

## Resíduos de inseticidas organofosforados: validação de método e ocorrência em hortícolas

### Residues of insecticides organophosphorus: method validation and occurrence in vegetables

RIALA6/1474

Eliane Hooper AMARAL<sup>1,2</sup>, Alexandre Augusto SOARES<sup>1,2</sup>, Leandro Augusto Ferreira de SOUSA<sup>1,2</sup>, Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA<sup>2</sup>, Roberto Gonçalves JUNQUEIRA<sup>2\*</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>2</sup>Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus da UFMG, Pampulha, CEP 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil. Tel. +55 (31) 3409-6913. E-mail: rjunqueira@ufmg.br

<sup>1</sup>Laboratório de Análises de Resíduos e Agrotóxicos (LARA), Laboratório de Química Agropecuária (LQA), Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA

Recebido: 06.09.2011 - Aceito para publicação: 30.04.2012

#### RESUMO

Foi validada uma metodologia de análise de multirresíduos para determinar inseticidas organofosforados clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa-metilica e pirimifós-metilico em amostras de alface, banana e tomate por cromatografia gasosa com detector termiônico específico. Foram realizados ensaios com curvas de solventes e de matriz em amostras-branco e adicionado de padrões dos analitos. A linearidade da técnica foi obtida na faixa de 12 a 92 ng.mL<sup>-1</sup>. Comprovou-se o efeito de matriz para a maioria dos analitos e matrizes estudados, com exceção de dimetoato em alface e clorpirifós em banana. As médias de recuperação, na faixa de quantificação, variaram de 81% a 104%. A metodologia apresentou precisão aceitável, com desvios padrão relativos, sob as condições de repetibilidade de 4,7% a 14,3% e precisão intermediária de 5,7% a 21,4%. Os limites de detecção e quantificação experimentais foram, respectivamente, de 5,0 µg.kg<sup>-1</sup> e de 8,0 µg.kg<sup>-1</sup>. Os limites de decisão de 6,7 a 5,2 mg.kg<sup>-1</sup> e capacidades de detecção de 11,3 a 5,5 mg.kg<sup>-1</sup> foram estimados. Das 309 amostras coletadas e analisadas no estado de Minas Gerais, 18,4% apresentaram resíduos de organofosforados, dos quais 17,2% estavam em desacordo com a legislação vigente.

**Palavras-chave.** validação intralaboratorial, resíduos de organofosforados, cromatografia gasosa, análise de alimentos, ocorrência.

#### ABSTRACT

A multi-residue analysis methodology was validated for determining the organophosphorus compounds chlorfenvinphos, chlorpyrifos, dichlorvos, dimethoate, ethion, ethoprophos, parathion-methyl and pirimiphos-methyl in lettuce, banana and tomato samples by using gas chromatography using thermionic specific detection. Experiments using solvent and matrix-matched calibration curves, blanks and spiked samples were performed. The methodology linearity ranged from 12 to 92 ng.mL<sup>-1</sup>. Matrix effect was proved to the majority of the investigated analytes and matrices, excepting dimethoate in lettuce and chlorpyrifos in banana. The recovery averages, at the quantification range, varied from 81 to 104 %. The technique showed the acceptable precision with relative standard deviations under repetitivity conditions from 4.7 to 14.3 %, and the intermediary precision from 5.7 to 21.4 %. The detection and quantification limits were 5.0 µg.kg<sup>-1</sup> and 8.0 µg.kg<sup>-1</sup>, respectively. Decision limits from 6.7 to 5.2 mg.kg<sup>-1</sup> and detection capabilities from 11.3 to 5.5 mg.kg<sup>-1</sup> were estimated. Of 309 analyzed samples, collected from the state of Minas Gerais, 18.4 % showed organophosphorus residues, being 17.2 % in disagreement with legislation in force.

**Keywords.** in-house validation, organophosphorus residues, gas chromatography, food analysis, occurrence.

## INTRODUÇÃO

A utilização dos agrotóxicos na agricultura iniciou-se na década de 1920, época em que eram pouco conhecidos do ponto de vista toxicológico. Durante a Segunda Guerra Mundial, foram utilizados como arma química, tendo seu uso se expandido enormemente a partir de então, chegando a produção industrial mundial a atingir dois milhões de toneladas de agrotóxicos por ano. No Brasil, foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas, passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 1960<sup>1</sup>.

O aumento da produção de alimentos nos países desenvolvidos, e em grande parte dos países em desenvolvimento, se deve à modernização das práticas agrícolas, incluindo a mecanização, a utilização de variedades melhoradas, de fertilizantes e agrotóxicos<sup>2</sup>. A maior utilização dos agrotóxicos é na agricultura, especialmente nos sistemas de monocultura, em grandes extensões. Estes são também utilizados em saúde pública, na eliminação e controle de vetores transmissores de doenças endêmicas. E, ainda, no tratamento de madeira para construção, no armazenamento de grãos e sementes, na produção de flores, para combate a piolhos e outros parasitas, na pecuária<sup>1</sup>.

Segundo dados fornecidos pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (Sindag), em 2009, o Brasil consumiu o equivalente a US\$ 6,6 bilhões em agrotóxicos. Deste valor, o mercado de herbicidas representou 38% (US\$ 2,5 bilhões), seguido por inseticidas e acaricidas com 31% (US\$ 2,1 bilhões), fungicidas com 27% (US\$ 1,8 bilhões) e outros com 4% (US\$ 0,3 bilhões). O emprego de agrotóxicos nos estados do Mato Grosso, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Minas Gerais representa 79% do total utilizado no país<sup>3</sup>.

No programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foram analisados resíduos de agrotóxicos em 206 amostras de maçã e 169 amostras de mamão, da safra 2009/2010. As porcentagens de amostras com irregularidades foram de 4,37% e 10,65% para maçã e mamão, respectivamente<sup>4</sup>. No âmbito do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), foram analisadas, em 2009, 3.130 amostras de 20 culturas, das quais 907 (29%) foram consideradas insatisfatórias. A avaliação das

irregularidades observadas permitiu concluir que o maior problema no Brasil, no tocante aos níveis de resíduos de agrotóxicos, não está na forma de aplicação dos produtos e, sim, na utilização de agrotóxicos não autorizados para as culturas analisadas<sup>5</sup>.

Dentre os agrotóxicos utilizados na agricultura, merecem destaque os inseticidas organofosforados (OF), ésteres do ácido fosfórico com diferentes substituintes<sup>6</sup>. Os inseticidas OF estão entre os agrotóxicos mais utilizados no mundo atualmente e são bastante utilizados na produção agrícola e horticultura no Brasil<sup>7</sup>.

A preocupação pública com o excesso de resíduos de agrotóxicos ganhou relevância na última década. Uma determinação exata dos resíduos de agrotóxicos em frutas, vegetais e matrizes relacionadas é certamente necessária e de grande importância<sup>8</sup>. Assim, a obtenção de dados analíticos comparáveis e confiáveis é essencial tanto no contexto de programas de monitoramento de níveis de resíduos em alimentos para proteção da saúde pública quanto para a eliminação de barreiras técnicas nas relações comerciais entre países.

Normas nacionais e internacionais de sistemas de gestão da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido<sup>9</sup>. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões equivocadas e a prejuízos irreparáveis. Então, para assegurar que um método analítico forneça informações confiáveis com interpretações corretas sobre a adequação de amostras, ele deve passar por uma avaliação denominada validação<sup>10</sup>. Mesmo que o método analítico já tenha sido objeto de um estudo colaborativo, ainda assim, o analista deve validá-lo no seu laboratório por meio de teste de recuperação e avaliação da linearidade, sensibilidade, seletividade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação<sup>11,12</sup>.

Diante do uso considerável de OF na agricultura brasileira, da toxicidade deste grupo de compostos e da necessidade de métodos devidamente validados para subsidiar ações de promoção da saúde relativas a este escopo analítico, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivos de validar um método para determinação de inseticidas OF clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa-metílica e pirimifós-metílico em alface, banana e tomate por cromatografia gasosa (CG) com detector termiônico específico e aplicar o método validado para monitoramento dos níveis de resíduos de OF em hortícolas produzidas em Minas Gerais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de validação e avaliação da ocorrência foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Análise de Resíduos e Agrotóxicos (LARA) do Laboratório de Química Agropecuária (LQA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), em Contagem, MG, Brasil.

### Reagentes e padrões

Acetato de etila e diclorometano grau para análise de resíduos (PAR) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Acetona grau para análise (PA) foi da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Acetona PAR e n-hexano PAR foram adquiridas da Tédia (Fairfield, OH, EUA), sulfato de sódio anidro PA foi da Spectrum (New Jersey, EUA). Os padrões analíticos de agrotóxicos OF (clorpirifós, dimetoato, etion, etoprofós, parationa-metilica e pirimifós-metilico) foram fornecidos por Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha).

### Método de ensaio

O método validado e utilizado para análise de resíduos de inseticidas OF foi o método de multirresíduos descrito por Netherlands<sup>13</sup>.

A extração de 15 g (balança analítica Gehaka modelo HR-200) das amostras trituradas foi realizada em homogeneizador do tipo *ultra turrax* (Marconi modelo MA102E) com acetona, sulfato de sódio e, em seguida, com solução de diclorometano:n-hexano (1:1, v/v). Após a extração, foi realizada uma filtração com auxílio de uma bomba de vácuo (Marconi modelo MA057). O eluato obtido foi evaporado em evaporador rotatório (Büchi modelo W240N), sendo o resíduo retomado em acetato de etila e injetado no equipamento de CG.

Na análise de resíduos de OF, foi utilizado um CG da marca Varian, modelo CP3800, equipado com amostrador automático modelo CP8200, detector nitrogênio e fósforo (DNF), detector fotométrico de chama pulsado (DFCP) e colunas cromatográficas capilares CP-Sil 19CB (14% cianopropil-fenil e 86% dimetilsilano, com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro externo, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 µm). O DFPC foi utilizado para confirmação dos inseticidas OF analisados.

### Amostras para a validação

As amostras-branco de alfaces, bananas e tomates foram adquiridas diretamente de produtores e de lojas

que revendem produtos orgânicos certificados em Belo Horizonte (MG).

As amostras foram trituradas (triturador Skymen modelo CR-4L) e homogeneizadas, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenadas sob congelamento entre -14 °C e -25 °C, até o momento dos ensaios.

### Validação do método de ensaio

Os parâmetros seletividade, linearidade, efeito do dia, efeito de matriz, exatidão, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão (CC $\alpha$ ) e a capacidade de detecção (CC $\beta$ ) foram estabelecidos em ensaios com soluções padrão, amostras-branco e amostras-branco adicionadas de padrão dos analitos<sup>14</sup>. A adequação para uso do método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos.

Para verificação da seletividade foram observadas as resoluções dos picos, a capacidade do método de detectar e quantificar os organofosforados testados e a ausência de interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

A linearidade dos métodos foi avaliada conforme procedimento descrito por Souza e Junqueira<sup>15</sup>. A avaliação do efeito do dia foi baseada nas curvas de calibração, empregadas para os estudos de linearidade, obtidas em três dias diferentes. As estimativas das inclinações e das interseções das curvas foram comparadas pelo teste de  $t^{16}$  aplicado a dois contrastes ortogonais.

O efeito de matriz foi verificado pelo método de adição de padrão em duas curvas de calibração paralelas, nas mesmas concentrações do analito, uma preparada com o solvente e outra com extratos de amostras-branco das matrizes estudadas. As curvas foram avaliadas como no estudo da linearidade e a interferência da matriz foi investigada pela comparação das inclinações e interseções das curvas, pelo teste de  $t^{16}$ .

Para os estudos de exatidão (recuperação) e precisão em condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, foram preparadas amostras adicionadas de padrão dos analitos, em cinco níveis de concentração, na faixa da curva de calibração. Para cada nível de concentração estudado, doze replicatas verdadeiras e independentes foram divididas em quatro lotes de três replicatas, sendo cada lote analisado independentemente, em diferentes dias, por diferentes analistas, simulando condições de precisão intermediária<sup>14</sup>. Os valores adotados como referência para avaliação da recuperação foram os estabelecidos pela European Commission<sup>17</sup>. Os valores

de referência para a precisão intermediária foram os obtidos pelas equações de Horwitz<sup>18</sup> ou de Thompson<sup>19</sup>, em função da concentração do analito, sendo adotado 2/3 dos valores de referência para avaliação da precisão em condições de repetibilidade<sup>20</sup>.

O limite de quantificação foi a menor concentração na qual o método pode operar com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de detecção foi a concentração mais baixa do analito detectada, mas não necessariamente quantificada, diferente de zero (sinal/ruído > 3)<sup>14</sup>.

O limite de decisão e a capacidade de detecção foram estimados de acordo com Van Looc e Beernaert<sup>21</sup>.

### Estudo da ocorrência de resíduos dos inseticidas em hortícolas de Minas Gerais

As análises foram conduzidas no período de fevereiro a dezembro de 2010. Foram coletadas 307 amostras de hortifrutícolas, sendo 10 de alface, 52 de banana, 6 de batata, 16 de cenoura, 14 de chuchu, 14 de jiló, 59 de morango, 12 de pepino, 15 de pimentão e 111 de tomate.

As amostras foram coletadas em 44 municípios do estado de Minas Gerais: Alfredo Vasconcelos, Araguari, Arapuá, Barbacena, Bom Repouso, Caeté, Cajuri, Capim Branco, Carandaí, Caratinga, Carmo do Cajuru, Coimbra, Curvelo, Estiva, Gouveia, Igarapé, Jaboticatubas, Jaíba, Jequitibá, Lagoa Formosa, Maravilhas, Nova Ponte, Nova União, Onça do Pitangui, Paracatu, Paraopeba, Patrocínio, Piedade de Caratinga, Pimenta, Pirapora, Pouso Alegre, Rio Manso, Rio Paranaíba, Sabará, Sacramento, Santa Rita de Minas, Santo Antônio da Serra, São Joaquim de Bicas, São José da Lapa, Sete Lagoas, Teófilo Otoni, Uberaba, Unai e Vespasiano, seguindo o procedimento do *Codex Alimentarius*<sup>22</sup>.

Os ingredientes ativos analisados foram: acefato, azinfós-etílico, azinfós-metílico, clorfeninfós, clorpirifós, clorpirifós-metílico, diazinona, diclorvós, dimetoato, dissulfotom, etiona, etoprofós, etrinfós, fenitrotiona, fentoato, forato, malationa, metamidofós, metidationa, mevinfós, monocrotofós, parationa-etílica, parationa-metílica, pirimifós-metílico, profenofós, perbufós e triazofós. As análises foram conduzidas empregando o método validado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Escolha de matrizes representativas

A seleção das matrizes representativas para a validação foi baseada no *Codex Alimentarius*<sup>23</sup>. Foram

escolhidos: a alface (elevado conteúdo de água e clorofila), a banana (elevado conteúdo de açúcar) e o tomate (elevado conteúdo de água e conteúdo escasso ou ausência de clorofila). Além disso, também foi levado em consideração o fato de estas culturas serem expressivas no estado de Minas Gerais.

### Seletividade

Cromatogramas obtidos das soluções padrão de OF, amostras-branco e amostras adicionadas encontram-se representados na Figura 1, indicando seletividade do método.

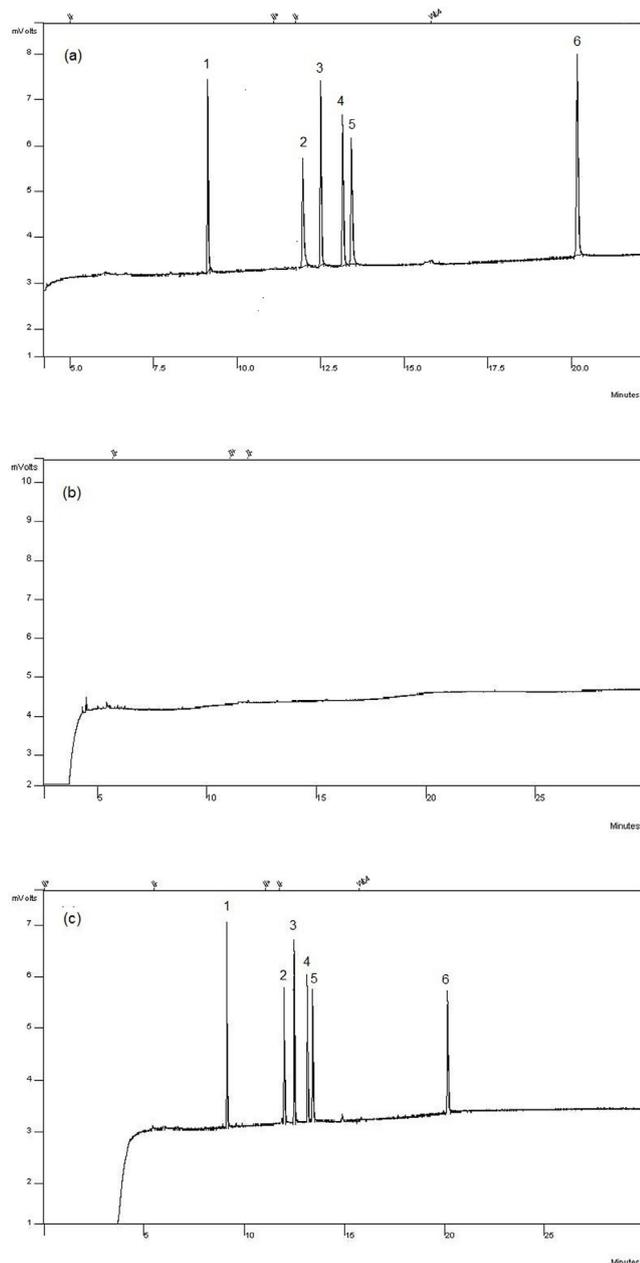
Nas amostras-branco analisadas não foram detectados (sinal/ruído < 3) picos cromatográficos nos tempos de retenção do OF pesquisados. Os perfis dos cromatogramas obtidos para soluções matriz foram semelhantes àqueles obtidos para as soluções padrão de organofosforados de concentrações correspondentes. A resolução dos picos (> 3,2) indicou capacidade do método em determinar clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa-metílica e pirimifós-metílico sem interferências mútuas.

### Linearidade

Os dados dispersos (*outliers*) detectados pelo cálculo dos resíduos padronizados Jackknife (externamente estudentizados) foram removidos. Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicaram que os desvios da normalidade não foram significativos com  $p > 0,05$ . A autocorrelação dos resíduos da regressão não foi observada ( $p > 0,10$ ), visto que as estatísticas de Durbin-Watson demonstraram independência dos mesmos. A variância dos erros ao longo dos níveis de concentração estimada pelo teste de Levene modificado também não foi significativa ( $p > 0,05$ ), indicando homoscedasticidade. Os dados obtidos foram avaliados como bem ajustados ao modelo linear. Significância da regressão ( $p < 0,001$ ) e desvios de linearidade não significativos ( $p > 0,05$ ) indicaram linearidade na faixa de 12 a 92 ng.mL<sup>-1</sup> para as três curvas dos seis OF pesquisados.

O emprego do coeficiente de correlação é predominante na avaliação da linearidade em métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos. Entretanto, este coeficiente não é adequado para demonstrar a linearidade<sup>15,24,25</sup>.

Um método de microextração em fase sólida por “*headspace*” em combinação com CG ligado ao espectrometria de massas (EM) se mostrou eficiente



**Figura 1.** Cromatogramas típicos de soluções *pool* de padrões de organofosforados (a), amostras-branco (b) e soluções *pool* de padrões de organofosforados em solução matriz (c). Sendo: (1) etoprophós, (2) dimetoato, (3) pirimifós-metílico, (4) clorpirifós, (5) parationa-metílico e (6) etiona. Condições experimentais: temperatura do forno: 80 °C (espera 1 min), aquecimento de 30 °C.min<sup>-1</sup> até 200 °C (espera 3 min), aquecimento de 15 °C.min<sup>-1</sup> até 230 °C (espera 6 min), aquecimento de 5 °C.min<sup>-1</sup> até 250 °C (patamar 10 min); tempo total da corrida: 30 min; modo de injeção: *splitless*; temperatura do injetor: 230 °C, temperatura do detector: 300 °C, gás de arraste: hélio, fluxo do gás de arraste: 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, pressão: 12,8 psi e volume de amostra injetada: 1 µL.

para a extração e quantificação dos organofosforados diazinona, fenitrotiona, fentiona, parationa, bromofós-etílico e etiona em amostras de morango e ameixa. O método apresentou um coeficiente de correlação ( $r > 0,986$ ) em uma faixa de linearidade de 50 a 500 µg.kg<sup>-1</sup><sup>26</sup>. Em um método de análise de OF por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência e reação pós-coluna, assumiu-se uma relação linear entre a concentração do analito e a área dos picos dentro da faixa de 0,016 a 7,0 µg.mL<sup>-1</sup> com coeficiente de correlação de 0,9995<sup>27</sup>. Um método multirresíduos para análise de OF utilizando DNF e captura de elétrons foi considerado linear com coeficientes da regressão de pelo menos 0,99<sup>28</sup>.

### Efeito do dia

Não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) quando as interseções foram comparadas, porém houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) para a inclinação. Com base nestes resultados, foi possível observar que as curvas de solvente não forneceram as mesmas respostas nos três dias avaliados e, diante disso, novas curvas de padrões foram preparadas em cada análise para quantificação dos resíduos de inseticidas organofosforados.

### Efeito de matriz

Nas três matrizes estudadas, as inclinações e interseções das curvas de solventes foram comparadas com aquelas estimadas para as curvas de matriz. Para alface, não houve diferença significativa entre as interseções, com exceção do etoprophós ( $p < 0,05$ ); quanto à inclinação, não houve diferença para dimetoato ( $p > 0,05$ ), enquanto os demais agrotóxicos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Nas matrizes de banana e tomate, não houve diferença significativa para interseções ( $p > 0,05$ ); quanto à inclinação, não houve diferença para clorpirifós na matriz de banana, enquanto os demais agrotóxicos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Diante disto, foi possível verificar que não há efeito de matriz para dimetoato em alface e clorpirifós em banana, enquanto os demais agrotóxicos apresentaram efeito de matriz.

Diante destes resultados, foi possível verificar que as curvas de solvente não fornecem as mesmas respostas que curvas com extrato de amostras contendo diferentes OF estudados, nas mesmas faixas de concentração, caracterizando efeito de matriz.

Segundo Ambrus<sup>29</sup>, experiências práticas indicam que o efeito matriz varia de dia para dia durante

o uso regular do método, dependendo das condições do sistema de CG (os injetores *on-column* induzem um menor efeito matriz que os injetores *split/splitless*). Consequentemente, a medida do efeito de matriz durante a validação do método fornece apenas uma indicação preliminar e este parâmetro deve ser reavaliado com uma certa frequência. Como alternativa, pode-se usar calibração com adição de padrão para demonstrar se o extrato branco da matriz disponível produz efeito idêntico ao extrato da amostra.

Foram testados os efeitos de matriz por meio da adição de padrão em método de multirresíduos, utilizando CLAE acoplada à EM. Produtos representativos foram escolhidos a fim de estudar a influência das várias matrizes. Os níveis de adição avaliados foram de 0,01 a 0,5 mg.kg<sup>-1</sup>. Os pesquisadores concluíram que, como a influência da matriz pode ser muito variável de um dia para o outro, não é possível testar somente uma vez o efeito de matriz e, então, usar este resultado para cálculos futuros. Além disso, não é possível usar o efeito da matriz para um agrotóxico em uma matriz específica e prever o efeito da matriz de outros agrotóxicos na mesma matriz<sup>30</sup>.

O efeito de matriz é maior em OF que contêm amidas, sulfonas, e/ou ligações P=O (por exemplo, dimetoato, ometoato, fosmete, dicrotofós, monocrotofós, malaxona e acefato). Os OF que não estiverem nestes grupos possuem menor efeito de matriz (exceto metamidofós). Os agrotóxicos que têm múltiplos de P=O ou amidas, tais como dicrotofós, monocrotofós e ometoato, foram afetados mais significativamente do que outros agrotóxicos com somente um único P=O ou amida. Fosmete e carbofentiona foram mais afetados devido às duas ligações =O. A quantidade do efeito relativo por grupo funcional pode ser observada comparando os resultados dos compostos com pequenas diferenças estruturais, tais como o dimetoato-ometoato, o parationa-paraoxona e o malationa-malaoxona. Terbufós e os pirazofós deram umas respostas mais elevadas na matriz em concentrações mais baixas<sup>31</sup>.

### Recuperação e precisão

As médias de recuperação e desvios padrão relativos (DPR), sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, obtidos para amostras de alface, banana e tomate adicionadas de resíduos de OF em níveis de concentração entre 8 a 62 µg.kg<sup>-1</sup> estão demonstrados na Tabela 1. Médias de recuperação e desvios aceitáveis foram atingidos para todos os OF avaliados. Estes

resultados sinalizaram adequada recuperação e precisão do método validado, considerando os critérios de aceitabilidade determinados.

Um método analítico de multirresíduos para análise OF e piretróides equipado com colunas *narrow-bore* com detectores de captura de elétrons foi otimizado e validado, apresentando recuperações em torno de 70% a 108% com níveis de adição de padrões de 0,04 a 0,10 mg.kg<sup>-1</sup> para amostras de cenoura, melão e tomate. A recuperação mais baixa foi a de clormefós de 51,5%<sup>32</sup>.

Médias de recuperações entre 70% e 116% foram obtidas para os níveis de adição de 0,01 e 0,1 mg.kg<sup>-1</sup> com valores associados de DPR ≤ 20 % na maioria dos casos. As estimativas do desvio padrão da reprodutibilidade parcial (DPR<sub>R</sub>) foram determinadas com base nas estimativas da incerteza associadas com a recuperação média observando valores de DPR<sup>33</sup>.

Um método multirresíduos para análise de OF, utilizando DNF e captura de elétrons, apresentou uma recuperação de 80% a 108% para amostras adicionadas de uva e vinho<sup>28</sup>.

Na validação de um método para determinação dos OF diazinona, fenitrotiona, fentiona, quinafós, triazofós, fosalona e pirazofós em frutas e sucos de frutas, os DPR, para análises em triplicata, das amostras fortificadas com 25 µg.kg<sup>-1</sup> de cada OF não eram maiores que 8,7%. Os testes de recuperação foram executados para concentrações entre 25 e 250 µg.kg<sup>-1</sup>. As recuperações médias para cada agrotóxico foram de 75,9% a 102,6% para o suco e de 70% a 99% para a fruta, à exceção do pirazofós em fruta, com recuperação média de 53%<sup>34</sup>.

### Limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção

O LD de OF para as três matrizes estudadas foi estabelecido como 5 µg.kg<sup>-1</sup> visto que foram detectadas com médias de sinal/ruído ≥ 3 nas amostras adicionadas. O LQ, correspondente ao menor nível de concentração no quais os experimentos indicaram exatidão e precisão do método, foi de 8 µg.kg<sup>-1</sup> nas matrizes alface, banana e tomate.

Os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  encontrados para os analitos OF estudados nas diferentes matrizes foi de 6,7 a 5,2 mg.kg<sup>-1</sup> e de 11,3 a 5,5 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente. O LMR adotado no cálculo destes parâmetros foi o estabelecido na legislação<sup>35</sup>.

Um método para a determinação de OF (diazinona, fenitrotiona, fentiona, quinalfós, triazofós,

**Tabela 1.** Médias de recuperação e desvios padrão relativo, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de alface, banana e tomate adicionadas de organofosforados em diferentes níveis de concentração

Nível ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )	Estatística	Ingrediente ativo					
		Clorpirifós	Dimetoato	Etiona	Etoprofós	Parationa	Pirimifós
<b>Alface</b>							
8	MR	92	104	104	87	93	93
	DPR <sub>r</sub>	9,4	6,5	12,8	10,4	11,5	10,2
	DPR <sub>R</sub>	10,1	9,5	12,8	17,6	15,4	12,0
35	MR	91	96	96	94	94	95
	DPR <sub>r</sub>	9,7	13,0	14,3	7,2	8,9	8,5
	DPR <sub>R</sub>	9,8	13,0	14,3	7,5	9,3	8,7
62	MR	93	98	92	93	96	94
	DPR <sub>r</sub>	6,2	6,3	11,2	6,6	5,8	5,3
	DPR <sub>R</sub>	6,4	7,3	13,1	7,8	6,0	5,7
<b>Banana</b>							
8	MR	96	91	95	95	92	89
	DPR <sub>r</sub>	10,0	12,9	8,7	9,3	13,3	9,0
	DPR <sub>R</sub>	10,7	20,6	9,3	13,5	17,8	13,1
40	MR	92	90	98	90	89	91
	DPR <sub>r</sub>	11,8	14,1	9,7	8,4	12,4	11,5
	DPR <sub>R</sub>	11,8	14,5	11,8	14,4	12,4	11,5
62	MR	88	90	95	90	90	89
	DPR <sub>r</sub>	7,4	5,2	5,5	4,7	8,6	7,8
	DPR <sub>R</sub>	13,1	10,9	21,4	10,1	19,4	14,0
<b>Tomate</b>							
8	MR	85	93	81	88	88	83
	DPR <sub>r</sub>	12,8	13,3	9,9	6,3	8,2	8,8
	DPR <sub>R</sub>	19,3	17,2	20,7	16,9	17,7	17,4
35	MR	90	94	88	88	93	93
	DPR <sub>r</sub>	11,4	10,1	10,8	13,1	11,5	12,9
	DPR <sub>R</sub>	14,7	11,8	16,5	13,8	13,1	16,2
62	MR	87	85	85	89	86	88
	DPR <sub>r</sub>	12,9	12,4	10,2	10,4	10,3	11,0
	DPR <sub>R</sub>	12,9	14,7	10,3	10,4	10,3	11,0

MR = média de recuperação, DPR<sub>r</sub> = desvio padrão relativo de repetitividade, DPR<sub>R</sub> = desvio padrão relativo da precisão intermediária. Critérios de aceitabilidade para MR: 70% a 110% (para 8  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), 80% a 110% (para 35, 40 e 62  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Critério de aceitabilidade para DPR<sub>r</sub>:  $\leq 14,7\%$ . Critério de aceitabilidade para DPR<sub>R</sub>:  $\leq 22\%$ .

fosfalona e pirazofós) em peras e em amostras do suco de fruta foi desenvolvido e validado. Os LD do método para matrizes da fruta e do suco de fruta estavam abaixo de 2  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para todos os OF<sup>34</sup>.

#### **Análise de resíduos dos inseticidas em hortifrutícolas**

Das 309 amostras analisadas, 57 apresentaram resíduos de OF, o que significa 18,4% do total, sendo: 1 (10%) amostra de alface, 3 (50%) de batata, 1 (6,25%) de cenoura, 4 (28,6%) de jiló, 8 (13,6%) de morango, 2 (16,7%) de pepino, 4 (26,7%) de pimentão e 34 (30,6%) de tomate. Nas amostras de banana e chuchu, não foram detectados resíduos dos OF (resultados abaixo do LD) (Tabela 2).

Foram consideradas amostras em desacordo com a legislação vigente quando apresentaram presença de resíduos acima do LMR e resíduos de uso não autorizado para a cultura<sup>35</sup>.

Das amostras que apresentaram resíduos, 53 estavam em desacordo com a legislação vigente, representando 17,2% em relação ao total analisado. As amostras que apresentaram percentuais acima de 20% de resíduos em desacordo, em ordem decrescente, foram as culturas de tomate, jiló e pimentão. Na avaliação dos resultados obtidos, resíduos de uso não autorizado foram identificados nas culturas de alface, cenoura, jiló, morango, pepino, pimentão e tomate e resíduos acima do LMR foram identificados nas amostras de tomate. Assim,

nas amostras de tomate, foram detectados resíduos de uso não autorizado e acima do LMR.

**Tabela 2.** Perfil dos resultados obtidos para as amostras analisadas do estado de Minas Gerais

Matriz	Números de amostras			Resíduos não autorizados
	Total analisado	Nível ≤ LMR	Nível > LMR	
Alface	10	-	-	1
Banana	52	-	-	-
Batata	6	3	-	-
Cenoura	16	-	-	1
Chuchu	14	-	-	-
Jiló	14	-	-	4
Morango	59	-	-	8
Pepino	12	-	-	2
Pimentão	15	-	-	4
Tomate	111	1	3	30
Total	309	4	3	50

LMR: Limite Máximo de Resíduo<sup>35</sup>, (-): não detectado.

Entre as amostras analisadas, o ingrediente ativo encontrado em uma amostra de alface, foi acefato na concentração de 0,54 mg.kg<sup>-1</sup>, sendo este agrotóxico não autorizado para a cultura. Das seis amostras de batata analisadas, três apresentaram resíduos de clorpirifós nas concentrações de: 0,01, 0,02 e 0,10 mg.kg<sup>-1</sup>, abaixo do limite permitido, que é de 1,0 mg.kg<sup>-1</sup>. Das 16 amostras analisadas de cenoura, uma apresentou clorpirifós na concentração de 0,01 mg.kg<sup>-1</sup>, sendo este não autorizado para a cultura. Para o produto jiló, das 14 amostras analisadas, uma apresentou clorpirifós na concentração de 0,02 mg.kg<sup>-1</sup>, duas metamidofós na concentração de 0,02 e 0,18 mg.kg<sup>-1</sup> e uma acefato na concentração de 0,18 mg.kg<sup>-1</sup>, todos não autorizados para a cultura. Das 12 amostras de pepino analisadas, uma apresentou clorpirifós e outra acefato, ambos não autorizados para a cultura, na concentração de 0,02 mg.kg<sup>-1</sup>. Das 15 amostras de pimentões, três apresentaram metamidofós nas concentrações de 0,05, 0,02 e 0,03 mg.kg<sup>-1</sup> e uma apresentou acefato na concentração de 0,04 mg.kg<sup>-1</sup>, agrotóxicos não autorizados para a cultura.

Nas amostras de morangos, todos os ingredientes ativos encontrados eram autorizados para a cultura. As concentrações de acefato foram de 0,40 e 1,05 mg.kg<sup>-1</sup>, de clorpirifós 0,01 e 0,04 mg.kg<sup>-1</sup>, de metamidofós 0,02, 0,06 e 0,61 mg.kg<sup>-1</sup> e parationa-metilica 0,04, 0,06 e 0,19 mg.kg<sup>-1</sup>.

Em monitoramento prévio, realizado em Minas Gerais em amostras coletadas na Ceasaminas, também

foram encontrados resíduos de inseticidas OF não autorizados para a cultura do morango. Em 2003, foram detectados acefato em 4 amostras e metamidofós em 5 amostras. Em 2004, acefato, clorpirifós, dimetoato e metamidofós foram detectados em 3, 1, 1 e 4 amostras, respectivamente<sup>36</sup>. Das 371 amostras de morango coletadas em 5 províncias no sudeste da Polônia, 76,1% não apresentaram resíduos e 23,9% apresentaram resíduos com níveis abaixo do permitido<sup>37</sup>. Na Turquia, resíduos dos inseticidas OF foram pesquisados em 32 amostras de morangos, sendo que 71,9% apresentaram resíduos e 53,1% excederam o LMR e os ingredientes ativos encontrados foram diazinona, metidationa, parationa e clorpirifós. 21 amostras apresentaram resíduos de diclorvós, sendo que 15 excederam o LMR<sup>38</sup>. Deve-se notar que, embora os resíduos de parationa e clorpirifós encontrados nas amostras de morango de Minas Gerais também tenham sido detectados nas amostras de morango da Turquia, o tipo de infração foi diferente, uma vez que estes agrotóxicos não são proibidos na Turquia para esta cultura. E também que continuam sendo encontrados resíduos de OF não autorizados.

Para a amostra de tomate, os ingredientes ativos encontrados variaram de 0,06 a 1,08 mg.kg<sup>-1</sup> para acefato, sendo 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> o LMR. A concentração clorpirifós foi de 0,01 a 0,07 mg.kg<sup>-1</sup> e para metamidofós de 0,04 a 0,14 mg.kg<sup>-1</sup>, sendo estes dois ingredientes não autorizados para cultura. Foram também encontrados 0,2 mg.kg<sup>-1</sup> de fentoato, cujo o LMR é de 0,1 mg.kg<sup>-1</sup> e 0,14 mg.kg<sup>-1</sup> de profenofós com LMR de 1,0 mg.kg<sup>-1</sup>.

Entre as infrações constatadas nas amostras coletadas para análise de OF, o maior número se deveu à presença de produtos não autorizados para as culturas. Das 309 amostras coletadas, 16,2% apresentaram resíduos de OF não autorizados para a cultura e 1,0% apresentaram limites acima do permitido.

Os resultados apresentados neste trabalho não diferem de outros estudos de monitoramento existentes no Brasil. Nos resultados de 2009 do PARA, dos 29% de amostras que estavam em desacordo com a legislação, 23,8% eram de agrotóxicos não autorizados para a cultura e 2,8% estavam com níveis acima dos LMR permitidos<sup>5</sup>. Em monitoramento realizado em São Paulo com amostras coletadas no período de julho de 2009 a junho de 2010 na Ceagesp, das 450 amostras analisadas, 6% apresentaram resíduos de ingredientes ativos não registrados para a cultura e 4% acima dos LMR<sup>39</sup>.

## CONCLUSÃO

Os parâmetros de desempenho avaliados indicaram adequação para uso na análise de resíduos de OF em produtos agrícolas, atendendo aos limites regulamentados pela Anvisa<sup>35</sup>.

Das 309 amostras analisadas, 18,4% apresentaram resíduos de OF, sendo que 17,2% em desacordo com a legislação vigente. Entre as amostras em desacordo, 94,3% apresentaram resíduos de OF não autorizados para a cultura e 5,7% apresentaram limites acima do permitido. Estes resultados sugerem a necessidade de maior orientação aos produtores tanto quanto à aplicação de agrotóxicos autorizados para as culturas como sobre a adoção de boas práticas agrícolas no emprego de doses seguras e do respeito ao período de carência. Os resultados deste trabalho sinalizam ainda para uma necessidade de avaliação no processo de registro e autorização de agrotóxicos para culturas de baixo suporte fitossanitário (*minor crops*).

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (578643/2008-1), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Fapemig (APQ-00923-08), pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: MS/OPAS; 1997.
2. Campanhola C, Rodrigues GS, Bettiol W. Evolução, situação atual, projeção e perspectiva de sucesso de um programa de racionalização do uso de agrotóxicos no Brasil. *In*: Rodrigues GS. Racionalización del uso de pesticidas en el Cono Sur. Montevideo: Procisur; 1998. p. 43-9.
3. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola - SINDAG. Dados do mercado: o setor de defensivos agrícolas no Brasil. [acesso 2011 jan 05]. Disponível em: [http://www.sindag.com.br/dados\_mercado.php].
4. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). [acesso 2011 mar 01]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\_editor/file/camaras\_setoriais/.../PNCRC.pdf].
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). [acesso 2011 mar 01]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia/].
6. Pagliuca G, Gazzotti T, Zironi E, Sicca P. Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr A*. 2005;1071:67-70.
7. Heudorf U, Butte W, Schulz C, Angerer J. Reference values for metabolites of pyrethroid and organophosphorous insecticides in urine for human biomonitoring in environmental medicine. *Int J Hyg Environ Health*. 2006;209:293-9.
8. Cuadros-Rodriguez L, Munõz JA, González LE, Garcia-Ayuso LE, Casado AG. A new approach to qualitative analysis of organophosphorus pesticide residues in cucumber using a double gas chromatographic system: GC-pulsed-flame photometry and retention time locking GC/mass spectrometry. *Talanta*. 2003;60:433-77.
9. Barros CB. Validação de métodos analíticos. *Biológico*. 2002;64(2):175-7.
10. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova*. 2004;27(5):771-80.
11. Eurachem. The Fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 1998.
12. Soares LMV. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2001;60(1):79-84.
13. Holanda, Ministério de Saúde Pública, Bem-Estar e Esporte. Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, 6. ed. Amsterdam: RIVM; 1996.
14. Souza SVC, Pinto CT, Junqueira RG. In-house method validation: Application in arsenic analysis. *J Food Compos Anal*. 2007;20:241-7.
15. Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal Chim Acta*. 2005;552:25-35.
16. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. 8. ed. Ames: Iowa State University; 1989.
17. European Commission. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed (doc. N° SANCO/10684/2009). *Off J Eur Comm*. 2010.
18. Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure Appl Chem*. 1995;67:331-43.
19. Thompson M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*. 2000;125:385-6.
20. European Commission - EC. Commission 554 decision 2002/657/EC, 12 ago 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Comm*. 2002;221/8.
21. Van Loco J, Beernaert H. *In*: Proceedings of European Food Chemistry, 12, 2003, Brugges, Bélgica. Proceedings... Brugges: European Food Chemistry; 2003. p. 91-4.
22. Codex Alimentarius. Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs. FAO Rome. CAC/GL 33; 1999.
23. Codex Alimentarius. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis. FAO Rome. CAC/GL 40-1993; Rev.1; 2003.
24. Burke S. Missing Values, Outliers, Robust Statistics & Non-parametric Methods. *LC-GC Europe*, January; 2001;19-24.

25. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 2002;74:835-55.
26. Lambropoulou DA, Albanis TA. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries. *J Chromatogr A*. 2003;993:197-203.
27. Pérez-Ruiz T, Matínez-Lozano C, Tómas V, Martín, J. High-performance liquid chromatographic assay of phosphate and organophosphorus pesticides using a post-column photochemical reaction and fluorimetric detection. *Anal Chim Acta*. 2005;540:383-91.
28. Oliva J, Barba A, Vela N, Melendreras F, Navarro, S. Multiresidue method for the rapid determination of organophosphorus insecticides in grapes, must and wine. *J Chromatogr A*. 2000;882:213-20.
29. Ambrus A. Worked example for validation of a multi-residue method. *In: Fajgelp A, Ambrus A. Principles and practices of method validation. Workshop on the principles and practices of method validation, nov. 1999, Budapeste: Royal Society of Chemistry; 2000. p. 157-75.*
30. Jansson C, Pihlström T, Österdahl BG, Markides KE. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. 2004;1023:93-104.
31. Schenck FJ, Lehotay SJ. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food?. *J Chromatogr A*. 2000;868:51-61.
32. Gelsomino A, Petrovicová B, Tiburtini S, Magnani E, Felici M. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. 1997;782:105-22.
33. Patel K, Fussella RJ, Macarthur R. Method validation of resistive heating-gas chromatography with flame photometric detection for the rapid screening of organophosphorus pesticides in fruit and vegetables. *J Chromatogr A*. 2004;1046:225-34.
34. Simplicio AL, Vilas Boas L. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J Chromatogr A*. 1999;833:35-42.
35. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Monografias de Produtos Agrotóxicos. [acesso 2010 set 1]. Disponível em: [<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia/>].
36. Amaral EH, Altoe IMFF. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos no morango de Minas Gerais. Belo Horizonte: CeasaMinas; 2005. (Boletim do Morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico).
37. Rogozinska K, Rupa J, Szpyrka E. Occurrence of pesticide residues in strawberries of south eastern Poland in 1996-2000. *Pestycydy*. 2001;33(37):3-4.
38. Durmusoglu E. Market basket monitoring of some organophosphorus pesticides on apple and strawberry in IzmirProvince, Turkey. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*. 2003;54(1):16-20.
39. Gorenstein O. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças frescas comercializadas na Ceagesp. *In: 44º Congresso Brasileiro de Olericultura, julho de 2004; Campo Grande, MS.*