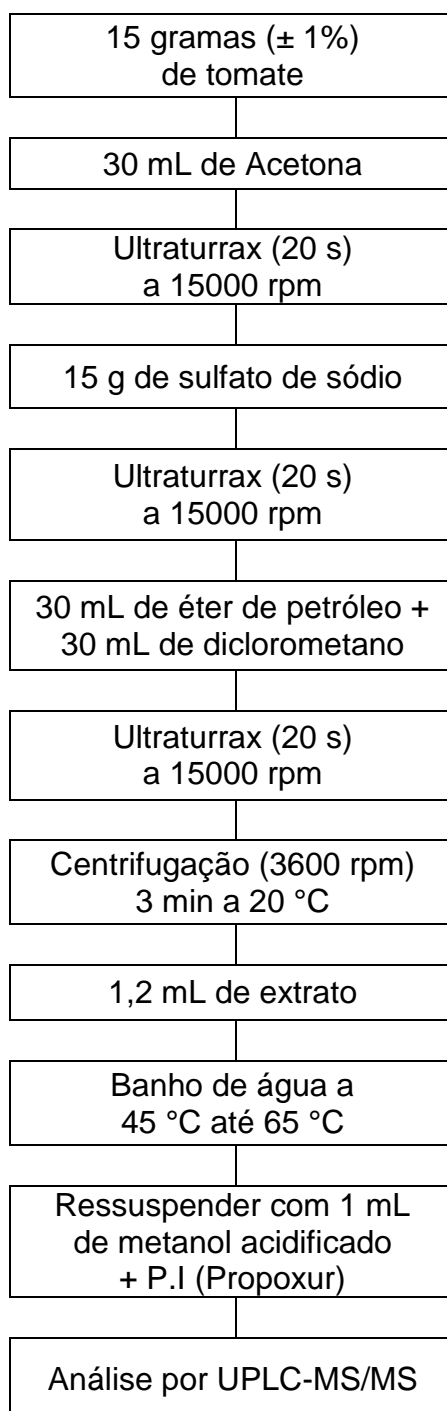


Figura 3 – Fluxograma do método multirresíduo empregado para extração e análise de agrotóxicos em tomate.

3.7.4 Validação do método

3.7.4.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade das curvas analíticas foi avaliada através da injeção das soluções analíticas preparadas tanto em solvente orgânico quanto em extrato “branco” da matriz de tomate no sistema cromatográfico.

Primeiramente, injetou-se o “branco” dos reagentes (procedimento de extração realizado sem a matriz e sem os analitos) e o “branco” da matriz (extração da matriz sem a adição dos analitos). Em seguida, procedeu-se a injeção das soluções analíticas preparadas em solvente e em extrato da matriz, conforme item 3.5. As soluções foram injetadas em ordem crescente de concentração, onde as soluções em solvente e em extrato da matriz de mesma concentração foram injetadas alternadamente a fim de evitar *carryover* na coluna cromatográfica. Esta sequência de injeção foi repetida 7 vezes. A maioria dos trabalhos publicados na literatura sobre desenvolvimento e validação de métodos analíticos faz o uso de 6 replicatas. No presente trabalho, todos os procedimentos descritos foram desenvolvidos fazendo o uso de 7 replicatas, seguindo as orientações do INMETRO.

A partir dos dados obtidos foi realizado o cálculo da média das áreas e dos valores de RSD% das injeções. Os valores de área e concentração foram colocados em gráfico a fim de se obter uma equação de reta do tipo $y = ax + b$ para a obtenção dos parâmetros das curvas analíticas para cada agrotóxico. Com esses dados, foi possível obter o valor de r^2 (coeficiente de determinação), a (coeficiente angular) e b (coeficiente linear).

3.7.4.2 Efeito matriz

O efeito matriz para a determinação dos agrotóxicos em tomate foi avaliado de duas maneiras. A primeira delas consistiu-se na comparação entre as áreas obtidas a partir das soluções preparadas em solvente orgânico e das soluções preparadas em extrato “branco” da matriz, conforme a equação 5. Através dessa

equação foi possível determinar o efeito matriz em cada ponto da curva analítica estudada.

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{A1 - A2}{A2} \times 100 \quad (5)$$

Sendo:

A1 = média das áreas da solução em matriz em uma determinada concentração;

A2 = média das áreas da solução em solvente orgânico em uma determinada concentração.

A segunda maneira de avaliação do efeito matriz foi através da comparação das inclinações das curvas analíticas obtidas a partir das soluções preparadas em solvente orgânico e daquelas em extrato da matriz.

O cálculo para a avaliação do efeito matriz a partir das inclinações da curva foi realizado de acordo com a equação 6:

$$\text{Efeito matriz(\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{S_m}{S_s} \right) \quad (6)$$

Sendo:

S_m = inclinação da curva preparada em extrato “branco” da matriz;

S_s = inclinação da curva preparada em solvente orgânico.

Fazendo o uso dessas equações foi possível determinar se a matriz exercia um efeito positivo (ocasionado um acréscimo de sinal) ou efeito negativo (ocasionando uma diminuição na intensidade do sinal). Segundo recomendação do SANCO, os resultados com efeito matriz entre +20% e -20% são considerados aceitáveis para análises de contaminantes em alimentos a nível de traços. (SANCO, 2013)

3.7.4.3 Limite de detecção e quantificação

Utilizando os dados obtidos através do estudo de linearidade para cada um dos agrotóxicos determinados, procedeu-se à determinação da estimativa do limite de detecção do instrumento (LODi) e do método (LODm), bem como do limite de quantificação do instrumento (LOQi) e do método (LOQm).

A partir das áreas das soluções analisadas e do RSD% (7 réplicas) para cada um dos agrotóxicos, fez-se o uso da equação 7 e obteve-se o LODi estimado.

$$\text{LODi (ng mL}^{-1}\text{)} = 3 \times \text{RSD\%} \times C \quad (7)$$

Sendo:

RSD% = desvio padrão relativo das áreas das 7 injeções em determinada concentração

C = concentração da solução analítica

Multiplicando-se o valor do LODi pelo fator do método de extração (5 neste caso, calculado como descrito no apêndice 2), obtém-se o valor estimado do LODm ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

A partir da estimativa do LODi, aplicando-se a equação 8, obtém-se o valor do LOQi (ng mL^{-1}).

$$\text{LOQi (ng mL}^{-1}\text{)} = \text{LODi} \times 3,33 \quad (8)$$

Realizando a multiplicação do LOQi pelo fator do método de extração, obtém-se o valor do LOQm ($\mu\text{g kg}^{-1}$). No entanto, considera-se como valor real do LOQm a menor concentração que ao ser fortificada na matriz apresenta recuperações na faixa de 70 a 120%, com RSD% menor ou igual a 20%. (PIZZUTTI, 2006)

3.7.4.4 Ensaio de fortificação e recuperação

Para avaliar a exatidão do método desenvolvido, ensaios de fortificação e recuperação foram empregados.

A amostra “branco” de tomate foi contaminada com uma quantidade conhecida da solução mistura 1 mg L^{-1} de todos os analitos estudados, em concentrações diferentes (10, 20 e $50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). Para cada concentração foram realizadas 7 réplicas, incluindo 7 réplicas da amostra “branco” extraída sem a prévia adição da solução mistura. O cálculo para as quantidades de solução mistura adicionadas em cada concentração estão detalhadas no apêndice 2.

O critério de aceitação para os ensaios de fortificação é que os valores de recuperação estejam compreendidos na faixa de 70 a 120%. (SANCO, 2013)

3.7.4.5 Precisão intermediária

A fim de avaliar a repetitividade do método analítico desenvolvido em termos de precisão intermediária, os ensaios de fortificação e recuperação foram efetuados por dois analistas distintos e em dias distintos. Para isso, cada analista realizou o procedimento de fortificação e extração das amostras como descrito em 3.7.4.4 em dias diferentes.

A média dos percentuais de recuperação das 7 replicatas de cada concentração fortificada foi calculada para cada um dos agrotóxicos estudados pelos dois analistas. Posteriormente, foi realizado o cálculo da média das médias entre os resultados dos dois analistas e calculado o desvio padrão para cada concentração. Com esses resultados foram calculados os valores de RSD% em cada concentração, para cada substância.

3.8 Participação em ensaio de proficiência

Nem todos os analitos utilizados para a realização do ensaio de proficiência foram os mesmos do método validado descrito anteriormente visto que estes são

escolhidos pelo órgão organizador do ensaio. A tabela 3 mostra os analitos que poderiam estar presentes na amostra de pimentão e destes, quais foram analisados por UPLC-MS/MS. Os demais analitos foram analisados por outra técnica instrumental. A grande maioria dos materiais de referência de cada analito não estava dentro da validade, porém foram mesmo assim utilizados, a fim de avaliar a capacidade do laboratório em realizar essas determinações. A amostra de pimentão do teste de proficiência pertence ao mesmo grupo do tomate (matrizes com alto teor de água) e foi submetida ao mesmo procedimento de extração do método multirresíduo desenvolvido para o tomate.

Tabela 3 - Agrotóxicos que poderiam estar presentes na matriz de pimentão, fazendo parte de um ensaio de proficiência.

Azametifós*	Clorotalonil	Etoprofós*	Malationa*	Pirimifós-metílico*
Azinfós etil*	Clorpirifós etil*	Famoxadona*	Microbutanil*	Procimidona
Azoxistrobina*	Deltametrina	Fenvalerato	Metidationa*	Procloráz*
Alacloro*	Diclorvós*	Fenitrotiona	Mevinfós*	Protiofós
Bioaletrina	Dicofol	Fentiona*	Monocrotofós*	Quinalfós*
Bifentrina	Dimetoato*	Fipronil*	Naledo	Tetradifona
Carbendazim*	Dissulfotona	Folpete	Oxifluofem	Triazofós*
Carbofenotiona	Endrin	Forato*	Parationa-metílica	Triclorfom*
Ciflutrina	Esfenvalerato	Fosmete*	Permetrina*	Trifluralina
Cipermetrina	Etiona*	Lambda-cialotrina	Pirazofós*	Vinclozolina

* Analisados por UPLC-MS/MS

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padrão interno selecionado

Padrão interno é uma substância química adicionada a uma porção da amostra ou ao extrato da amostra em uma quantidade conhecida, em uma etapa específica da análise, a fim de avaliar a execução correta do procedimento analítico (ou parte dele). O padrão interno deve ser quimicamente estável e deve demonstrar o mesmo comportamento dos analitos. (SANCO, 2013)

No caso da análise de resíduos de agrotóxicos, o padrão interno é um agrotóxico que tem seu uso banido ou que não seja comumente encontrado nas amostras. Para este estudo, fez-se o uso do agrotóxico propoxur na concentração de 40 ng mL^{-1} , o qual foi adicionado em todas as soluções da curva analítica e também nas amostras utilizadas para a avaliação da exatidão e precisão do método.

A quantificação foi, no entanto, realizada através de padronização externa, onde se leva em consideração somente a área do pico de cada agrotóxico estudado.

4.2 Análise da pureza de solventes e reagentes

Após realização do experimento citado em 3.7.2 para avaliação da pureza dos solventes e reagentes, não foi observado qualquer indício de contaminação nos mesmos. Com isso, atesta-se que esses solventes e reagentes podem ser utilizados neste estudo sem a introdução de contaminantes ou interferentes que possam comprometer a qualidade do método analítico.

4.3 Validação do método analítico

4.3.1 Validação de soluções estoque

Os resultados da validação das soluções estoque encontram-se na tabela 4. Pode-se observar que para 43 dos 51 agrotóxicos estudados a diferença percentual entre as áreas de uma mesma substância, obtidas por dois analistas, estão entre a faixa aceitável de $\pm 10\%$.

Com esses dados, pode-se concluir que o preparo das soluções estoque teve desempenho satisfatório, visto que não houve resultados discrepantes entre os dois analistas para a grande maioria dos agrotóxicos estudados.

Para as 8 soluções estoque que demonstraram diferença fora do intervalo aceitável, será preparada uma terceira solução e esta será comparada com as outras duas a fim de avaliar a qualidade no preparo dessas soluções.

Tabela 4 - Diferença percentual das áreas obtidas através do preparo de soluções estoque realizado por dois analistas distintos.

Agrotóxico	Analista 1		Analista 2		Diferença % entre as soluções
	Média das áreas	RSD(%)	Média das áreas	RSD(%)	
Acefato	3871	5,8	4043	3,9	-4,3
Azoxistrobina	166742	5,3	163995	6,4	1,7
Bitertanol	794	29,9	698	14,9	13,7
Buprofezina	120006	4,3	115935	4,8	3,5
Carbaril	178	25,2	200	41,5	-10,9
Ciproconazol	24438	4,3	21340	7,7	14,5
Clorpirifós	43854	4,8	43084	4,7	1,8
Clotianidim	7703	3,3	7818	5,6	-1,5
Cresoxim metílico	839	17,3	821	11,3	2,2
Difenoconazol	75613	5,5	80359	4,5	-5,9
Dimetoato	33654	4,1	29838	3,1	12,8
Dimetomorfe	26247	4,1	22958	4,1	14,3
Diuron	33854	3,2	34245	9,0	-1,1
Espinosade	40073	2,8	43665	2,1	-8,2
Etofemproxe	59556	3,2	63946	4,7	-6,9
Fenarimol	6135	8,4	6040	7,0	1,6
Fention	47992	7,6	48372	7,2	-0,8
Fludioxonil	1840	10,0	1798	4,3	2,4
Flufenoxurom	41503	3,6	40889	3,0	1,5
Flutriafol	51293	2,8	50984	4,1	0,6
Hexaconazol	35740	5,4	34561	2,5	3,4
Imidacloprido	9356	3,5	9421	6,2	-0,7
Indoxacarbe	11007	16,1	11106	15,9	-0,9
Linurom	36030	2,4	35501	3,0	1,5
Lufenurom	6581	12,9	6740	16,2	-2,4
Malationa	38245	3,8	37288	7,1	2,6
Metamidofós	27683	3,7	29976	2,2	-7,6
Metidatiom	4581	6,1	4604	3,3	-0,5
Metomil	708	7,9	692	9,8	2,4
Metoxifenosida	14355	4,7	16829	6,4	-14,7
Ometoato	22228	3,7	22697	2,5	-2,1
Oxadixil	36496	2,7	35572	2,4	2,6
Oxamil	2468	8,8	2595	6,3	-4,9
Pencicurom	202925	4,8	183146	5,1	10,8
Piraclostrobina	70495	1,6	67448	3,2	4,5
Pirimifós metílico	97276	4,9	101171	1,5	-3,9
Piriproxifem	222514	5,1	234250	1,9	-5,0
Procloráz	43721	4,1	41395	10,7	5,6
Profenofós	51416	5,6	49620	7,1	3,6
Propiconazol	34241	4,0	34880	2,5	-1,8
Tebuconazol	51749	6,6	49992	5,6	3,5
Teflubenzurom	7336	11,0	7437	9,9	-1,4
Tiabendazol	77161	1,2	76730	1,3	0,6
Tiacloprido	106285	3,0	106813	2,3	-0,5
Tolifluanida	11222	6,1	11841	4,5	-5,2
Triadimefom	36451	4,6	34943	4,1	4,3
Triadimenol	3036	3,8	2646	8,3	14,7
Triclorfom	22944	1,3	22369	3,6	2,6
Trifloxistrobina	126242	7,7	125343	5,4	0,7
Triflumizol	65138	5,9	63411	7,1	2,7
Zoxamida	86975	3,9	84528	6,3	2,9

4.3.2 Curva analítica e linearidade

Para o estudo de linearidade das curvas analíticas as soluções foram preparadas em solvente orgânico (metanol 0,1% ácido acético) e no extrato “branco” da matriz de tomate, conforme descrito em 3.5.

Na tabela 5 encontram-se a equação da reta, coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear para cada um dos agrotóxicos estudados, preparados em solvente orgânico e em extrato da matriz.

O valor do coeficiente de determinação (r^2) expressa numericamente o percentual da variação total do sinal analítico explicado pela variação da concentração do analito em questão. Esse percentual varia de 0 a 100% e o valor de r^2 varia de 0 a 1. Idealmente, quanto mais próximo de 100% for o percentual da variação observada para o sinal analítico modificado pela variação da concentração se terá um valor de r^2 mais próximo de 1. Logo, melhor será a qualidade da curva analítica, pois a variação da resposta analítica em função da concentração do analito será mais sensível e melhor representada pela equação de reta obtida. (RIGHI, 2013)

Dos agrotóxicos analisados, tanto em solvente orgânico quanto em extrato da matriz, 47 (92%) apresentaram coeficiente de determinação (r^2) maior ou igual a 0,99. Já o bitertanol, carbaril, lufenurom e teflubenzurom apresentaram r^2 entre 0,96 e 0,99 para ambas as curvas analíticas .

Tabela 5 – Dados de linearidade dos agrotóxicos estudados: equação da reta, coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear das curvas analíticas obtidas através de soluções preparadas em solvente orgânico e em extrato da matriz.

Agrotóxico	Solvente orgânico			Extrato da matriz		
	Equação da reta	r^2	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	Equação da reta	r^2	Faixa linear (ng mL ⁻¹)
Acefato	$y = 350,68x - 127,4$	0,998	5,0 - 100	$y = 363,78x - 189,67$	0,996	5,0 - 100
Azoxistrobina	$y = 17755x - 606,3$	0,997	0,1 - 100	$y = 17142x + 2705,$	0,996	0,1 - 100
Bitertanol	$y = 89,77x - 142,2$	0,970	5,0 - 100	$y = 99,97x - 318,3$	0,974	5,0 - 100
Buprofezina	$y = 12364x + 1244,$	0,995	0,1 - 100	$y = 12202x + 1459,$	0,998	0,1 - 100
Carbaril	$y = 15,98x + 35,81$	0,967	5,0 - 100	$y = 15,63x + 65,66$	0,967	5,0 - 100
Ciproconazol	$y = 2353x + 68,19$	0,991	0,1 - 100	$y = 2424x + 75,41$	0,998	0,1 - 100
Clorpirifós	$y = 4391x + 194,7$	0,992	0,1 - 100	$y = 4531x - 14,52$	0,997	0,1 - 100
Clotianidim	$y = 838,9x + 39,95$	0,997	0,1 - 100	$y = 828,9x + 55,19$	0,996	0,1 - 100
Cresoxim-metilico	$y = 96,63x - 51,72$	0,998	1,0 - 100	$y = 93,96x - 63,93$	0,993	1,0 - 100
Difenoconazol	$y = 8337x - 1219,$	0,998	0,1 - 100	$y = 8152x + 227,2$	0,996	0,1 - 100
Dimetoato	$y = 3416x - 235,3$	0,999	0,1 - 100	$y = 3454x - 114,8$	0,999	0,1 - 100
Dimetomorfe	$y = 2197x - 175,5$	0,996	0,1 - 100	$y = 2567x + 238,3$	0,995	0,1 - 100
Diuron	$y = 3429x - 405,4$	0,998	0,2 - 100	$y = 3403x - 123,7$	0,999	0,2 - 100
Espinosade	$y = 4366x - 426,8$	0,996	0,1 - 100	$y = 4295x - 321,6$	0,998	0,1 - 100
Etofenprox	$y = 6574x + 118,6$	0,997	0,1 - 100	$y = 6588x + 577,0$	0,998	0,1 - 100
Fenarimol	$y = 636,6x - 151,8$	0,993	1,0 - 100	$y = 629,1x + 50,99$	0,998	1,0 - 100
Fention	$y = 5135x + 413,8$	0,995	0,1 - 100	$y = 5215x + 90,24$	0,991	0,1 - 100
Fludioxonil	$y = 205,2x - 23,55$	0,997	0,5 - 100	$y = 203,4x + 16,27$	0,993	0,5 - 100
Flufenoxurom	$y = 4625x - 408,7$	0,996	0,1 - 100	$y = 4702x - 278,8$	0,993	0,1 - 100
Flutriafol	$y = 5527x + 957,9$	0,997	0,1 - 100	$y = 5530x + 935,6$	0,996	0,1 - 100
Hexaconazol	$y = 3770x - 137,9$	0,994	0,2 - 100	$y = 3778x - 83,34$	0,997	0,2 - 100
Imidacloprido	$y = 1047x - 69,93$	0,996	0,1 - 100	$y = 1054x + 255,7$	0,996	0,1 - 100
Indoxacarbe	$y = 1207x - 66,39$	0,993	0,5 - 100	$y = 1238x - 317,5$	0,990	0,5 - 100
Linurom	$y = 3621x - 205,2$	0,998	0,1 - 100	$y = 3552x + 121,8$	0,999	0,1 - 100
Lufenurom	$y = 767,4x - 134,8$	0,981	0,1 - 100	$y = 813,6x - 288,1$	0,986	0,1 - 100
Malationa	$y = 3919x + 246,0$	0,997	0,1 - 100	$y = 3919x + 406,6$	0,998	0,1 - 100
Metamidofós	$y=2718,5x - 350,42$	0,998	0,1 - 100	$y=2662,5x - 167,86$	0,999	0,1 - 100
Metidatiom	$y = 526,4x - 80,12$	0,997	0,2 - 100	$y = 518,8x - 46,25$	0,997	0,2 - 100
Metomil	$y = 62,76x - 30,78$	0,996	1,0 - 100	$y = 62,40x - 33,74$	0,995	1,0 - 100
Metoxifenosida	$y = 1485x - 80,63$	0,998	0,1 - 100	$y = 1476x - 145,1$	0,996	0,1 - 100
Ometoato	$y = 2423x - 372,6$	0,999	0,1 - 100	$y = 2367x - 65,57$	0,999	0,1 - 100
Oxadixil	$y = 3668x - 532,9$	0,998	0,5 - 100	$y = 3643x - 358,3$	0,999	0,5 - 100
Oxamil	$y = 274,6x - 53,43$	0,998	0,5 - 100	$y = 276,4x - 75,61$	0,998	0,5 - 100
Pencicurom	$y = 19571x - 1144,$	0,998	0,1 - 100	$y = 19155x + 1412,$	0,998	0,1 - 100

Tabela 5 – Dados de linearidade dos agrotóxicos estudados: equação da reta, coeficiente de determinação (r^2) e faixa linear das curvas analíticas obtidas através de soluções preparadas em solvente orgânico e em extrato da matriz.

(conclusão)

Agrotóxico	Solvente orgânico			Extrato da matriz		
	Equação da reta	r^2	Faixa linear (ng mL ⁻¹)	Equação da reta	r^2	Faixa linear (ng mL ⁻¹)
Piraclostrobina	$y = 7336x - 32,14$	0,996	0,1 - 100	$y = 7068x + 1096,$	0,997	0,1 - 100
Pirimifós metílico	$y = 10334x + 108,5$	0,997	0,1 - 100	$y = 10104x + 1366,$	0,996	0,1 - 100
Piriproxifem	$y = 22568x + 3407,$	0,998	0,1 - 101	$y = 22755x + 3395,$	0,999	0,1 - 101
Procloráz	$y = 4604x + 307,8$	0,995	0,5 - 100	$y = 4774x - 604,0$	0,998	0,5 - 100
Profenofós	$y = 5524x - 578,0$	0,997	0,1 - 100	$y = 5532x - 431,5$	0,996	0,1 - 100
Propiconazol	$y = 3678x - 300,2$	0,996	0,5 - 100	$y = 3647x + 631,1$	0,996	0,5 - 100
Tebuconazol	$y = 5484x + 127,7$	0,998	0,1 - 100	$y = 5284x + 1302,$	0,993	0,1 - 100
Teflubenzurom	$y = 847,3x - 220,5$	0,984	0,1 - 100	$y = 752,4x + 323,4$	0,978	0,1 - 100
Tiabendazol	$y=7610x - 546,51$	0,999	0,1 - 100	$y = 7514,1x + 117,84$	0,999	0,1 - 100
Tiacloprido	$y = 10848x + 169,3$	0,999	0,1 - 100	$y = 10858x + 951,7$	0,999	0,1 - 100
Tolifluanida	$y = 1153x - 270,3$	0,997	0,2 - 100	$y = 1081x + 189,6$	0,993	0,2 - 100
Triadimefom	$y = 3898x - 83,05$	0,997	0,1 - 100	$y = 3719x + 679,7$	0,997	0,1 - 100
Triadimenol	$y = 308,4x + 10,97$	0,994	1,0 - 100	$y = 301,6x - 20,80$	0,997	1,0 - 100
Triclorfom	$y = 2457x - 566,0$	0,997	1,0 - 100	$y = 2468x - 552,8$	0,998	1,0 - 100
Trifloxistrobina	$y = 12861x - 199,3$	0,997	0,1 - 100	$y = 12747x - 740,7$	0,992	0,1 - 100
Triflumizol	$y = 6984x - 948,4$	0,997	1,0 - 100	$y = 6829x + 1323,$	0,995	1,0 - 100
Zoxamida	$y = 9190x + 304,5$	0,996	0,1 - 100	$y = 9131x + 439,0$	0,997	0,1 - 100

4.3.3 Limite de detecção e de quantificação

As tabelas 6 e 7 mostram os limites de detecção e quantificação (do instrumento e do método) calculados a partir das soluções individuais preparadas em solvente orgânico (metanol acidificado) em extrato da matriz.

Para as soluções analíticas preparadas em solvente orgânico, 28 dos 51 agrotóxicos estudados apresentaram LODi como sendo $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ e LOQi como sendo $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$. Já para outros 10 agrotóxicos o LODi calculado foi $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ e LOQi como sendo $0,7 \text{ ng mL}^{-1}$. Para 4 e 6 das substâncias os LODi foram $0,5$ e $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ e LOQi de $1,7$ e $3,3 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente.

Para as soluções analíticas preparadas em extrato da matriz, 25 dos 51 agrotóxicos estudados apresentaram como LODi a concentração de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ e LOQi como sendo $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$. Para outros 10 agrotóxicos o LODi calculado foi $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ e LOQi como sendo $0,7 \text{ ng mL}^{-1}$. Para 8 e 3 das substâncias os valores de LODi foram $0,5$ e $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ e LOQi $1,7$ e $3,3 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente.

Os agrotóxicos bitertanol, cresoxim-metílico e triclorfom não tiveram os limites de detecção e quantificação do instrumento e do método estimados a partir das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico por não serem detectados nas menores concentrações da curva analítica com os quais se realiza o cálculo das estimativas. Já para as soluções da curva analítica preparadas em extrato da matriz não foram detectados o bitertanol, carbaril, cresoxim-metílico, metomil e triclorfom, portanto não tiveram seus limites de detecção e quantificação do instrumento e do método estimados.

Tabela 6 - Valores dos LOD e LOQ, do instrumento e do método, a partir das soluções analíticas em solvente orgânico, para o desenvolvimento do método multirresíduo em tomate.

Agrotóxico	Conc. das soluções (ng mL ⁻¹)				LOD _i (ng mL ⁻¹)	LOD _m (µg kg ⁻¹)	LOQ _i (ng mL ⁻¹)	LOQ _m (µg kg ⁻¹)
	0,1	0,2	0,5	1,0				
	LODs (ng mL ⁻¹) calculados nas concentrações individuais							
Acefato	nd	nd	nd	0,5	1,0	5,0	3,3	16,7
Azoxistrobina	0,04	0,02	0,07	0,12	0,1	0,5	0,3	1,7
Bitertanol	nd	nd	nd	nd				
Buprofezina	0,04	0,03	0,05	0,16	0,1	0,5	0,3	1,7
Carbaril	0,10	0,35	nd	3,16	0,1	0,5	0,3	1,7
Ciproconazol	0,04	0,10	0,21	0,45	0,1	0,5	0,3	1,7
Clorpirifós	0,04	0,08	0,11	0,15	0,1	0,5	0,3	1,7
Clotianidim	0,09	0,03	0,21	0,22	0,1	0,5	0,3	1,7
Cresoxim metílico	nd	nd	nd	1,89	nd	nd		
Difenoconazol	0,15	0,09	0,22	0,42	0,2	1,0	0,7	3,3
Dimetoato	0,04	0,07	0,05	0,13	0,1	0,5	0,3	1,7
Dimetomorfe	0,09	0,08	0,11	0,31	0,1	0,5	0,3	1,7
Diuron	0,79	0,03	0,06	0,10	0,2	1,0	0,7	3,3
Espinosade	0,02	0,03	0,11	0,20	0,1	0,5	0,3	1,7
Etofenprox	0,01	0,03	0,07	0,11	0,1	0,5	0,3	1,7
Fenarimol	nd	nd	nd	0,57	1,0	5,0	3,3	16,7
Fentiona	0,07	0,06	0,18	0,21	0,1	0,5	0,3	1,7
Fludioxonil	0,68	1,47	0,95	0,54	1,0	5,0	3,3	16,7
Flufenoxurom	0,06	0,11	0,06	0,10	0,1	0,5	0,3	1,7
Flutriafol	0,02	0,06	0,10	0,14	0,1	0,5	0,3	1,7
Hexaconazol	nd	0,12	0,10	0,30	0,2	1,0	0,7	3,3
Imidacloprido	0,11	0,16	0,11	0,28	0,2	1,0	0,7	3,3
Indoxacarbe	nd	0,42	0,60	0,79	1,0	5,0	3,3	16,7
Linurom	0,02	0,04	0,07	0,19	0,1	0,5	0,3	1,7
Lufenurom	nd	0,25	0,33	0,41	0,5	2,5	1,7	8,3
Malationa	0,07	0,09	0,15	0,18	0,1	0,5	0,3	1,7
Metamidofós	0,04	0,04	0,09	0,17	0,1	0,5	0,3	1,7
Metidatíom	nd	0,09	0,25	0,23	0,2	1,0	0,7	3,3
Metomil	nd	nd	nd	0,78	1,0	5,0	3,3	16,7
Metoxifenosida	0,07	0,11	0,25	0,27	0,1	0,5	0,3	1,7
Ometoato	0,04	0,07	0,11	0,14	0,1	0,5	0,3	1,7
Oxadixil	nd	nd	0,13	0,21	0,5	2,5	1,7	8,3
Oxamil	nd	nd	0,29	0,51	0,5	2,5	1,7	8,3
Pencicurom	0,07	0,06	0,15	0,32	0,1	0,5	0,3	1,7
Piraclostrobina	0,05	0,03	0,11	0,20	0,1	0,5	0,3	1,7
Pirimifós-metílico	0,05	0,05	0,09	0,21	0,1	0,5	0,3	1,7
Piriproxifem	0,02	0,02	0,07	0,18	0,1	0,5	0,3	1,7
Procloráz	nd	0,04	0,24	0,59	0,2	1,0	0,7	3,3
Profenofós	0,15	0,10	0,31	0,39	0,2	1,0	0,7	3,3
Propiconazol	nd	nd	0,18	0,38	0,5	2,5	1,7	8,3
Tebuconazol	0,04	0,07	0,23	0,26	0,1	0,5	0,3	1,7
Teflubenzurom	0,18	0,15	0,28	0,50	0,2	1,0	0,7	3,3
Tiabendazol	0,02	0,02	0,04	0,11	0,1	0,5	0,3	1,7
Tiacloprido	0,02	0,03	0,06	0,15	0,1	0,5	0,3	1,7
Tolifluanida	nd	0,09	0,30	0,49	0,2	1,0	0,7	3,3
Triadimefom	0,03	0,05	0,08	0,23	0,1	0,5	0,3	1,7
Triadimenol	nd	nd	nd	0,62	1,0	5,0	3,3	16,7
Triclorfom	nd	nd	3,97	3,75	nd	nd		
Trifloxistrobina	0,10	0,14	0,12	0,22	0,1	0,5	0,3	1,7
Triflumizol	nd	0,07	0,20	0,37	0,2	1,0	0,7	3,3
Zoxamida	0,04	0,10	0,09	0,21	0,1	0,5	0,3	1,7

nd = não detectado

Tabela 7 - Valores dos LOD e LOQ, do instrumento e do método, a partir das soluções analíticas em extrato da matriz, para o desenvolvimento do método multirresíduo em tomate.

Agrotóxico	Conc. das soluções (ng mL ⁻¹)				LOD _i (ng mL ⁻¹)	LOD _m (μg kg ⁻¹)	LOQ _i (ng mL ⁻¹)	LOQ _m (μg kg ⁻¹)
	0,1	0,2	0,5	1,0				
	LODs (ng mL ⁻¹) calculados nas concentrações individuais							
Acefato	nd	nd	0,51	0,38	1,0	5,0	3,3	16,7
Azoxistrobina	0,02	0,03	0,10	0,14	0,1	0,5	0,3	1,7
Bitertanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
Buprofezina	0,03	0,03	0,13	0,16	0,1	0,5	0,3	1,7
Carbaril	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
Ciproconazol	0,08	0,07	0,15	0,25	0,1	0,5	0,3	1,7
Clorpirifós	0,04	0,05	0,14	0,12	0,1	0,5	0,3	1,7
Clotianidim	0,08	0,19	0,31	0,59	0,1	0,5	0,3	1,7
Cresoxim-metílico	nd	nd	nd	1,21	nd	nd		
Difenoconazol	0,06	0,13	0,24	0,31	0,1	0,5	0,3	1,7
Dimetoato	0,01	0,07	0,05	0,11	0,1	0,5	0,3	1,7
Dimetomorfe	0,06	0,12	0,15	0,20	0,1	0,5	0,3	1,7
Diuron	nd	0,04	0,09	0,10	0,2	1,0	0,7	3,3
Espinosade	0,02	0,04	0,09	0,15	0,1	0,5	0,3	1,7
Etofenprox	0,02	0,03	0,10	0,17	0,1	0,5	0,3	1,7
Fenarimol	nd	nd	nd	0,30	1,0	5,0	3,3	16,7
Fentiona	0,04	0,09	0,17	0,34	0,1	0,5	0,3	1,7
Fludioxonil	0,79	0,58	0,34	0,89	0,5	2,5	1,7	8,3
Flufenoxurom	0,04	0,07	0,17	0,16	0,1	0,5	0,3	1,7
Flutriafol	0,04	0,04	0,11	0,19	0,1	0,5	0,3	1,7
Hexaconazol	nd	0,06	0,26	0,24	0,2	1,0	0,7	3,3
Imidacloprido	0,16	0,22	0,42	0,49	0,5	2,5	1,7	8,3
Indoxacarbe	0,27	0,12	0,87	1,03	0,2	1,0	0,7	3,3
Linurom	0,03	0,03	0,08	0,12	0,1	0,5	0,3	1,7
Lufenurom	0,21	0,13	0,27	0,61	0,2	1,0	0,7	3,3
Malationa	0,02	0,07	0,08	0,30	0,1	0,5	0,3	1,7
Metamidofós	0,04	0,07	0,08	0,15	0,1	0,5	0,3	1,7
Metidatiom	nd	0,14	0,26	0,27	0,2	1,0	0,7	3,3
Metomil	nd	nd	1,00	1,60	nd	nd		
Metoxifenosida	0,11	0,15	0,08	0,25	0,2	1,0	0,7	3,3
Ometoato	0,05	0,08	0,11	0,13	0,1	0,5	0,3	1,7
Oxadixil	nd	nd	0,15	0,15	0,5	2,5	1,7	8,3
Oxamil	nd	nd	0,41	0,59	0,5	2,5	1,7	8,3
Pencicurom	0,09	0,13	0,17	0,41	0,1	0,5	0,3	1,7
Piraclostrobina	0,06	0,08	0,12	0,14	0,1	0,5	0,3	1,7
Pirimifós-metílico	0,06	0,07	0,09	0,15	0,1	0,5	0,3	1,7
Piriproxifem	0,02	0,04	0,07	0,06	0,1	0,5	0,3	1,7
Procloráz	nd	0,25	0,41	0,33	0,5	2,5	1,7	8,3
Profenofós	0,16	0,23	0,16	0,38	0,5	2,5	1,7	8,3
Propiconazol	nd	nd	0,21	0,19	0,5	2,5	1,7	8,3
Tebuconazol	0,15	0,07	0,19	0,44	0,2	1,0	0,7	3,3
Teflubenzurom	0,17	0,12	0,34	0,61	0,2	1,0	0,7	3,3
Tiabendazol	0,02	0,03	0,04	0,07	0,1	0,5	0,3	1,7
Tiacloprido	0,02	0,02	0,04	0,09	0,1	0,5	0,3	1,7
Tolifluanida	nd	0,14	0,57	0,59	0,2	1,0	0,7	3,3
Triadimefom	0,02	0,04	0,10	0,21	0,1	0,5	0,3	1,7
Triadimenol	nd	nd	nd	0,49	1,0	5,0	3,3	16,7
Triclorfom	nd	nd	nd	2,00	nd	nd		
Trifloxistrobina	0,13	0,11	0,13	0,19	0,2	1,0	0,7	3,3
Triflumizol	nd	nd	0,14	0,31	0,5	2,5	1,7	8,3
Zoxamida	0,04	0,03	0,10	0,19	0,1	0,5	0,3	1,7

nd = não detectado

4.3.4 Efeito matriz

O efeito matriz é o efeito observado pelo aumento ou decréscimo na resposta do detector, para um determinado analito, presente no extrato da matriz, comparado com a resposta do detector para o analito em solvente orgânico. (PIZZUTTI, 2006)

Em LC-MS/MS este efeito é normalmente causado pela interferência dos componentes da matriz que eluem na mesma banda ou tempo de retenção que o analito e competem com ele durante o processo de ionização. Em baixas concentrações, o efeito matriz pode se tornar significativamente relevante, pois ocorre um decréscimo na ionização do analito devido à baixa concentração desse na matriz. (PIZZUTTI, 2006)

A figura 4 mostra um exemplo de curva analítica de um agrotóxico (Teflubenzurom) que teve o sinal afetado pela presença da matriz e de outro que não teve diferença considerável (Etofemproxe). Já a figura 5 mostra os cromatogramas desses mesmos agrotóxicos quando analisados em solvente orgânico e em extrato da matriz. Como pode ser observado nessa figura, o formato do pico, para ambos os agrotóxicos, não sofreu diferença. Porém, quando analisada a intensidade do sinal observa-se que para o Etofemproxe a diferença foi de 0,9% quando comparadas as intensidades dos picos analisados em solvente e em matriz. Para o Teflubenzurom essa diferença é mais acentuada (16%). Apesar da diferença ser relativamente mais pronunciada para o agrotóxico Teflubenzurom quando comparado ao primeiro, o efeito matriz não interferiu na exatidão e na precisão dos seus resultados.

Os resultados da avaliação do efeito matriz em cada uma das concentrações da curva analítica, bem como daqueles determinados através da inclinação das curvas analíticas em solvente orgânico e em extrato da matriz, encontram-se nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Como pode ser observado na tabela 9, todos os agrotóxicos avaliados nesse estudo demonstraram um efeito matriz entre -20 e +20%. Com isso é possível concluir que a matriz não exerce efeito considerável no sinal de nenhum dos agrotóxicos analisados.

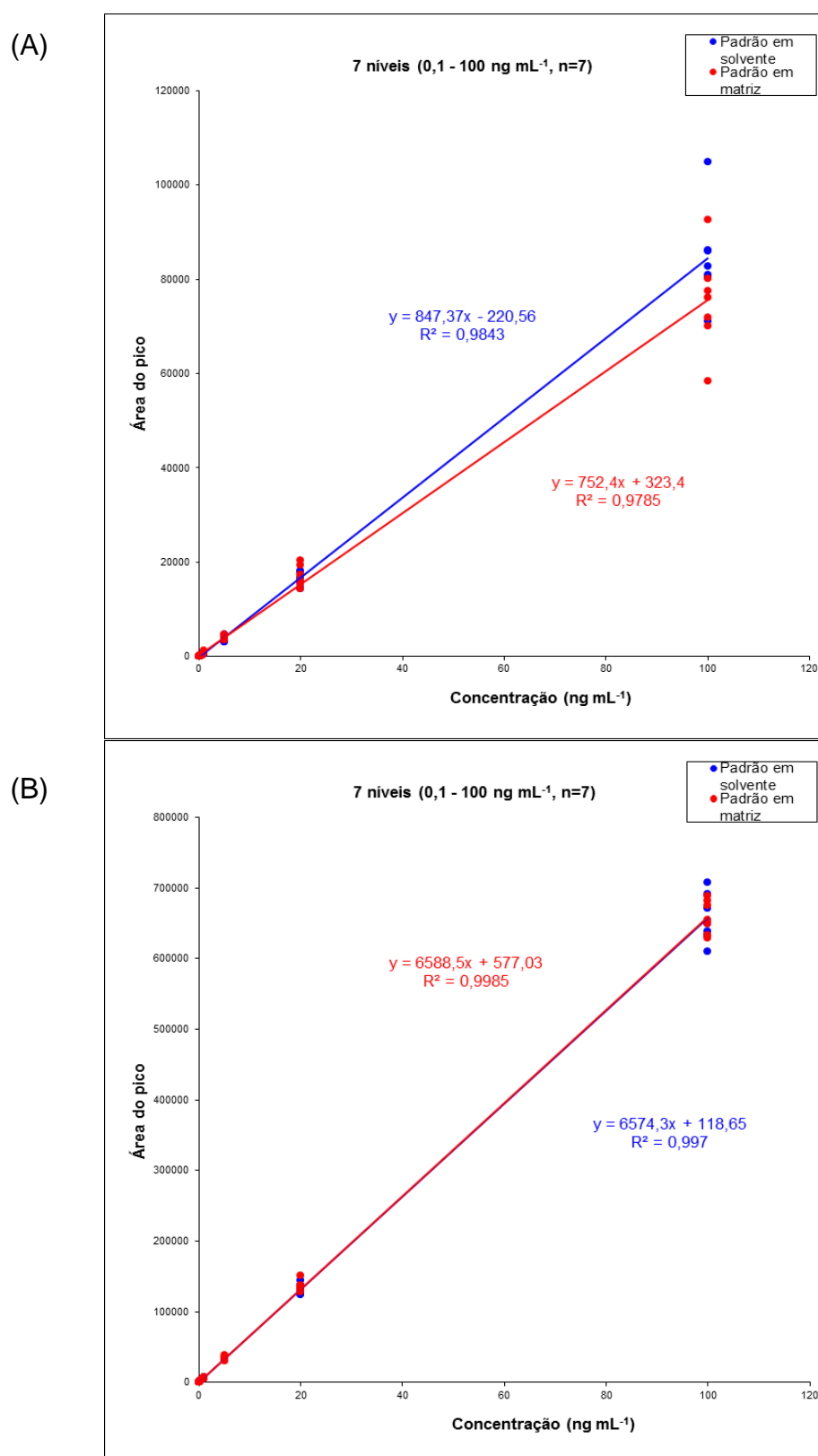


Figura 4 - Curvas analíticas para agrotóxico que apresentou (A) efeito matriz negativo (Teflubenzurom) e (B) efeito matriz não considerável (Etofemprox).

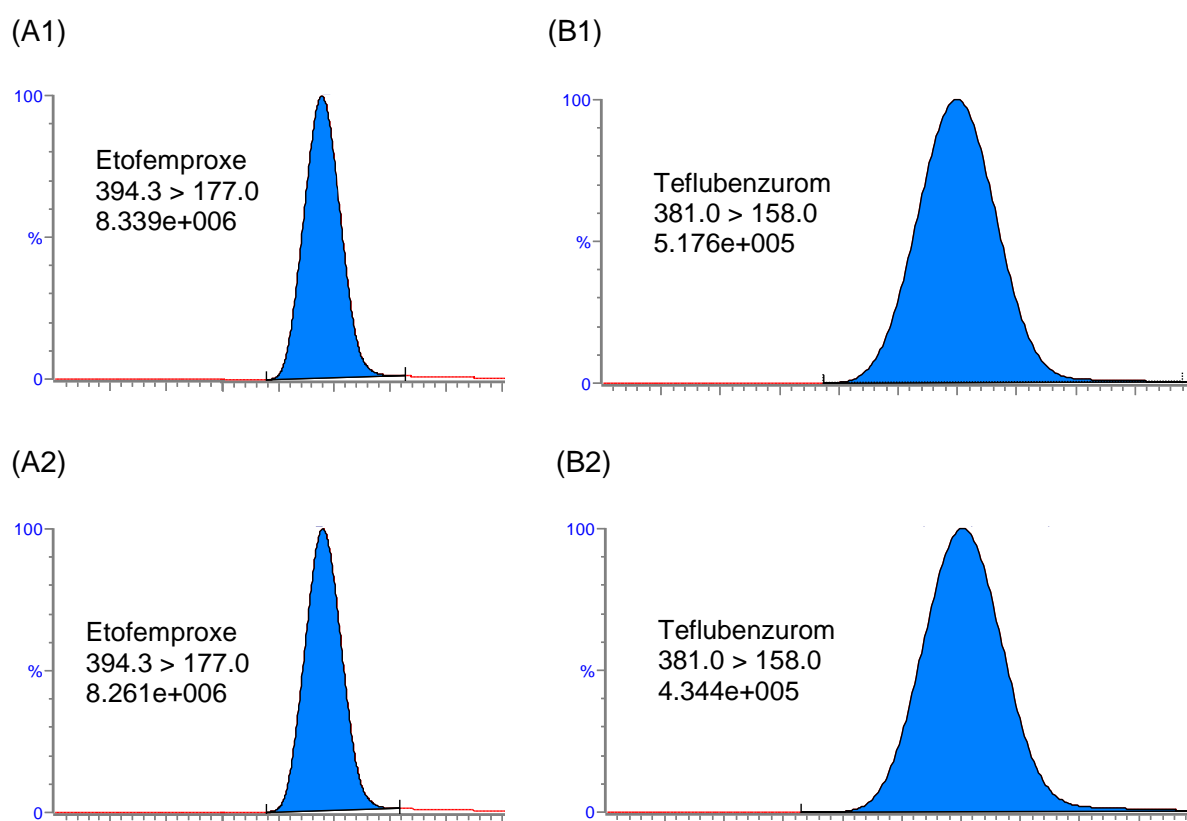


Figura 5 - Cromatogramas dos agrotóxicos Etofemproxe e Teflubenzurom quando analisados em solvente orgânico (A1 e B1) e em extrato da matriz (A2 e B2) na concentração de 5 ng mL^{-1} .

Tabela 8 - Efeito matriz (n=7) calculado para cada solução analítica dos agrotóxicos analisados por UPLC-MS/MS, para o desenvolvimento do método multirresíduo em tomate.

Agrotóxico	Efeito Matriz (%)							Média Total (%)
	0,1 (ng mL ⁻¹)	0,2 (ng mL ⁻¹)	0,5 (ng mL ⁻¹)	1,0 (ng mL ⁻¹)	5,0 (ng mL ⁻¹)	20,0 (ng mL ⁻¹)	100,0 (ng mL ⁻¹)	
Acefato	nd	nd	nd	-5	-4	5	4	0
Azoxistrobina	74	53	16	14	1	-1	-3	22
Bitertanol	nd	nd	nd	nd	1	-7	10	1
Buprofezina	1	4	4	-3	0	-1	-1	1
Carbaril	-89	-114	nd	-92	-8	-1	0	-51
Ciproconazol	3	5	14	1	1	4	3	4
Clorpirifós	38	43	18	2	2	1	3	15
Clotianidim	6	-11	9	-2	0	-1	-1	0
Cresoxim metílico	nd	nd	nd	-14	-9	-3	-3	-7
Difenoconazol	-10	20	-2	8	-1	3	-2	2
Dimetoato	19	4	0	3	3	2	1	5
Dimetomorfe	53	50	27	25	20	22	17	30
Diuron	-12	4	-3	2	0	1	-1	-1
Espinosade	5	2	0	-3	-2	-1	-2	0
Etofemproxe	-29	-8	-7	-2	2	3	0	-6
Fenarimol	nd	nd	nd	18	4	2	-1	6
Fentiona	-2	-2	2	-3	6	-1	2	0
Fludioxonil	106	430	81	27	0	1	-1	92
Flufenoxurom	3	9	2	0	4	2	2	3
Flutriafol	-7	-2	-1	0	1	0	0	-1
Hexaconazol	nd	1	-2	0	3	0	0	0
Imidacloprido	460	191	60	21	7	3	1	106
Indoxacarbe	nd	-51	-29	11	4	-3	2	-11
Linurom	3	4	-2	4	-1	1	-2	1
Lufenurom	-25	58	1	-4	-8	4	6	4
Malationa	22	13	0	5	3	0	0	6
Metamidofós	0	-7	2	-4	-2	0	-2	-2
Metidatiom	60	-17	1	-1	2	0	-1	6
Metomil	nd	nd	nd	-19	-7	0	-1	-7
Metoxifenosida	-11	-6	-6	3	2	-3	-1	-3
Ometoato	-3	8	8	-4	0	1	-2	1
Oxadixil	nd	nd	-5	2	1	0	-1	-1
Oxamil	nd	nd	-14	4	4	-4	1	-2
Pencicurom	-13	5	4	-3	1	2	-2	-1
Piraclostrobina	-9	-8	-4	-3	-4	2	-4	-4
Pirimifós-metílico	1	-6	1	-2	6	0	-2	0
Piriproxifem	-3	-6	-1	3	2	0	1	0
Procloráz	nd	62	26	2	0	-1	4	15
Profenofós	-16	9	11	0	-3	2	0	0
Propiconazol	nd	16	1	-1	7	3	-1	4
Tebuconazol	-1	16	0	5	2	1	-4	3
Teflubenzurom	-31	19	7	16	8	4	-11	2
Tiabendazol	5	7	2	2	1	1	-1	2
Tiacloprido	-4	-1	0	3	2	2	0	0
Tolifluanida	nd	-23	-12	-7	2	4	-6	-7
Triadimefom	2	6	3	-4	-2	1	-5	0
Triadimenol	nd	nd	nd	1	-5	-3	-2	-2
Triclorfom	nd	nd	-3	-2	2	0	0	-1
Trifloxistrobina	-13	-12	1	-11	0	-2	-1	-5
Triflumizol	nd	-35	-9	17	0	2	-2	-5
Zoxamida	9	9	6	5	2	-2	-1	4

nd = não detectado

Tabela 9 - Efeito matriz calculado através da inclinação das curvas analíticas obtidas a partir das soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato da matriz.

Agrotóxico	Inclinação da curva analítica (metanol)	Inclinação da curva analítica (extrato da matriz)	Efeito matriz (%)
Acefato	351	363	4
Azoxistrobina	17755	17142	-3
Bitertanol	89	98	10
Buprofezina	12364	12202	-1
Carbaril	16	16	1
Ciproconazol	2353	2424	3
Clorpirifós	4391	4531	3
Clotianidim	839	829	-1
Cresoxim metílico	96	94	-3
Difenoconazol	8338	8153	-2
Dimetoato	3417	3455	1
Dimetomorfe	2197	2567	17
Diuron	3430	3404	-1
Espinosade	4366	4296	-2
Etofenprox	6574	6588	0
Fenarimol	637	631	-1
Fentiona	5135	5215	2
Fludioxonil	205	204	-1
Flufenoxurom	4625	4703	2
Flutriafol	5527	5530	0
Hexaconazol	3771	3779	0
Imidacloprido	1048	1054	1
Indoxacarbe	1208	1238	2
Linurom	3622	3552	-2
Lufenurom	767	814	6
Malationa	3919	3919	0
Metamidofós	2719	2663	-2
Metidatiom	526	519	-1
Metomil	63	62	-1
Metoxifenosida	1485	1476	-1
Ometoato	2423	2367	-2
Oxadixil	3668	3645	-1
Oxamil	275	276	1
Pencicurorom	19571	19155	-2
Piraclostrobina	7337	7068	-4
Pirimifós-metílico	10334	10104	-2
Piriproxifem	22568	22755	1
Procloráz	4608	4775	4
Profenofós	5525	5532	0
Propiconazol	3680	3652	-1
Tebuconazol	5484	5284	-4
Teflubenzurom	847	752	-11
Tiabendazol	7610	7514	-1
Tiacloprido	10848	10858	0
Tolifluanida	1153	1082	-6
Triadimefom	3898	3719	-5
Triadimenol	309	302	-2
Triclorfom	2457	2468	0
Trifloxistrobina	12861	12747	-1
Triflumizol	6990	6848	-2
Zoxamida	9191	9132	-1

4.3.5 Ensaios de fortificação e recuperação

Os resultados dos ensaios de fortificação e recuperação dos analitos, valores de RSD% e de LOQ do método, para todos os agrotóxicos estudados nas 3 concentrações de fortificação estão apresentados na tabela 10. As amostras “branco” foram fortificadas nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Conforme pode ser observado na figura 6, dentre os agrotóxicos estudados, 45, 46 e 46 apresentaram percentuais de recuperação no intervalo aceitável de 70 a 120% para as concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Esses valores demonstram a excelente exatidão do método desenvolvido. Um dos agrotóxicos (Carbaril) apresentou, para a concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, recuperação de 64%. Porém para os níveis de fortificação de 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, os valores de recuperação foram 85 e 115% respectivamente.

A figura 7 mostra os valores de RSD% para os agrotóxicos analisados nos níveis de fortificação estudados. Como pode ser observado, somente 4 agrotóxicos apresentaram valores de RSD acima de 20% na concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Para os níveis de concentração de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ apenas 1 substância mostrou RSD superior a 20%.

Com relação ao LOQ do método (Figura 8), neste caso o LOQm real (que apresenta intervalos de recuperação e RSD% na faixa aceitável), 42 agrotóxicos apresentaram a concentração de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ como sendo o limite de quantificação do método. Para 3 dos analitos estudados o LOQm foi de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e para outros 3 analitos a concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foi definido como LOQm. Apenas para um agrotóxico (Carbaril) o valor de LOQm não pode ser determinado por não apresentar intervalos de recuperação entre 70 e 120% com RSD abaixo de 20%, para nenhuma das 3 concentrações estudadas.

Dois agrotóxicos (Bitertanol e Triflumizol) não foram detectados em nenhuma das 3 concentrações fortificadas, nas condições de análise empregadas.

A figura 9 mostra os cromatogramas MRM obtidos nas transições de quantificação (230,0>198,8) e confirmação (230>124,8) para um dos agrotóxicos mais utilizados na cultura do tomate (Dimetoato) que apresentou valores de recuperação de 103 a 108%, nas três concentrações de fortificação, e RSD% na faixa de 2,3 a 3,0%.

Tabela 10 - Média dos percentuais de recuperação e RSD% nos três níveis de fortificação estudados (10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e LOQ_m para cada agrotóxico.

Agrotóxico	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ _m ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	10		20		50		
	Rec Média (%)	RSD%	Rec Média (%)	RSD%	Rec Média (%)	RSD%	
Acefato	47	8,7	47	8,2	46	12,0	50
Azoxistrobina	108	1,9	103	3,9	105	5,5	10
Bitertanol	nd*		nd*		nd*		
Buprofezina	110	3,9	103	4,6	106	3,1	10
Carbaril	64	135,1	85	139,2	115	30,1	n.f.r
Ciproconazol	108	7,3	94	6,7	97	7,6	10
Clorpirifós	108	4,1	103	5,8	110	3,0	10
Clotianidim	104	7,8	100	5,9	100	4,6	10
Cresoxim metílico	110	24,8	104	15,8	118	12,8	20
Difenoconazol	103	12,6	96	4,3	102	5,3	10
Dimetoato	108	2,9	105	3,0	103	2,3	10
Dimetomorfe	111	9,5	109	2,9	109	5,0	10
Diuron	106	3,8	101	2,4	103	3,2	10
Espinosade	111	3,6	106	4,9	107	5,3	10
Etofenprox	106	3,8	99	6,7	102	3,3	10
Fenarimol	104	11,5	104	15,1	95	10,0	10
Fentiona	103	7,6	96	12,1	101	5,9	10
Fludioxonil	98	30,1	105	12,8	103	5,3	20
Flufenoxurom	108	5,8	102	7,3	101	9,0	10
Flutriafol	104	2,5	99	3,9	98	4,1	10
Hexaconazol	104	11,1	101	2,3	97	5,7	10
Imidacloprido	105	5,0	108	5,1	104	5,7	10
Indoxacarbe	113	13,5	88	18,7	98	6,7	10
Linurom	110	2,6	105	2,2	105	2,4	10
Lufenurom	104	8,3	101	16,5	104	11,1	10
Malationa	111	6,7	105	5,4	107	2,7	10
Metamidofós	35	8,3	32	4,3	35	7,6	50
Metidatiom	113	7,8	105	4,1	104	4,9	10
Metomil	109	13,0	104	11,2	94	9,6	10
Metoxifenosida	109	6,8	107	2,7	103	3,7	10
Ometoato	54	8,2	50	7,1	52	11,6	50
Oxadixil	110	4,8	104	3,4	105	2,1	10
Oxamil	98	18,7	88	9,2	97	5,6	10
Pencicurom	95	9,1	89	9,8	88	6,7	10
Piraclostrobina	108	4,1	102	3,8	103	4,1	10
Pirimifós metílico	107	3,5	99	5,2	98	5,3	10
Piriproxifem	108	4,1	102	6,0	103	4,9	10
Procloráz	103	13,3	97	8,0	97	5,3	10
Profenofós	112	13,4	104	6,8	107	5,4	10
Propiconazol	105	5,8	100	4,4	100	8,0	10
Tebuconazol	107	7,9	99	5,2	98	5,2	10
Teflubenzurom	113	17,4	110	16,1	114	11,9	10
Tiabendazol	101	4,0	96	3,3	98	2,4	10
Tiacloprido	87	7,5	81	8,4	86	7,1	10
Tolifluanida	109	12,6	96	8,0	96	4,5	10
Triadimefom	109	2,4	99	7,0	99	4,4	10
Triadimenol	101	46,8	109	6,4	106	8,8	20
Triclorfom	101	5,9	95	3,1	98	5,7	10
Trifloxistrobina	110	12,9	106	13,8	102	5,6	10
Triflumizol	nd*		nd*		nd*		
Zoxamida	109	6,2	104	6,5	107	5,6	10

n.d.* = não detectado

n.f.r.=não atendeu os critérios estabelecidos de recuperação e de RSD%, nestes níveis de fortificação e nestas condições de análise.

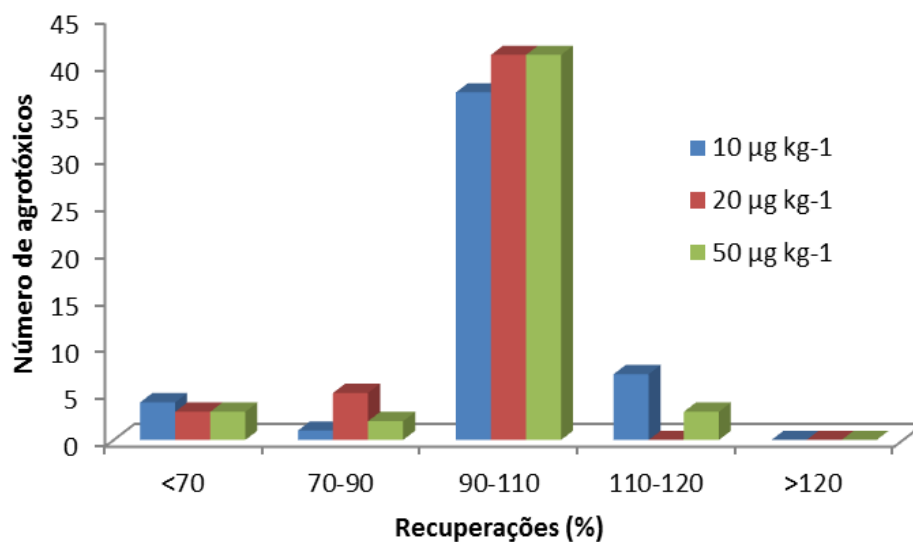


Figura 6 - Recuperações (%) para os agrotóxicos estudados nos 3 níveis de fortificação (10, 20 e 50 µg kg⁻¹).

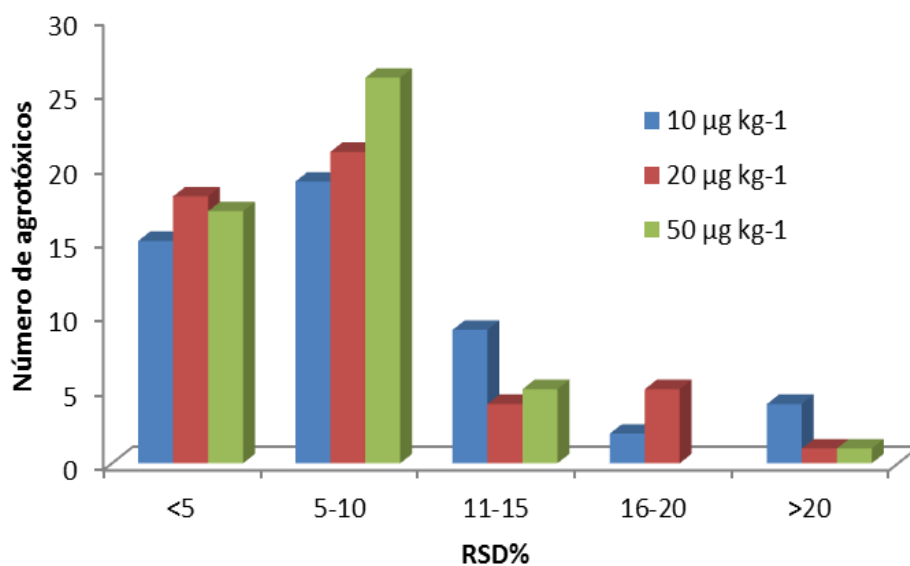


Figura 7 – Valores de RSD% para os agrotóxicos estudados nos 3 níveis de fortificação (10, 20 e 50 µg kg⁻¹).

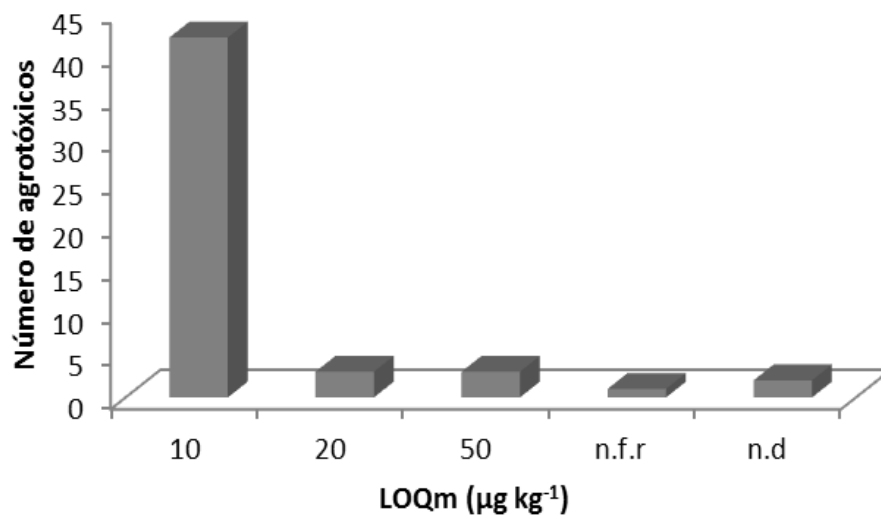


Figura 8 - Número de agrotóxicos que apresentaram o LOQm como sendo 10, 20 ou $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. n.f.r = não atendeu aos critérios estabelecidos; n.d = não detectado.

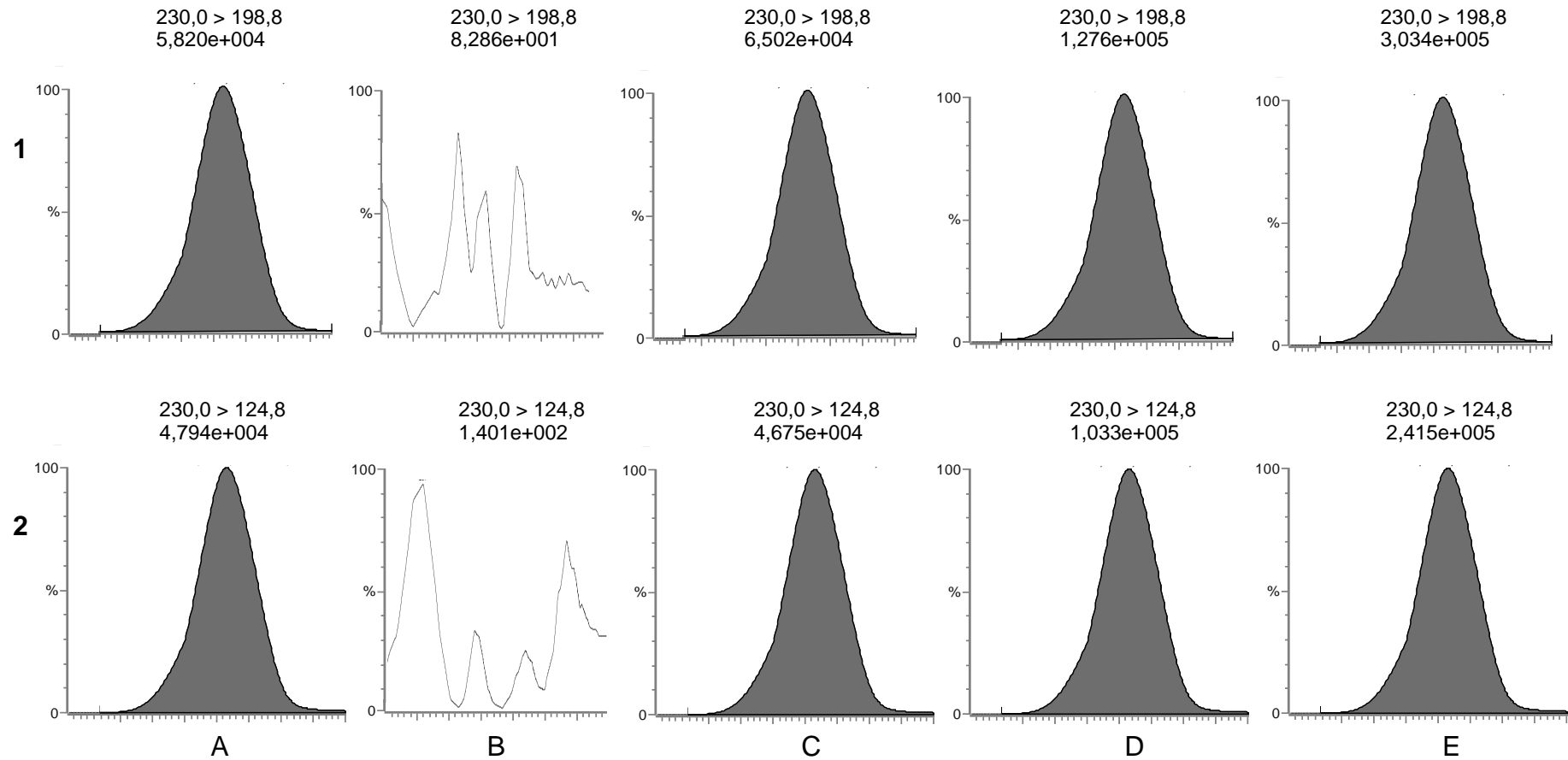


Figura 9 - Cromatogramas MRM para dimetoato: 1) 1^a transição e 2) 2^a transição obtidos por UPLC-MS/MS modo ESI positivo para A) solução analítica preparada no extrato “branco” de tomate na concentração de 2 ng mL⁻¹; B) extrato “branco” de tomate; C) tomate fortificado a 10 µg kg⁻¹; D) tomate fortificado a 20 µg kg⁻¹ e E) tomate fortificado a 50 µg kg⁻¹.

4.3.6 Precisão intermediária

A precisão intermediária do método desenvolvido foi avaliada sob a variação de dois parâmetros: diferentes analistas e diferentes dias.

O cálculo para precisão intermediária foi realizado conforme descrito em 3.7.4.5. O critério de aceitação para o método desenvolvido foi de 20% de RSD% de precisão intermediária, ou seja, encontram-se dentro da faixa aceitável de repetitividade os valores menores ou iguais a 20%.

Como pode ser observado na tabela 11, para todos os agrotóxicos estudados, os valores de RSD% para precisão intermediária ficaram dentro da faixa de aceitação, com exceção da concentração de fortificação de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o agrotóxico carbaril que apresentou 78% de RSD. O carbaril será, então, retirado do escopo da acreditação devido à insatisfatória variabilidade dos resultados. Além do carbaril, dois analitos (bitertanol e triflumizol) também serão retirados do escopo por não serem detectados em nenhuma das concentrações de fortificação estudadas pelos dois analistas, nas condições de análise empregadas.

A figura 10 mostra o número de agrotóxicos que apresentaram os diferentes valores de RSD% para cada concentração de fortificação estudada.

Tabela 11 - Resultados de precisão intermediária (RSD%) para cada agrotóxico estudado fortificados nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Médias das recuperações % (n=7)		Média das médias	Desvio Padrão (SD)	RSD de precisão intermediária (%)
		Analista 1	Analista 2			
Acefato	10	47	51	49	2,8	5,8
	20	47	56	51,5	6,4	12,4
	50	46	55	50,5	6,4	12,6
Azoxistrobina	10	108	109	108,5	0,7	0,7
	20	103	113	108	7,1	6,5
	50	105	116	110,5	7,8	7,0
Bitertanol	10	nd	nd			
	20	nd	nd			
	50	nd	nd			
Buprofezina	10	110	111	110,5	0,7	0,6
	20	103	109	106	4,2	4,0
	50	106	107	106,5	0,7	0,7
Carbaril	10	76	80	78	2,8	3,6
	20	90	26	58	45,3	78,0
	50	117	122	119,5	3,5	3,0
Ciproconazol	10	108	108	108	0,0	0,0
	20	94	109	101,5	10,6	10,4
	50	97	107	102	7,1	6,9
Clorpirifós	10	108	107	107,5	0,7	0,7
	20	103	104	103,5	0,7	0,7
	50	110	105	107,5	3,5	3,3
Clotianidim	10	104	113	108,5	6,4	5,9
	20	100	106	103	4,2	4,1
	50	100	107	103,5	4,9	4,8
Cresoxim metílico	10	110	103	106,5	4,9	4,6
	20	104	109	106,5	3,5	3,3
	50	118	97	107,5	14,8	13,8
Difenoconazol	10	103	106	104,5	2,1	2,0
	20	96	103	99,5	4,9	5,0
	50	102	103	102,5	0,7	0,7
Dimetoato	10	108	109	108,5	0,7	0,7
	20	105	107	106	1,4	1,3
	50	103	108	105,5	3,5	3,4
Dimetomorfe	10	111	111	111	0,0	0,0
	20	109	110	109,5	0,7	0,6
	50	109	111	110	1,4	1,3
Diuron	10	106	108	107	1,4	1,3
	20	101	106	103,5	3,5	3,4
	50	103	106	104,5	2,1	2,0
Espinosade	10	111	113	112	1,4	1,3
	20	106	110	108	2,8	2,6
	50	107	111	109	2,8	2,6
Etofenprox	10	106	106	106	0,0	0,0
	20	99	100	99,5	0,7	0,7
	50	102	99	100,5	2,1	2,1

nd = não detectado

Tabela 11 – Resultados de precisão intermediária (RSD%) para cada agrotóxico estudado fortificados nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Médias das recuperações % (n=7)		Média das médias	Desvio Padrão (SD)	RSD de precisão intermediária (%)
		Analista 1	Analista 2			
Fenarimol	10	104	115	109,5	7,8	7,1
	20	104	110	107	4,2	4,0
	50	95	96	95,5	0,7	0,7
Fentiona	10	103	106	104,5	2,1	2,0
	20	96	102	99	4,2	4,3
	50	101	107	104	4,2	4,1
Fludioxonil	10	98	105	101,5	4,9	4,9
	20	105	103	104	1,4	1,4
	50	103	103	103	0,0	0,0
Flufenoxurom	10	108	111	109,5	2,1	1,9
	20	102	106	104	2,8	2,7
	50	101	106	103,5	3,5	3,4
Flutriafol	10	104	108	106	2,8	2,7
	20	99	103	101	2,8	2,8
	50	98	101	99,5	2,1	2,1
Hexaconazol	10	104	108	106	2,8	2,7
	20	101	107	104	4,2	4,1
	50	97	102	99,5	3,5	3,6
Imidacloprido	10	105	113	109	5,7	5,2
	20	108	106	107	1,4	1,3
	50	104	111	107,5	4,9	4,6
Indoxacarbe	10	113	108	110,5	3,5	3,2
	20	88	107	97,5	13,4	13,8
	50	98	101	99,5	2,1	2,1
Linurom	10	110	112	111	1,4	1,3
	20	105	108	106,5	2,1	2,0
	50	105	106	105,5	0,7	0,7
Lufenurom	10	104	104	104	0,0	0,0
	20	101	104	102,5	2,1	2,1
	50	104	101	102,5	2,1	2,1
Malationa	10	111	111	111	0,0	0,0
	20	105	102	103,5	2,1	2,0
	50	107	103	105	2,8	2,7
Metamidofós	10	35	41	38	4,2	11,2
	20	32	40	36	5,7	15,7
	50	35	41	38	4,2	11,2
Metidatiom	10	113	110	111,5	2,1	1,9
	20	105	105	105	0,0	0,0
	50	104	106	105	1,4	1,3
Metomil	10	109	87	98	15,6	15,9
	20	104	95	99,5	6,4	6,4
	50	94	100	97	4,2	4,4

Tabela 11 – Resultados de precisão intermediária (RSD%) para cada agrotóxico estudado fortificados nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Médias das recuperações % (n=7)		Média das médias	Desvio Padrão (SD)	RSD de precisão intermediária (%)
		Analista 1	Analista 2			
Metoxifenosida	10	109	109	109	0,0	0,0
	20	107	107	107	0,0	0,0
	50	103	107	105	2,8	2,7
Ometoato	10	54	63	58,5	6,4	10,9
	20	50	63	56,5	9,2	16,3
	50	52	63	57,5	7,8	13,5
Oxadixil	10	110	111	110,5	0,7	0,6
	20	104	107	105,5	2,1	2,0
	50	105	106	105,5	0,7	0,7
Oxamil	10	98	103	100,5	3,5	3,5
	20	88	98	93	7,1	7,6
	50	97	96	96,5	0,7	0,7
Pencicuroom	10	95	99	97	2,8	2,9
	20	89	97	93	5,7	6,1
	50	88	99	93,5	7,8	8,3
Piraclostrobina	10	108	108	108	0,0	0,0
	20	102	108	105	4,2	4,0
	50	103	102	102,5	0,7	0,7
Pirimifós metílico	10	107	112	109,5	3,5	3,2
	20	99	109	104	7,1	6,8
	50	98	108	103	7,1	6,9
Piriproxifem	10	108	111	109,5	2,1	1,9
	20	102	107	104,5	3,5	3,4
	50	103	107	105	2,8	2,7
Procloráz	10	103	104	103,5	0,7	0,7
	20	97	95	96	1,4	1,5
	50	97	98	97,5	0,7	0,7
Profenofós	10	112	104	108	5,7	5,2
	20	104	105	104,5	0,7	0,7
	50	107	108	107,5	0,7	0,7
Propiconazol	10	105	111	108	4,2	3,9
	20	100	107	103,5	4,9	4,8
	50	100	104	102	2,8	2,8
Tebuconazol	10	107	111	109	2,8	2,6
	20	99	106	102,5	4,9	4,8
	50	98	103	100,5	3,5	3,5
Teflubenzurom	10	113	114	113,5	0,7	0,6
	20	110	95	102,5	10,6	10,3
	50	114	109	111,5	3,5	3,2
Tiabendazol	10	101	107	104	4,2	4,1
	20	96	104	100	5,7	5,7
	50	98	104	101	4,2	4,2

Tabela 11 – Resultados de precisão intermediária (RSD%) para cada agrotóxico estudado fortificados nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

(conclusão)

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Médias das recuperações % (n=7)		Média das médias	Desvio Padrão (SD)	RSD de precisão intermediária (%)
		Analista 1	Analista 2			
Tiacloprido	10	87	98	92,5	7,8	8,4
	20	81	92	86,5	7,8	9,0
	50	86	95	90,5	6,4	7,0
Tolifluanida	10	109	111	110	1,4	1,3
	20	96	106	101	7,1	7,0
	50	96	107	101,5	7,8	7,7
Triadimefom	10	109	111	110	1,4	1,3
	20	99	106	102,5	4,9	4,8
	50	99	108	103,5	6,4	6,1
Triadimenol	10	101	89	95	8,5	8,9
	20	109	105	107	2,8	2,6
	50	106	101	103,5	3,5	3,4
Triclorfom	10	101	105	103	2,8	2,7
	20	95	102	98,5	4,9	5,0
	50	98	98	98	0,0	0,0
Trifloxistrobina	10	110	108	109	1,4	1,3
	20	106	108	107	1,4	1,3
	50	102	100	101	1,4	1,4
Triflumizol	10	nd	nd			
	20	nd	nd			
	50	nd	nd			
Zoxamida	10	109	113	111	2,8	2,5
	20	104	105	104,5	0,7	0,7
	50	107	106	106,5	0,7	0,7

nd = não detectado

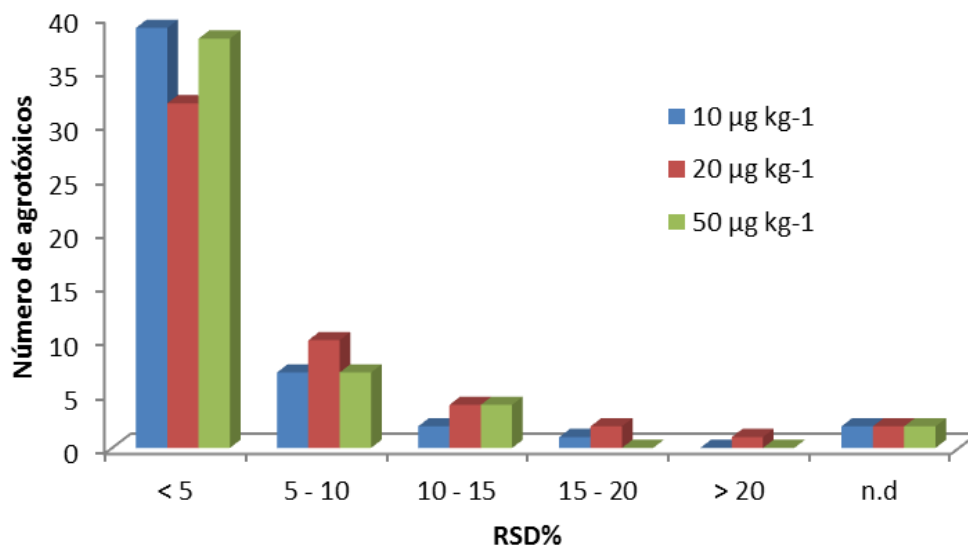


Figura 10 - Precisão intermediária avaliada através do RSD% para as três concentrações de fortificação estudadas (10, 20 e 50 µg kg⁻¹).

4.4 Participação em ensaio de proficiência

Ensaio de proficiência é o uso de comparações interlaboratoriais com o objetivo de avaliar a habilidade de um laboratório em realizar um determinado ensaio ou medição de modo competente e demonstrar a confiabilidade dos dados gerados. Além disso, um dos pré-requisitos para a acreditação de laboratórios de ensaio junto ao INMETRO é a participação em ensaios de proficiência.

O CEPARC participou do ensaio de proficiência organizado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A rodada EP AGR 08/13 (Determinação de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros), de agosto de 2013, teve como matriz o pimentão, que pertence ao mesmo grupo de culturas do tomate (matrizes com alto teor de água). (SANCO, 2013)

Vinte e dois laboratórios se inscreveram nessa rodada do ensaio de proficiência, porém apenas 17 enviaram os resultados ao provedor. Dos laboratórios participantes, 11 são acreditados na ISO/IEC 17025.

Como pode ser observado na figura 11, dos 27 agrotóxicos analisados por UPLC-MS/MS, 74,2% apresentaram LOD de $0,002 \text{ mg kg}^{-1}$ e LOQ $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$, 22,1% apresentaram LOD de $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ e LOQ $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ e 3,7% apresentaram LOD de $0,025 \text{ mg kg}^{-1}$ e LOQ $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$.

Após a realização do ensaio, o CEPARC detectou, nas amostras fortificadas de pimentão, o agrotóxico azoxistrobina a uma concentração de $0,043 \text{ mg kg}^{-1}$, permetrina a uma concentração de $0,023 \text{ mg kg}^{-1}$ e clorpirifós etílico a uma concentração abaixo do LOQ ($0,005 \text{ mg kg}^{-1}$). Além disso, na amostra “branco”, enviada pelo provedor do ensaio de proficiência, foram detectados traços de carbendazim a uma concentração abaixo do LOQ ($0,005 \text{ mg kg}^{-1}$).

Após emissão dos resultados pelo provedor do teste de proficiência, soube-se que, dos 50 possíveis agrotóxicos que poderiam estar presentes na amostra, azoxistrobina, permetrina, tetradifona e trifluralina foram os agrotóxicos fortificados na amostra de pimentão, sendo que os dois últimos não foram analisados por UPLC-MS/MS. As concentrações nominais teóricas finais dos agrotóxicos adicionados à polpa de pimentão estavam compreendidas na faixa de $0,02$ a $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$.

Para a qualificação dos resultados dos laboratórios, o índice z (z-score, medida da distância relativa do resultado da medição do laboratório em relação ao valor designado do ensaio de proficiência) foi calculado. Se o índice z for menor que 2 o resultado é considerado satisfatório, entre 2 e 3 o resultado é questionável e maior que 3 o resultado é insatisfatório.

O valor do z-score do CEPARC foi 1,3 demonstrando o desempenho satisfatório deste laboratório na participação do ensaio, cumprindo assim um requisito exigido para a acreditação.

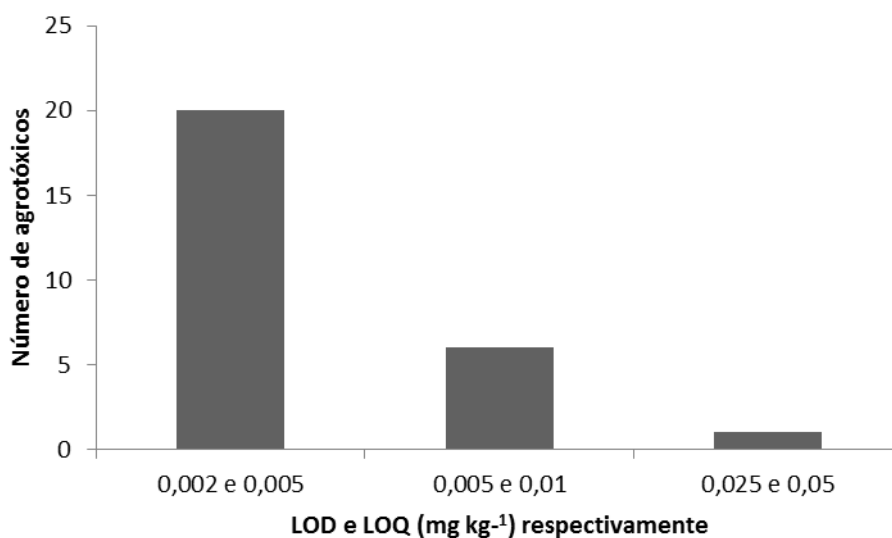


Figura 11 - LOD e LOQ (mg kg⁻¹), obtidos na determinação dos agrotóxicos analisados no ensaio de proficiência.

5 CONCLUSÕES

A acreditação de laboratórios oferece reconhecimento através de organismos oficiais que reconhecem a competência técnica do laboratório em realizar determinado serviço. Para a acreditação de laboratórios de ensaios, faz-se necessário a validação de método, no próprio laboratório, a fim de comprovar sua capacidade em realizar determinada análise através dos parâmetros de validação exigidos.

Para isso, um método analítico para determinação de 51 agrotóxicos foi desenvolvido e validado seguindo os parâmetros exigidos pelo organismo de acreditação brasileiro (INMETRO/CGCRE) e em acordo com a ISO/IEC 17025:2005 como pré-requisito para solicitação de acreditação do laboratório.

Os parâmetros da validação foram seguidos de acordo com documento orientativo da Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE), órgão ligado ao INMETRO responsável pela acreditação de laboratórios. O método foi validado sob condições monitoradas, como exigido pela ISO 17025, garantindo assim a confiabilidade dos resultados.

O método de extração utilizado para as análises foi o método Mini Luke que se baseia na extração dos agrotóxicos da matriz fazendo o uso de acetona, éter de petróleo e diclorometano. Após etapa de evaporação e reconstituição do extrato em solvente apropriado, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (UPLC-MS/MS).

O preparo das soluções estoque foi avaliado através da preparação destas por dois analistas. Dos 51 agrotóxicos estudados, 43 apresentaram diferenças na faixa aceitável de $\pm 10\%$, demonstrando a qualidade no preparo destas.

Dos 52 agrotóxicos analisados, 46 apresentaram intervalos de recuperação entre 81 e 115% quando fortificados nas concentrações de 10, 20 ou 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, demonstrando a exatidão do método multirresíduo desenvolvido. O limite de quantificação do método foi de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para 42 dos analitos estudados. Para 3 dos agrotóxicos ficou definida a concentração de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e para outros 3 a concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

O efeito matriz avaliado através da comparação entre a resposta do detector quando as soluções foram preparadas em solvente orgânico e em extrato da matriz foi aceitável para todos os agrotóxicos avaliados, visto que nenhum apresentou valor de efeito matriz fora do intervalo de -20 a +20% quando calculados através das inclinações das curvas analíticas.

O desempenho do método analítico no que diz respeito à precisão intermediária foi avaliado, visto que essa medida é a mais significativa na representação da variabilidade dos resultados em um laboratório. Após uma avaliação através do estudo de recuperação dos analitos adicionados às amostras concluiu-se que o método apresentou repetitividade satisfatória, visto que a variação do analista e a variação dos dias nos quais os ensaios foram realizados não geraram dados fora da faixa aceitável.

O escopo do método será reduzido para 48 agrotóxicos, visto que do total de 51 estudados, 2 (bitertanol e triflumizol) não foram detectados em nenhuma das condições estudadas e 1 (carbaril) não apresentou resultados satisfatórios de recuperação e RSD% em nenhuma das concentrações fortificadas. Esses agrotóxicos serão reavaliados para que possam ser incluídos novamente no escopo. Será realizado novo procedimento de infusão desses analitos diretamente no espectrômetro de massas para confirmação dos íons estudados (transições) bem como energias de colisão, voltagem do cone de amostragem, entre outros parâmetros. Caso esses resultados se mantenham, os agrotóxicos serão definitivamente retirados do escopo.

Com esses resultados, pode-se concluir que o método multirresíduo validado mostrou desempenho satisfatório, podendo ser, então, utilizado para o fim ao qual foi proposto.

6 REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO/IEC 17025**. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005. 31p.

ALBANO, F. M.; RODRIGUEZ, M. T. R. **Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais – Guia Prático**. 1ª ed. Porto Alegre: Rede Metrológica do Rio Grande do Sul, 2009.

ALMEIDA, J. A. S.; PIRES, A. C. Acreditação: vantagens e dificuldades da implementação de um Sistema da Qualidade num laboratório de ensaio e/ou calibração. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 101, p. 34-39, 2006.

ANDRADE, G. C. R. M. **Análise multirresíduo de pesticidas em tomate utilizando LC-MS/MS e avaliação dos efeitos de lavagem na descontaminação**. Tese de Doutorado, USP, Piracicaba, 2013.

ANVISA. **Nota Técnica de Esclarecimento sobre o Risco de Consumo de Frutas e Hortaliças Cultivadas com Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Acesso em: 29 de outubro de 2013. Publicado em 2010.

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): Relatório de atividades de 2011 e 2012**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16 de novembro de 2013. Publicado em 29 de outubro de 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, S. P. **Fundamentos de cromatografia**. 1ª ed. São Paulo: UNICAMP, 2010.

CONSEA. Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. **Os impactos dos agrotóxicos na segurança alimentar e nutricional: Contribuições do CONSEA.** Disponível em: < <http://www.coeptbrasil.org.br/portal/Publico/apresentarArquivo.aspx?ID=1efd7f1f-d132-426e-8644-29004872b236>> Acesso em: 20 de outubro de 2013. Publicado em setembro de 2013.

DA SILVA, R. C. **Métodos individual e multirresidual para determinação de pesticidas em grãos e derivados por GC-PFPD, GC-ITD-MS e LC-MS/MS.** Tese de Doutorado, UFSM, Santa Maria, 2011.

DIEESE. Produção brasileira e mundial de tomate. Disponível em: < <http://www.dieese.org.br/projetos/informalidade/estudoSobreAproducaoDeTomateIndustrialNoBrasil.pdf>> Acesso em: 10 de outubro de 2013. Publicado em julho de 2010.

EMBRAPA HORTALIÇAS. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/hortalicasnaweb/tomate.html>>; Acesso em: 07 de outubro de 2013. Publicado em 2010a.

EMBRAPA HORTALIÇAS. Disponível em <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/imprensa/artigos/beneficios_tomate_para_saude.htm> Acesso em: 07 de outubro de 2013. Publicado em 2010b.

EMBRAPA HORTALIÇAS. Disponível em < http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_tomate_industrializacao/pragas > Acesso em: 07 de outubro de 2013. Publicado em 2010c.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency. **Pesticide program. Promoting Safety for America's Future.** EPA-735-R-03-001, FY 2102 Annual Report. EPA, 2012. Disponível em: < <http://nepis.epa.gov/Exe>> Acesso em: 01 de novembro de 2013.

FAO. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Disponível em: < http://www.fao.org/publications/search/en/?cx=018170620143701104_933%3Aqq82js>

fa7w&q=MRL&cof=FORID%3A9&siteurl=www.fao.org%2Fpublications%2Fen%2F&ref=www.fao.org%2Fhome%2Fen%2F&ss> Acesso em: 20 de novembro de 2013.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues**. Amsterdã, Holanda: Elsevier, 2005;

GENERAL INSPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION, **Analytical Methods for Pesticides Residues in Foodstuffs**, 6^a Ed., Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague, The Netherlands, 1996.

HIEMSTRA, M.; DE KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 3-25, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. v. 25, n. 02, p.1-88, 2012.

ILAC. **Por que tornar-se um laboratório acreditado**. Disponível em: <<https://www.ilac.org/portugues.html>>; Acesso em: 02 de outubro de 2013. Publicado em maio de 2011a.

ILAC. **Vantagens de ser um laboratório acreditado**. Disponível em: <<https://www.ilac.org/portugues.html>>; Acesso em: 02 de outubro de 2013. Publicado em maio de 2011b.

IMOTO, M. N. **Validação de método multirresíduo para pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com captura de elétrons (CG/ECD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/MS)**. Dissertação de mestrado, UFPR, Curitiba, 2004.

INMETRO. **Orientação sobre a validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008**. Revisão 4, 2011a.

INMETRO. Disponível em: <www.inmetro.gov.br/credenciamento/index.asp> Acesso em: 05 de outubro de 2013. Publicado em 2011b.

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

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. D.; DE QUEIROZ, S. C. D. Residues of pesticides in food: a global environmental preoccupation – focusing on apples. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

LUKE, M. A.; FROBER, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of AOAC**, v. 56, p. 1020-1026, 1975.

MAKISHIMA, N.; MELO, W. F. O rei das hortaliças. **Cultivar Hortaliças e Frutas**. n. 29, p. 28-32, 2005.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. AGROFIT: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 13 de novembro de 2013.

MATOS, E. S.; SHIRAHIGE, F. H.; DE MELO, P. C. T. Performance for tomato hybrids of indeterminate growth depending on training systems. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 240-245, 2012.

MELO, P. C. T. Panorama da Agroindústria do tomate no mundo. In: 6º Congresso Brasileiro de Tomate Industrial, Goiânia, 2012.

NIESSEN, W. M. A.; **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**. 2ª ed. Nova Iorque, Estados Unidos: Marcel Dekker, 1999.

PIZZUTTI, I. R. et al. A multi-residue method for pesticide analysis in green coffee beans using gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry in selective ion monitoring mode. **Journal of Chromatography A**, v. 1251, p. 16-26, 2009a.

PIZZUTTI, I. R. et al. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4539-4552, 2009b.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de métodos multirresíduo de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS**. Tese de Doutorado, UFSM, Santa Maria, 2006

PORTAL DE NOTÍCIAS G1 (G1). **Melhora no clima e na safra pode fazer tomate voltar à mesa, diz IBGE**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/noticia/2013/04/melhora-no-clima-e-na-safra-podem-fazer-tomate-voltar-mesa-diz-ibge.html>> Acesso em: 10 de outubro de 2013. Publicado em 10 de abril de 2013.

REICHERT, B. **Desenvolvimento e validação de método multirresidual para determinação de pesticidas em café verde utilizando GC-MS (NCI-SIM)**. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, 2012.

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

RIGHI, L. W. **Método multirresíduo para determinação de micotoxinas em vinho por UPLC-MS/MS**. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, 2013.

SAEGER, S. D. **Determining mycotoxin and mycotoxigenic fungi in food and feed**. 1ª ed. England: Woodhead Publishing in Food Science and Technology, 2011.

SANCO, **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Document No. SANCO/12571/2013, 2013.

TERRA ECONOMIA (TERRA). Disponível em: <<http://economia.terra.com.br/preco-do-tomate-sobe-80-em-2013-mas-deve-cair-a-partir-de-maio,724821c209890410VgnCLD200000bbcceb0aRCRD.html>> Acesso em: 15 de outubro de 2013. Publicado em 09 de abril de 2013.

TRUFELLI, H. et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p. 491-509, 2011.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E. Análise do risco de contaminação ambiental por agrotóxicos nos sistemas hídricos do município de Paty do Alferes, RJ. In: XXV ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO (ENEGEP), **Anais**, Porto Alegre, 2005, p. 4259-4264.

APÊNDICE 1 - Agrotóxicos analisados e suas respectivas classes, classificação toxicológica e grupo químico.

Agrotóxico	Classe	Classificação toxicológica*	Grupo químico
Acefato	Inseticida	III	Organofosforado
Azoxistrobina	Fungicida	III	Estrobirulina
Bitertanol	Fungicida	III	Triazol
Buprofezina	Inseticida	III	Tiadiazinona
Carbaril	Inseticida	I	Carbamato
Ciproconazol	Fungicida	III	Triazol
Clorpirifós	Inseticida	II	Organofosforado
Clotianidim	Inseticida	III	Neonicotinóide
Cresoxim-metílico	Fungicida	III	Estrobirulina
Difenoconazol	Fungicida	III	Triazol
Dimetoato	Inseticida	II	Organofosforado
Dimetomorfe	Fungicida	III	Ácido Cinâmico
Diuron	Herbicida	III	Uréia
Espinosade	Inseticida	IV	Espinosina
Etofemproxe	Inseticida	IV	Piretróide
Fenarimol	Fungicida	III	Pirimidina
Fentiona	Inseticida	II	Organofosforado
Fludioxonil	Fungicida	III	Fenilpirrol
Flufenoxurom	Inseticida	III	Benzoiluréia
Flutriafol	Fungicida	III	Triazol
Hexaconazol	Fungicida	IV	Triazol
Imidacloprido	Inseticida	II	Neonicotinóide
Indoxacarbe	Inseticida	I	Oxadiazina
Linurom	Herbicida	III	Uréia
Lufenurom	Inseticida	III	Benzoiluréia
Malationa	Inseticida	III	Organofosforado
Metamidofós	Inseticida	I	Organofosforado
Metidatiom	Inseticida	I	Organofosforado
Metomil	Inseticida	IV	Carbamato
Metoxifenosida	Inseticida	IV	Diazilidrazida
Ometoato	Inseticida	I	Organofosforado
Oxadixil	Fungicida	III	Carbamato
Oxamil	Inseticida	I	Carbamato
Pencicurorom	Fungicida	IV	Feniluréia
Piraclostrobina	Fungicida	II	Metoxicarbamato
Pirimifós-metílico	Inseticida	III	Organofosforado
Piriproxifem	Inseticida	IV	Piripiloxipropilo
Procloráz	Fungicida	III	Imidazol
Profenofós	Inseticida	III	Organofosforado
Propiconazol	Fungicida	II	Triazol
Tebuconazol	Fungicida	III	Triazol
Teflubenzurom	Inseticida	IV	Benzoiluréia
Tiabendazol	Fungicida	III	Benzimidazol
Tiacloprido	Inseticida	II	Neonicotinóide
Tolifluanida	Fungicida	II	Sulfamida
Triadimefom	Fungicida	III	Triazol
Triadimenol	Fungicida	III	Triazol
Triclorfom	Inseticida	II	Organofosforado
Trifloxistrobina	Fungicida	III	Oximinoacetato
Triflumizol	Fungicida	III	Imidazol
Zoxamida	Fungicida	II	Benzidamida

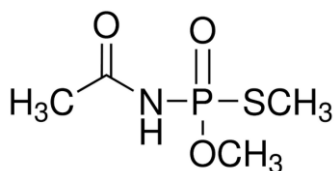
* I = altamente tóxico; II = moderadamente tóxico; III = fracamente tóxico; IV = pouco tóxico.

APÊNDICE 2 - Ensaio de fortificação e recuperação

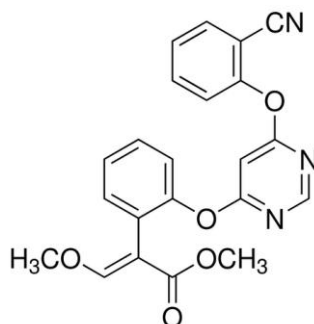
Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração da solução mistura (mg L^{-1})	Volume adicionado da solução mistura (μL)	Massa absoluta de agrotóxico adicionado à amostra (ng)	Quantidade de amostra (g)	Volume de solvente de extração (mL)	Concentração dos agrotóxicos antes da injeção (ng mL^{-1})	Fator do método*
10	1	150	150	15	90	2	5
20	1	300	300	15	90	4	5
50	1	750	750	15	90	10	5

* Fator do método = Concentração da fortificação/concentração dos agrotóxicos antes da injeção

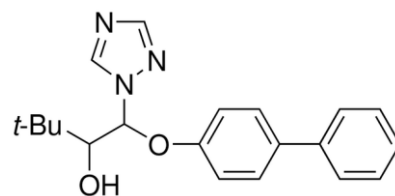
APÊNDICE 3 - Fórmulas estruturais dos agrotóxicos analisados. (Fonte: *The Pesticide Manual*)



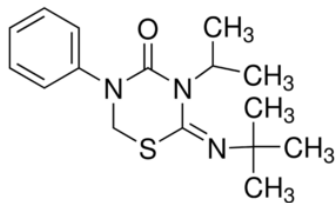
Acefato



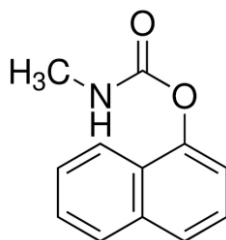
Azoxistrobina



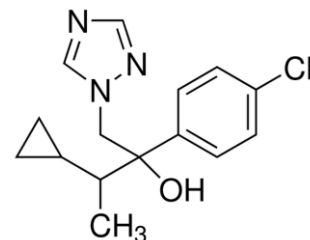
Bitertanol



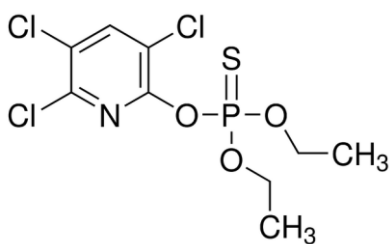
Buprofezina



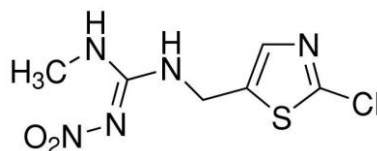
Carbaril



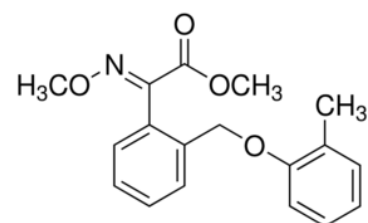
Ciproconazol



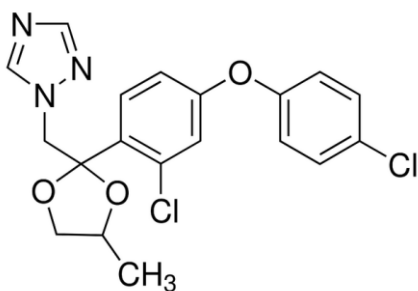
Clorpirifós



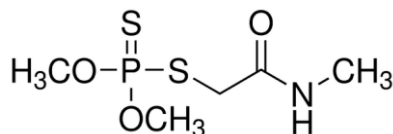
Clotianidim



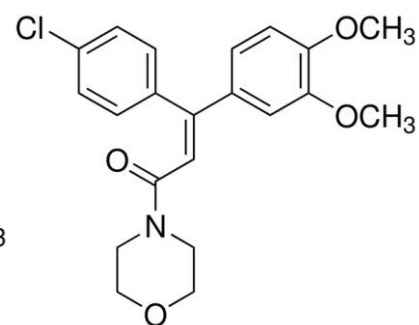
Cresoxim metílico



Difenoconazol

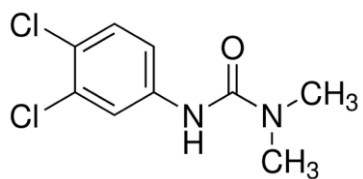


Dimetoato

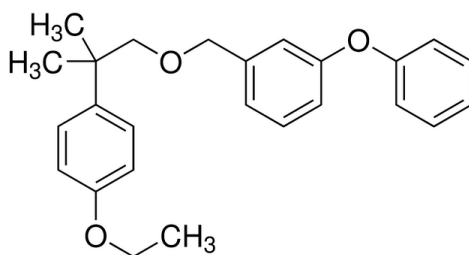


Dimetomorfe

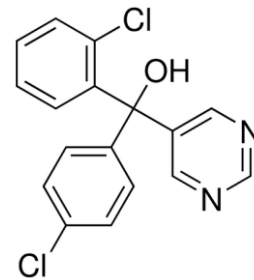
(continua)



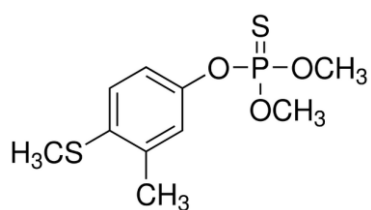
Diuron



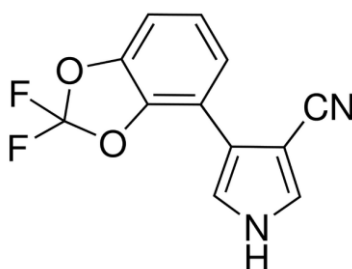
Etofemproxe



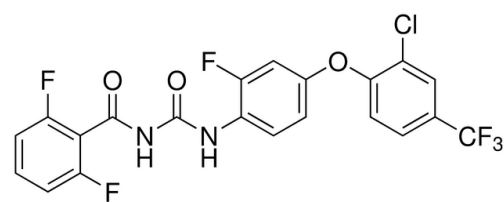
Fenarimol



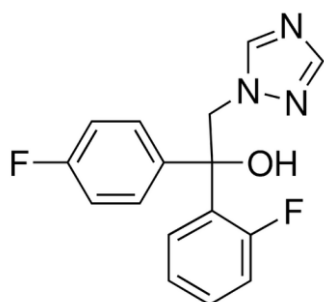
Fention



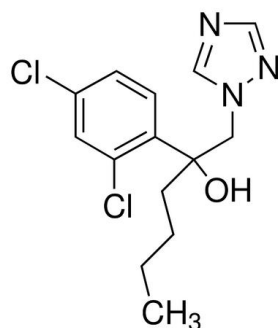
Fludioxonil



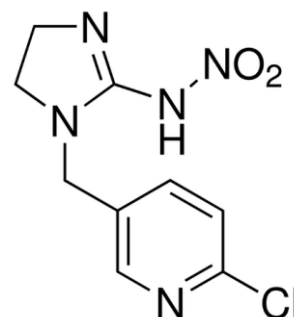
Flufenoxurom



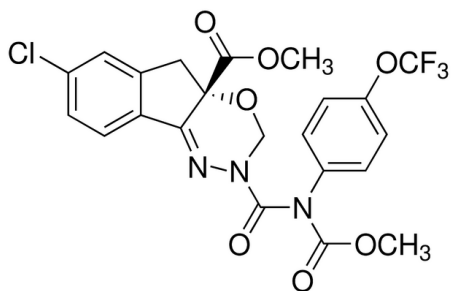
Flutriafol



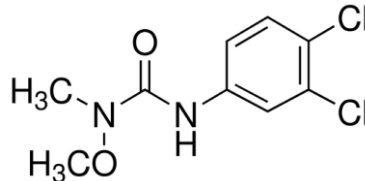
Hexaconazol



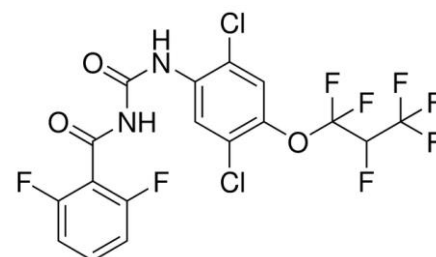
Imidacloprido



Indoxacarbe

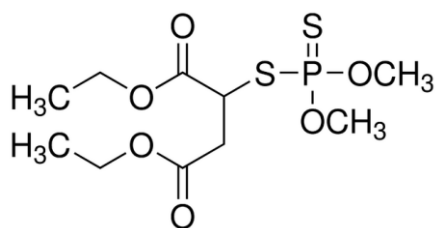


Linurom

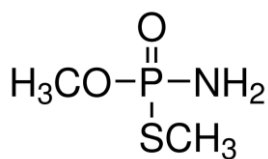


Lufenurom

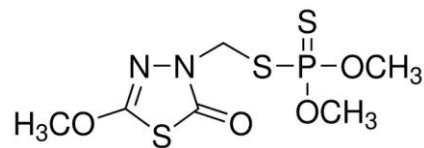
(continua)



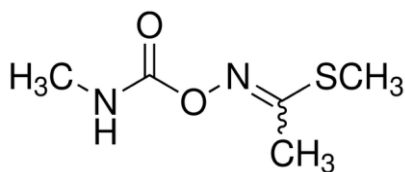
Malationa



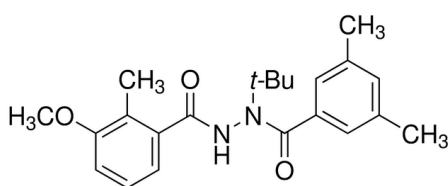
Metamidofós



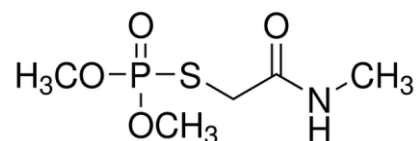
Metidatiom



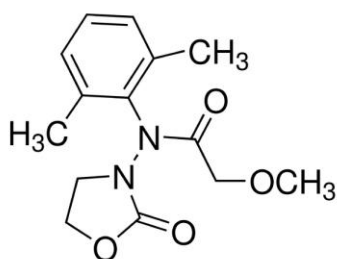
Metomil



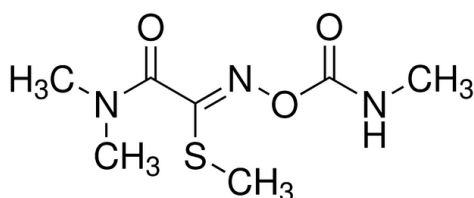
Metoxifenosida



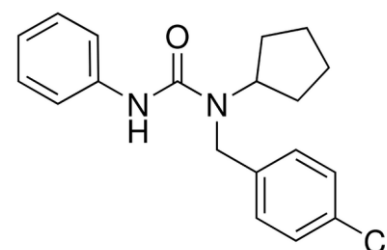
Ometoato



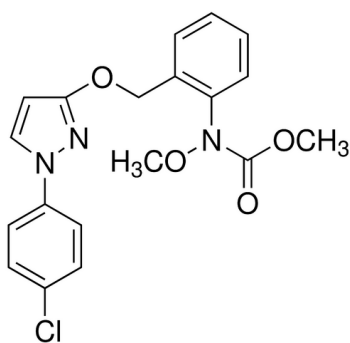
Oxadixil



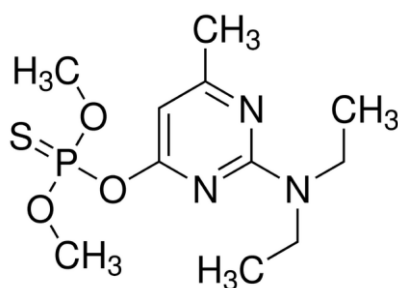
Oxamil



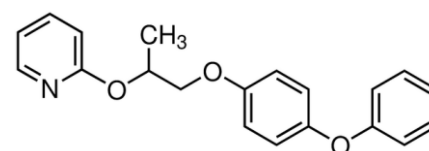
Pencicurom



Piraclostrobina

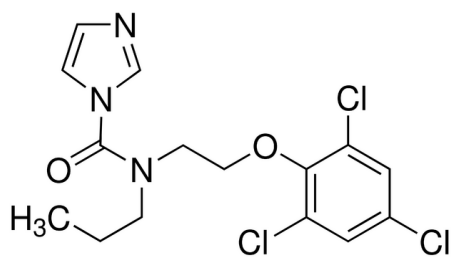


Pirimifós-metil

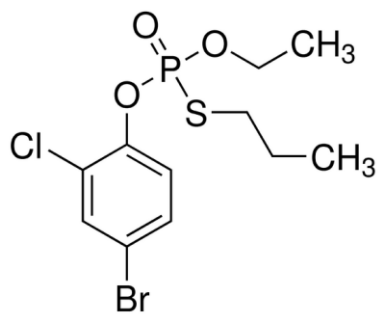


Piriproxifem

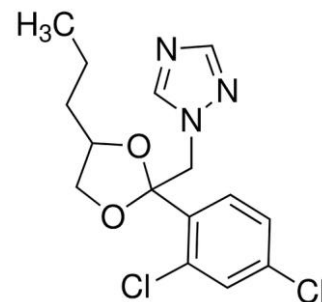
(continua)



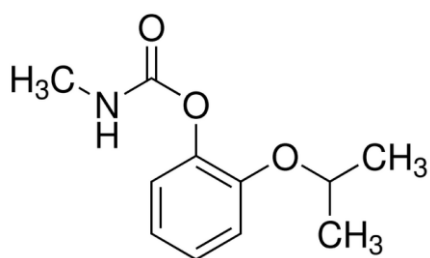
Prochloráz



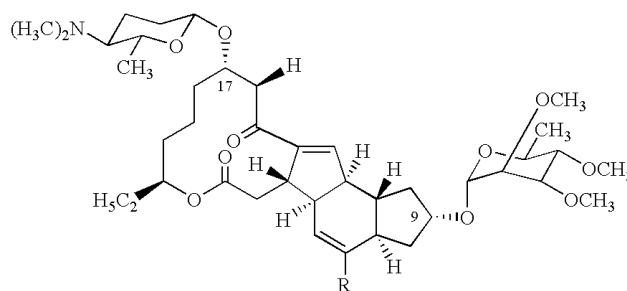
Profenofós



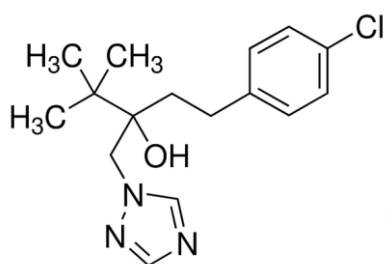
Propiconazol



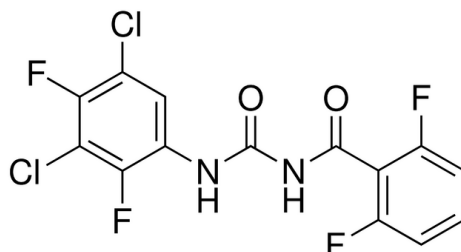
Propoxur



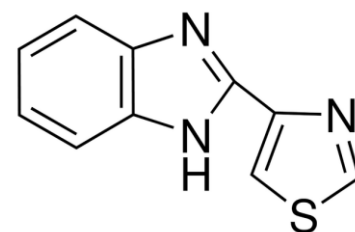
Espinosade



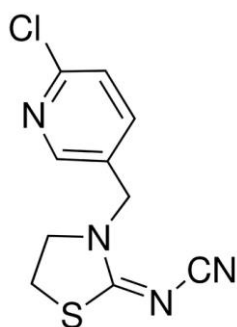
Tebuconazol



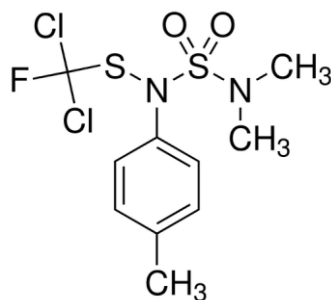
Teflubenzurom



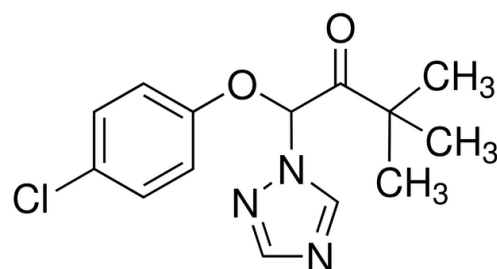
Tiabendazol



Tiacloprido

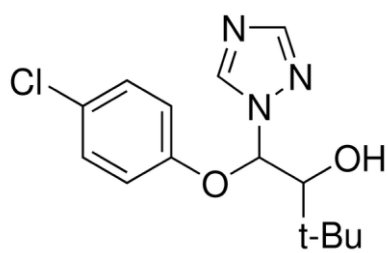


Tolifluanida

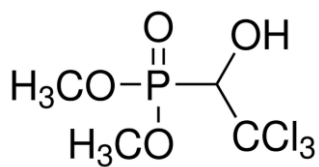


Triadimefom

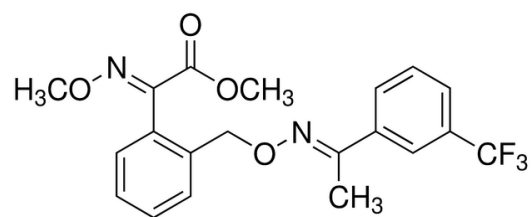
(continua)



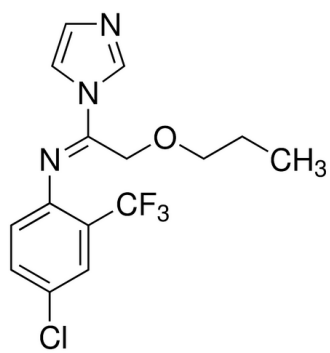
Triadimenol



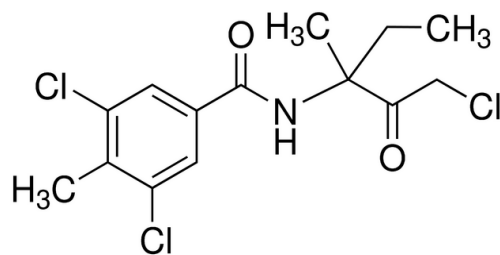
Triclorfom



Trifloxistrobina



Triflumizol



Zoxamida