

PREPARAÇÃO DE UM MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO PARA
CONTROLE DE AGROTÓXICOS EM HORTIFRUTIGRANJEIROS

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes
Dr. Armi W. Nóbrega

Rio de Janeiro

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

PREPARAÇÃO DE UM MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO PARA CONTROLE DE AGROTÓXICOS EM HORTIFRUTIGRANJEIROS

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso

Tese de Doutorado submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada:

Prof^a. Dr^a. _____

Shirley de M. P. Abrantes - orientadora (FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. _____

Adélia Cristina Pessoa Araújo (ITEP)

Prof^a. Dr^a. _____

Izabela Miranda de Castro - (EMBRAPA)

Prof. Dr. _____

José Ubiratan Delgado - suplente (IRD)

Orientador: _____

Prof^a.: Dr^a. Shirley M. P Abrantes

Prof.: Dr. Armi W. Nóbrega

Rio de Janeiro

2008

Cardoso, Maria Helena Wohlers Morelli

Preparação de um Material de Referência Certificado para Controle de Agrotóxicos em Hortifrutigranjeiros./ Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2008.

xvii, 191 p., il., tab.

Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária, Prog. De Pós-Graduação em Vigilância Sanitária / INCQS, 2008. Orientadores: Dr^a. Shirley de Mello Pereira Abrantes e Dr. Armi Wanderley da Nóbrega.

1. Agrotóxicos. 2. Material de Referência. 3. Hortifrutigranjeiros. 4. Análise de Resíduos. I. Título.

PREPARATION OF A CERTIFIED REFERENCE MATERIAL FOR PESTICIDE CONTROL IN FRUITS AND VEGETABLES

Às duas pessoas que deram novo sentido
a minha vida,

ROBERTHA E VICTOR.

A alguém muito especial,
que está sempre ao meu lado, compartilhando meus sonhos,
me incentivando e não me deixando esmorecer,

RENATO.

Aos meu pais Galileu (*in memorium*) e Dina
pelo apoio que me deram ao longo de toda
a minha vida, Obrigada!

Com todo o meu amor.

“Não se pode ensinar
alguma coisa a alguém, pode-se apenas
auxiliá-lo a descobrir por si mesmo”.

(Galileu Galilei)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por todas as oportunidades dela advinda.

A minha família, principalmente meu esposo e filhos, pela compreensão e paciência nos diversos e longos períodos de ausência necessários para realização deste trabalho.

A Maria José, que sem seu suporte, carinho e amizade não conseguiria finalizar este projeto.

A minha orientadora, e antes de tudo Amiga, Shirley de M. P. Abrantes, que depositando em mim toda sua confiança me incentivou durante toda a trajetória deste projeto.

Ao meu orientador, Armi W. Nóbrega, pelas oportunidades, reconhecimento e credibilidade no sucesso deste projeto.

A Lucia Helena, por sua ajuda, amizade, sugestões e companheirismo em todos os momentos.

A Adherlene, por toda ajuda, apoio e amizade.

A toda equipe do laboratório de resíduos de agrotóxicos do INCQS, do passado e do presente, que compartilharam das dificuldades e alegrias desta jornada.

Ao Fábio Bazílio e Vera Machado, pela colaboração nos cálculos de incerteza.

Ao Dr. André Gemal, diretor do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS / FIOCRUZ), por sua confiança ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. John Gilbert, do *Central Science Laboratory do Department for Environment Food and Rural Affairs* (CSL/DEFRA, York, Reino Unido) pela hospitalidade e disponibilidade de tempo para o treinamento recebido.

Ao Dr. Paul Armishaw, do *National Measurement Institute* (NMI, Austrália), pelas informações e orientações prontamente respondidas.

A Dra. Amanda Earshaw, representante do *Food Analysis Performance Assessment Scheme* (FAPAS/CSL/DEFRA, York, Reino Unido) pelo apoio e parceria nas análises finais realizadas.

Ao Centro Tecnológico do Exército, na pessoa do Dr. Hélio Vital pela gentileza e apoio na utilização do irradiador de alimentos, etapa fundamental deste trabalho.

Aos funcionários do *Central Science Laboratory*, pelo agradável convívio, criação de ambiente propício e auxílio durante o período de treinamento.

A Dra. Manuela da Silva e Carla de Oliveira Rosas, pelas análises microbiológicas realizadas nas amostras deste projeto.

Aos funcionários da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária pela atenção dispensada.

A todos que direta ou indiretamente estiveram presentes nesse momento de minha vida.

A utilização de materiais de referência é um dos requisitos necessários para garantir a confiabilidade de resultados analíticos. Esses materiais são classificados como materiais de referência (MR) e materiais de referência certificados (MRC).

Os MR e MRC vêm sendo cada vez mais utilizados nos laboratórios para o controle de análises; calibração de equipamentos; identificação e caracterização quantitativa de materiais e desenvolvimento de metodologias, atividades que demandam medidas confiáveis, comparáveis e rastreáveis. A capacidade total de produção desses materiais, em especial aqueles destinados à análise de agrotóxicos, é, a nível global, muito inferior à demanda. No Brasil não há um provedor dessa classe de material. Além disso, a importação desses materiais, os quais nem sempre apresentam matrizes e níveis de concentrações compatíveis com a realidade brasileira, é tipicamente dispendiosa e morosa. Por outro lado, a produção de um MR ou MRC de alta qualidade apresenta-se como uma tarefa complexa, geralmente precedida por um longo processo de pesquisa e desenvolvimento, o qual deve atender a rígidas normas impostas por organismos internacionais, dentre elas: a homogeneidade, estabilidade e a caracterização do mesmo.

O objetivo desse trabalho foi produzir um MRC para ser utilizado na análise de resíduos de agrotóxicos, utilizando uma matriz mundialmente consumida e enraizada no hábito alimentar: o tomate. A essa matriz foram adicionadas concentrações na faixa entre 0,1 a 0,2 mg/kg de γ -HCH, fenitrotona, clorpirifós e procimidona.

Diante da preocupação em garantir a integridade do MRC durante o tempo de estocagem, utilizou-se a radiação gama como tratamento de esterilização na dose de 2 kGy, visando evitar crescimento microbiano na polpa de tomate envasada em ampolas de vidro, o que ocasionaria a degradação dos agrotóxicos.

As concentrações certificadas dos agrotóxicos após caracterização foram $0,192 \pm 0,049$ mg/kg; $0,194 \pm 0,070$ mg/kg; $0,233 \pm 0,082$ mg/kg e $0,186 \pm 0,049$ mg/kg para o γ -HCH, a fenitrotona, clorpirifós e procimidona respectivamente.

Appropriate reference materials are essential for the successful analysis of food for pesticide residues and are a necessary requirement to guarantee the reliability of analytical results. Those materials are classified as Reference Materials (RM) and Certified Reference Materials (CRM).

In laboratories, RM and CRM are used for analytical control, to calibrate equipments, qualitative and quantitative identification of substances and the searching of new analytical methodologies. The world wide production of those materials, especially those to be used in the determination of pesticide residues in food, is very much inferior to the global demands. There no are suppliers of RM and/or CRM in Brazil. Thus, to acquire these materials from foreign suppliers, it is always necessary in Brazil to go through a costly and very time-consuming process.

The production of RM and CRM for pesticide residues analysis is a very complex task, usually anticipated by a long research process, which obeys strict regulations created by international organisms. Very much importance is attributed to the demonstration of the homogeneity of the material, its stability within a certain time interval and, of course, its composition.

The objective of this work was to produce a CRM to be used in the analysis of pesticide residue in food. A tomato matrix was used because of the importance of tomatoes in the food habits of the Brazilian population. A tomato puree was prepared and spiked with γ -HCH, fenithroton, chlorpyrifos and procymidone in concentrations ranging from 0.1 to 0.2 mg/kg.

To avoid microbial growth in the CRM enclosed in glass ampoules, which could end up in pesticide degradation, that is, to guarantee the integrity of the CRM during storage and transportation, gamma irradiation (2.0 kGy) was used to sterilize the material.

The certified concentrations of γ -HCH, fenithroton, chlorpyrifos and procymidone were 0.192 ± 0.049 mg/kg; 0.194 ± 0.070 mg/kg; 0.233 ± 0.082 mg/kg and 0.186 ± 0.049 mg/kg, respectively.

SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV – Coeficiente de Variação
CSL – Central Science Laboratory
DCE – Detector por Captura de Elétrons
DPR – Desvio Padrão Relativo
FAPAS – Food Analysis Performance Assessment Scheme
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
LD – Limite de Detecção
LDI – Limite de Detecção do Instrumento
LDM – Limite de Detecção do Método
LQ – Limite de Quantificação
LQI - Limite de Quantificação do Instrumento
LQM - Limite de Quantificação do Método
LMR – Limite Máximo de Resíduos permitido
MR – Material de Referência
MRC – Material de Referência Certificado
NIST – National Institute for Standards and Technology
PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PDP – Pesticide Data Program
VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Cálculo pela análise de variância (ANOVA) fator único	28
Tabela 2: Composição dos frutos maduros de tomate	38
Tabela 3: Teores de vitaminas nos frutos maduros de tomate	38
Tabela 4: Analitos selecionados para o estudo de preparação de um MR em agrotóxico.	39
Tabela 5: Limites máximos de resíduos permitidos para a cultura de tomate no Brasil e em outros países.	40
Tabela 6: Resultados do teste de homogeneidade apresentados pelo Central Science Laboratory – York/Reino Unido.	163
Tabela 7: Resultados do teste de homogeneidade apresentados pelo laboratório produtor do material de referência – INCQS.	164

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Modelos para o estudo de homogeneidade entre garrafas (recipientes)	27
Figura 2: Etapas de avaliação do processo de certificação de um lote de material candidato a material de referência.	32

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1: Registro de recebimento de amostra	181
Anexo 2: Descrição de materiais enviados e instruções	183
Anexo 3: Formulário para envio do resultado	186

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ANEXOS	xv
SUMÁRIO	xvi
1 – Introdução	18
1.2 – Qualidade	22
1.3 – Material de Referência	24
1.4 – Homogeneidade do Material de Referência	27
1.5 – Estabilidade do Material de Referência	30
1.6 – Caracterização do Material de Referência	32
1.7 – Esterilização de alimentos	34
1.8 – Matriz e agrotóxicos selecionados	37
1.8.1 – O tomate	37
1.8.2 – Agrotóxicos selecionados	39
2 – Objetivos	41
3 – Resultados	42
3.1 – MANUSCRITO 1 - Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomates: Uma experiência laboratorial.	43
3.2 – MANUSCRITO 2 – Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: Estudo em caso de tomates.	66
3.3 – MANUSCRITO 3 – Aplicação da Radiação Gama na Preservação de Material de Referência a ser usado na Análise de Resíduos de Agrotóxicos.	79

3.4 – MANUSCRITO 4 - Preparação e Certificação de um Material de Referência a ser Usado no Controle de Agrotóxicos em Hortifrutigranjeiros: Parte 1. Estudo da Homogeneidade.	92
3.5 – MANUSCRITO 5 - Preparação e Certificação de um Material de Referência a ser Usado no Controle de Agrotóxicos em Hortifrutigranjeiros: Parte 2. Estudo da Estabilidade.	110
3.6 – MANUSCRITO 6 – Relatório de certificação do material INCQS-MRC01	128
4 – Discussão	160
5 – Conclusões	168
6 – Referências Bibliográficas	171
7 – Anexos	180

“Agrotóxicos e afins - produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002).

Dentre as classificações que recebem são categorizados com a finalidade a que se destinam ou segundo os tipos de pragas que combatem. Quanto à finalidade de uso encontram-se subdivididos para o uso na agricultura, na erradicação de vetores transmissores de doenças contagiosas e no uso doméstico. Já quanto aos tipos de pragas que combatem são subdivididos em para o uso em animais invertebrados (insetos - inseticidas, ácaros - acaricidas e moluscos - molusquicidas), nos animais vertebrados (roedores - rodenticidas e/ou raticidas, aves – avicidas e peixes - piscicidas), nos vegetais superiores (ervas daninhas – herbicidas, culturas – reguladores de crescimento vegetal, desfolhantes e dessecantes) e nos vegetais inferiores (fungos – fungicidas e algas - algicidas) (OLIVEIRA et al., 1996; MÍDIO & MARTINS, 2000).

Os agrotóxicos comercialmente disponíveis podem ser classificados quanto à persistência no meio ambiente em: não persistentes ou ligeiramente residuais (agrotóxicos organofosforados - OFs, carbamatos e piretróides); em moderadamente persistentes ou moderadamente residuais (agrotóxicos derivados da uréia) e em persistentes ou altamente residuais (agrotóxicos organoclorados - OCs) (MENZER, 1991). Entretanto, um dos problemas existentes em relação à venda dessas substâncias se refere ao fato de que não há fiscalização devida no comércio o que acarreta muitas vezes em sérios danos a agricultura e a população.

O objetivo maior no uso dos agrotóxicos, também chamados de defensivos agrícolas, é o de colaborar no aumento da produção de alimentos, principalmente em países onde a carência é grande. Ser herói ou vilão é uma consequência que depende

de quem o utiliza. Corretamente utilizados os agrotóxicos são os maiores aliados dos agricultores e da população para se obter alimentos em quantidade.

Quando mal utilizados eles prestam um desserviço tornando-se até um risco à saúde humana (PINHEIRO et al., 1998).

Existe uma ampla gama de substâncias agrotóxicas permitidas para uso na agricultura. Entretanto, não se dispõe de um agrotóxico, completamente seletivo para determinada praga, ocasionando situações de usos indevidos. Como consequência, o homem e demais vertebrados são também susceptíveis aos seus efeitos deletérios. Em virtude da seletividade parcial dessas substâncias, contaminam grande parte da superfície terrestre. As principais rotas pelas quais os agrotóxicos atingem culturas, solo, água e gêneros alimentícios compreendem a aplicação para o controle de pragas nas plantações; a lixiviação para os lençóis freáticos; o transporte para campos adjacentes; a transferência do solo para as culturas em crescimento; o descarte em córregos, rios e lagos e os efluentes de indústrias de agrotóxicos (MUKHERJIE & GOPAL, 1996).

A contaminação humana por agrotóxicos pode ocorrer de duas formas, a direta e a indireta. A primeira é consequência da exposição sofrida pelos operários das indústrias de síntese ou ainda, na manipulação dessas substâncias por aqueles que as aplicam: agricultores, operadores de firmas de desinsetização e funcionários de campanhas de saúde pública. A forma indireta resulta da exposição do conjunto da população aos agrotóxicos, seja por causa de acidentes, seja por contaminação do ambiente por resíduos industriais ou em consequência de aplicações pouco criteriosas dessas substâncias (ZAMBRONE, 1986).

Os agrotóxicos, mesmo bem aplicados, poderão, com freqüência, deixar resíduos tóxicos nos alimentos cujo significado deve ser motivo de preocupação para autoridades governamentais e para o público em geral. Essas substâncias podem permanecer nos alimentos, por via direta (como resultado da aplicação numa das fases de sua produção, transporte ou armazenamento) ou indireta (como no caso dos animais tratados com ração composta de vegetais previamente submetidos a agrotóxicos, ou na rotação de culturas, quando o solo conserva remanescentes de aplicações anteriores e os transmite às novas culturas) (LARA, 1986).

O reconhecimento do potencial de danos ao meio ambiente por resíduos desses agrotóxicos ocasionou o desenvolvimento de complexos sistemas de registro,

organização de monitoramentos e a exigência de dados a serem fornecidos antes da liberação dos agrotóxicos para uso geral. Entretanto, os agrotóxicos são ainda utilizados nos países em desenvolvimento sem exigências adequadas para registro ou precauções convenientes, acarretando problemas potenciais ao meio ambiente (EDWARDS, 1994).

O estabelecimento de normas internacionais para evitar a contaminação excessiva dos alimentos constituiu a finalidade principal do Programa Comum FAO/OMS de Normas Alimentares e da Comissão do *Codex Alimentarius* (CODEX ALIMENTARIUS 1984 *apud* WHO, 1990).

No Brasil, os limites máximos de resíduos de agrotóxicos – LMR, são regulamentados por Portarias do Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária, bem como a indicação ao uso para determinada cultura (ANVISA, 2008). Internacionalmente esses valores podem diferir do indicado pela legislação brasileira, gerando em algumas situações problemas relacionados a barreiras sanitárias, acarretando prejuízos econômicos ao país.

Muitos países realizam frequentemente, programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em diversos gêneros alimentícios que são de grande importância. Nos Estados Unidos, o Departamento de Agricultura (USDA) introduziu o Pesticide Data Program (PDP) – cujos resultados, de análises contínuas e programadas, são disponibilizados anualmente via Internet (USDA, 2008). A União Européia e Canadá também realizam anualmente esse tipo de programa (EUC, 2008; CFIA, 2008).

Com a preocupação de avaliar a realidade brasileira em relação ao uso de agrotóxicos, foi instituído pela Resolução RDC nº 119 de 19 de maio de 2003 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA (BRASIL, 2003). Este programa foi uma iniciativa conjunta da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS / FIOCRUZ). O PARA buscou a partir de uma monitoração continuada obter dados que permitissem a tomada de decisões quanto ao uso de agrotóxicos no país, avaliando os níveis de resíduos nos alimentos produzidos, comercializados e consumidos no país; verificar se os níveis excedem o LMR (limite máximo de resíduo permitido) da legislação; e se há emprego de agrotóxicos proibidos. O PARA iniciou o monitoramento abrangendo uma gama de 88 agrotóxicos, em 9 culturas distintas as quais fazem parte

da dieta diária do povo brasileiro. Os resultados encontrados ao final do primeiro ano do programa sinalizaram como culturas mais comprometidas: o morango, o tomate, a batata e o mamão, comprovando a importância do monitoramento contínuo dos alimentos. O último relatório apresentado pelo PARA, referente aos resultados do ano de 2007, indicam que a cultura de tomate ainda está entre as mais problemáticas (ANVISA, 2008).

Todavia, quando se fala em resultado de medição de uma análise específica ou de se expressar esse resultado em um laudo analítico é imprescindível garantir a confiabilidade dos mesmos de modo a se obter valores que afastem qualquer dúvida razoável com respeito a sua exatidão e que possuam uma precisão adequada para a finalidade a que se destinam. Para que esta confiabilidade seja atingida, algumas etapas são necessárias e estarão necessariamente incluídas em qualquer programa de controle e segurança de qualidade analítica.

Atualmente, cada laboratório tem o seu próprio procedimento para assegurar a qualidade e confiabilidade dos resultados analíticos.

Podemos atribuir vários significados para 'Qualidade', porém o adotado como definição internacional pela ISO 8402/1994 é: “*qualidade é a totalidade de requisitos e características de um produto ou serviço que estabelece a sua capacidade de satisfazer necessidades explícitas ou implícitas sem prejuízo ao homem e ao meio ambiente*”.

As análises realizadas por laboratórios analíticos abrangem produtos essenciais à vida, como a água que bebemos, alimentos que ingerimos, medicamentos que usamos, etc. Portanto, o principal objetivo de qualquer laboratório analítico é de assegurar a qualidade de suas análises e resultados.

Qualidade em laboratórios é a execução de atividades técnicas e administrativas onde são organizadas e planejadas, desde a amostragem até a saída dos resultados, com o objetivo de que estes sejam precisos, exatos, rastreáveis e, conseqüentemente, confiáveis. O controle da qualidade busca ajustar e manter o processo de medição em um estado de estabilidade e reprodutividade desejado (ISO 8402/1994). O laboratório que apresenta o controle de qualidade bem definido através de um sistema de qualidade poderá alcançar a 'acreditação' que é o reconhecimento formal pelo órgão competente capacitando o laboratório a realizar ensaios ou calibrações específicas, adotando a Norma ISO/IEC 17025 (2005) para o gerenciamento da qualidade.

Diante do exposto os objetivos de se acreditar um laboratório são: garantir a validade de resultados de ensaios; promover a aceitação de resultados de ensaios pelos usuários; facilitar o comércio, tanto nacional como internacional; identificar centros de competência; entre outros.

Para que esta confiabilidade seja atingida, algumas etapas são necessárias e estarão necessariamente incluídas em qualquer bom programa de controle e segurança de qualidade analítica que são: uso de métodos analíticos validados, confirmação da identidade da substância de interesse, escolha de métodos de quantificação adequados, testes de recuperação na rotina do controle de qualidade, emprego de amostra de referência (material de referência - MR), e participação em ensaios de proficiência (VALENTE SOARES, 2001).

A medição é uma fase entre as muitas operações unitárias envolvidas durante uma análise química e conseqüentemente o seu resultado depende de como estas

foram realizadas e principalmente da aplicação de conceitos das Boas Práticas de Laboratório (BPL), o que evita operações desnecessárias e reforça os cuidados durante as etapas críticas (ALVES & MORAES, 2004). Fundamentalmente, medir é comparar e desse modo o objetivo principal da metrologia física e química é conseguir alta exatidão com mínimo de incerteza. Uma maneira de assegurar a medição é a utilização de padrão de medição de referência.

Os MR são as bases de sustentação da normalização metrológica em Química, pois permitem a rastreabilidade e confiabilidade das medições (ALVES & MORAES, 2004; IAMASHITA, 2004). Duas classes de materiais são reconhecidas pela Norma ISO/IEC 17025 (2005) e pelo VIM (INMETRO, 2007), chamados de “materiais de referência” (MR) e “materiais de referência certificado” (MRC).

Segundo o VIM (INMETRO, 2007), material de referência (MR) é definido como um *“Material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para serem usados na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais”*. Um material de referência pode ser uma substância pura ou uma mistura na forma de gás, líquido ou sólido.

O material de referência certificado (MRC) é definido como *“Material de referência, acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, e certificados por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, e cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido”*.

Cabe salientar que essas terminologias estão sendo revisadas a fim de evitar interpretações indevidas sobre as mesmas. De acordo com EMONS e colaboradores (2006), a definição recentemente aprovada pelo Comitê sobre Material de Referência da Organização Internacional de Padronização – ISO REMCO, para Material de referência é de *“Material, suficientemente homogêneo e estável no que diz respeito às suas propriedades, as quais foram estabelecidas para estarem adequadas ao uso pretendido em um processo de medição”*. Nesta definição deve-se ainda, levar em consideração que: 1 - MR é um termo genérico, ou seja, deve ser expresso como um nome geral, mas com homogeneidade e estabilidade definidas; 2 - as propriedades do MR podem ser quantitativas ou qualitativas; 3 - indicação ao uso, se para calibração do sistema de medição ou se para o controle de qualidade; 4 - o MR deve ser usado apenas para uma única finalidade em um sistema de medição, ou seja, como calibrador ou como controle de qualidade do material.

Para os materiais de referência certificados a nova definição é “*Material de Referência, caracterizado metrologicamente por um procedimento válido para uma ou mais propriedades específicas, acompanhado por um certificado que fornece o valor da propriedade especificada com sua incerteza associada e dados de rastreabilidade metrológica*”. Esta nova definição leva em consideração que o termo ‘rastreabilidade’ nos dias de hoje, também é usado para identificação das fontes de incerteza na cadeia de produção do material.

Apesar das definições citadas estarem em processo de alteração, infelizmente, não existem MR para todas as análises químicas realizadas em laboratórios. Somente estão disponíveis MR para as técnicas analíticas mais rotineiramente empregadas e para um número muito pequeno de matrizes. Na análise de agrotóxicos existe ainda um grande inconveniente analítico que é o efeito da matriz, isto é, determinados métodos sofrem interferência da matriz tornando necessário utilizar um MR com características semelhantes às da matriz (ZUCCHINI, 2004).

Estes MR são muito caros, tendo em vista que as etapas de elaboração e certificação são demoradas e dispendiosas. Quando ocorre a compra de um MR, existe ainda a possibilidade de ocorrer uma falha na logística de envio ocasionando uma perda do material devido a deficiência das condições de transporte.

No Brasil não existe nenhum provedor de MRC referente a agrotóxicos, o que dificulta o acesso e, conseqüentemente o aumento do custo para o laboratório. São disponíveis apenas MR destinados a Ensaio de Proficiência (BASTOS et al., 2007). Em sua maioria esses materiais são produzidos por países como os EUA, Inglaterra, Alemanha entre outros (ALVES & MORAES, 2004).

ARMISHAW et al. (1996) prepararam um material de referência certificado utilizando como matriz gordura animal contaminada com os agrotóxicos clorfluazuron e fluazuron ao nível de 1 mg/kg cada. Para etapa de certificação foram utilizados três laboratórios colaboradores além do laboratório produtor do material.

Em outro empreendimento ARMISHAW et al. (1998) prepararam a mesma matriz, citada anteriormente, com resíduos de dois agrotóxicos organoclorados e três organofosforados em nível de 0,2 e 0,8 mg/kg, respectivamente. Cinco laboratórios colaboram para a certificação.

No Reino Unido, o FAPAS[®] – “*Food Analysis Performance Assessment Scheme*” trabalha há anos como provedor de ensaio de proficiência de diversas

matrizes para análise de resíduos de agrotóxicos, entre as quais, hortifrutigranjeiros, leite, vinhos e farinhas (2008).

O NIST – *National Institute for Standards and Technology* dos Estados Unidos, oferece espinafre, peixes, chocolate, amostras ambientais, entre outras (2008).

O *Institute for Reference Materials and Measurements* – IRMM, na Europa oferece materiais de referência certificado para análise de resíduos de agrotóxicos nas matrizes de leite em pó, ração animal e carne de porco (2008).

A produção de um MR requer um planejamento experimental detalhado, para o qual deve ser prevista uma quantidade suficiente de material a ser utilizado para a execução de todos estudos de caracterização (ISO GUIDE 35, 2006). Basicamente são quatro as etapas de trabalho para a produção de um MR: 1 - o preparo do material, 2 - envasamento das amostras com verificação da homogeneidade do material nos recipientes, 3 - estabelecimento da estabilidade, que garantirá ao material embalado ser mantido íntegro durante estocagem por tempo pré-estabelecido e 4 - a certificação dos valores atribuídos às propriedades de interesse do material preparado. A embalagem do MR também tem sua relevância, pois irá contribuir para manter sua integridade durante todo o período despendido no transporte e armazenamento. O valor certificado dos materiais de referência deve ser mensurado a partir de cálculos estatísticos adequados e informado com suas incertezas devidamente estimadas, provenientes da caracterização da amostra, da homogeneidade e da estabilidade da amostra conforme apresentado na Equação 1 (ILAC, 2000; CHUI et al. 2005; ISO GUIDE 35, 2006).

$$u_{MRC} = \sqrt{u^2_{caracterização} + u^2_{homogeneidade} + u^2_{estabilidade}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: $u^2_{caracterização}$ = incerteza padrão inerente à caracterização da amostra

$u^2_{homogeneidade}$ = incerteza padrão inerente à homogeneidade da amostra

$u^2_{estabilidade}$ = incerteza padrão inerente à estabilidade da amostra

1.4 – Homogeneidade do Material de Referência

O teste da homogeneidade do MRC é um dos fatores essenciais para a garantia da manutenção das propriedades físico-químicas do material estudado e, portanto, as dimensões da amostra devem ser representativas ao tamanho do grupo. No experimento, o número de frascos selecionados aleatoriamente deve incluir entre 10 e 30 unidades do lote preparado (ISO GUIDE 35, 2006).

O planejamento para verificar a homogeneidade de um lote de material preparado para fins de certificação deve indicar as variabilidades da amostra dentro do recipiente, no qual uma quantidade mínima da amostra deve ser tomada para que represente a porção teste dentro do mesmo, assim como entre os recipientes que contêm os materiais que compõem o lote, devidamente envasados. Os modelos indicados para realização desse estudo são apresentados na Figura 1 (VAN DER VEEN et al., 2001; ISO GUIDE 35, 2006).

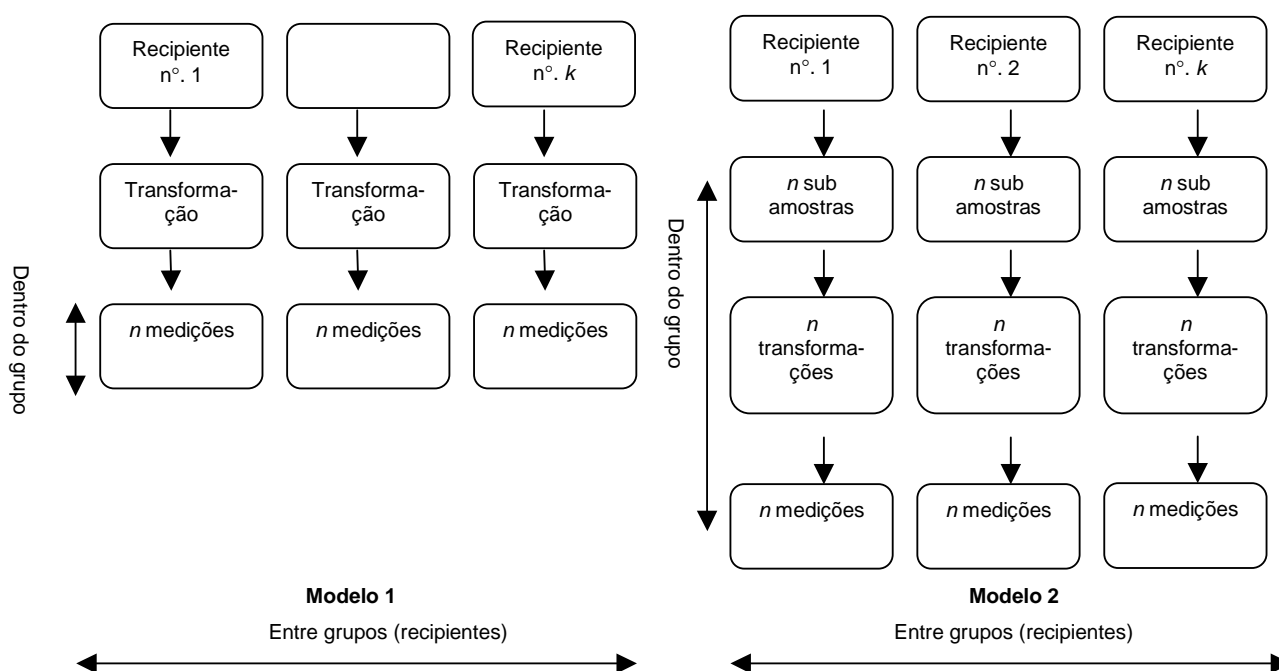


Figura 1: Modelos para o estudo de homogeneidade entre garrafas (recipientes) (figura adaptada do modelo apresentado por VAN DER VEEN et al. (2001; ISO GUIDE 35, 2006).

O Modelo 1 apresentado na Figura 1 representa a situação onde é impossível ou não devem ser realizadas, por razões econômicas, sub amostragens do mesmo

recipiente. Nesse caso o número de replicata do experimento será 1. O Modelo 2 é o experimento ideal apresentado na mesma Figura 1, no qual é possível de serem realizados vários ensaios do mesmo recipiente gerando nesse caso $n = k$ replicatas. Entretanto a maior variabilidade observada ocorrerá entre os vários recipientes envasados já que a variabilidade dentro do mesmo recipiente poderá ser minimizada homogeneizando o mesmo antes da realização do ensaio.

Os dados para o teste de homogeneidade devem ser executados em condições de estrita repetitividade (mesmo laboratório, mesmo analista e todas amostras testadas no mesmo dia, se possível). Além disso, na variabilidade entre os recipientes, deve ser incluída a incerteza relativa a tal condição (ISO GUIDE 35, 2006; ELLISON et al., 2001; ILAC, 2000).

A análise de variâncias (ANOVA) fator único (ISO GUIDE 35, 2006), é a ferramenta estatística indicada para avaliar se a variação na composição das amostras distribuídas nos recipientes foi suficientemente pequena para o objetivo proposto. O teste F de Snedecor, indica se os resultados da homogeneidade são significantes. Quando $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico, } (\alpha=5\%)}$ não há motivo para a não aceitação da homogeneidade entre os recipientes com amostra. O valor de P indica em qual nível o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi observado. Na Tabela 1 são expressas as equações e termos para o cálculo da análise de variância (ANOVA) fator único.

Tabela 1: Cálculo pela análise de variância (ANOVA) fator único.

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados (MQ)	F calculado	Valor-P	F crítico
Entre as garrafas	$\sum_i T_i^2/n - T^2/N$	$h-1$	$(\sum_i T_i^2/n - T^2/N)/(h-1)$	$\frac{\text{MQ entre}}{\text{MQ dentro}}$	DISTF (F_{cal} ; GL_{num} ; GL_{den})	F_{α} ($1; n-2$)GL
Dentro das garrafas	$\sum_i \sum_j (x_{ij} - x_i^{\text{médio}})^2$	$h(n-1)$	$(\sum_i \sum_j (x_{ij} - x_i^{\text{médio}})^2)/(h(n-1))$			
Total	Soma	Soma				

Fonte: ISO GUIDE 35 (2006).

Onde:

T_i = soma das medições para uma mesma garrafa (recipiente contendo a amostra);

T = soma de todas as medições;

N = número total de medições;

n = número de alíquotas de uma mesma garrafa (recipiente contendo a amostra);

h = número de garrafas (recipiente contendo a amostra).

A incerteza da homogeneidade é função dos valores da média quadrática (MQ) entre os recipientes (MQ_{entre}) e dentro dos recipientes (MQ_{dentro}), a qual também é fornecida pelo teste de análise de variância (Tabela 1). Quando o valor de MQ_{entre} dos recipientes for maior que MQ_{dentro} dos recipientes, a incerteza padrão devido à não homogeneidade ($u_{homogeneidade}$) é equivalente ao desvio padrão (S_{bb}) entre os recipientes, podendo ser estimada através da Equação 2, com n = número de replicatas dos recipientes.

$$u_{homogeneidade} = u_{bb} = S_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n}} \quad \text{Equação 2}$$

Nas situações onde o valor de MQ_{entre} for menor que MQ_{dentro} utiliza-se a Equação 3 para o cálculo da incerteza da homogeneidade, onde df representa o número de graus de liberdade avaliados.

$$u_{homogeneidade} = u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{df_{dentro}}} \quad \text{Equação 3}$$

1.5 – Estabilidade do Material de Referência

Assim como a avaliação da homogeneidade, a avaliação da estabilidade é também pré-requisito no processo de certificação do MR e tem como objetivo avaliar a estabilidade do mesmo após a sua preparação durante períodos específicos de tempo e temperatura, pois o material preparado pode ser suscetível à degradação com o tempo devido a fenômenos produzidos por: temperatura, luz, oxigênio, umidade, atividade microbiológica etc.

O teste de estabilidade é mais complexo que o de homogeneidade e devem ser considerados dois tipos de variação:

- Estabilidade a longo prazo do material (representando o tempo de estocagem ou tempo de prateleira);
- Estabilidade a curto prazo do material (representando, por exemplo, condições de transporte).

O primeiro tipo é o modelo clássico, mede o valor da propriedade da amostra em função do tempo. A duração do estudo de estabilidade relacionado a longa duração normalmente pode variar entre 24 e 36 meses com intervalos típicos de amostragem de 5 a 6 vezes durante o período determinado. Como este modelo é executado sob condições de reprodutibilidade, deve apresentar o valor da incerteza inerente a esta característica - u_{lte} , - onde lte significa longo tempo de estocagem, ou simplesmente $u_{estabilidade}$ (VAN DER VEEN, 2001; ISO GUIDE 35, 2006).

O estudo realizado em curto período de tempo é conhecido como '*isochronous design*' ou modelo isocrônico (LAMBERTY et al. 1998), onde são simultaneamente realizadas medições de amostras mantidas em diferentes temperaturas demonstrando o comportamento acelerado dos agrotóxicos em termos de estabilidade. Para este modelo as medições são efetuadas sob condições de repetitividade, ou seja, em uma mesma análise é possível avaliar diferentes condições de estocagem. Nesse caso deve apresentar incertezas menores que no modelo clássico e sendo assim, na maioria das vezes essas incertezas são negligenciadas. O tempo de estudo pode ser de dois meses, podendo se estender para seis a doze meses a fim de se obter informações adicionais sobre o longo tempo de estocagem (VAN DER VEEN et al., 2001; LINSINGER et al., 2001; ISO GUIDE 35, 2006).

A ISO Guide 35 (2006), estabelece que a avaliação da estabilidade do material seja feita pela análise de resíduos da regressão linear e a análise de variância (ANOVA), que consiste em observar se a regressão linear dos valores de concentração dos analitos ao longo do tempo apresenta alguma tendência. Se a inclinação da reta ou a não linearidade da mesma não forem significativas, ou seja, se a concentração do agrotóxico não variar em função do tempo, o material é considerado estável. Sendo assim, o agrotóxico é considerado estável quando apresentar o valor-P maior que 0,05 (95%), indicando que a inclinação da regressão linear é insignificante (VAN DER VEEN et al.2001, ISO GUIDE 35, 2006).

A partir da tabela gerada com os dados da regressão e da ANOVA, calcula-se a incerteza inerente a estabilidade multiplicando o valor do erro padrão da inclinação pelo tempo de estudo, de acordo com a Equação 4 (ISO GUIDE 35, 2006).

$$u_{\text{est}} = \text{erro padrão} \times \text{tempo de estudo}$$

Equação 4

1. 6 – Caracterização do Material de Referência

A caracterização do candidato a material de referência certificado baseia-se na ISO GUIDE 35 (2006).

Os materiais de referência geralmente são caracterizados baseados na exatidão de todo o processo experimental e desse modo o valor certificado da propriedade representa a melhor estimativa do valor verdadeiro. A incerteza declarada desse valor da propriedade deve levar em consideração todos efeitos casuais e sistemáticos inerentes ao processo de medição, tão bem como a variabilidade entre as amostras (homogeneidade) e o tempo de validade do material (estabilidade). Na Figura 2 é apresentado um típico exemplo do processo de certificação de um MR (VAN DER VEEN et al., 2001).

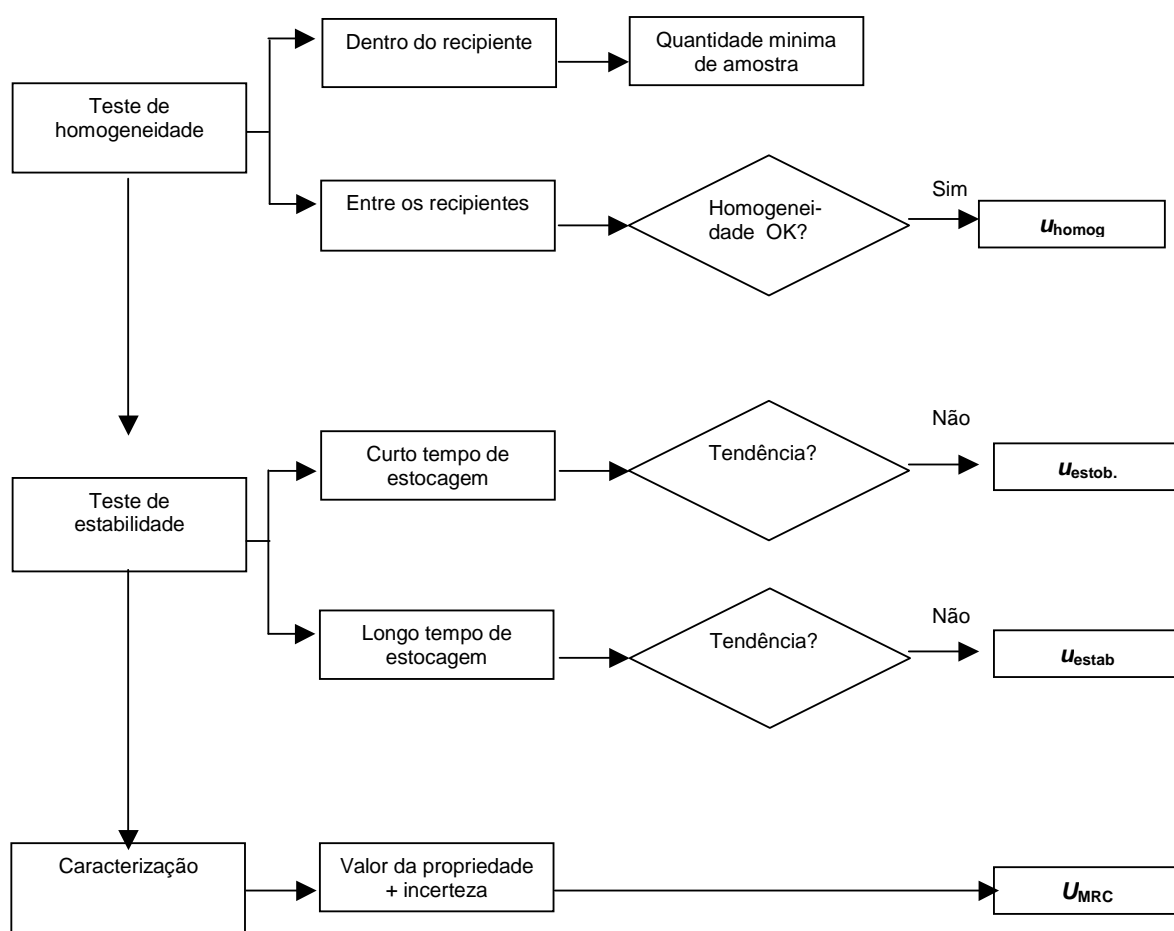


Figura 2: Etapas de avaliação do processo de certificação de um lote de material candidato a material de referência (Figura adaptada do modelo apresentado por VAN DER VEEN et. al, 2001).

A norma ABNT ISO/GUIA 34 (2004), bem como a ISO GUIDE 35 (2006) indicam quatro procedimentos tecnicamente válidos que o produtor do MR pode empregar na caracterização do material de referência:

1. Utilização de um método primário em um único laboratório;
2. Medições por dois ou mais métodos de referência independentes em um mesmo laboratório;
3. Uma rede de laboratórios qualificados que utilizem para medição um ou mais métodos de exatidão demonstrável;
4. Elaboração de um estudo interlaboratorial, utilizando um método específico, que forneça valor(es) de propriedade avaliado(s) para este método.

A escolha por uma delas dependerá do tipo de material de referência, do seu uso pretendido, da competência dos laboratórios envolvidos e da qualidade dos métodos empregados e então, escolhida conforme apropriado (ABNT ISO GUIA 34, 2004).

Após a caracterização do material deve ser elaborado um relatório de certificação detalhado com todo o procedimento de execução do mesmo, além do certificado propriamente dito. Ambos documentos baseiam-se para sua elaboração na norma ABNT ISO/GUIA 31 (2004), inclusive o conteúdo dos rótulos dos recipientes.

A atividade microbiológica em materiais de referência para análise de alimentos pode comprometer a estabilidade a curto e/ou a longo prazo do material.

Assim, procedimentos convencionalmente utilizados pela indústria alimentícia para a minimização da atividade microbiana na mesma podem ser empregados na preparação de tais MR (SILVA et al. 2006).

Neste trabalho foram explorados a pasteurização (GAVA, 1999) e a irradiação gama (ANVISA, 2001) visando maximizar o prazo de validade dos MRC preparados.

A pasteurização é um processo de tratamento capaz de inviabilizar o crescimento da maior parte das bactérias normalmente presentes no alimento, sem alterar as propriedades ou características do mesmo. Tradicionalmente, o processo caracteriza-se por um aquecimento do material a temperaturas entre 63 a 75 °C, por um período variável de 15 a 30 segundos e em seguida um resfriamento rápido com temperaturas abaixo de 5 °C. Esse tratamento fornece uma eficiência bactericida superior a 98% podendo ser realizado em condições laboratoriais, ou seja, em pequena escala (GAVA, 1999).

Armishaw & Millar (2001) empregaram esterilização em banho de água quente (temperatura de ebulição) seguido de resfriamento rápido em amostras de polpa de tomate, contaminada com agrotóxicos, envasadas em latas de alumínio.

A irradiação de alimentos, segundo a RDC n° 21 da ANVISA (2001), é um processo físico de tratamento que consiste em submeter o alimento, já embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante, com finalidade sanitária, fitossanitária e ou tecnológica.

Os tipos de radiação são divididos pelo seu comprimento de onda e as mais curtas tornam-se mais eficazes na destruição de microrganismos (ADAMS & MOSS, 1995).

A dose de radiação é usualmente medida em Gray (Gy) que é definido como a quantidade de energia transferida por unidade de massa para um alimento, microrganismos ou outra substância irradiada (CDC, 2006).

Os tipos de radiação empregados nos alimentos são divididos em: radiações não ionizantes (luz ultravioleta e microondas) e radiações ionizantes (onda eletromagnética

de alta energia como raios beta, raios gama, raios X) ou partículas (elétrons muito energéticos) capazes de arrancar elétrons dos átomos, excitar e dissociar moléculas (HERNANDES et al., 2003; CENA, 2006).

As fontes de radiação gama são as mais baratas porque os elementos ^{60}Co e ^{137}Cs são obtidos através da fissão atômica e são os dois únicos autorizados para irradiação de alimentos. Eles produzem uma radiação eletromagnética de alta energia, emitida por núcleos desses elementos (radionuclídeos) excitados. Os raios gama possuem um excelente poder de penetração, podendo alcançar profundidade de até 20 cm. Além disso, o ^{60}Co possui uma meia-vida de aproximadamente cinco anos e o ^{137}Cs de aproximadamente 30 anos (CENA, 2006), o que torna economicamente viável a utilização da irradiação.

Um dos principais inconvenientes do emprego da radiação em certos alimentos destinado ao consumo é a mudança de cor e produção de odores desagradáveis. Entretanto podem ainda ocorrer reações químicas resultando na alteração do produto. Essas alterações dependem da dose de radiação aplicada, da quantidade de água do alimento e do meio gasoso em que o produto é irradiado (HERNANDES et al., 2003; SILVA et al., 2006; SANT'ANA et al., 2007).

A radiação de alimentos pode ser vantajosa frente à pasteurização, porque a penetração da radiação é mais profunda, instantânea e uniforme. A irradiação é considerada um processo “frio” porque leva a apenas um pequeno aumento da temperatura durante o processamento. Entretanto a desvantagem ao uso da irradiação está relacionada principalmente a disponibilidade de irradiadores de alimento (SILVA et al., 2006; SANT'ANA et al., 2007).

Os trabalhos encontrados na literatura com a finalidade de uso da radiação gama envolvem na maioria das vezes, o uso para degradação dessas substâncias em vista de cancelar a potencialidade delas no meio ambiente e alimentos. Outros visam a simples conservação dos alimentos durante o tempo de armazenamento sem perda de suas características sensoriais e organolépticas (CASTRICINI et al., 2002; MOREIRA et al., 2005; MIRANDA, et al., 2006; SANT'ANA et al., 2007).

Javaroni et al. (1991) avaliaram a degradação de lindano ($\gamma\text{-HCH}$) em solução aquosa através de radiação gama objetivando um meio de proporcionar uma descontaminação ambiental.

Golan et al. (1993) perceberam que utilizando banho de água quente a 50°C por 2 min foi mais efetivo que aplicar dose de 1 kGy de radiação gama para redução de fungos em tomates.

Luchini et al., (1996) determinarem os efeitos de diferentes doses e taxas de doses de radiação gama, na degradação do inseticida parationa visando a proteção do meio ambiente. Avaliaram-se soluções aquosas, contendo esse inseticida que foram irradiadas em doses que variaram de 0 a 1 kGy nas taxas de dose: 1,87; 2,80; 3,12 e 3,41 kGy/h. Os resultados encontrados demonstraram a formação de produtos de degradação da parationa, indicando a aplicabilidade desta técnica ao uso pretendido. Com o uso desse inseticida em metanol sua degradação foi completa na dose de 30 kGy.

Costa et al., (2001) avaliaram os níveis residuais de procloraz aplicado em mangas em vista de verificar os efeitos indesejáveis do mesmo. Os frutos foram submetidos à radiação gama na dose de 1,0 kGy visando verificar se a mesma induziu a degradação do fungicida. Os resultados demonstraram baixa degradação do procloraz em mangas.

Melnikova et al. (2003) avaliaram os efeitos da radiação gama por Co^{60} , na estabilidade de agrotóxicos organoclorados em alimentos nas doses entre 0,77 a 55,55 kGy.

Schindler et al., (2005) investigaram a redução da concentração de substâncias fenólicas em amostras de tomate. Das cinco substâncias pesquisadas quatro não foram afetadas pela radiação nem com o emprego na dose de 10 kGy.

Juárez & Becerril (2006) irradiaram nas doses de 1 a 10 kGy, soluções de clorofenóis com o objetivo de aplicação deste tratamento no meio ambiente.

1.8 – Matriz e agrotóxicos selecionados

A matriz tomate foi escolhida para a preparação do MRC uma vez que o programa de monitoramento de hortifrutigranjeiros realizado pela ANVISA (PARA) apontou para uma extensiva contaminação daquela verdura com agrotóxicos de todas as classes e grupos químicos utilizados no Brasil.

Adiante, frente ao consumo alimentar no país, a avaliação da contaminação do tomate com resíduos de agrotóxicos assume importância significativa em se tratando de análise de resíduos.

Finalmente, o fato de que o Laboratório de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos do INCQS, já acumulou nos últimos anos experiência significativa em análise de resíduos de agrotóxicos em matriz tomate (MORELLI-CARDOSO et al., 1999) sugerindo que aquela matriz fosse escolhida para preparação de um MRC.

1.8.1 – O Tomate

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) encontra-se bastante desenvolvida no Brasil e o tomate está entre as hortaliças mais consumidas no mundo, sendo uma fonte de vitaminas A e C e de sais minerais como o potássio e o magnésio. Segundo dados da FAO (2008) o Brasil produziu no ano de 2006, 3,3 milhões de toneladas do fruto, colocando-se como nono país produtor desta cultura. Para o ano de 2008 a estimativa da safra segunda IBGE (2008) deve apresentar uma pequena alteração em relação ao ano de 2006.

O tomate pode ser utilizado tanto para o consumo direto, como legume de mesa, ou então aproveitado na indústria para o preparo de massas de tomate, sucos ou conservas.

O fruto do tomateiro possui, em sua composição, aproximadamente 93 a 95 % de água. Nos 5 a 7% restantes, encontram-se compostos inorgânicos, ácidos orgânicos, açúcares, sólidos insolúveis em álcool e outras substâncias conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: composição da matéria seca dos frutos maduros de tomate.

Composição		% na matéria seca
Açúcares	Glucose	22
	Frutose	25
	Sacarose	1
Sólidos insolúveis em álcool	Proteínas	8
	Substâncias pécicas	7
	Hemicelulose	4
Ácidos orgânicos	Celulose	6
	Ácido cítrico	9
	Ácido málico	4
Minerais – principalmente	K, Ca, Mg e P	8
	Lipídios	2
	Aminoácidos dicarboxílicos	2
Outros	Pigmentos	0,4
	Ácido ascórbico	0,5
	Voláteis	0,1
	Outros aminoácidos, vitaminas e polifenóis	1,0

Fonte: DAVIES & HOBSON, 1981.

Embora as vitaminas estejam presentes em uma pequena proporção do total da matéria seca do tomate, estas substâncias são importantes do ponto de vista nutricional (Tabela 3).

Tabela 3: Teores de vitaminas nos frutos maduros de tomate.

Vitaminas	Valores médios por 100g de fruto fresco
β -caroteno	900 – 1271 i.u.*
Vitamina B ₁ (tiamina)	50 – 60 mg
Vitamina B ₂ (riboflavina)	20 – 50 mg
Vitamina B ₃ (ácido pantotênico)	50 – 750 mg
Vitamina do complexo B ₆	80 – 110 mg
Ácido nicotínico (niacina)	500 – 700 mg
Ácido fólico	6,4 – 20 mg
Biotina	1,2 – 4,0 mg
Vitamina C	15000 – 23000 mg
Vitamina E (α -tocoferol)	40 – 1200 mg

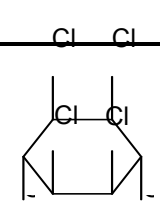
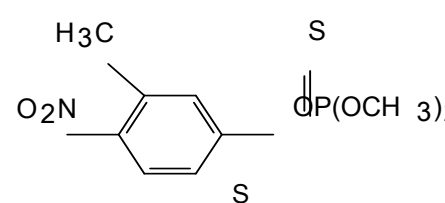
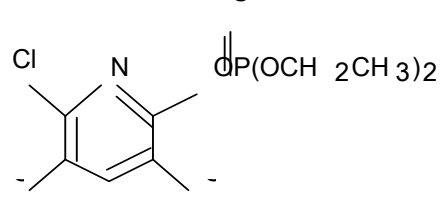
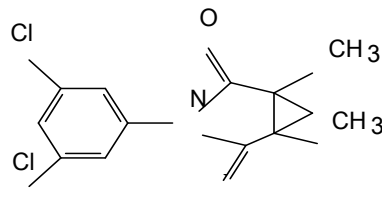
* 1 u.i. (unidade internacional) = 0,6 mg de β -caroteno.

Fonte: DAVIES & HOBSON, 1981.

1.8.2 – Agrotóxicos selecionados

Os agrotóxicos selecionados são princípios ativos pertencentes a classes distintas, já validados no INCQS para a matriz tomate. Na Tabela 4 são apresentados os agrotóxicos selecionados para serem avaliados neste estudo e na Tabela 5 são apresentados os LMRs adotados para a cultura do tomate no Brasil e em outros países (ANVISA, 2008; APVMA, 2008; PSD, 2008; PSD/CODEX, 2008; RIKILT, 2008; MINISTERE DE L'AGRICULTURE et DE la PÊCHE, 2008; DGADR, 2008). A inclusão pelo γ -HCH (Lindano) foi feita visando utilizá-lo como controle para os dados analíticos, devido a conhecida estabilidade desse agrotóxico.

Tabela 4: Analitos selecionados para o estudo de preparação de um MR em agrotóxicos.

Agrotóxico	Fórmula estrutural	Classe	Grupo químico
γ -HCH		Inseticida	organoclorado
Fenitrotiona		Inseticida, formicida	organofosforado
Clorpirifós		Inseticida, formicida, acaricida	organofosforado
Procimidona		Fungicida	Dicarboximida

Fonte: ANVISA, 2008.

Tabela 5: Limites máximos de resíduos permitidos para a cultura de tomate no Brasil e em outros países.

Agrotóxico	LMR (mg/kg)							
	Brasil	Austrália	Canadá	Codex	França	Holanda	Portugal	Reino Unido
γ HCH	NI*	NI*	3,0	NI*	0,01	NI*	NI*	0,01
fenitrotiona	NI*	NI*	NI*	NI*	0,01	NI*	NI*	0,01
clorpirifós	0,5	0,5	0,01	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
procimidona	2,0	NI*	NI*	5,0	2,0	2,0	2,0	2,0

NI* = não indicado

Fontes: Brasil (ANVISA, 2008); Austrália (APVMA, 2008); Canadá (PMRA, 2008); Codex (PSD/CODEX, 2008); França (MINISTERE DE L'AGRICULTURE et DE la PÊCHE, 2008); Holanda (RIKILT, 2008); Portugal (DGADR, 2008); UK/EC (PSD, 2008).

Embora o γ HCH e a fenitrotiona e não sejam indicados no Brasil para a cultura do tomate, observamos na Tabela 5 que seu uso é indicado em outros países, demonstrando que não há impedimento para a sua inclusão no material objeto de estudo. Para a procimidona a indicação de uso no Brasil apresenta mesmos LMRs que Reino Unido, França, Portugal e Holanda (PDD, 2008; MINISTERE DE L'AGRICULTURE et DE la PÊCHE, 2008, DGADR, 2008; RIKILT, 2008), entretanto o LMR determinado pelo *Codex Alimentarius* para tomate corresponde a um valor acima do dobro nos demais países. No Brasil o γ -HCH é indicado apenas como preservante de madeira (ANVISA, 2008). Dentre os agrotóxicos selecionados, apenas o clorpirifós e a procimidona são permitidos no Brasil para a cultura de tomate, respeitando os limites máximos de resíduos permitidos (LMR) de 0,5 e 2,0 mg/kg, respectivamente (ANVISA, 2008).

A concentração dos agrotóxicos na matriz candidata a ser transformada em material de referência foi definida de modo a garantir que os níveis resultantes de analitos no MR pudessem ser detectados em todos os laboratórios envolvidos na análise e aquisição do referido material. Esses valores correspondem a aproximadamente 0,1 a 0,2 mg/kg dos agrotóxicos na polpa de tomate.

O objetivo principal desse projeto foi estudar as condições mais adequadas para o preparo de uma matriz referência certificada utilizando uma matriz natural que foi contaminada com concentrações residuais e conhecidas de agrotóxicos seguindo normas nacionais e internacionais de boas práticas.

A matriz selecionada foi o tomate com os resíduos dos agrotóxicos γ -HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona na faixa de concentração de 0,1 a 0,2 mg/kg.

O objetivo específico foi avaliar um tratamento adequado para a amostra visando garantir a integridade da mesma durante longo tempo de estocagem e sob condições extremas de transporte.

Como consequência desta produção, prover para outros laboratórios esse material de modo a melhorar seu desempenho no controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil.

Os resultados obtidos neste trabalho de tese estão apresentados em formato de coletânea de artigos científicos, com a apresentação de cinco manuscritos e um relatório de natureza restrita ao INCQS. O primeiro (Manuscrito 1): **Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: Uma experiência laboratorial** (CARDOSO et al, 2008) (submetido)¹; o segundo (Manuscrito 2): **Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: Estudo em caso de tomates** (CARDOSO; NÓBREGA; ABRANTES, 2008) (publicado)²; o terceiro (Manuscrito 3): **Aplicação da radiação gama na preservação de material de referência a ser usado na análise de resíduos de agrotóxicos** (CARDOSO et al, 2008) (no prelo)³; o quarto (Manuscrito 4): **Preparação de um material de referência certificado para o controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 1: Estudo da homogeneidade** (CARDOSO et al, 2008) (submetido)⁴; **Preparação de um material de referência certificado para o controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 2: Estudo da estabilidade** (CARDOSO et al, 2008) (submetido)⁵; o sexto (Relatório Interno) **Relatório de certificação de material de referência: Resíduos de agrotóxicos em purê de tomate** (CARDOSO; NÓBREGA; ABRANTES, 2008)⁶.

¹ Artigo científico de autoria de Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso et al, elaborado e submetido à publicação no periódico “Ciência e Tecnologia de Alimentos” em 2008.

² Artigo científico de autoria de Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso, Armi W. Nóbrega e Shirley Abrantes, publicado no periódico “Revista Analytica”, v. 34, p. 48-55, 2008.

³ Artigo científico de autoria de Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso et al, aprovado para publicação no periódico “Revista Analytica”, a ser publicado no ano de 2008. No prelo.

⁴ Artigo científico de autoria de Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso et al, elaborado e submetido à publicação no periódico “Ciência e Tecnologia de Alimentos”, em 2008.

⁵ Artigo científico de autoria de Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso et al, elaborado e submetido à publicação no periódico “Ciência e Tecnologia de Alimentos”, em 2008.

⁶ Relatório interno, restrito ao INCQS, de autoria de Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso, Armi W. Nóbrega e Shirley Abrantes, elaborado em 2008.

3.1 – **MANUSCRITO 1** – Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: Uma experiência laboratorial.

Artigo científico de autoria de Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso et al., elaborado e submetido à publicação no periódico “**Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**” em 2008.

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TOMATE: UMA EXPERIÊNCIA LABORATORIAL¹

VALIDAÇÃO EM RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

Maria Helena W. M. CARDOSO^{1,2*}, Adherlene V. GOUVÊA²,
Armi W. NÓBREGA² e Shirley ABRANTES²

¹*Doutoranda em Vigilância Sanitária pelo programa de pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/FIOCRUZ;*

²*Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, 21.045-900.*

E-mail: helenawohlrs@hotmail.com

** A quem a correspondência deve ser enviada*

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TOMATE: UMA EXPERIÊNCIA LABORATORIAL¹

RESUMO

Um modelo de procedimento para validação de método de ensaio para determinação de cinco agrotóxicos (γ - HCH, clorotalonil, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona em matriz tomate) é demonstrado através da análise cromatográfica. A amostra é processada e extraída com 30 mL de acetona e em seguida com 60 mL de uma mistura diclometano:éter de petróleo (1:1). O volume total é centrifugado e a alíquota orgânica é filtrada sob Na_2SO_4 . Um mL do extrato orgânico é concentrado e dissolvido em um mL de isooctano. Um μL deste é injetado no cromatógrafo à gás com detector por captura de elétrons - CG/DCE. Foram avaliados a seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e de quantificação. As recuperações obtidas variaram de 70 a 110 %, considerando-se os níveis de adição agrotóxicos/amostra de 0,02 a 2,50 mg/kg. Os limites de detecção do método variaram de 0,005 a 0,010 mg/kg e os de quantificação entre 0,02 a 0,03 mg/kg.

Palavras-chave: agrotóxicos, tomate, cromatografia em fase gasosa, validação.

VALIDATION METHOD FOR DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN TOMATOES: A LABORATORIAL EXPERIENCE

SUMMARY

It is presented a model of validation procedure of a multiresidue method for chromatographic analyses of five pesticides residues γ -HCH, chlorotalonil, fenitrothion, chlorpyrifos and procymidone in tomatoes. The tomato was processed and extracted by acetone plus a mixture of dichloromethane:petroleum benzine (1:1). The volume was centrifugated and after this was filtered under Na_2SO_4 . One mL of organic extract was concentrated then diluted in isooctane and one μL was injected into the gas chromatograph with electron capture detector - GC/ECD. Selectivity, linearity, precision, accuracy, and limits of detection and quantification were the parameters evaluated. The recovery ranged from 70 to 110 % in the concentration range of 0.02 to 2.50 mg/kg. The limits of detection ranged from 0.005 to 0.010 mg/kg and the limits of quantification were between 0.02 to 0.03 mg/kg.

Key words: pesticides, tomato, gas chromatography, validation.

1 - INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) encontra-se bastante desenvolvida no Brasil e seu fruto está entre as hortaliças mais consumidas no mundo, estando globalmente enraizado no hábito alimentar. Entretanto, seus sistemas de produção envolvem, de modo geral, aplicação excessiva de agrotóxicos por serem suscetíveis ao ataque de pragas (SILVA et al, 2005). Os tomates estão classificados dentro do grupo de alto risco em relação à exposição aos agrotóxicos, por serem mais exigentes quanto ao tipo ou número de práticas agronômicas para a sua produção. Desta forma, são os frutos que mais recebem pulverizações de agrotóxicos, gerando problemas de saúde pública, contaminação do meio ambiente principalmente do solo e da água, além de altas taxas residuais dessas substâncias nos frutos (MOREIRA, 1995).

Segundo a Associação Brasileira da Indústria da Alimentação – ABIA (2007) o Brasil produziu no ano de 2004, três milhões e meio de toneladas do fruto colocando-se como a oitava cultura em produção no país (IBGE, 2007).

O tomate pode ser utilizado tanto para o consumo direto como legume de mesa, ou então aproveitado na indústria para o preparo de massas, sucos ou conservas. Os frutos do tomateiro que são utilizados em grande escala por vários setores produtivos e mais intensamente pelo setor agropecuário, têm sido objeto de vários estudos. Estudos estes em relação aos danos que provocam à saúde da população, dos trabalhadores rurais de modo particular, como pelos danos ao meio ambiente.

Os LMRs – limites máximo residuais de cada agrotóxico para determinado hortifrutigranjeiro são regulamentados, no Brasil, pela ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003; ANVISA, 2007). No entanto, esses LMR podem não ser os mesmos em outros países, ocasionando barreiras fitossanitárias.

Uma das competências de um laboratório em produzir dados confiáveis é demonstrada pela validação do método de ensaio (INMETRO, 2007). Desse modo, a extensão do termo “validação de um método” é bastante ampla e apresentada com diversas definições na literatura além de quais parâmetros de desempenho devem ser avaliados (GREEN, 1996; NATA, 1997; EURACHEM, 1998; HUBER, 1998; WOOD, 1999; FAJGELJ & AMBRUS, 2000; THOMPSON et al, 2002; INMETRO, 2007). Outra questão não harmonizada diz respeito a que critérios de aceitabilidade são aceitos para cada parâmetro avaliado (HILL & REYNOLDS, 1999).

O objetivo deste trabalho é apresentar um procedimento de validação, adotado no estudo para preparação e certificação de um material de referência a ser usado no controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros (CARDOSO et al, 2005), embasado em fundamentos teóricos. A discussão detalhada para aplicação dos modelos seguidos é encontrada na literatura, e não será apresentada neste trabalho. A aplicação foi demonstrada para cinco agrotóxicos, γ -HCH (organoclorado), clorotalonil (isoflotalonitrila), procimidona (dicarboximida), fenitrotiona e clorpirifós (organofosforados), cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 1, em tomate utilizando a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a detector por captura de elétrons (CGAR-DCE). Dentre os agrotóxicos estudados apenas o clorotalonil, o clorpirifós e a procimidona são permitidos na cultura de tomates no Brasil em níveis de 1,0 mg/kg; 0,5 mg/kg e 2,0 mg/kg, respectivamente (ANVISA, 2007). Vale salientar que outros resíduos podem ser encontrados em tomate em razão de uma aplicação indevida ou mesmo contaminação do meio ambiente. Sendo assim, a pesquisa de outros agrotóxicos não deve ser descartada.

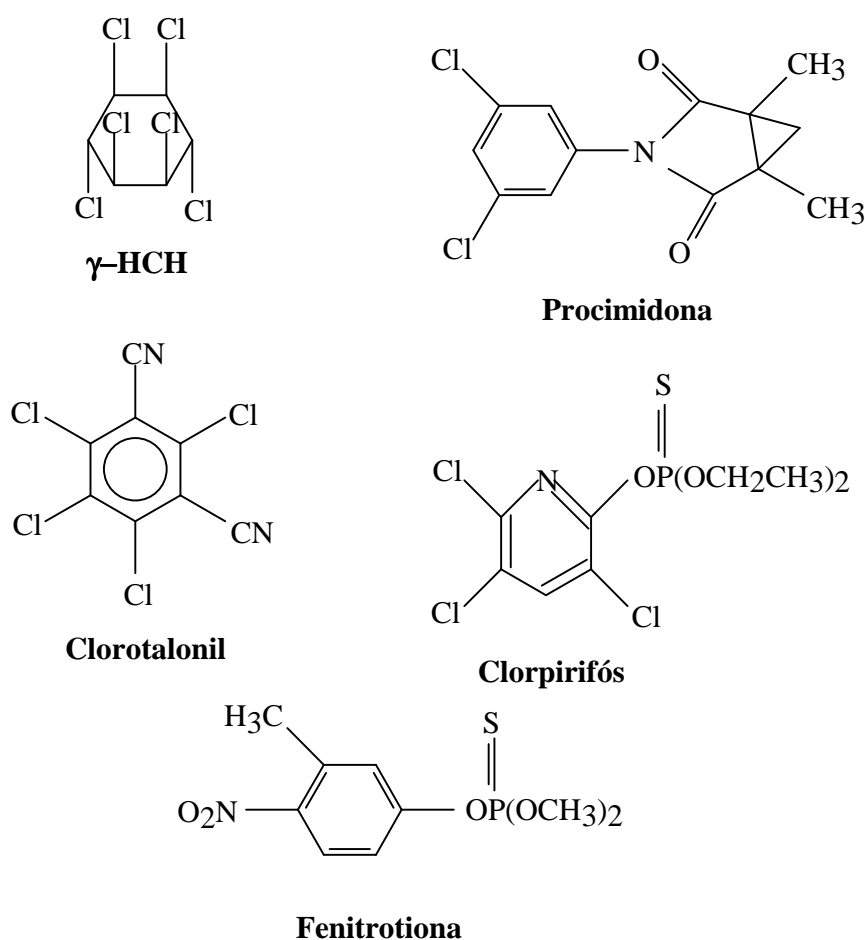


Figura 1: Estruturas químicas dos cinco agrotóxicos estudados.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Amostras

As amostras de tomate, da variedade *Styllus* (tomate longa vida híbrido *Styllus*), provenientes da região serrana do estado do Rio de Janeiro, foram adquiridas de uma produção orgânica, certificada com o selo de qualidade ABIO – Associação de Agricultores Biológicos do Estado do Rio de Janeiro (ABIO, 2006).

Os tomates foram cortados em quatro partes e processadas em blender (liquidificador com copo de aço inox) de acordo com indicação do *Codex Alimentarius* (2000), em seguida a polpa foi mantida em recipientes de vidro até o momento da análise. Primeiramente a polpa de tomate foi testada e analisada com a finalidade de avaliar a possibilidade de ser a amostra testemunho, sem a presença dos agrotóxicos alvos do estudo.

2.2 - Padrões e Reagentes

Foram utilizados padrões de agrotóxicos, com certificado de análise e grau de pureza superior a 95% (Dr. Ehrenstorfer – Augsburg, Alemanha). Solventes de alta pureza e grau resíduos de pesticidas (Merck e Tedia), acetona, diclorometano, éter de petróleo (faixa de ebulição 40-60 °C), isooctano e acetato de etila foram utilizados. Sulfato de sódio anidro (granulado para análise de resíduos, Merck) e papel de filtro (Whatman nº 40, diâmetro de 12,5 cm) foram tratados de acordo com MORELLI-CARDOSO et al (1999).

Soluções estoque foram preparadas individualmente na concentração nominal de 100 µg/mL e soluções intermediárias de trabalho contendo a mistura com os cinco agrotóxicos, estudados nas faixas de concentrações apresentadas na tabela 1, foram preparadas em isooctano a partir das soluções estoque preparadas previamente. As concentrações das soluções de trabalho foram empregadas para preparo das curvas analíticas em solvente e no extrato orgânico da polpa de tomate bem como para fortificação das mesmas.

Tabela 1: Concentrações das soluções preparadas para o estudo de validação do método de ensaio

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	
	solução estoque	Misturas: Soluções intermediárias
γ -HCH	100,60	0,0030 a 3,2192
Clorotalonil	103,90	0,0031 a 15,5850
fenitrotiona	110,90	0,0033 a 4,4360
clorpirifós	102,10	0,0031 a 7,1470
procimidona	124,17	0,0037 a 37,2498

2.3 - Condições Cromatográficas

Cromatógrafo a gás HP 6890 (Agilent), equipado com detector por captura de elétrons (Ni^{63}), sistema de injeção automático e estação de trabalho - ChemStation. Temperatura do injetor e detector de 210°C e 300°C , respectivamente. Coluna 5 % fenil metil polisiloxano - HP 5MS de 30m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e $0,25\mu\text{m}$ de espessura de filme. Programação de temperatura do forno de 80°C (0 min) @ $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 180°C (8 min) @ $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 200°C (5 min) @ $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 280°C (5 min). Fluxo de gás carreador (Helio) = 1,2 mL/min, fluxo da purga do septo = 2,8 mL/min, fluxo total = 64,1 mL/min, fluxo do gás “make-up”(Nitrogênio) = 60 mL/min, modo de injeção “splitless” = 0,75 min, volume injetado = 1,0 μL .

2.4 - Procedimento analítico multi-resíduos

A extração dos agrotóxicos da polpa de tomate seguiu o método multi-resíduos baseado nos métodos do Laboratório da Califórnia - Department of Food and Agriculture – Sacramento/CA (LEE et al, 1991) e de Laboratórios do “Working Group on the Improvement and Development of Residue Methods” – Netherlands (GENERAL INSPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION, 1996). Para tal, foram pesadas 15 g da amostra processada em frasco, para uso em centrífuga de 250 mL e, 1 mL do “surrogate” (clorpirifós metil) na concentração nominal de $2\mu\text{g/mL}$ foi adicionado a amostra antes da extração. O clorpirifós metil atua como controlador

individual do processo (“surrogate”) que é uma substância com características físicas e químicas similares aos dos agrotóxicos que estão sendo analisados, com o objetivo de garantir a integridade de uma amostra dentro do processo analítico (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA, 2004). Quando a recuperação encontrada para esta substância estiver entre 70 e 110% a integridade da amostra está garantida. Caso contrário deve-se verificar todo o procedimento.

A extração foi realizada com a adição de 30 mL de acetona à amostra, que em seguida foi homogeneizada em agitador de alta dispersão (ultraturrax) por 30 segundos. Adicionou-se 60 mL de uma mistura diclorometano:éter de petróleo (1:1, v:v) sendo novamente homogeneizados em agitador de alta dispersão (ultraturrax) por 30 segundos.

Após a homogeneização o frasco foi lacrado e levado para centrifugação por 7 minutos a 5°C e 3000 rpm.

Após centrifugação o extrato foi filtrado sob sulfato de sódio e papel de filtro sendo coletado em proveta graduada. Desse volume final, retirou-se uma alíquota de 1 mL transferindo para “vial” de vidro, que foi levado a evaporação até à secura sob leve atmosfera de nitrogênio. O extrato seco foi dissolvido em 1 mL de isooctano e 1µL analisado em CG/DCE.

2.5 - Validação da Metodologia e Avaliação dos Critérios de Desempenho

A validação do método foi conduzida segundo várias indicações citadas em literaturas científicas (MILLER & MILLER, 1984; EURACHEM, 1998; CODEX ALIMENTARIUS, 2000; THOMPSON et al, 2002; SANCO, 2006; INMETRO, 2007), cujo processo permite demonstrar que o mesmo é adequado ao uso pretendido (“Fitness for purpose”) (EURACHEM, 1998). Isto foi feito através do cumprimento de alguns critérios de desempenho que são expressos em termos de parâmetros estatísticos de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e de quantificação.

2.5.1 - Seletividade

A seletividade foi verificada através da injeção de uma amostra de tomate (branco do tomate) que não contivesse os agrotóxicos em questão e que não apresentasse interferentes que coincidisse com os tempos de retenção das substâncias estudadas. Para comprovar a seletividade do método, foram injetadas misturas de padrões para identificação dos tempos de retenção de cada substância (THOMPSON et al, 2002; RIBABI et al, 2004; SANCO, 2006).

2.5.2 - Estudo da linearidade e faixa de trabalho

O estudo da linearidade da faixa de trabalho foi realizado com injeções de soluções padrão, preparadas em solvente (isooctano) e na matriz (extrato orgânico do branco da polpa de tomate) nas concentrações 0,003; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 µg/mL, preparadas em duas replicatas genuínas para cada nível e onde as mesmas foram injetadas 2 vezes no cromatógrafo. A faixa de trabalho estabelecida está de acordo com a sensibilidade do método e o LMR dos agrotóxicos avaliados correspondendo as concentrações entre 0,02 a 2,5 mg/kg. Recomenda-se que os pontos da curva analítica sejam igualmente espaçados, ao longo da faixa estudada, para haver equilíbrio entre eles (THOMPSON et al, 2002). Para preparação da curva na matriz, 1 mL do extrato orgânico do branco da polpa de tomate foi evaporado sob atmosfera de N₂ e após a secura dissolvido em 1 mL da mistura de agrotóxico em solvente com concentração correspondente ao ponto da curva analítica. Esse procedimento foi realizado para cada ponto da curva em questão.

A linearidade da faixa de trabalho para o método de ensaio foi verificada através da leitura da curva analítica utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) de acordo com a relação linear representada pela equação tipo: $y = bx + a$ (Equação 1), onde b é a estimativa da inclinação, a é a estimativa da interseção, x concentração conhecida do analito e y a variável dependente estimada pela equação de regressão. A correlação representada pelo modelo matemático entre os valores numéricos de x e de y é representado pelo coeficiente de Pearson – ‘ r ’. O quadrado deste coeficiente é chamado de coeficiente de determinação ou simplesmente R^2 . Vale ressaltar que o coeficiente de correlação – ‘ r ’ e o coeficiente de determinação - ‘ R^2 ’ são equivocadamente interpretados para avaliação da linearidade, não sendo adequados para este fim e não devem ser empregados isoladamente (THOMPSON et al, 2002). Tais coeficientes indicam apenas o grau de ajuste dos dados à curva. Neste trabalho os valores aceitos foram de $R^2 \geq 0,95$ e de $r \geq 0,98$.

No MMQO deve-se levar em consideração os possíveis erros associados às medições (PIMENTEL & NETO, 1996; RIBANI et al, 2004; INMETRO, 2007) avaliando-se os resíduos decorrentes das mesmas de acordo com as premissas apresentadas na tabela 2, a fim de verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa (PIMENTEL & NETO, 1996; GREEN, 1998; EURACHEM, 1998; THOMPSON et al, 2002).

Tabela 2: Premissas para verificação da linearidade da faixa da curva analítica (PIMENTEL & NETO, 1996; GREEN, 1998; EURACHEM, 1998; THOMPSON et al, 2002).

Avaliações	Estatística	Crítérios de aceitação
existência de valores aberrantes – ‘outliers’, para cada nível de concentração	teste de Grubbs	$G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}}$
homogeneidade na variância dos resíduos da regressão	teste de Cochran	$C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$ ($k = 7; n = 2; \alpha = 0,05$)
significância da regressão	ANOVA – teste F	$F_{\text{calculado}} \geq \text{valor-p}$, existe relação linear entre as variáveis e a inclinação da reta de regressão não é nula. Há indicação que a regressão é significativa. $F_{\text{calc}} \leq \text{valor-p}$, não há indicação de existência de relação linear entre as variáveis x e y e não tem sentido utilizar a regressão.
desvio da linearidade da faixa de trabalho	ANOVA – Teste da Falta de Ajuste	$\alpha = 0,05 \leq \text{valor-p}$, se aceita a linearidade, o modelo é satisfatório. $\alpha = 0,05 \geq \text{valor-p}$, deve-se estabelecer outro intervalo para faixa de trabalho.

2.5.3 - Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz

O efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz ou “efeito matriz” observado pode causar um aumento ou diminuição da resposta do detector de um analito presente no extrato da amostra comparado ao mesmo analito presente em solvente orgânico (EURACHEM, 1998; HALŠLOVÀ et al, 1998; BRUCE et al, 1998; ZROSTLÍKOVA et al, 2001; THOMPSON et al, 2002).

O procedimento para avaliação deste efeito está apresentado detalhadamente por CARDOSO et al, (2008).

2.5.4 - Limites de Detecção e de Quantificação do Instrumento e do Método

Os limites de detecção do instrumento (LDI) e do método (LDM) bem como os limites de quantificação do instrumento (LQI) e do método (LQM) foram estabelecidos com base no

método da relação sinal/ruído (S/R) onde se aceita a estimativa de 3:1, ou seja, o sinal produzido através da resposta da injeção de uma concentração conhecida do analito de interesse foi 3 vezes maior do que o sinal produzido do ruído da linha de base do cromatograma (THOMPSON et al, 2002; RIBANI et al, 2004). Esta relação (S/R) foi calculada pela ChemStation do cromatógrafo HP-6890.

Para estabelecer esta relação para os valores dos LDI e LQI, utilizou-se uma concentração conhecida de 0,0117 µg/ml para o γ-HCH; 0,0148 µg/ml para o clorotalonil; 0,0215 µg/ml para a fenitrotona; 0,0123 µg/ml para o clorpirifós e 0,0184 µg/ml para a procimidona em solvente e na matriz (extrato branco da polpa de tomate em isooctano), analisadas em seis replicatas genuínas ($n = 6$).

Para o LDM e LQM, seis replicatas, também genuínas, da polpa de tomate foram fortificadas, nas mesmas concentrações acima citadas, e extraídas pelo método de ensaio. Os resultados analíticos dos extratos orgânicos dessas amostras foram utilizados para estabelecer a relação (S/R). Em seguida, foram determinadas as médias e os desvios padrão das respostas obtidas das injeções realizadas das replicatas de cada concentração e os valores dos limites calculados com as seguintes equações:

$$\text{LDI ou LDM} = \frac{\text{concentração S/R } 3:1 \times 3 \times S}{\bar{X}} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{LQI ou LQM} = \frac{\text{concentração S/R } 3:1 \times 10 \times S}{\bar{X}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde, concentração S/R 3:1 = é a concentração injetada que produziu uma resposta na razão sinal/ruído (S/R) de aproximadamente 3 sobre o ruído da linha base; \bar{X} corresponde a média das respostas medidas (áreas); S = desvio padrão das respostas medidas (áreas).

Para efeito de confirmação dos valores de LQM calculados foram preparadas seis replicatas da polpa de tomate nas respectivas concentrações e extraídas de acordo com o método de ensaio.

2.5.5 - Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão são consideradas os parâmetros da validação mais importantes na verificação de desempenho de método de ensaio. São realizados experimentos com concentração

conhecida do agrotóxico, em replicatas e sob condições pré-estabelecidas. A exatidão também pode ser avaliada através da participação em ensaio de proficiência, porém esta é uma ferramenta nem sempre disponível.

A realização dos experimentos de recuperação proporcionaram a determinação da exatidão do método através da comparação da concentração real de cada agrotóxico adicionado à amostra antes do procedimento de determinação, com aquela encontrada após esta etapa.

No estudo da recuperação dos agrotóxicos da amostra de tomate, 1 mL de uma solução contendo os cinco agrotóxicos, em 3 diferentes níveis de concentrações (nível baixo, intermediário e alto), foram adicionados a 15 g da polpa de tomate branco. Depois disso, foram misturados com bastão de vidro visando garantir sua homogeneidade. As amostras fortificadas, preparadas em seis replicatas de cada concentração ($n = 6$, total $n = 18$), foram mantidas por 15 minutos a temperatura ambiente antes do procedimento de extração, para evaporação do solvente. As concentrações dos agrotóxicos na amostra foram: γ -HCH de 0,02; 0,10 e 0,20 mg/kg; clorotalonil de 0,02; 0,10 e 1,00 mg/kg; fenitrotiona de 0,03; 0,10 e 0,30 mg/kg; clorpirifós de 0,02; 0,10 e 0,5 mg/kg e procimidona de 0,02; 0,10 e 2,5 mg/kg. Os valores diferenciados no terceiro nível (nível alto) se devem ao fato de se avaliar níveis próximos ao LMR estabelecido do agrotóxico no tomate. Os valores do nível um (nível baixo) foram utilizados para checagem dos LQM calculados através da razão sinal/ruído (S/R). A fórmula utilizada para o cálculo da taxa de recuperação foi:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\bar{X}_{\text{experimental}}}{\bar{X}_{\text{teórica}}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde, $\bar{X}_{\text{experimental}}$ corresponde a concentração ou área média obtida experimentalmente e $\bar{X}_{\text{teórica}}$ corresponde a concentração ou área média teórica adicionada à amostra.

A precisão é medida sob condições de repetitividade ou sob condições de reprodutibilidade e expressa na forma de coeficiente de variação – (CV (%)) e/ou estimativa do desvio padrão relativo – (DPR (%)) (THOMPSON et al, 2002; SANCO, 2006). A precisão foi avaliada através da repetitividade dos experimentos de recuperação.

$$\text{DPR(\%)} \text{ ou } \text{CV(\%)} = \frac{S}{\bar{X}} 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde, S = Desvio padrão das leituras no nível de concentração estudado; \bar{X} = média dos resultados obtidos.

Como critério de aceitação dos parâmetros exatidão e precisão foram adotadas como referência os valores estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (2000) e SANCO (2006).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra de tomate orgânico testemunha apresentou-se satisfatória para avaliação do método realizado, já que não continha os cinco agrotóxicos estudados e nenhum interferente de coeluição que impedisse a identificação e quantificação dos mesmos.

3.1 - Validação da Metodologia e Avaliação dos Critérios de Desempenho

3.1.1 - Seletividade

Na Figura 2 são apresentados os cromatogramas do branco da amostra (amostra testemunha) e da mistura padrão. Os picos que apareceram no branco da amostra não coincidem com os dos cinco agrotóxicos em questão, não interferindo na análise com as condições cromatográficas determinadas.

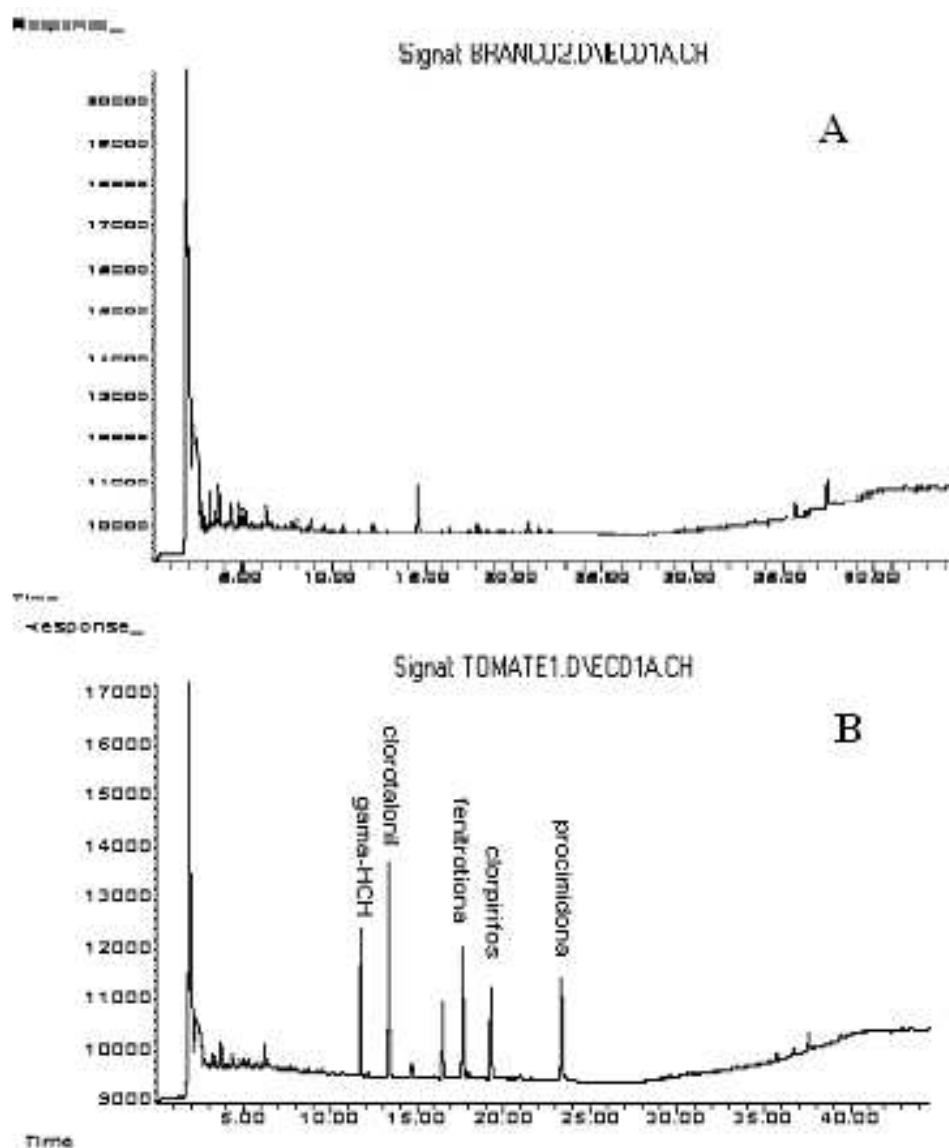


Figura 2: A - Cromatograma do branco da polpa de tomate analisada por CG/DCE, de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas previamente. B - Cromatograma da polpa de tomate fortificada com uma mistura de: γ -HCH, clorotalonil, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona nas concentrações de 0,0117 mg/kg, 0,0148 mg/kg, 0,0215 mg/kg, 0,0123 mg/kg e 0,0184 mg/kg respectivamente, analisada por CG/DCE.

3.1.2 - Estudo da linearidade e faixa de trabalho

A avaliação da curva analítica pelo MMQO foi realizada através de uma planilha eletrônica, apresentada na Figura 3. Vale salientar que a construção da planilha será abordada em outro trabalho científico. É possível observar na planilha a análise do gráfico x - y , o gráfico dos

resíduos da regressão, a variâncias dos resíduos, a significância da regressão e se há falta no ajuste da linearidade.

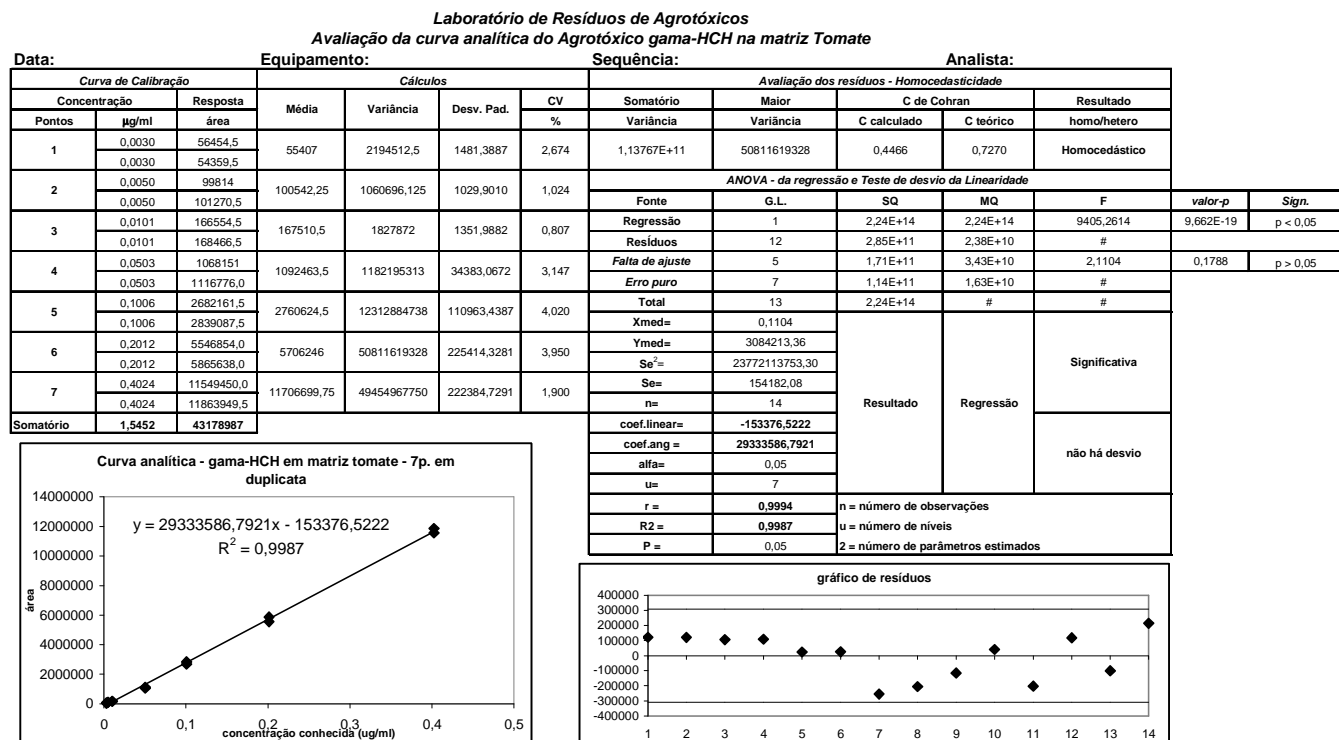


Figura 3: Planilha eletrônica para avaliação da linearidade da curva analítica. Modelo referente a curva analítica na matriz tomate para o γ -HCH, com sete níveis de concentrações em duplicata.

A planilha eletrônica utilizada para avaliação das premissas relacionadas a linearidade da faixa de trabalho mostrou-se bastante adequada ao roteiro de validação adotado no laboratório. Os testes estatísticos empregados para avaliar os resíduos referentes aos ajustes das curvas analíticas em solvente e em matriz para os agrotóxicos, de acordo com a Tabela 2, não apresentaram valores aberrantes, os resíduos apresentaram comportamento homocedásticos e a regressão foi significativa não demonstrando desvio da linearidade na faixa de trabalho avaliada para os cinco agrotóxicos alvos do estudo. Entretanto nas análises de rotina é possível utilizar curvas analíticas com apenas três a cinco níveis de concentrações diferentes devido a complexidade da análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

3.1.3 - Efeito da Resposta Cromatográfica Acentuada e Induzida pela Matriz

De acordo com os resultados apresentados por CARDOSO et al (no prelo) o efeito matriz demonstrou ser significativo para os agrotóxicos da classe dos organofosforados, a fenitrotiona e o clorpirifós, indicando a utilização da curva analítica preparada com o extrato orgânico branco da polpa de tomate a fim de minimizar esse efeito. Embora para o γ -HCH, o clorotalonil e a procimidona esse efeito não ser significativo adotou-se como forma de trabalho o emprego da curva preparada na matriz para os cinco agrotóxicos alvos do estudo.

3.1.4 - Limites de detecção e de Quantificação do instrumento e do método

Os valores dos limites de detecção e dos limites de quantificação calculados são apresentados na Tabela 3. Os limites de detecção e limites de quantificação referentes ao instrumento em solvente e na matriz são inferiores aos do método, entretanto os valores calculados através do método de ensaio são os que mais refletem os valores reais e foram adotados como referência neste trabalho. Eles foram confirmados através do teste realizado com seis replicatas da amostra fortificadas com as respectivas concentrações, além de serem inferiores ao LMR estabelecido para o clorotalonil, clorpirifós e procimidona em tomate, demonstrando a adequação do método a sua finalidade.

Tabela 3: Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do instrumento e do método, calculados para o agrotóxico em solvente, na matriz tomate e através do método de ensaio.

Agrotóxico	Instrumento ^(a) com solvente		Instrumento ^(a) com matriz		Método ^(a)	
	LDI (mg/L)	LQI (mg/L)	LDI (mg/Kg)	LQI (mg/Kg)	LDM (mg/Kg)	LQM (mg/Kg)
γ HCH	0,002	0,007	0,004	0,012	0,006	0,020
Clorotalonil	0,003	0,010	0,005	0,017	0,008	0,030
Fenitrotiona	0,006	0,020	0,006	0,020	0,010	0,030
Clorpirifós	0,003	0,010	0,003	0,010	0,005	0,020
Procimidona	0,003	0,010	0,004	0,015	0,009	0,030

^(a) Dados foram obtidos através da média de seis determinações ($n = 6$), realizadas em paralelo para: γ -HCH, clorotalonil, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona nas concentrações de 0,0117 mg/kg, 0,0148 mg/kg, 0,0215 mg/kg, 0,0123 mg/kg e 0,0184 mg/kg respectivamente, analisadas por CG/DCE.

3.1.5 - Exatidão e Precisão

Segundo o documento do SANCO (2006) a possibilidade de se calcular a taxa de recuperação com apenas um único nível de calibração pode ser empregada em situações quando a concentração investigada for muito baixa, fornecendo resultados mais exatos do que quando utilizados vários níveis de calibração (SANCO, 2006). Desse modo as taxas de recuperação encontradas para os níveis mais baixos seguiram essa indicação para os cinco agrotóxicos em questão. Para os níveis intermediário e alto utilizou-se a padronização externa com a curva analítica construída com os sete níveis de concentrações diferentes.

Na Tabela 4 são apresentados a recuperação e o desvio padrão relativo para dois níveis de concentrações de cada agrotóxico estudado através do tratamento estatístico da curva de calibração e do primeiro nível calculado ponto a ponto. Para todos os agrotóxicos estudados as recuperações, calculadas através da curva na matriz, foram na faixa de 70 a 110% para amostras de polpa de tomate e estão de acordo com o recomendado pelo *Codex Alimentarius* (2000) e SANCO (2006), ou seja, na faixa de concentração $> 0,01$ mg/kg e ≤ 1 mg/kg o intervalo de recuperação aceitável em % é entre 70 – 110. Para as recuperações calculadas através da curva em solvente podemos observar que para os agrotóxicos clorotalonil, fenitrothion e clorpirifós obtiveram-se valores acima dos 110 %, recomendados pelos documentos oficiais (CODEX ALIMENTARIUS, 2000; SANCO, 2006). Esses valores podem estar sendo influenciados pelo efeito da matriz, sabidamente conhecido no caso dos agrotóxicos da classe dos organofosforados (fenitrothion e clorpirifós). Para a procimidona e o γ -HCH as diferenças na recuperação obtidas através das duas curvas analíticas não são consideradas significativas.

Os desvios padrão relativos calculados também estão de acordo com o estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (2000), até 20% na faixa de concentração $> 0,01$ mg/kg e $\leq 0,1$ mg/kg e até 15% na faixa de concentração $> 0,1$ mg/Kg e ≤ 1 mg/kg.

Tabela 4: Parâmetros estatísticos de recuperação e coeficiente de variação calculados para tomate, para $n = 6$.

Agrotóxico	Concentração de Fortificação (mg/kg)	Recuperação (%) em solvente	Recuperação (%) em matriz	CV (%) em matriz
γ-HCH	0,020	101	77	9
	0,100	102	86	9
	0,200	82	75	15
Clorotalonil	0,030	91	83	5
	0,100	114	99	4
	1,040	98	97	6
Fenitrotiona	0,030	93	103	4
	0,100	115	81	3
	0,300	113	103	5
Clorpirifós	0,020	101	72	6
	0,100	116	72	4
	0,500	106	92	6
Procimidona	0,025	81	76	4
	0,100	105	103	2
	2,500	104	110	2

De modo a comprovar a exatidão do método de ensaio estudado, houve a oportunidade de participação em dois ensaios de proficiência (EP) provenientes do NMI-Austrália, no ano de 2006 e do FAPAS - Reino Unido, no ano de 2007. A matriz recebida foi a polpa de tomate que continha, entre outros, o agrotóxico procimidona. Os resultados encontrados nos dois EP, através do método de ensaio descrito neste trabalho, obteve como avaliação de desempenho o valor do índice $Z \leq 2$, ou seja, satisfatório de acordo com a ISO Guia 43-1 (1999) para este agrotóxico.

4 - CONCLUSÕES

O modelo proposto para verificação da adequação do método de ensaio, demonstrando a qualidade e confiabilidade dos dados analíticos, seguiu parâmetros indicados na literatura para realização da validação e foi selecionado para atender as necessidades do trabalho realizado.

A utilização da planilha eletrônica para avaliação do parâmetro linearidade proporcionou rápida interpretação dos dados obtidos para a faixa analítica estudada demonstrando ser uma ferramenta aplicável às expectativas do laboratório.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram a habilidade do método estudado e são satisfatórios para as necessidades da rotina do laboratório, já que é um procedimento multi-resíduos, simples, de baixo custo por não precisar da etapa de limpeza (“clean-up”) e eficiente.

A oportunidade de participação em dois ensaios de proficiência em matriz tomate contendo o agrotóxico procimidona pode ainda, comprovar a exatidão do método objeto de estudo.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABIA. Associação Brasileira da Indústria da Alimentação. Disponível em: <<http://www.abia.org.br>>. Acesso em: 06 jul. 2007.
- [2] ABIO. Associação de Agricultores Biológicos do Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.abio.org.br>>. Acesso em: 23 out. 2006.
- [3] ABNT ISO/IEC Guia 43-1: 1999. Ensaio de Proficiência por comparações interlaboratoriais – Parte 1. Desenvolvimento e Operação de programas de Ensaios de Proficiência.
- [4] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias>> Acesso em: 06 jul. 2007.
- [5] BRASIL. Resolução-RE nº 165, de 29 de agosto de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de set. 2003, Seção 1, p. 48-50.
- [6] BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim Acta.**, v. 128, p. 93-106, 1998.

- [7] CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A. W.; ABRANTES, S. Efeito da Resposta Cromatográfica Acentuada e Induzida pela Matriz: Estudo de Caso em Tomates. **Analytica**. v.34, p. 48-55, 2008.
- [8] CARDOSO, M. H. W. M.; ABRANTES, S.; NÓBREGA, A. Estudo para preparação e certificação de um material de referência a ser usado no controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros. In: IX JORNADA CIENTÍFICA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. 2005, Rio de Janeiro. **Resumos ...** Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, p. 358.
- [9] CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Pesticide Residues in Food. Methods of analysis and sampling**. 2 ed., Roma 2000, vol. 2A, part 1.
- [10] EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington: LGC, 1998.
- [11] EUROPEAN COMMISSION, DG-SANCO, **Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis. Document No. SANCO/10232/2006**, Brussels, 24 March 2006.
- [12] GENERAL INSPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION, **Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs**, 6th ed., Ministry of Public Health, Welfare and Sport, The Hague, The Netherlands, 1996. Part I.
- [13] GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 305A-309A, 1996.
- [14] FAJGELJ, A. & AMBRUS, A. Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals. In: FAJGELJ, A. & AMBRUS, A. (Ed.) **Principles and practices of method validation**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000, Cap. X, p. 179-252.
- [15] HAJŠLOVA, J.; KOCOURCK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNY, M. Matriz-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues **J. Chrom. A.**, v. 800, p. 283-295, 1998.
- [16] HILL, A. R. C. & REYNOLDS, S. L. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. **Analyst.**, v. 124, p. 953-958, 1999.
- [17] HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC Int.**, Feb, p. 96-105. 1998.
- [18] IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 06 jul. 2007.

- [19] INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2007.
- [20] LEE, M.; PAPATHAKIS, M. L.; FENG, H. M.C.; HUNTER, G. F.; CARR, J. E. Multipesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 339, p. 376-383, 1991.
- [21] MILLER, J. C. and MILLER J.N.; **Statistics for Analytical Chemistry**, Ellis Horwood Limited: New York, 1984.
- [22] MOREIRA, L. F.; **Diagnóstico dos problemas ecotoxicológicos causados pelo uso de inseticida (metamidofós) na região agrícola de Viçosa**. Viçosa, 1995, 95p. Dissertação (Mestre em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa.
- [23] MORELLI-CARDOSO, M. H. W.; CARDOZO, R. T. M.; MELLO, J. L.; ABRANTES, S.; MENEZES, K. M. P. Extraction and clean-up method for the determination of twenty organochlorine pesticide residues in tomatoes by GLC-ECD. **J. High Resol. Chromatogr.**, v. 22, p. 619-622, 1999.
- [24] NATA (National Association of Testing Authorities – Austrália). Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods. Sidney: NATA, 8p. 1997.
- [25] PIMENTEL, M. T.; NETO, B. B. Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos. **Quím. Nova.**, v. 19, p. 268-277, 1996.
- [26] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos Cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova.**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- [27] SILVA, J. M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e Trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, p.891, 2005.
- [28] SOUZA, S. V. C. **Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análises de Alimentos**. Belo Horizonte, 2007, 297p. Dissertação (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
- [29] THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 835-855, 2002.

- [30] United States Department of Agriculture (USDA). Pesticide Data Program. **SOP No: POP-QC-13. Required Compounds, Commodity Groups, and Marker Pesticides.** Jul 01, 2004.
- [31] WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends Anal. Chem.**, v. 18, p. 624-632, 1999.
- [32] ZROSTLÍKOVÁS, J.; HAJŠLOVÁ, J.; GODULA, M.; MAŠTOVSKÁ, K. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **J. Chrom. A.**, v. 937, p. 73-86, 2001.

3.2 – **MANUSCRITO 2** – Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: Estudo em caso de tomates.

Artigo científico de autoria de Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso; Armi W. Nóbrega e Shirley Abrantes, publicado na: **Revista Analytica**, v. 34, p. 48-55, 2008.

EFEITO DA RESPOSTA CROMATOGRÁFICA ACENTUADA E INDUZIDA PELA MATRIZ: ESTUDO DE CASO EM TOMATES

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso^{1,2}, Armi W. Nóbrega² e Shirley Abrantes²*

¹Doutoranda em Vigilância Sanitária pelo programa de pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/FIOCRUZ;

²Laboratório de Alimentos e Contaminantes, Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ)

*Autora para correspondência: INCQS/FIOCRUZ - Departamento de Química,

²Laboratório de Alimentos e Contaminantes, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, 21.045-900. Fone (21) 3865.51.87. Fax (21) 2539.67.77.

e-mail: helenawohlers@hotmail.com

RESUMO

A validação de método é um processo para demonstrar se o método de ensaio é capaz de produzir resultados confiáveis para a finalidade a que se destina. Para alcançar este objetivo é necessária a verificação de alguns parâmetros de desempenho como, por exemplo, a seletividade. O efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz ou efeito da matriz é um fator avaliado de grande magnitude neste parâmetro já que pode afetar acentuadamente as concentrações da amostra. Este trabalho tem o objetivo de demonstrar a avaliação deste efeito em matriz tomate para cinco agrotóxicos, γ -HCH, clorotalonil, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona.

Palavras-chave: agrotóxicos, tomate, cromatografia em fase gasosa, efeito matriz.

MATRIX-INDUCED CHROMATOGRAPHIC RESPONSE ENHANCEMENT: STUDY IN TOMATOES

Summary

The validation is a process to demonstrate that the method is able to produce reliable results. To reach this objective is necessary to verify some parameters as: selectivity. The matrix-induced chromatographic response enhancement or matrix effect is a factor of selectivity and the magnitude of this effect may affect the sample concentrations. It was presented in this work how the matrix effect takes action over five pesticides residues γ -HCH, chlorotalonil, fenitrothion, chlorpyrifos and procymidone in tomatoes.

Key words: pesticides, tomato, gas chromatography, matrix effects.

INTRODUÇÃO

Uma das competências de um laboratório para produzir dados confiáveis é demonstrada pela validação do método de ensaio (INMETRO, 2007). Desse modo, a extensão do termo “*validação de um método*” é bastante ampla e apresentada com diversas definições na literatura, além de quais parâmetros de desempenho devem ser avaliados (Green, 1996; NATA, 1997; EURACHEM, 1998; Huber, 1998; Wood, 1999; Fajgelj & Ambrus, 2000; Thompson et al., 2002; INMETRO, 2007).

Um dos parâmetros de desempenho que deve ser avaliado cuidadosamente se refere ao efeito da matriz ou efeito da resposta cromatográfica acentuada induzida pela matriz. Este fenômeno sugere que componentes da matriz presentes na amostra podem bloquear os sítios ativos no injetor e desse modo prevenir possível degradação e adsorção de analitos nessa câmara de vaporização. O efeito da matriz pode gerar sérios problemas analíticos, devido a possível super estimação da concentração dos analitos (Zrostlíková et al, 2001).

O objetivo deste trabalho é apresentar o estudo do efeito da resposta cromatográfica acentuada induzida pela matriz (efeito matriz) tomate para cinco agrotóxicos, γ -HCH (organoclorado), clorotalonil (isofalonicitrila), procimidona (dicarboximida), fenitrotiona e clorpirifós (organofosforado) utilizando a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a detector por captura de elétrons (CGAR-DCE). Este parâmetro de desempenho foi um dos requisitos avaliados no procedimento de validação adotado no estudo para preparação e certificação de um material de referência a ser usado no controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros (Cardoso et al., 2005). O protocolo de validação seguido não será discutido neste trabalho, devido sua extensão e será apresentado detalhadamente em outro trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras de tomate, da variedade ‘Styllus’, provenientes da região serrana do estado do Rio de Janeiro, foram adquiridas de uma produção orgânica certificada com o

selo de qualidade ABIO – Associação de Agricultores Biológicos do Estado do Rio de Janeiro (ABIO, 2006).

Os tomates foram cortados e processados em blender (liquidificador com copo de aço inox) de acordo com indicação do *Codex Alimentarius* (2000). Em seguida, a polpa foi mantida em recipientes de vidro até o momento da análise.

Padrões e Reagentes

Foram utilizados padrões de agrotóxicos, com certificado de análise e grau de pureza superior a 95% (Dr. Ehrenstorfer – Augsburg, Alemanha). Solventes de alta pureza e grau resíduos de pesticidas (Merck e Tedia).

Soluções estoque foram preparadas individualmente na concentração nominal de 100 µg/mL e soluções intermediárias de trabalho contendo a mistura com os 5 agrotóxicos estudados nas faixas de 0,003 a 0,4 µg/mL foram preparadas em isooctano a partir das soluções estoque preparadas previamente. Estas concentrações das soluções de trabalho foram utilizadas para construção das curvas analíticas em solvente e na matriz (extrato branco da polpa de tomate em isooctano). Para preparação da curva na matriz, 1 mL do extrato orgânico do branco da polpa de tomate foi evaporado sob atmosfera de N₂ e após secura dissolvido em 1 mL da mistura de agrotóxico em solvente com concentração correspondente ao ponto da curva analítica. Esse procedimento foi realizado para cada ponto da curva em questão.

Condições Cromatográficas

Cromatógrafo a gás HP 6890 (Agilent), equipado com detector por captura de elétrons (Ni⁶³), sistema de injeção automático e estação de trabalho - ChemStation. Temperatura do injetor e detector de 210°C e 300°C, respectivamente. Coluna 5 % fenil metil siloxano - HP 5MS de 30m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura de filme. Programação de temperatura do forno de 80°C (0 min) @30°C/min 180°C (8 min) @2°C/min 200°C (5 min) @6°C/min 280°C (5 min). Fluxo de gás carreador (Helio) = 1,2 mL/min, fluxo da purga do septo = 2,8 mL/min, fluxo total = 64,1 mL/min, fluxo do gás “make-up” (Nitrogênio) = 60 mL/min, modo de injeção “splitless” = 0,75 min, volume injetado = 1,0 µL.

Procedimento analítico multi-resíduos

A extração dos agrotóxicos da polpa de tomate seguiu o método multi-resíduos apresentado no fluxograma da Figura 1 (Lee et al. 1991; General Inspectorate For Health Protection, 1996; United States Department of Agriculture – USDA, 2004).

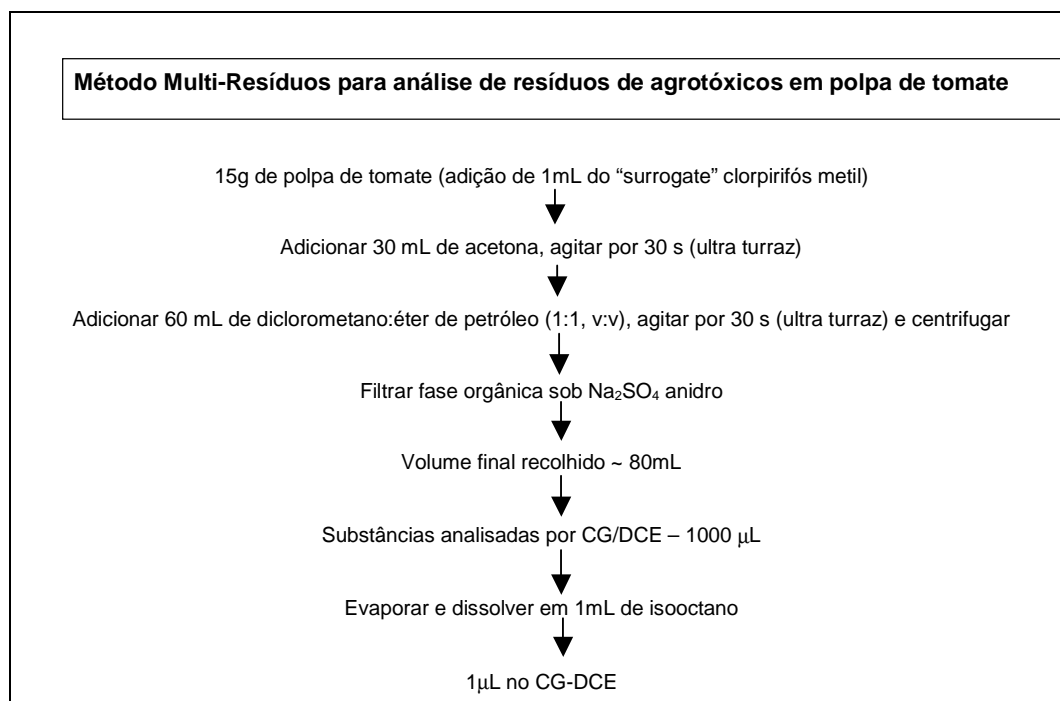


Figura 1: Fluxograma do método multi-resíduos adotado no estudo.

Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz

O 'efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz' ou 'efeito matriz' observado pode causar um aumento ou diminuição da resposta do detector de um analito presente no extrato da amostra comparado ao mesmo analito em solvente orgânico (Hajšlová et al., 1998; EURACHEM, 1998; Bruce et al., 1998; Zrostlíková et al, 2001, Thompson et al., 2002; SANCO, 2006; INMETRO, 2007).

Zrostlíková et al (2001) realizaram a avaliação do efeito matriz por comparação da resposta do detector (áreas medidas) das soluções padrão dos agrotóxicos em solvente (isooctano) com aquelas preparadas com o extrato branco da polpa de tomate em isooctano, em todos níveis de concentração estudados. Quando a média das

respostas das soluções preparada na matriz for \geq ou \leq 20% das médias das respostas das soluções preparadas em solvente, este efeito pode ser considerado significativo nos resultados analíticos quantitativos da amostra.

Thompson et al. (2002) indicam a necessidade de avaliar se os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas para o solvente e para matriz são significativamente diferentes através do teste t (*Student*). Para esse caso indica-se avaliar primeiramente se as variâncias residuais das duas curvas são significativamente diferentes, através do teste F para em seguida aplicar o teste t mais apropriado (Snedecor & Cochran, 1989; Bruce et al., 1998; INMETRO, 2007). A estatística utilizada para avaliar esse efeito através da comparação dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas é apresentada na Tabela 1. Se o valor de F calculado for menor que o valor de F tabelado (Equação 1), pode se considerar que não há diferença significativa entre as variâncias residuais e que as mesmas são iguais. Neste caso a matriz não tem efeito sobre a precisão do método na faixa de estudo avaliada. O teste t (Equação 2) será aplicado após cálculo do desvio padrão agrupado (Equação 3). O valor de t calculado menor que o valor de t tabelado indica que a matriz não afeta o ensaio. Entretanto, se o valor de F calculado for maior que o valor de F tabelado (Equação 1) as variâncias não serão consideradas iguais demonstrando que a matriz tem efeito sobre a precisão do método e uma abordagem diferente é considerada. O valor de t calculado segue a Equação 4, utilizando os valores das estimativas dos erros padrão dos coeficientes angulares obtidos através das Equações 5 e 6. Se o valor de t calculado for maior que o valor de t' (Equação 7), a diferença é significativa demonstrando que o efeito matriz afeta o ensaio.

Com a finalidade de se avaliar corretamente a significância entre as curvas, optou-se por realizar as duas indicações citadas acima.

Tabela 1: estatística para avaliação do efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz

Avaliação	Estatística
Variância residual	$* \text{teste F, } F = \frac{s_{res_1}^2}{s_{res_2}^2} \quad (\text{Equação 1})$
	<p>Onde $s_{res_1}^2$ = estimativa do desvio padrão residual da curva 1;</p>
	<p>$s_{res_2}^2$ = estimativa do desvio padrão residual da curva 2.</p>
	<p>$F_{cal} < F_{tab}$ não há diferença significativa, variâncias semelhantes $F_{cal} > F_{tab}$ há diferença significativa, variâncias diferentes</p>
Comparação dos coeficientes angulares	$\text{Se } F_{cal} < F_{tab} \Rightarrow t_{cal} = \frac{ b_{1_1} - b_{1_2} }{S_{res_a} \sqrt{\frac{1}{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2 \sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}}}; \quad (\text{Equação 2})$
	<p>Onde b_{1_1} = coeficiente angular da curva 1 (curva em solvente); b_{1_2} = coeficiente angular da curva 1 (curva na matriz); x_1 = áreas da curva em solvente e x_2 = áreas da curva na matriz; \bar{x}_1 = média dos valores de x_1 e \bar{x}_2 = média dos valores de x_2. S_{res_a} = estimativa do desvio padrão residual agregado das duas curvas.</p>
$S_{res_a} = \sqrt{\frac{(n_1 - 2)S_{res_1}^2 + (n_2 - 2)S_{res_2}^2}{n_1 + n_2 - 4}} \quad (\text{Equação 3})$	<p>Onde S_{res_1} = estimativa do desvio padrão residual da curva 1; S_{res_2} = estimativa do desvio padrão residual da curva 2; n_1 = número de medidas da curva 1 e n_2 = número de medidas da curva 2.</p>
<p>** Se $t_{cal} > t_{tab}$ o efeito matriz significativo</p>	

$$\text{Se } F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}} \Rightarrow t_{\text{cal}} = \frac{|b_{11} - b_{12}|}{\sqrt{s_{b_{11}}^2 + s_{b_{12}}^2}} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde b_{11} = coeficiente angular da curva 1 e b_{12} = coeficiente angular da curva 2;

$s_{b_{11}}$ = estimativa do erro padrão do coeficiente angular da curva 1;

$s_{b_{12}}$ = estimativa do erro padrão do coeficiente angular da curva 2.

$$S_{b_{11}}^2 = \frac{(S_{\text{res}_1})^2}{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2} \quad (\text{Equação 5}) \quad \text{e} \quad S_{b_{12}}^2 = \frac{(S_{\text{res}_2})^2}{\sum (x_2 - \bar{x}_2)^2} \quad (\text{Equação 6})$$

6)

Onde $S_{b_{11}}$ e $S_{b_{12}}$ são as estimativas dos erros padrão dos coeficientes angulares das curvas 1 e 2, respectivamente.

Se $t_{\text{cal}} > t'$ o efeito matriz significativo

$$t' = \frac{t_1 S_{b_{11}}^2 + t_2 S_{b_{12}}^2}{S_{b_{11}}^2 + S_{b_{12}}^2} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde $***t_1$ = valor teórico de t para curva 1 e $***t_2$ = valor teórico de t para curva 2.

* teste F, bilateral, para 95% de confiança (P=0,05) e (n_1-1) e (n_2-1) graus de liberdade para o numerador e o denominador.

** teste t, bilateral, para 95% de confiança (P=0,05) e $(n_1 + n_2 - 4)$.

***teste t, bilateral, para 95% de confiança (P=0,05) e $(n_1 - 2)$ e $(n_2 - 2)$ graus de liberdade para o numerador e o denominador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra de tomate orgânico apresentou-se adequada para avaliação do efeito matriz, já que não continha os cinco agrotóxicos estudados.

Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz

Na Tabela 2 são apresentados os efeitos na matriz observado, de acordo com a indicação de Thompson et al. (2002) na comparação dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas e Zrostlíkova et al (2001) na variação de 20% entre as áreas medidas das mesmas curvas.

Tabela 2: Resultado do efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz.

Agrotóxicos	Varição $\geq 20\%$ da resposta (áreas medidas)	*estatística	Conclusão obtidas pelas duas avaliações
γ -HCH	Curva solvente \equiv curva matriz	Teste F; $F_{cal} < F_{tab}$ Teste t; $t_{cal} < t_{tab}$	efeito da matriz não é significativo.
Clorotalonil	Curva solvente \equiv curva matriz	Teste F; $F_{cal} < F_{tab}$ Teste t; $t_{cal} < t_{tab}$	efeito da matriz não é significativo.
Fenitrotiona	Curva solvente $<$ curva matriz	Teste F; $F_{cal} > F_{tab}$ Teste t; $t_{cal} > t'$	efeito da matriz significativo.
Clorpirifós	Curva solvente $<$ curva matriz	Teste F; $F_{cal} > F_{tab}$ Teste t; $t_{cal} > t'$	efeito da matriz significativo.
Procimidona	Curva solvente \equiv curva matriz	Teste F; $F_{cal} < F_{tab}$ Teste t; $t_{cal} < t_{tab}$	efeito da matriz não é significativo.

O efeito da matriz, avaliado por ambos modelos propostos, foi observado apenas para a fenitrotiona e para o clorpirifós, fato este previamente conhecido já que este efeito é mais acentuado em agrotóxicos da classe dos organofosforados. Entretanto, vale salientar que a curva analítica elaborada na matriz tem a vantagem de incorporar uma correção de recuperação nos resultados obtidos e assim demonstrar um valor mais próximo do real. As curvas analíticas em solvente e na matriz para os cinco agrotóxicos são apresentadas graficamente na Figura 2. Para o γ -HCH, clorotalonil e procimidona, não há diferença significativa e as curvas praticamente se sobrepõem. O mesmo não acontece para o clorpirifós e a fenitrotiona que apresentam uma variação maior, com o efeito da matriz significativo.

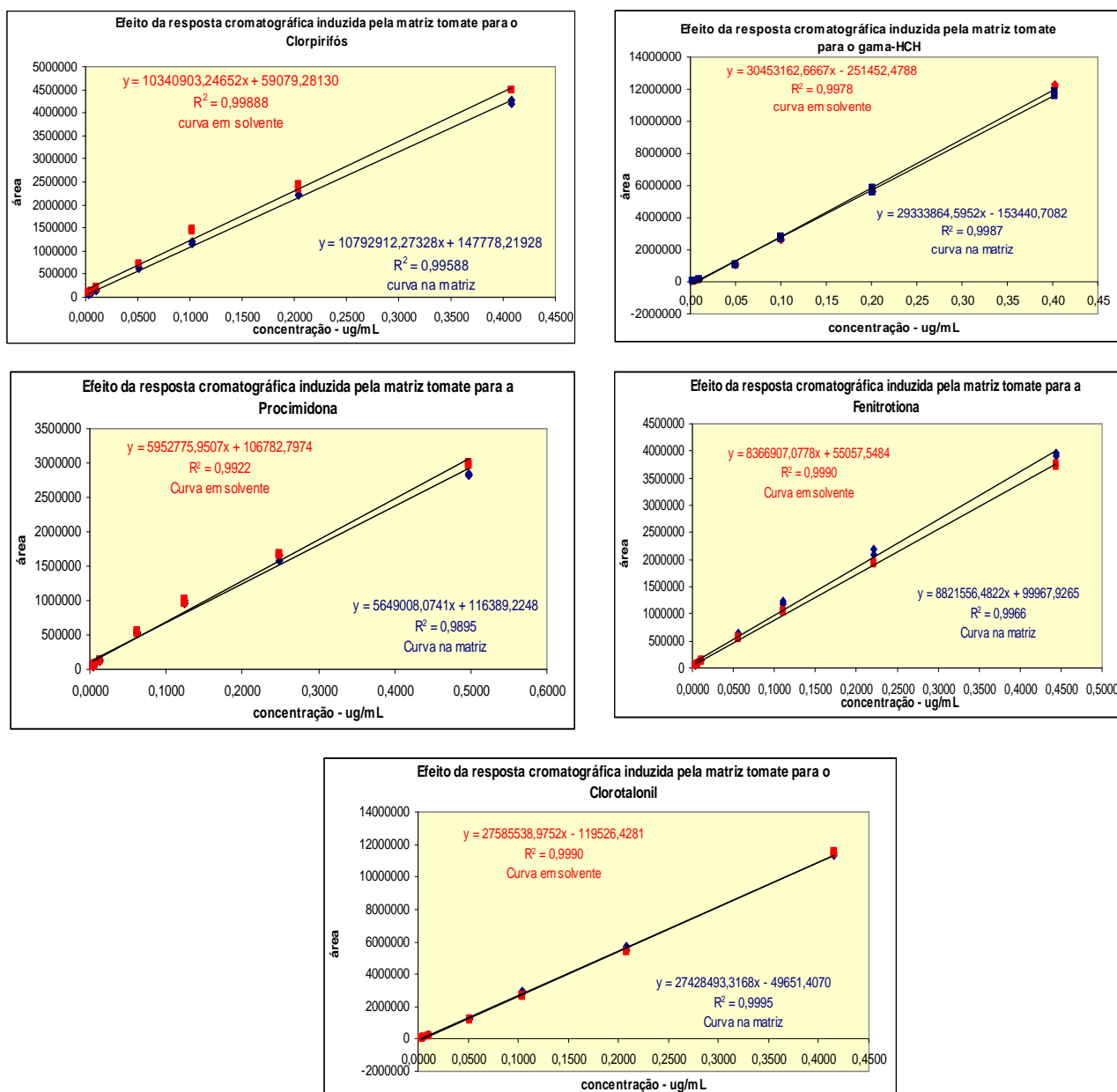


Figura 2: Representação gráfica das curvas analíticas em solvente e na matriz para o clorpirifós, γ -HCH, procimidona, fenitrotiona e clorotalonil.

CONCLUSÕES

As estatísticas empregadas para verificação do efeito da matriz, demonstraram que este efeito foi significativo apenas para os agrotóxicos da classe dos organofosforados, o clorpirifós e a fenitrotiona. Nesse caso a utilização da curva analítica construída no extrato orgânico da polpa de tomate torna-se de grande valia para minimizar erros decorrentes de interferentes desta matriz sobre os resultados obtidos. Entretanto, para

os demais agrotóxicos estudados este mesmo efeito não foi significativo. O analista neste caso deve considerar a realização deste ensaio com o emprego de curvas analíticas de naturezas distintas ou assumir o efeito da matriz para todas as substâncias avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIO. Associação de Agricultores Biológicos do Estado do Rio de Janeiro. [on-line]. 2006. Disponível: <http://www.abio.org.br> [capturado em 23 out. 2006].
- BRUCE, P., MINKKINEN, P. & RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim Acta**, 128, 93-106, 1998.
- CARDOSO, M. H. W. M., ABRANTES, S. e NÓBREGA, A. Estudo para Preparação e Certificação de um Material de Referência a ser Usado no Controle de Agrotóxicos em Hortifrutigranjeiros. In: **Anais da IX Jornada Científica de Pós-Graduação da Fundação Oswaldo Cruz**. 07 a 10 de nov. 2005. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.
- CODEX ALIMENTARIUS. Volume 2A. **Pesticide Residues in Food. Methods of analysis and sampling**. 2 ed., part 1, Roma. 2000.
- EUROPEAN COMMISSION, DG-SANCO, **Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis**, Document No. SANCO/10232/2006, Brussels, 24 March 2006.
- FAJGELJ, A. & AMBRUS, A. Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals. In: FAJGELJ, A. & AMBRUS, A. (Ed.) **Principles and practices of method validation**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 200, 179-252.
- GENERAL Inspectorate for Health Protection, **Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs**, sixth ed., Ministry of Public Health, Welfare and Sport, The Hague, The Netherlands, 1996. Part I.
- GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, 68, 305A-309A, 1996.
- HAIŠLOVÁ, J. et al. Matriz-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, 800, 283-295, 1998.

- HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC Int.**, Feb, 96-105, 1998.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007. 24 p.
- LEE, M., PAPATHAKIS, M. L., FENG, H. M.C., HUNTER, G. F. & CARR, J. E. Multipesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**. 339, 376-383, 1991.
- NATA (National Association of Testing Authorities – Austrália). **Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods**. Sidney: NATA, 1997. 8p.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, 74, 835-855, 2002.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. Pesticide Data Program. SOP No: POP-QC-13. Required Compounds, Commodity Groups, and Marker Pesticides. Jul 01, 2004.
- SNEDECOR, S. W. & COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University, Sixth edition, 1989. 503p.
- WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, 18, 624-632, 1999.
- ZROSTLÍKOVA, J., HAJŠLOVÁ, J., GODULA, M. & MAŠTOVSKÁ. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, 937 (1-2), 73-86, 2001.

3.3 – **MANUSCRITO 3** – Aplicação da radiação gama na preservação de material de referência a ser usado na análise de resíduos de agrotóxicos.

Artigo científico de autoria de Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso et al., aprovado para publicação no periódico “**Revista Analytica**”, a ser publicado no ano de 2008. No prelo.

APLICAÇÃO DA RADIAÇÃO GAMA NA PRESERVAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA A SER USADO NA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

Maria Helena W. M. Cardoso^{1}, Armi W. Nóbrega²,
Hélio C. Vital³ e Shirley Abrantes²*

^{1,2} Doutoranda em Vigilância Sanitária pelo programa de pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/FIOCRUZ

² Laboratório de Alimentos e Contaminantes, Departamento de Química, I.N.C.Q.S. / Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365 – Manguinhos, Rio de Janeiro / RJ, Brasil, 21.040-900.

³ Divisão de Defesa Química, Biológica e Nuclear do Centro Tecnológico do Exército (DDQBN/CTEx) – Av. da Américas, 28705 – Guaratiba, Rio de Janeiro / RJ, Brasil, 23020-470.

* Autora para correspondência: INCQS/FIOCRUZ - Departamento de Química, ²Laboratório de Alimentos e Contaminantes, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, 21.045-900. Fone (21) 3865.51.87. Fax (21) 2539.67.77.

e-mail: helenawohlers@hotmail.com

RESUMO

Materiais de referência adequados são essenciais para o sucesso de uma análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. No entanto, sua aquisição é dificultada, tanto pela disponibilidade de provedores, como pelo tempo necessário ao transporte, sendo que as dificuldades se agravam quando distâncias continentais ou intercontinentais estão envolvidas. Normalmente, amostras referências são congeladas e enviadas aos laboratórios em caixas termicamente vedadas contendo gelo seco. Nessas condições, podem ser preservadas por até 72 horas sem sofrer qualquer decomposição. Por razões de segurança, torna-se mais difícil despachar esse tipo de amostras para outros

países sem evitar qualquer tipo de degradação antes que alcancem seu destino final. Neste trabalho, são apresentados os resultados preliminares do emprego da radiação gama para prevenção da decomposição microbiológica das amostras de purê de tomate contendo cinco agrotóxicos: γ -HCH, clorotalonil, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona. Os tomates orgânicos utilizados foram lavados antes da remoção da pele e sementes e então processados. Depois de adequado processo de homogeneização, foram pesados e transferidos para frascos de vidro. Os frascos foram estocados em congelador até o momento da aplicação da radiação gama. As doses absorvidas foram 0,3; 0,5; 0,6; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 kGy. Os resultados encontrados indicam a possibilidade do uso da dose de 2,0 kGy para a polpa de tomate contendo os cinco agrotóxicos mencionados. Perdas significativas de clorotalonil e fenitrotiona foram verificadas para a dose de 3,0 kGy ou superiores. Este trabalho está sendo empregado para a produção de materiais de referência que serão enviados a laboratórios brasileiros, bem como a outros países na América do Sul e Central.

Palavras-chave: material de referência, resíduos, agrotóxicos, irradiação gama, tomate.

THE APPLICATION OF GAMMA RADIATION IN THE PRESERVATION OF REFERENCE MATERIALS FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS

Summary

Appropriate reference materials are essential for an adequate analysis of pesticide residues in foods. However the preparation of standards must ensure that they will withstand the long transportation times – e. g. tomato puree spiked with pesticides, from the manufacturer's site to the laboratories where they will be used. When continental or intercontinental distances are involved an even more challenging situation ensues. Usually the samples are frozen and sent to other laboratories in thermally isolated boxes containing dry ice. Under such conditions, the reference samples can be preserved for no more than 72 hours without decomposing. For safety reasons, it is becoming increasingly difficult to transport such materials to different countries before their decomposition starts. This work summarizes the preliminary results of efforts aimed at using the process of gamma irradiation to prevent the microbiological decomposition of tomato puree samples spiked with five pesticides: gamma-HCH, chlorothalonil, fenitrothion, chlorpyrifos and procymidone. Only organically grown tomatoes were used in this study. They were washed before removing seeds and skins and then processed. After undergoing adequate homogeneity processes, they were weighted and transferred to five hundred glass bottles. The bottles were then stored in a freezer until they were gamma irradiated with doses of 0.3, 0.5, 0.6, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 and 10.0 kGy. Severe degradation of Chlorothalonil and fenitrothion irradiated with 3.0 kGy was found. In contrast, the results indicated that the dose of 2.0 kGy is appropriate for the conservation of tomato pulp spiked with the five aforementioned pesticides. The findings support the use of irradiation as an efficient tool to help in the production of reference samples that must withstand long transportation times.

Key words: reference material, pesticides, residues, gamma-irradiation, tomato

INTRODUÇÃO

A presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos é uma preocupação existente há muitas décadas não somente no Brasil, mas em todo o mundo, principalmente no que se refere a garantir a qualidade de vida do ser humano. O homem se encontra no topo da cadeia alimentar e desse modo não se pode negligenciar a interligação do ciclo que envolve a mesma.

Tal preocupação está diretamente relacionada com a qualidade dos produtos e serviços oferecidos. Por sua vez, os laboratórios que realizam este tipo de análise estão se esforçando cada vez mais para alcançar, em curto espaço de tempo, garantias de confiabilidade de seus resultados. O objetivo não é apenas adquirir competitividade nacional, mas também superar barreiras internacionais. Esta adequação torna-se indispensável ao laboratório que expressa resultados a níveis de concentrações cada vez menores.

Cada laboratório tem seu próprio procedimento para assegurar a qualidade e confiabilidade de seus resultados analíticos. Entretanto, esses dados devem ser rastreáveis a referências conhecidas para conseguir alta exatidão com o mínimo de incerteza (1).

Os materiais de referência (MR) e materiais de referência certificados (MRC) são ferramentas indicadas para esta finalidade. O valor atribuído ao MR pode ser utilizado na comparação das medições químicas, no processo de validação de ensaios analíticos, calibração de equipamentos de medição, testes de proficiência e controle de qualidade interno (1). Os MRC são conhecidos também por serem padrões de matrizes reais, ou seja, preparados a partir de matérias processadas, como por exemplo, a polpa de tomate.

O MR ou MRC requererem características essenciais como: a homogeneidade (do lote preparado) a representatividade e estabilidade (durante o período de conservação). Além disso, as especificações do MRCs devem ser submetidas a uma etapa de certificação (2).

A preocupação em garantir a estabilidade desses materiais de referência relaciona-se com esforços visando a evitar possíveis efeitos de degradação após seu preparo. As dificuldades se intensificam quando o material é uma matriz complexa e

quando distâncias continentais ou intercontinentais estão envolvidas em sua aquisição, já que a disponibilidade de provedores deste tipo de materiais é rara.

A irradiação é um processo físico de tratamento que consiste em submeter o alimento, já embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante, com finalidade sanitária, fitossanitária e ou tecnológica (3). A eficiência do processo para conservação de vários tipos de alimentos já foi extensivamente comprovada (4).

O objetivo deste trabalho foi investigar preliminarmente os efeitos da aplicação de diferentes doses de radiação gama para prevenir a decomposição microbiana em amostras de polpa de tomate contaminadas com cinco agrotóxicos: gama-HCH, clorotalonil, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona, a serem usadas como material de referência (5). O branco da polpa de tomate e as soluções padrão de concentração conhecidas também foram avaliadas. Os resultados foram obtidos através de cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a um detector por captura de elétrons (CG-DCE) e a um espectrômetro de massa (CG-EM).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo da amostra para irradiação

Cinco quilogramas de tomates, provenientes de agricultura orgânica, foram utilizados nos experimentos. Após sanitização, eles tiveram sua pele e sementes retirados e em seguida foram submetidos ao processamento. A polpa foi separada em duas porções, com a finalidade de se obter um lote branco de polpa de tomate e outro lote ao qual seria adicionado agrotóxicos.

O lote branco de polpa de tomate foi homogeneizado em batedeira industrial por aproximadamente uma hora. A velocidade da hélice foi ajustada de modo a proporcionar agitação sem formação excessiva do esparramento do líquido. Após esse período, as amostras foram transferidas para frasco de vidro (capacidade de 30 mL) devidamente identificados, lacrados e estocados em congelador (faixa de temperatura entre – 10 a – 25 °C) para posterior tratamento com irradiação gama.

O lote de polpa destinado à contaminação com agrotóxicos foi separado em duas partes. A uma pequena porção de aproximadamente 500g, foram adicionados quantitativamente os cinco agrotóxicos, em uma solução de concentração conhecida, a

qual permaneceu em homogeneização por cerca de uma hora em bateadeira industrial. Em seguida, ao restante da polpa de tomate, foi adicionada a massa inicial, permanecendo por mais três horas à velocidade constante, a fim de proporcionar uma melhor interação da amostra com os agrotóxicos. Durante o envase, a amostra foi mantida em agitação, de modo a evitar a falta de uniformidade da mesma. O envase sofreu o mesmo procedimento adotado para as amostras branco.

Após sofrerem homogeneização, as amostras foram irradiadas. Um detalhamento deste tratamento será apresentado em outro trabalho.

Reagentes, solventes e padrões

Foram utilizados padrões de agrotóxicos (Dr. Ehrenstorfer) e solventes de alta pureza, grau resíduos de pesticidas (Merck e Tedia): acetona, diclorometano, éter de petróleo, isooctano e acetato de etila.

A solução contendo os cinco agrotóxicos, estudados nas faixas de concentrações entre 0,1 a 0,2 mg/kg, foram preparadas em isooctano a partir das soluções estoque preparadas previamente. As mesmas concentrações das soluções foram avaliadas em função das doses de radiação aplicadas às amostras.

Método analítico

O método de ensaio para quantificação dos resíduos por CG-DCE seguiu modelo, validado, apresentado por CARDOSO et al (6, 7, 8).

Na Figura 1, é apresentado o fluxograma das análises por CG-DCE e por CG-EM.

Método Multi-resíduos para análise de polpa de tomate

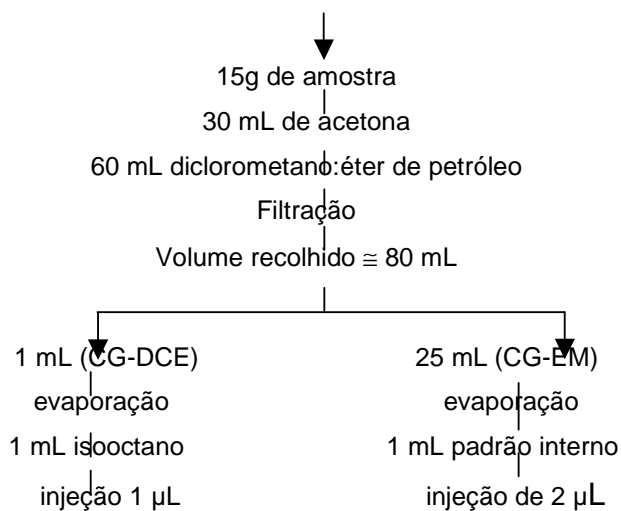


Figura 1: Fluxograma do método multi-resíduos (7, 8).

Condições cromatográficas

As condições de análises por CG-DCE estão apresentadas em CARDOSO et al (6).

As condições analíticas de separação para o CG-EM foram: Temperatura do injetor de 230°C. Coluna 5 % fenil metil siloxano - HP 5MS de 30m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura de filme, nas temperaturas de 60°C (2,50 min) @10°C/min 180°C (1 min) @2°C/min 215°C (1 min) @10°C/min 280°C (15 min). Fluxo de gás carreador (Hélio) = 1,0 mL/min, fluxo da purga do septo = 60,1 mL/min, fluxo total = 58,0 mL/min, injeção “pulsed splitless” = 0,75 min. Temperatura da linha de transferência de 280 °C. Varredura de íons na faixa de 90 a 450 mm.

Fonte de Radiação e irradiação das amostras

As amostras foram submetidas à radiação gama em um irradiador de pesquisa do tipo cavidade blindada; com porta blindada e fonte móveis; dimensões aproximadas de 3m x 2m x 1,7 m (pesando 19 toneladas); fonte de ¹³⁷Cs com atividade de 46 kCi e taxa de dose máxima de 1,8 kGy/h, localizado no Centro de Tecnologia do Exército – CTEEx/Rio de Janeiro – RJ (9).

Os frascos com as amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento de serem irradiadas.

As doses de radiação gama de 0,3; 0,5; 0,6; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 kGy foram aplicadas em esquema de duplicata para a polpa de tomate em branco, a quintuplicatas da polpa contaminada com os agrotóxicos alvos do estudo e a duplicatas das soluções padrão individuais.

O erro estimado das doses é de $\pm 5\%$ (um desvio-padrão).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações dos agrotóxicos antes da irradiação são apresentadas na Tabela 1 para a polpa de tomate.

Tabela 1: Concentrações experimentais pré-irradiação das soluções padrão e dos agrotóxicos na polpa de tomate

Agrotóxico	Concentração em solvente ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração na polpa de tomate ($\mu\text{g/g}$)
γ -HCH	0,0189	0,1131
clorotalonil	0,0227	0,1364
fenitrotiona	0,0375	0,2249
clorpirifós	0,0197	0,1180
procimidona	0,0266	0,1599

Os resultados são expressos pela taxas de recuperações obtidas após análise multiresíduos por CG-DCE. A análise por CG-EM foi empregada para confirmação e identificação de possíveis produtos de degradação.

Para algumas substâncias, os efeitos da radiação gama foram mais acentuados na polpa de tomate do que nas soluções preparadas em solvente isooctano, como por exemplo, a fenitrotiona e o clorotalonil. Essas duas substâncias apresentaram perdas significativas a partir da dose de 3,0 kGy na polpa de tomate. Este resultado é razoável já que o teor de água da polpa de tomate é de aproximadamente 90%, o que proporciona a formação e a ação de radicais radiolíticos e, conseqüentemente, maior decomposição das substâncias adicionadas.

Como esperado, os efeitos da radiação gama sobre os agrotóxicos em ambos estudos, solução em isooctano e polpa de tomate, se intensificam com a dose,

dependendo mais do substrato (composição e textura do meio) do que da substância (resíduo) irradiada, confirmando os achados de LÉPINE (10), de que os mesmos podem não ser significativamente degradados por irradiação em baixas doses. De fato, como se pode observar nas figuras 2 e 3, no intervalo entre 2,0 kGy e até 10,0 kGy a concentração de gama-HCH na solução em isooctano e na polpa de tomate manteve-se quase constante. Por outro lado, na faixa de doses gama investigada, a concentração de outros agrotóxicos diminuiu consideravelmente.

Observa-se também que a constituição mais complexa da polpa de tomate e sua textura pastosa reduziram as perdas dos agrotóxicos em relação ao que ocorreu nas soluções de isooctano, nas quais, a ação protetora do meio, mais simples, provavelmente foi menos intensa, além do fato de que o substrato líquido acarretou uma maior mobilidade dos radicais livres formados pela irradiação.

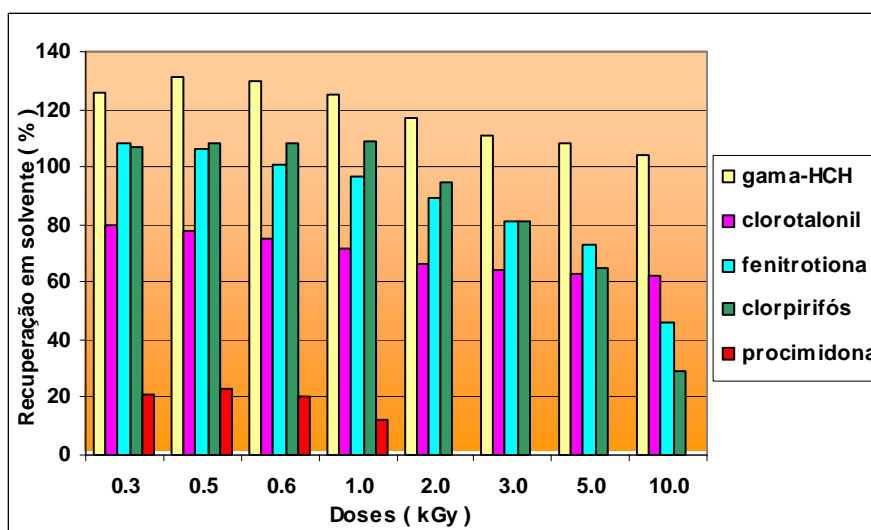


Figura 2: Porcentagem de recuperação dos resíduos de agrotóxicos contidos nas soluções de agrotóxicos em isooctano após irradiação

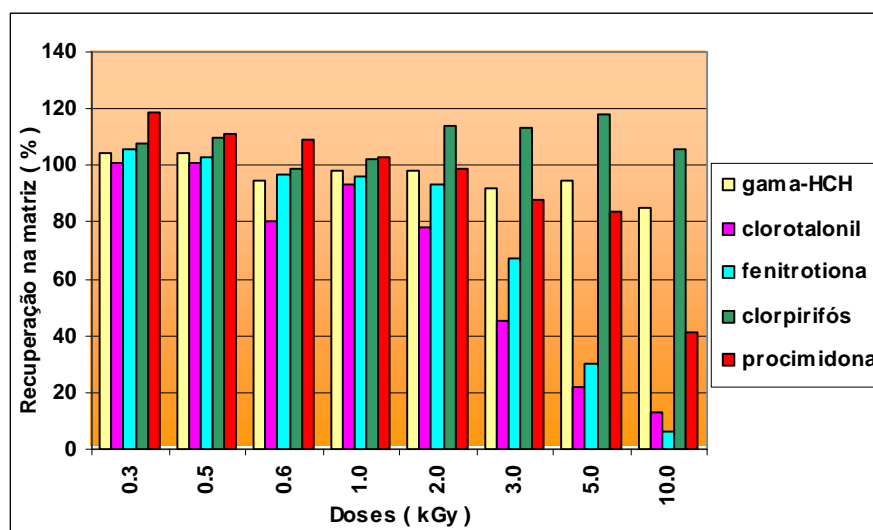


Figura 3: Porcentagem de recuperação dos resíduos de agrotóxicos contidos na polpa de tomate após irradiação

Nas amostras em branco da polpa de tomate não foram identificadas substâncias outras além daquelas constituintes do fruto, como por exemplo, o licopeno e vitamina E.

Nas amostras da polpa de tomate contaminada com os cinco agrotóxicos, os produtos de degradação foram identificados através da biblioteca de espectros do CG-EM. Foram os seguintes esse produtos: isômeros do HCH nas amostras com o γ -HCH; triclorodicianobenzeno, diclorodicianobenzeno e clorocianobenzeno nas amostras com o clorotalonil; 3-metil-4-nitrofenol nas amostras com fenitrotiona; 3,5,6-tricloro-2-piridinol nas amostras com clorpirifós e uma substância não identificada (fragmentograma demonstrando a perda de uma molécula de cloro) nas amostras com procimidona.

CONCLUSÕES

Os resultados preliminares apresentados neste trabalho sugerem que a radiação gama poderá ser empregada, até a dose de 2,0 kGy, na preparação de material de referência utilizando a matriz polpa de tomate contendo resíduos dos seguintes agrotóxicos γ -HCH, clorotalonil, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona com a finalidade de reduzir a degradação microbiológica das amostras e garantir a estabilidade das mesmas por períodos prolongados.

AGRADECIMENTOS

À Divisão de Defesa Química, Biológica e Nuclear do Centro Tecnológico do Exército – RJ, pela realização da irradiação das amostras de polpa de tomate, etapa essencial para o desenvolvimento de parte deste projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) INMETRO. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia:** portaria INMETRO n° 029 de 1995/INMETRO, SENAI – Departamento Nacional. 5. ed. – Rio de Janeiro: Ed. SENAI,2007. 72p.
- (2) ISO. **GUIDE 35: Reference materials – General and statistical principles for certification.** 3. ed. Geneva, 2006. 64p.
- (3) ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n° 21, de 26 de janeiro de 2001 [on-line]. Disponível: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/21_01rdc.htm [capturado em 23 de outubro de 2007].
- (4) HERNANDES, N.K; VITAL, H.C; SABAA-SRUR, A.U.O. Irradiação de alimentos: Vantagens e Limitações - **Bol. SBCTA**, Campinas, v. 37, n. 2: p. 154-159, jul.-dez. 2003.
- (5) CARDOSO, M. H. W. M.; ABRANTES, S.; NÓBREGA, A. Estudo para preparação e certificação de um material de referência a ser usado no controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros. In: JORNADA CIENTÍFICA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 10., 2007, Rio de Janeiro. **Resumos ...** Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2007, 1 CD-Rom.
- (6) CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A W.; ABRANTES, S. Efeito da Resposta Cromatográfica Acentuada e Induzida pela Matriz: Estudo de Caso em Tomates. **Analytica**. No prelo.
- (7) LEE, M.; PAPATHAKIS, M. L.; FENG, H. M.C.; HUNTER, G. F.; CARR, J. E. Multipesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 339, p. 376-383, 1991.
- (8) GENERAL INSPECTORATE FOR HEALTH PROTECTION, **Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs**, 6th ed., Ministry of Public Health, Welfare and Sport, The Hague, The Netherlands, 1996. Part I.

- (9) VITAL, H. C. e PIRES, L. F. G., Experimentos Dosimétricos no Irradiador Gama do IPE. **Anais** do V Encontro Nacional de Aplicações Nucleares (ENAN), Rio de Janeiro, RJ, 15 - 20 Out. 2000.
- (10) LÉPINE, F. L. Effects of ionizing radiation on pesticides in a food irradiation perspective: a bibliographic review. **J. Agri. Food Chem.**, v. 32, n. 12, p. 2112-2118, 1991.

3.4 – **MANUSCRITO 4** – Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 1: Estudo da homogeneidade.

Artigo científico de autoria de Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso et al., submetido à apreciação na Revista **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 1. Estudo da homogeneidade

Preparação de um material de referência

Maria Helena W. M. CARDOSO^{1*}, Armi W. NÓBREGA¹, Hélio C. VITAL²
e Shirley ABRANTES¹

¹*Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, 21.045-900. E-mail: helenawohlrs@hotmail.com*

²*Divisão de Defesa Química, Biológica e Nuclear do Centro Tecnológico do Exército (DDQBN/CTEx) – Av. da Américas, 28705 – Guaratiba, Rio de Janeiro / RJ, Brasil, 23020-470.*

** A quem a correspondência deve ser enviada*

Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 1. Estudo da homogeneidade

Resumo

Neste trabalho são apresentados os esforços para garantir a homogeneidade de um material de referência. Resíduos de quatro agrotóxicos: γ -HCH, fenitrothion, clorpirifós e procimidona foram adicionados à polpa de tomate com o objetivo de se preparar um material de referência certificado. As propriedades mais importantes desses materiais são a homogeneidade e a estabilidade. Antes de serem enviados a outros laboratórios os materiais de referência precisam ter sua homogeneidade verificada. Nos estudos preliminares, amostras foram avaliadas de modo a obter dados sobre o tratamento mais adequado para minimizar a variabilidade analítica do lote preparado e garantir a qualidade da amostra candidata a material de referência certificado tão bem como a estimativa da incerteza associada à homogeneidade. Depois da preparação as amostras foram expostas à radiação gama na dose de 2kGy. A análise de variância fornece informações sobre a variabilidade do lote preparado e o grau de invariabilidade da amostra fortificada.

Palavras-chave: agrotóxicos, tomate, material de referência, homogeneidade.

Preparation of a reference material to pesticide control in fruits and vegetable: Part 1.

Homogeneity study

Abstract

This work discusses efforts to ensure the homogeneity of certified reference materials. Residues of four pesticides, namely: γ -HCH, fenitrothion, chlorpyrifos and procymidone have been added to tomato pulp in order to produce reference materials. The two most important properties of such materials are known to be homogeneity and stability. Thus, reference materials to be shipped to other laboratories must have their homogeneity certified. As part of a preliminary study, hundreds of samples have been investigated in order to provide data on the most suitable treatments to minimize analytical variability and ensure the quality of samples intended for use as reference materials as well as to yield estimates of the uncertainty associated to the homogeneity data. After preparation, the samples were exposed to 2kGy of gamma radiation. In addition, variance analysis provided accurate information on the bulk variability and the degree of non-homogeneity of blank and contaminated samples.

Key words: pesticides, tomato, reference material, homogeneity.

1 Introdução

Materiais de referência – MR e materiais de referência certificados – MRC são as bases para verificação da exatidão de medições analíticas, visando a garantir a sua confiabilidade.

Infelizmente, não existem MR e MRC para todas as análises químicas realizadas em laboratórios, sendo que eles se encontram disponíveis apenas para as técnicas analíticas rotineiramente empregadas e para um número muito reduzido de matrizes. Tais materiais são muito caros, tendo em vista que as etapas de certificação são demoradas e dispendiosas. Poucos são produzidos no Brasil e, em sua maioria, são produzidos por países como os EUA, Inglaterra, Alemanha, Austrália entre outros (ALVES; MORAES, 2004).

Na análise de agrotóxicos, existe ainda um grande inconveniente analítico, que é o efeito da matriz e, considerando-se que alguns métodos sofrem interferência da mesma, torna-se necessário utilizar um material semelhante à matriz da amostra (ZUCCHINI, 2004). No Brasil, não existe nenhum provedor de MRC para agrotóxicos, o que dificulta o acesso e, conseqüentemente, aumenta o custo para o laboratório. São disponíveis apenas MR destinados a Ensaio de Proficiência (BASTOS et al, 2007). Quando ocorre a compra de um material, existe ainda a possibilidade de ocorrer uma falha na logística de envio, ocasionando perda do material, devido à deficiência nas condições de transporte.

A produção de um MRC requer um planejamento experimental detalhado, no qual deve ser prevista uma quantidade suficiente de material para a execução de todos estudos inerentes a ele (ISO GUIDE 35, 2006). Basicamente, são quatro etapas de trabalho para a produção de um MRC: preparo do material, envasamento das amostras, com verificação da homogeneidade do material nos frascos, estabelecimento da estabilidade, que garantirá ao material embalado ser mantido íntegro durante estocagem por tempo pré-estabelecido, e a certificação dos valores atribuídos às propriedades de interesse do material preparado. A embalagem desse material também tem relevância, pois irá contribuir para manter sua integridade durante todo o período despendido no transporte e armazenamento. O valor certificado dos materiais de referência deve ser mensurado a partir de cálculos estatísticos adequados e informado com suas incertezas devidamente estimadas, provenientes da caracterização da amostra, da homogeneidade e da estabilidade da amostra (ISO GUIDE 35, 2006; ILAC, 2008; CHUI; IMAHITA; BISPO, 2005).

O teste da homogeneidade da amostra é um dos fatores essenciais para a garantia da manutenção das propriedades físico-químicas do material estudado e, portanto, as dimensões da amostra devem ser representativas do tamanho do grupo. No experimento, o número de frascos

selecionados aleatoriamente deve incluir entre 10 e 30 unidades do lote preparado (ISO GUIDE 35, 2006). O planejamento para verificar a homogeneidade de um lote de material preparado para fins de certificação deve indicar as variabilidades da amostra dentro do recipiente, assim como entre os recipientes que contêm os materiais que compõem o lote, devidamente envasados (ISO GUIDE 35, 2006; ILAC, 2008). Os dados para o teste de homogeneidade devem ser executados em condições de estrita repetitividade (mesmo laboratório, mesmo analista e todas amostras testadas no mesmo dia, se possível). Além disso, na variabilidade entre os frascos, deve ser incluída a incerteza relativa a tal condição (ISO GUIDE 35, 2006; ILAC, 2008; ELLISON et al, 2001).

Este trabalho apresenta os resultados da etapa referente à homogeneização de um lote de polpa de tomate, submetida à radiação gama, candidato a MRC, a ser utilizado na análise de resíduos de agrotóxicos, incluindo a incerteza associada à homogeneidade. A amostra foi irradiada visando à sua conservação, e conseqüentemente, à garantia de sua integridade, durante o longo período de armazenamento.

À polpa de tomate foram adicionadas quantidades conhecidas de quatro agrotóxicos (γ -HCH, fenitrotona, clorpirifós e procimidona) na faixa de concentração entre 0,1 e 0,2 mg/kg. A concentração dos agrotóxicos na matriz a ser transformada em material de referência foi definida de modo a garantir que os níveis resultantes de analitos no MR pudessem ser detectados em todos os laboratórios envolvidos na pesquisa. Dentre os agrotóxicos selecionados no Brasil, apenas o clorpirifós e a procimidona são indicados para a cultura de tomate nos limites máximos de resíduos permitidos (LMR) de 0,5 e 2,0 mg/kg respectivamente (ANVISA, 2008). Na Tabela 1, são apresentados os LMR adotados para a cultura do tomate no Brasil e em outros países (ANVISA, 2008; APVMA, 2008; PMRA, 2008; PSD/CODEX, 2008; MINISTERE DE L'AGRICULTURE et DE la PÊCHE, 2008; RIKILT, 2008; DGADR, 2008; PSD, 2008).

Tabela 1: Limites máximo de resíduos permitidos para a cultura de tomate no Brasil e em outros países.

Agrotóxico	LMR (mg/kg)							
	Brasil	Austrália	Canadá	Codex	França	Holanda	Portugal	Reino Unido
γ HCH	NI*	NI*	3,0	NI*	0,01	NI*	NI*	0,01
fenitrotiona	NI*	NI*	NI*	NI*	0,01	NI*	NI*	0,01
clorpirifós	0,5	0,5	0,01	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
procimidona	2,0	NI*	NI*	5,0	2,0	2,0	2,0	2,0

*NI = não indicado

Fontes: Brasil (ANVISA, 2008); Austrália (APVMA, 2008); Canadá (PMRA, 2008); Codex (PSD/CODEX, 2008); França (MINISTERE DE L'AGRICULTURE et DE la PÊCHE, 2008); Holanda (RIKILT, 2008); Portugal (DGADR, 2008); UK/EC (PSD, 2008).

Embora a fenitrotiona e o γ HCH não sejam indicados no Brasil para a cultura do tomate, observamos na Tabela 1 que seu uso é indicado em outros países, demonstrando que não há impedimento para a sua inclusão no material objeto de estudo.

A quantificação dos agrotóxicos foi realizada por cromatografia gasosa de alta resolução, acoplada a um detector por captura de elétrons (CGAR-DCE).

2 Material e métodos

2.1 Amostra

Foram utilizados, neste trabalho, tomates orgânicos provenientes da região serrana do Rio de Janeiro, os quais foram empregados no preparo do material de referência nomeado de INCQS-MRC01. As amostras foram lavadas e descascadas e suas sementes foram retiradas, antes de serem processadas em um liquidificador.

O volume de polpa de tomate processado foi homogeneizado com o auxílio de um agitador mecânico e, após 30 minutos, retirou-se quantidade suficiente para servir como branco da amostra e determinação do valor do pH. O pH foi medido na polpa processada antes e após a adição dos agrotóxicos.

A análise da polpa foi realizada por cromatografia em fase gasosa, acoplada a detector seletivo de massa (CG/DSM), para confirmação da ausência de resíduos de agrotóxicos, e por cromatografia em fase gasosa de alta resolução, acoplada a detector por captura de elétrons

(CGAR/DCE), para quantificação dos agrotóxicos estudados utilizando-se o método dos multiresíduos.

Para realização dos estudos pilotos utilizaram-se aproximadamente 45 kg da polpa de tomate.

Estudo Piloto I

Uma pequena quantidade de polpa de tomate obtida foi retirada do volume inicialmente preparado e mantida à velocidade mínima em liquidificador, por 1 hora, após a adição da solução de fortificação, preparada em solvente isooctano, contendo os analitos em questão. O volume restante foi mantido em congelador sob temperaturas entre -10 a -25 °C. Logo após essa etapa de homogeneização, esse volume de polpa contaminada foi adicionado à massa restante, para homogeneização em batedeira industrial (capacidade para 20 litros) por mais três horas, a fim de proporcionar uma melhor interação da polpa de tomate com os padrões de agrotóxicos. Em seguida, o material foi envasado em ampolas de vidro inequivocamente identificadas, as quais foram armazenadas em congelador após serem seladas. A capacidade de cada ampola é de 30 mL, o que corresponde à massa de 14 a 20g/ampola. Durante a transferência do volume necessário para as ampolas de vidro, a agitação da batelada de amostra não foi interrompida e a velocidade da hélice da batedeira foi ajustada de modo a proporcionar agitação sem provocar respingos do líquido.

Estudo Piloto II

Numa segunda avaliação, passou-se o restante da polpa de tomate, já processada no estudo piloto I, através de uma peneira com abertura de malha de 0,84 mm, a fim de proporcionar uma redução adicional do particulado da amostra (ARMISHAW; MILLAR, 2001). Além disso, foram adicionadas soluções de fortificação individuais de cada agrotóxico, obtidas em solvente acetona, em substituição a uma única solução. As demais condições de preparo não foram alteradas.

Preparo do material INCQS-MRC01

Quinze kg de tomate de mesma procedência foram utilizados para o preparo da matriz candidata a tornar-se material de referência, conforme as modificações do estudo piloto II.

Quatro soluções padrão, em acetona, foram utilizadas para fortificação da polpa de tomate, γ -HCH (56,52 $\mu\text{g/mL}$; 99,5%), fenitrotiona (44,26 $\mu\text{g/mL}$; 97,7%), procimidona (42,73

$\mu\text{g/mL}$; 98%), fornecidas pelo Dr. Ehrenstorfer (Alemanha) e clorpirifós (51,58 $\mu\text{g/mL}$; 99,2%), produzidas por Riedel-de-Haën (Alemanha), todas incluindo certificados de análise. Essas concentrações correspondem à faixa de 0,1 a 0,2 mg/kg na amostra.

Os solventes utilizados foram do tipo grau pesticida (Tedia, EUA) e todas as pesagens foram supervisionadas por um segundo analista. A balança analítica utilizada estava calibrada e apresentava-se em conformidade com as normas de qualidade (ISO/IEC 17025, 2005).

Após a adição das soluções padrão, a polpa foi homogeneizada e seu pH foi medido. Em seguida, ela foi transferida para ampolas de vidro, as quais foram armazenadas em congelador sob temperaturas entre -10 a -25 °C até o tratamento por irradiação gama visando à conservação da amostra. O montante de ampolas contendo polpa de tomate totalizou 220. O mesmo procedimento foi realizado para o preparo do branco da amostra, o qual resultou no quantitativo de 100 ampolas.

As ampolas fortificadas e brancas foram irradiadas com dose de 2 kGy no irradiador de pesquisa com fonte de césio-137 (com atividade atual de 46 kCi) localizado no Centro Tecnológico do Exército (VITAL et al, 2000; CARDOSO et al; no prelo). A taxa de dose foi 1,7 kGy/h.

2.2 Teste de Homogeneidade

Para avaliação da homogeneidade do lote preparado, 10 ampolas, foram aleatoriamente selecionadas, usando-se uma função do Excel®, antes do início do envasamento, de modo a facilitar a identificação dos frascos destinados ao teste. Os agrotóxicos foram extraídos da amostra de acordo com o método multiresíduos proposto e foram analisadas por CGAR-DCE. Cada ampola lacrada originou duas alíquotas resultantes do mesmo extrato da amostra, denominadas de A e B. O teste de homogeneidade foi realizado segundo recomendação da ISO GUIDE 35 (VAN DER VEEN; LISINGER; PAUWLES, 2001; ISO GUIDE, 2006). Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente, utilizando a análise de variâncias (ANOVA) com fator único (ISO GUIDE 35, 2006), a qual informou se a variação na composição das amostras distribuídas nos recipientes foi suficientemente pequena para o objetivo proposto.

2.3 Incerteza Inerente à Homogeneidade

A parcela da incerteza inerente à homogeneidade ($u_{\text{homogeneidade}}$) do material que compõe o lote preparado foi obtida a partir dos mesmos dados gerados pela ANOVA com fator único (VAN DER VEEN; LISINGER; PAUWLES, 2001; ISO GUIDE 35, 2006).

2.4 Método Multiresíduos

Para quantificação dos quatro analitos na polpa de tomate empregou-se procedimento validado previamente (CARDOSO et al., submetido). Resumidamente, 15 g da amostra são extraídas com 30 mL de acetona e, em seguida, com 60 mL de uma mistura diclorometano:éter de petróleo (1:1, v:v). O recipiente é levado à centrifugação e a fase orgânica filtrada sob sulfato de sódio. Desse volume coletado, 1 mL é evaporado e dissolvido em 1 mL de isooctano para análise por CGAR/DCE. Para análise por CG/DSM, foram retirados 25 mL do mesmo extrato filtrado, evaporado em banho de aquecimento até no máximo 70 °C, dissolvido em 1 mL de uma mistura de padrão interno em acetato de etila e 2 µl do extrato foram injetados no cromatógrafo.

2.5 Instrumentação e Condições Cromatográficas Otimizadas

Nos experimentos, foram utilizados os seguintes equipamentos com respectivos ajustes e procedimentos:

Cromatógrafo a gás HP 6890 (Agilent), devidamente qualificado, equipado com detector por captura de elétrons. Temperatura do injetor e detector de 210°C e 300°C, respectivamente. Coluna HP 5MS (30m x 0,25 mm x 0,25µm). Programação de temperatura do forno de 80°C (0 min) @30°C/min 180°C (8 min) @2°C/min 200°C (5 min) @6°C/min 280°C (5 min). Fluxo de gás carreador (Helio) = 1,2 mL/min, injeção “splitless” = 0,75 min, volume injetado = 1,0 µL.

Cromatógrafo a gás acoplado a detector seletivo de massas (Agilent 6890/5973). Temperatura do injetor de 230°C. Coluna HP 5MS (30m x 0,25 mm x 0,25µm), nas temperaturas de 60°C (2,50 min) @10°C/min 180°C (1 min) @2°C/min 215°C (1 min) @10°C/min 280°C (15 min). Fluxo de gás carreador (Hélio) = 1,0 mL/min, injeção “pulsed splitless” = 0,75 min. Temperatura da linha de transferência de 280 °C. Varredura de íons na faixa de 90 a 450 mm.

2.6 Avaliação do pH

Medidor de pH (Mettler Toledo) modelo MP 220.

3 Resultados e discussão

Os lotes utilizados nos estudos pilotos I e II permitiram investigar o processo de produção e identificar problemas inerentes a ele, bem como avaliar previamente sua estabilidade durante condições de tempo e de temperatura pré-determinados. Os tratamentos utilizados para garantir a

integridade da amostra após ter sua homogeneidade confirmada foram: pasteurização e irradiação gama, os quais serão descritos detalhadamente em outro trabalho (CARDOSO et al., submetido).

3.1 Preparo da amostra

Após a retirada da casca e sementes, a massa de polpa ficou reduzida a aproximadamente 70 a 80% de seu volume inicial. A opção pela remoção da casca e das sementes teve como objetivo principal buscar uniformizar as dimensões do particulado de polpa de tomate processada sem a possível interferência de pequenos fragmentos oriundos dessas partes do fruto que poderiam vir a prejudicar o grau de homogeneidade esperado para o lote (ARMISHAW; MILLAR, 2001). Em seguida, o material foi testado para verificação de ausência de resíduos de agrotóxicos, a qual foi confirmada por CG/DSM.

Estudo Piloto I

Nesta etapa, testou-se, além dos agrotóxicos já apresentados, a utilização de uma solução de fortificação contendo essas quatro substâncias, aferindo-se também a solubilidade do solvente desta solução na polpa de tomate.

O valor do pH na polpa foi levado em consideração, pois deve ser reduzido o suficiente para garantir o longo tempo de estocagem após o acondicionamento nos recipientes de vidro, correspondendo a valores de 4,02 a 4,09 respectivamente, indicando pequena alteração com adição da solução de fortificação. Valores maiores que 4,4 não são desejados, pois propiciariam o crescimento de organismos microbiológicos favorecendo condições para degradação dos analitos (ARMISHAW; MILLAR, 2001).

Sendo o tomate um fruto que apresenta alto teor de água, conseqüentemente sua polpa é um sistema de duas fases e um determinado grau de heterogeneidade é esperado. Sendo assim, foi imprescindível manter a agitação da batelada de amostra durante a transferência do volume para as ampolas.

A homogeneidade da fenitrotiona na polpa de tomate não foi assegurada nesta etapa. Entretanto, na avaliação para o clorpirifós e para a procimidona, a homogeneidade só foi confirmada após a retirada de quatro valores aberrantes (“outliers”), provenientes de 10 amostras. Segundo Horwitz (1995), o número máximo de valores aberrantes que podem ser descartados em um conjunto de medições é de 22%, concluindo-se que o clorpirifós e a procimidona não se apresentavam homogêneos. Dos quatro agrotóxicos estudados, apenas o γ -HCH foi considerado homogêneo, em relação aos valores de concentração dos mesmos, após a retirada de um valor

aberrante. Uma possível indicação para tal ocorrência pode ter sido o preparo da solução de fortificação em isooctano, o qual não apresentou adequada solubilidade na polpa de tomate devido ao alto teor de água da mesma.

Estudo Piloto II

O valor do pH e os resultados encontrados para os quatro agrotóxicos, após as referidas alterações, foram satisfatórios em relação à homogeneidade da amostra, indicando que o particulado constante da matriz após utilização da peneira, o uso da acetona como solvente de diluição da solução de fortificação e o tempo de homogeneização de 3 horas foram satisfatórios para a produção de um material de referência contendo γ -HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona.

Este lote contendo polpa de tomate, preparado com o propósito de avaliar a estabilidade dos agrotóxicos após confirmação da homogeneidade, foi submetido a tratamento por esterilização térmica e radiação gama para ser estudada durante o período de um ano. Quatrocentos e vinte ampolas foram avaliadas em relação à homogeneidade, sob condições pré-estabelecidas (CARDOSO et al., submetido).

Preparo do material INCQS-MRC01

Não ocorreram dificuldades para o preparo deste lote. O valor do pH antes da adição da solução de fortificação foi de 4,01 e de 4,02 antes do envasamento nas ampolas.

A verificação prévia da homogeneidade foi confirmada com os dados gerados a partir de 10 ampolas, indicando que as amostras encontravam-se em estado apropriado e poderiam então ser expostas à radiação gama.

Após a irradiação, a homogeneidade das amostras e sua incerteza foram avaliadas com os resultados obtidos relativos ao lote restante, subtraído de 10 amostras.

3.2 Avaliação da homogeneidade e respectiva incerteza do lote preparado INCQS-MRC01

Na Tabela 2, estão dispostos os resultados gerados para avaliação da homogeneidade do material MRC01, realizada após o tratamento por irradiação. As Tabelas 3, 4, 5 e 6 listam os resultados dos estudos de homogeneidade das amostras, para cada agrotóxico fortificado, tendo como fontes de variação, as diferenças entre as amostras (linhas) e dentro das amostras (colunas).

Tabela 2: Concentrações médias e desvios padrão (DP) calculados na determinação do γ -HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona na polpa de tomate.

Identidade da amostra	Agrotóxicos (mg/kg)							
	γ -HCH		Fenitrotiona		Clorpirifós		Procimidona	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	0,1788	0,1826	0,1815	0,2066	0,1997	0,2167	0,1867	0,2072
19	0,1703	0,1834	0,1775	0,1937	0,1864	0,2038	0,1860	0,1936
36	0,1737	0,1694	0,1758	0,2152	0,1850	0,2190	0,1898	0,2052
44	0,1707	0,1635	0,2054	0,2030	0,2172	0,2095	0,2069	0,2004
46	0,1680	0,1643	0,1902	0,2002	0,2007	0,2090	0,1918	0,1967
93	0,1815	0,1830	0,1982	0,1977	0,2146	0,2073	0,1944	0,2028
127	0,1645	0,1552	0,1942	0,1995	0,2023	0,2044	0,1932	0,1982
133	0,1725	0,1716	0,1895	0,2031	0,2048	0,2074	0,1916	0,2079
172	0,1850	0,1598	0,2117	0,2209	0,2236	0,2250	0,2124	0,2133
207	0,1739	0,1881	0,2262	0,2123	0,2239	0,2270	0,2018	0,2186
Média	0,1730		0,2001		0,2094		0,1999	
DP	0,0091		0,0135		0,0115		0,0092	

Tabela 3: Análise de variância das amostras de polpa de tomate gerada usando-se o software Microsoft Excel® para o γ -HCH.

Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre ampolas	0,000964	9	0,000107089	1,78823	0,189081	3,02038
Dentro das ampolas	0,000599	10	0,000060			
Total	0,001563	19				

Tabela 4: Análise de variância das amostras de polpa de tomate gerada usando-se o software Microsoft Excel® para a fenitrotiona.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i> <i>calculado</i>	<i>Valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre ampolas	0,001931	9	0,0002146	1,408979	0,29951	3,02038
Dentro das ampolas	0,001523	10	0,0001523			
Total	0,003454	19				

Tabela 5: Análise de variância das amostras de polpa de tomate gerada usando-se o software Microsoft Excel® para o clorpirifós.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i> <i>calculado</i>	<i>Valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre ampolas	0,001651	9	0,0001834	1,886883	0,168315	3,02038
Dentro das ampolas	0,000972	10	0,0000972			
Total	0,002623	19				

Tabela 6: Análise de variância das amostras de polpa de tomate gerada usando-se o software Microsoft Excel® para a procimidona.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i> <i>calculado</i>	<i>Valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre ampolas	0,000911	9	0,0001013	1,42117	0,295041	3,02038
Dentro das ampolas	0,000713	10	0,0000713			
Total	0,001624	19				

Usando-se o modelo ANOVA fator único (ISO GUIDE 35, 2006), como ferramenta estatística para avaliação dessa característica nos recipientes, o teste F indica se os resultados da homogeneidade são significantes. Quando $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico, } (\alpha=5\%)}$ não há motivo para a não aceitação da homogeneidade entre os recipientes com amostra. O valor de P indica em qual nível o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi observado.

Para os agrotóxicos citados nas Tabelas 3 a 6, o teste F confirmou não haver diferenças significativas, com $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, estando a amostra homogênea em relação aos agrotóxicos nela presentes.

A incerteza da homogeneidade é função dos valores da média quadrática (MQ) entre as ampolas (MQ_{entre}) e dentro das ampolas (MQ_{dentro}), a qual também é fornecida pelo teste de análise de variância (Tabelas 3 a 6). Quando o valor de MQ_{entre} as ampolas for maior que MQ_{dentro} das ampolas, a incerteza padrão devido à não homogeneidade ($u_{\text{homogeneidade}}$ ou u_{bb}) é equivalente ao desvio padrão (S_{bb}) entre as ampolas, podendo ser estimada através da Equação 1, com $n =$ número de replicatas das ampolas. Neste estudo, as ampolas continham quantidade referente a apenas uma pesagem de amostra, resultando em $n = 1$ unidade. Desse modo, nos casos em que a sub-amostragem é inviável, ou seja, quando não é possível se efetuar duas pesagens do mesmo recipiente, a variabilidade dentro das ampolas é avaliada inferida da reprodutibilidade da mesma unidade sob medição (ISO GUIDE 35, 2006; VAN DER VEEN; LISINGER; PAUWLES, 2001).

$$u_{bb} = S_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}}{n}} \quad (1)$$

Na Tabela 7, são apresentados os valores das incertezas (variâncias) referentes à homogeneidade do material INCQS-MRC01, calculados usando-se a Equação 1 para os quatro agrotóxicos utilizados.

Tabela 7: Valores das incertezas referentes à homogeneidade do material de referência MRC01 para os agrotóxicos estudados.

Agrotóxico	Incerteza Padrão ($u_{\text{homogeneidade}}$) (mg/kg)
γ -HCH	0,0069
Fenitrotona	0,0079
Clorpirifós	0,0093
Procimidona	0,0055

Após realização do teste de homogeneidade, foi conduzido um programa interlaboratorial para a execução da etapa de certificação do lote de polpa de tomate preparado, INCQS-MRC01.

4 Conclusões

O parâmetro homogeneidade é de grande relevância na produção de um material de referência, por prover informações relativas à qualidade dos resultados analíticos e, conseqüentemente, não devem ser negligenciados. Em virtude disso, as etapas de produção de um material de referência devem ser minuciosamente planejadas, a fim de se garantir o bom estado de conservação do material.

O estudo piloto realizado forneceu dados fundamentais e imprescindíveis à elaboração do material MRC01, no que se refere ao tamanho da partícula da amostra, à solubilidade do solvente indicado para preparo da solução de fortificação e ao uso de soluções individuais dos agrotóxicos, que garantiram a homogeneidade do lote produzido.

A incerteza associada à homogeneidade do material informa sobre a estabilidade do lote preparado e será incorporada à incerteza combinada do material MRC01.

Referências Bibliográficas

- ALVES, N. P.; MORAES, D. N. **Metrologia Química e a Utilização de Materiais de Referência em medições Químicas**. Disponível em: <<http://www.quimlab.com.br>>. Acesso em: 02 fev. 2004.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias>>. Acesso em: 06 mar. 2008.
- APVMA – Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Disponível em: <<http://www.apvma.gov.au/residues>>. Acesso em: 06 mar. 2008.
- ARMISHAW, P.; MILLAR, R. A natural matrix (pureed tomato) candidate reference material containing residue concentrations of pesticide chemicals. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 370, p. 291-296, 2001.
- BASTOS, L. H. P.; GÓES, H. C. A.; CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; DIAS, D. P.; ALMEIDA, R. R. R.; NÓBREGA, A.; ABRANTES, S. Ensaio de Proficiência para análise de ditiocarbamatos em polpa de banana. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 32-35, 2007.

- CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; NÓBREGA, A.; ABRANTES, S. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: Uma experiência laboratorial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, submetido.
- CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A.; VITAL, H. C.; ABRANTES, A. Aplicação da radiação gama na preservação de material de referência a ser usado na análise de resíduos de agrotóxicos. **Analytica**, no prelo.
- CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A.; VITAL, H. C.; ABRANTES, S. Preparação de um material de referência para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 2; estudo da estabilidade. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, submetido.
- CHUI, Q. S. H.; IAMASHITA, C. O.; BISPO, J. M. A. Estudo de homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência. **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 497-501, 2005.
- DGADR – Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural / Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, PORTUGAL, Disponível em: <<http://www.dgadr.pt>>. Acesso em: 16 mar. 2008.
- ELLISON, S. L. R.; BURKE, S.; WALKER, R. F.; HEYDON, K.; MÅNSSON, M.; PAUWELS, J.; WEGSCHEIDER, W.; B. te NIJENHUIS. Uncertainty for reference materials certified by interlaboratory study: recommendations of an international study group. **Accred. Qual. Assur.**, v. 6, p. 274-277, 2001.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure & Appl. Chem**, v. 67, n.2, p.331-343, 1995.
- ISO GUIDE 35 - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION -. **Reference materials – General and statistical principles for certification**. Switzerland, 2006.
- ILAC Guidelines for the Requirements for the Competence of Reference Material Producers. ILAC G-12, 2000. Disponível em: <<http://www.ilac.org>>. Acesso em: 11 Fev. 2008.
- MINISTERE DE L'AGRICULTURE et DE la PÊCHE – FRANÇA. Disponível em: <<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/lmr/vegres/02030101.htm>>. Acesso em: 16 mar. 2008.
- NBR/ISO/IEC 17025 - Associação Brasileira de Normas Técnicas; Requisitos Técnicos para a Competência de Laboratório de Ensaios e Calibração. **ISO Guia 17025**. Rio de Janeiro, 2005.
- PMRA – Pest Management Regulatory Agency – CANADÁ. Disponível em: <<http://www.pmr-arla.gc.ca/english/legis.maxres-e.html>>. Acesso em: 16 mar. 2008.

- PSD - Pesticides Safety Directorate, UK. Disponível em: <<http://www.pesticides.gov.uk/home.asp>>. Acesso em: 16 mar. 2008.
- PSD - Pesticides Safety Directorate, UK/CODEX. Disponível em: <<https://secure.pesticides.gov.uk/MRLs/Codex/MRLlist.asp>>. Acesso em: 16 mar. 2008.
- RIKILT - Institute of Food Safety, The Netherlands. Disponível em: <<http://www2.rikilt.dlo.nl/vws/asp/gfmrl.asp>>. Acesso em: 16 mar. 2008.
- VITAL, H. C.; PIRES, L. F. G.; LIMA, R. Q.; VELLOSO, S. O., Experimentos Dosimétricos no Irradiador Gama do IPE. In: ENCONTRO NACIONAL DE APLICAÇÕES NUCLEARES (ENAN). V. 2000, Rio de Janeiro. **Anais**Rio de Janeiro: 2000.
- VAN DER VEEN, A. M. H.; LISINGER, T.; PAUWLES, J., Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Homogeneity study. **Accred. Qual. Assur.**, v. 6, p.26-30, 2001.
- ZUCCHINI, R. R. **Bate-Papo Programado: Materiais de Referência Certificados**. Disponível em: <<http://www.ipt.br>>. Acesso em: 02 fev. 2004.

Agradecimentos

À Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP pelos auxílios financeiros concedidos ao projeto “Estruturação de uma rede de laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos para apoio à exportação de alimentos (REAGROEX)”.

3.5 – **MANUSCRITO 5** – Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 2: Estudo da estabilidade.

Artigo científico de autoria de Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso et al., submetido à apreciação na Revista **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 2. Estudo da estabilidade

Estabilidade de material de referência

Maria Helena W. M. CARDOSO^{1*}, Armi W. NÓBREGA¹, Hélio C. VITAL²
e Shirley ABRANTES¹

¹*Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, 21.045-900. E-mail: helenawohlrs@hotmail.com*

²*Divisão de Defesa Química, Biológica e Nuclear do Centro Tecnológico do Exército (DDQBN/CTEx) – Av. da Américas, 28705 – Guaratiba, Rio de Janeiro / RJ, Brasil, 23020-470.*

* *A quem a correspondência deve ser enviada*

Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 2. Estudo da estabilidade

Resumo

Neste trabalho são apresentados os resultados dos estudos de estabilidade referentes à produção de material de referência certificado. Foram avaliados resíduos dos agrotóxicos: γ -HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona em polpa de tomate. A pasteurização e a irradiação gama foram empregadas à polpa de tomate visando manter a integridade da amostra candidata a material de referência. A polpa foi preparada e dividida em duas partes. Cada parte foi fortificada com os referidos agrotóxicos na faixa de 0,1 a 0,2 mg/kg. Uma das partes foi submetida a pasteurização a 90°C por 4 minutos e a outra parte foi irradiada com dose de 2,0 kGy depois de homogeneizada. A estabilidade e a incerteza da amostra correspondentes ao período de tempo do experimento foram determinados através da análise de regressão. Os resultados indicaram que o tratamento com a dose de 2,0 kGy foi mais apropriado para a conservação da polpa de tomate fortificada com os quatro agrotóxicos.

Palavras-chave: agrotóxicos, material de referência, irradiação, pasteurização, estabilidade.

Preparation of a reference material to pesticide control in fruits and vegetable: Part 2.

Stability study

Abstract

This work presents the results of stability studies regarding the production of certificate reference materials. Residues in tomato pulp of four pesticides, namely: γ -HCH, fenitrothion, chlorpyrifos and procymidone have been investigated. Pasteurization combined to gamma irradiation has been used to maintain the integrity of the mixture tested as a reference material candidate. The pulp was prepared and split in two parts. Each part was then spiked with those pesticides in the range of 0.1 to 0.2 mg/kg in tomato pulp. One of them was submitted to pasteurization at 90°C for 4 minutes after being homogenized and the other was irradiated with dose of 2.0 kGy. The material stability and the corresponding uncertainty during the time period of the experiments were determined by using regression analysis. The results indicated that the dose of 2.0 kGy was appropriated for the conservation of tomato pulp spiked with the four aforementioned pesticides.

Key words: pesticides, reference material, stability test, irradiation, pasteurization.

1 Introdução

A constante busca em garantir a qualidade e confiabilidade de uma medição obtida através de ensaios analíticos é o alvo prioritário em laboratórios nos dias de hoje. Uma ferramenta indicada para este objetivo são os materiais de referência, certificados ou não, que apresentam como características essenciais: a homogeneidade e estabilidade conhecidas.

Na parte 1 deste trabalho (CARDOSO et al, submetido), foram apresentados os resultados referentes ao estudo da homogeneidade de um lote de polpa de tomate, fortificada com quatro agrotóxicos: γ -HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona, candidata a material de referência certificado - MRC. Assim como a homogeneidade, a estabilidade é também pré-requisito no processo de certificação do material de referência, pois constitui um importante parâmetro, indicativo do grau de conservação do material durante períodos específicos de tempo e temperatura após a sua preparação. Sabe-se que o material preparado pode ser suscetível à degradação por ação de agentes tais como: tempo, temperatura, luz, oxigênio, umidade, atividade microbiológica entre outros (ISO GUIDE 35, 2006).

O teste de estabilidade é mais complexo que o de homogeneidade. Nele devem ser considerados dois tipos de variação: longa duração de estabilidade do material, representando o tempo de estocagem ou tempo de prateleira e, de curta duração, representando, por exemplo, as condições de transporte (VAN DER VEEN et al, 2001; ISO GUIDE 35, 2006).

O primeiro tipo é o modelo clássico, o qual mede o valor da propriedade da amostra em função do tempo. A duração do estudo de estabilidade está relacionado com a duração da amostra, normalmente entre 24 e 36 meses, com intervalos típicos de amostragem de 5 a 6 vezes no período determinado (ISO GUIDE 35, 2006).

Como tal modelo deve ser executado sob condições de reprodutibilidade, o valor da incerteza inerente a essa característica - u_{lte} , onde lte significa longo tempo de estocagem (VAN DER VEEN et al, 2001), ou simplesmente u_{est} , deve ser também informado.

O estudo realizado em curto período de tempo é conhecido como '*isochronous design*' ou modelo isocrônico, onde são realizadas medições simultâneas em diferentes temperaturas, para produzir variações na taxa de deterioração dos agrotóxicos (LAMBERTY; SCHIMMEL; PAUWELS, 1998; VAN DER VEEN et al, 2001; LINSINGER et al, 2001; LINSINGER et al, 2004; ISO GUIDE 35, 2006). Na aplicação desse modelo, as medições são efetuadas sob condições de repetitividade, geralmente levando a incertezas menores que aquelas decorrentes da utilização do modelo clássico e que, na maioria das vezes, são negligenciadas. O tempo de estudo

pode ser de dois meses, podendo se estender até seis a doze meses, visando-se a se obter informações adicionais sobre o longo tempo de estocagem (ISO GUIDE 35, 2006).

O tomate foi o fruto matriz escolhido para ser o material de referência. A polpa de tomate apresenta teor de água elevado e, conseqüentemente, há possibilidade de ocorrência de alguma degradação dos agrotóxicos, na polpa, via alguma atividade bacteriana que possa se desenvolver e interferir em sua estabilidade.

Os processos térmicos ou físicos para fins de esterilização de alimentos constituem tecnologias empregadas na indústria para conservação de alimentos.

Dois exemplos desse processo de esterilização, a pasteurização e a irradiação são utilizados em indústrias de alimentos, com o propósito de eliminar microrganismos, visando a conservá-los, sem perda de suas qualidades e características nutricionais durante tempo prolongado de estocagem ou transporte (SILVA et al, 2006).

A pasteurização é um processo de tratamento capaz de inviabilizar o crescimento da maior parte das bactérias normalmente presentes no alimento, sem alterar as propriedades ou características do mesmo. Tradicionalmente, o processo caracteriza-se por um aquecimento do material a temperaturas entre 63 a 75 °C, por um período variável de 15 a 30 segundos, seguido por um resfriamento rápido sob temperaturas abaixo de 5 °C. Esse tratamento fornece uma eficiência bactericida superior a 98%, podendo ser realizado em condições laboratoriais, ou seja, em pequena escala (GAVA, 1999).

A irradiação de alimentos, segundo a RDC nº 21 da ANVISA (ANVISA, 2008), é um processo físico de tratamento que consiste em submeter o alimento, já embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante, com finalidade sanitária, fitossanitária e ou tecnológica.

Os tipos de radiação ionizante são classificados em função do seu comprimento de onda, sendo que as mais curtas são mais eficazes na destruição de microrganismo (ADAMS; MOSS, 1995).

A dose de radiação é usualmente medida em uma unidade denominada Gray (Gy) que é a medida da quantidade de energia por unidade de massa, transferida para um alimento, microrganismos ou outra substância irradiada (CDC, 2007).

Os tipos de radiação empregados nos alimentos são divididos em: radiações não ionizantes (luz ultravioleta e microondas) e radiações ionizantes (onda eletromagnética de alta energia como a radiação gama e os raios X) ou partículas (elétrons muito energéticos). Essas

últimas são capazes de arrancar elétrons dos átomos, excitar e dissociar moléculas (HERNANDES; VITAL; SABAA-SRUR, 2003; CENA, 2007).

As fontes de radiação gama autorizadas pela legislação para o tratamento de alimentos, por não induzirem radiação, são aquelas provenientes dos radionuclídeos ^{60}Co e ^{137}Cs . Os raios gama possuem um excelente poder de penetração, podendo alcançar profundidade de até 20 cm (CENA, 2007).

Um dos principais inconvenientes do emprego da conservação de alimentos por irradiação é a mudança de cor e produção de odores desagradáveis, reações químicas que podem ocasionar alteração na aceitação do produto. Essas alterações dependem da dose de radiação aplicada, da quantidade de água do alimento e do meio gasoso em que o produto é irradiado (HERNANDES; VITAL; SABAA-SRUR, 2003; SILVA et al, 2006; SANT'ANA; ARAÚJO, 2007).

A irradiação de alimentos pode ser vantajosa frente à pasteurização porque a penetração da radiação é mais profunda, instantânea e uniforme. A irradiação é considerada um processo “frio” porque acarreta um pequeno aumento da temperatura durante o processamento. Entretanto, a desvantagem ao uso da irradiação está relacionada principalmente à disponibilidade de irradiadores de alimento (SILVA et al, 2006; SANT'ANA; ARAÚJO, 2007).

A ISO Guide 35 (2006) estabelece que a avaliação da estabilidade do material seja feita pela análise de resíduos da regressão linear e por análise de variância (ANOVA), que consiste em observar se a regressão linear dos valores de concentração dos analitos ao longo do tempo apresenta alguma tendência. Se a inclinação da reta, ou a não linearidade da mesma, não forem significativas, ou seja, se a concentração do agrotóxico não variar em função do tempo, o material deve ser considerado estável (ISO GUIDE 35, 2006).

Os valores das concentrações dos analitos, obtidos ao longo do tempo, foram gerados pela cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a detector por captura de elétrons (CGAR-DCE). Na análise qualitativa, empregou-se a análise por cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG-DSM), para detecção de substâncias desconhecidas na amostra (CARDOSO et al, submetido).

Este trabalho tem o objetivo de estudar procedimentos visando a garantir a integridade da amostra durante o longo tempo de estocagem e condições de transporte. São apresentados os resultados da etapa referente à estabilidade (incluindo a incerteza) de um lote de polpa de tomate, submetido à radiação gama e à pasteurização, candidato a MRC, a ser utilizado na análise de resíduos de agrotóxicos. Os resultados encontrados neste estudo deverão indicar se a estabilidade da amostra é suficiente para que ela possa ser considerada um material de referência certificado.

2 Material e métodos

2.1 Preparo das amostras

O tomate utilizado foi processado em um liquidificador após ser lavado, descascado e ter suas sementes retiradas. Em seguida, a polpa foi passada por peneira, de abertura de malha de 0,84 mm. Diante da preocupação de extinguir qualquer atividade, buscou-se na escolha dos dois tratamentos distintos, a pasteurização e a irradiação gama, manter íntegra a polpa preparada.

Parte do lote preparado foi separada para o estudo do efeito da esterilização por processo de pasteurização (Estudo piloto I) e outra parte foi destinada ao tratamento por irradiação da polpa de tomate (Estudo piloto II).

As soluções padrão individuais, preparadas em acetona, foram adicionadas à polpa, homogeneizadas e envasada em ampolas de vidro âmbar, capacidade de 30 mL. Contudo, antes de serem submetidas aos tratamentos específicos, objetivando manter a integridade da amostra, tiveram sua homogeneidade confirmada, conforme apresentado na parte 1 deste trabalho (CARDOSO et al, submetido).

Concentrações das soluções de fortificação e pureza

As concentrações das soluções padrão no Estudo piloto I correspondem a γ -HCH (40,24 $\mu\text{g/mL}$; 99,5%), fenitrotiona (49,96 $\mu\text{g/mL}$; 97,7%) e procimidona (49,66 $\mu\text{g/mL}$; 98%) provenientes do Dr. Ehrenstorfer (Alemanha) e clorpirifós (47,92 $\mu\text{g/mL}$, 99,2%) da Riedel-de-Haën (Alemanha).

Para realização do Estudo piloto II, as concentrações da fenitrotiona e clorpirifós foram 44,36 $\mu\text{g/mL}$ (97,7%) e 40,84 $\mu\text{g/mL}$ (99,2%), respectivamente, e as demais não foram alteradas. Todos os padrões utilizados nos dois estudos apresentam certificados de análise.

As concentrações de fortificação empregadas em ambos os estudos correspondem à faixa teórica aproximada de 0,1 a 0,2 mg/kg na polpa de tomate.

Estudo Piloto I – tratamento por pasteurização

Preliminarmente, foram avaliados os efeitos da temperatura e tempo empregados no processo de pasteurização (90°C/4min).

As ampolas de vidro lacradas, contendo a polpa de tomate fortificada e o branco da polpa, foram submetidas ao tratamento térmico em banho a aproximadamente 90 °C por cerca de 4 minutos, seguido de banho de gelo para resfriamento rápido. Foram então imediatamente

armazenadas em geladeira, freezer, estufa ou à temperatura ambiente, sob faixas de temperaturas discriminadas no planejamento experimental, para o estudo da estabilidade de estocagem. As amostras brancas foram mantidas apenas em freezer.

Estudo piloto II – tratamento por irradiação

Da mesma forma, foram feitas avaliações preliminares dos efeitos da radiação gama, aplicando-se diferentes doses (0,3; 0,5; 0,6; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 e 10,0 kGy) à polpa de tomate contendo resíduos dos quatro agrotóxicos (CARDOSO et al, no prelo).

Além disso, ampolas com a polpa fortificada, ampolas com a polpa branca e ampolas contendo soluções padrão na faixa de concentração correspondente à da amostra foram submetidas à radiação gama na dose de 2 kGy após serem seladas. Objetivando comparar os resultados, foram avaliadas paralelamente ampolas não irradiadas mantidas à temperatura ambiente. As condições de tempo e temperatura de estocagem foram iguais àquelas do Estudo piloto I, entretanto, os dois estudos não se iniciaram no mesmo dia.

Preparo do material INCQS-MRC01

Tal material foi preparado conforme apresentado em trabalho anterior (CARDOSO et al, submetido). O tratamento selecionado para manter a integridade da amostra foi a irradiação na dose de 2 kGy. Em seguida, as amostras foram mantidas em freezer até o momento de serem enviadas aos laboratórios ou submetidas a avaliações de acompanhamento durante o período de armazenamento.

2.2 Estabilidade da estocagem

A estabilidade do material foi avaliada nas seguintes condições de tempo e temperatura de armazenamento: em freezer (- 10 a -25 °C), geladeira (4 a 6 °C), estufa (38 a 52 °C) e temperatura ambiente (20 a 27 °C), sendo que o período foi de um ano para as amostras submetidas ao processo de pasteurização e de 10 meses para as amostras irradiadas. A periodicidade das análises de monitoração foi semanal no primeiro mês e quinzenal no período posterior. Os resultados das concentrações determinadas pelo teste de homogeneidade referem-se ao dia zero. Cada amostragem (em duplicatas) nas condições estabelecidas é acompanhada de duas amostras branco, duas amostras fortificadas no dia da análise e duas armazenadas sob as

condições-teste, ou seja, em freezer, geladeira, estufa e temperatura ambiente, totalizando 12 ensaios para cada período de estocagem.

As ampolas lacradas, contendo material submetido aos respectivos tratamentos, foram selecionadas aleatoriamente nos dias de realização do ensaio. Os agrotóxicos foram extraídos da amostra usando o método de multiresíduos, sendo que duas alíquotas do extrato, denominadas de A e B, foram analisadas por CG-DCE para quantificação dos mesmos. Os resultados apresentados correspondem à concentração média encontrada.

2.3 Método multiresíduos e Instrumentação analítica

Para quantificação dos quatro agrotóxicos na polpa de tomate, empregou-se o procedimento descrito na parte 1 deste trabalho (CARDOSO et al, submetido).

2.4 Fonte de Irradiação

As amostras foram submetidas à radiação gama em um irradiador de pesquisa do tipo cavidade blindada; com porta blindada e fonte, móveis; dimensões aproximadas de 3m x 2m x 1,7 m (pesando 19 toneladas); fonte de ^{137}Cs com atividade de 46 kCi e taxa de dose máxima de 1,8 kGy/h, localizado no Centro Tecnológico do Exército – CTEEx/Rio de Janeiro – RJ (VITAL; PIRES, 2000; CARDOSO et al, no prelo).

3 Resultados e discussão

As avaliações preliminares, objetivando determinar os efeitos dos referidos tratamentos à amostra, forneceram informações sobre a viabilidade do emprego de ambos os processos. Os resultados indicam a possibilidade de uso da dose de 2 kGy para a finalidade pretendida (HERNANDES; VITAL; SABAA-SRUR, 2003).

Para as amostras submetidas à pasteurização a 90° por 4 minutos as taxas de recuperação encontradas para os resíduos de γ -HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona foram de 86 %, 70%, 92 % e 100%, respectivamente. A indicação desta condição baseou-se em trabalho apresentado por Armishaw (ARMISHAW; MILLAR, 2001).

O lote inicialmente preparado nos estudos pilotos I e II permitiram avaliar previamente a integridade da amostra, após confirmação da homogeneidade, em relação ao tempo de estocagem sob diferentes temperaturas, após serem submetidas aos tratamentos de pasteurização e irradiação.

Estudo Piloto I

Na Figura 1, estão dispostos os gráficos das médias dos resultados de concentração, gerados para avaliação da estabilidade do material após o tratamento de pasteurização. Na Tabela 1, são apresentados os valores encontrados, que permitem avaliar a tendência das concentrações durante o período de estocagem. Os resultados foram obtidos usando-se análise de regressão linear e também incluem os valores dos intervalos superior e inferior de confiança, a inclinação da curva ajustada e também, os períodos garantidos de estabilidade.

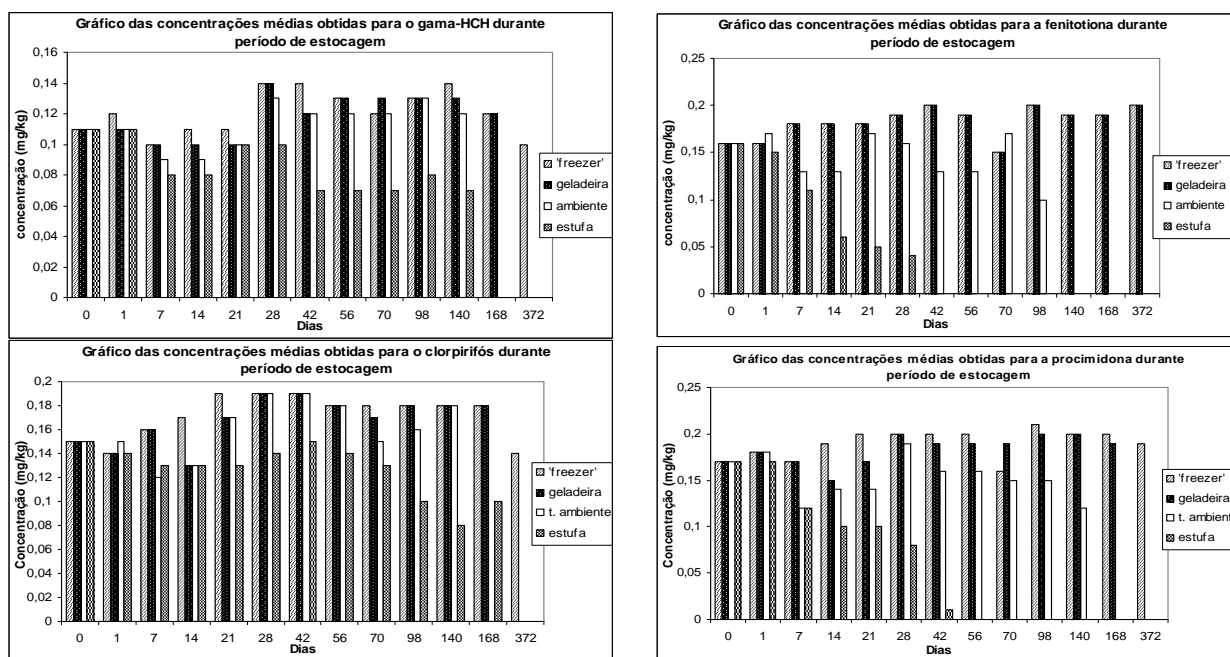


Figura 1: Gráficos dos resultados médios das concentrações dos agrotóxicos nas amostras submetidas ao processo de pasteurização (90°C/4 min) após períodos pré-definidos de estocagem. As faixas de temperaturas citadas na Figura 1 correspondem a: freezer (-10 a -25 °C), geladeira (4 a 6 °C), estufa (38 a 52 °C) e temperatura ambiente (20 a 27 °C).

Tabela 1: Dados relativos ao processo de pasteurização, obtidos por análise de regressão (ANOVA), necessários para a avaliação da estabilidade das amostras ao longo do tempo de estocagem.

agrotóxico	Estocagem	Inclinação da reta	Intervalo de confiança da inclinação	Erro padrão da inclinação	Período de estabilidade (dias)	Valor-P (95%)
γ -HCH	freezer	-0,000023	$\pm 0,000091$	0,00040	372	0,5862
	geladeira	0,000130	$\pm 0,000152$	0,00068	168	0,0864
	ambiente	0,000185	$\pm 0,000196$	0,00087	140	0,0611
	estufa	- 0,000275	$\pm 0,001645$	0,00059	28	0,6669
Fenitrotiona	freezer	0,000076	$\pm 0,000093$	0,000042	372	0,0990
	geladeira	0,000142	$\pm 0,000219$	0,000097	140	0,1784
	ambiente	- 0,000221	$\pm 0,000359$	0,000159	140	0,1983
	estufa*	- 0,004466	$\pm 0,005118$	0,000403	entre 1 a 7	0,0367
Clorpirifós	freezer	- 0,000044	$\pm 0,000113$	0,000052	372	0,4049
	geladeira	0,000189	$\pm 0,000207$	0,000093	168	0,0697
	ambiente	0,000222	$\pm 0,000360$	0,000159	140	0,1975
	estufa	- 0,000034	$\pm 0,000299$	0,000126	70	0,7938
Procimidona	freezer	0,000032	$\pm 0,000090$	0,000041	372	0,4540
	geladeira	0,000106	$\pm 0,000205$	0,000092	168	0,2769
	ambiente	- 0,000198	$\pm 0,000348$	0,000154	140	0,2299
	estufa	-0,007558	$\pm 0,012795$	0,001007	7	0,0843

* Os valores gerados a partir da regressão linear com os dados obtidos para avaliação da estabilidade da fenitrotiona em polpa de tomate, armazenada em estufa, demonstraram que a mesma, a partir do sétimo dia, já indicava instabilidade. Desse modo, os valores apresentados para este item foram obtidos considerando a estabilidade até o dia 7.

Estudo Piloto II

Na Figura 2, estão apresentados as médias da estabilidade do material, determinadas após tratamento com radiação gama. Na Tabela 2, os valores encontrados comprovam a tendência das concentrações durante o período de estocagem, obtidas pela análise de regressão linear com respectivos valores de intervalos de confiança superior e inferior da inclinação da linha de regressão e também, os períodos garantidos de estabilidade.

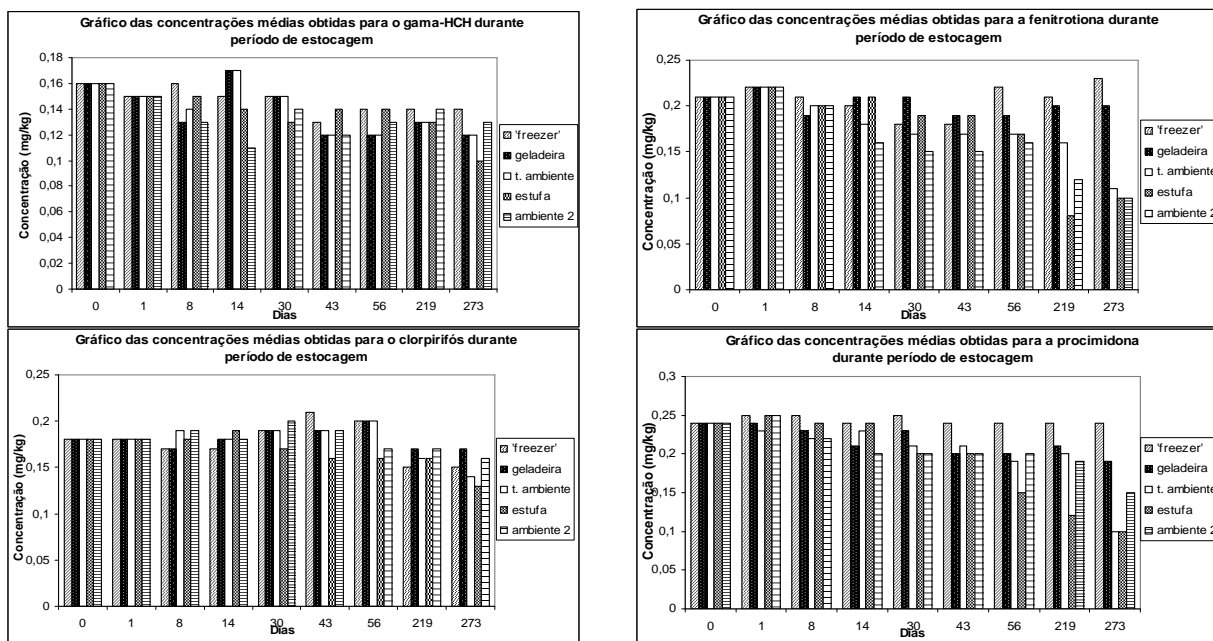


Figura 2: Gráficos dos resultados médios das concentrações dos agrotóxicos nas amostras submetidas ao processo de irradiação após períodos pré-definidos de estocagem.

*ambiente 2 = amostra não irradiada armazenada à temperatura ambiente.

As faixas de temperaturas citadas na Figura 2 correspondem a: freezer (-10 a -25 °C), geladeira (4 a 6 °C), estufa (38 a 52 °C) e temperatura ambiente (20 a 27 °C).

Tabela 2: Dados obtidos, pelo procedimento de radiação gama, através da análise de regressão (ANOVA) indicando valores utilizados para avaliação da tendência do tempo de estocagem e cálculo da incerteza da estabilidade.

agrotóxico	Estocagem	Inclinação da reta	Intervalo de confiança da inclinação	Erro padrão da inclinação	Período de estabilidade (dias)	Valor-P (95%)
γ -HCH	freezer	- 0,000050	\pm 0,000076	0,0000321	273	0,1666
	geladeira	-0,000100	\pm 0,000141	0,000060	273	0,1376
	ambiente	-0,000107	\pm 0,000133	0,000056	273	0,0977
	estufa	0,000090	\pm 0,000110	0,000045	273	0,0958
	*ambiente 2	- 0,000013	\pm 0,000056	0,000056	273	0,8247
Fenitrotiona	freezer	0,000071	\pm 0,000138	0,000059	273	0,2662
	geladeira	-0,000247	\pm 0,000093	0,000040	273	0,5519
	ambiente	-0,000199	\pm 0,000229	0,000094	219	0,0786
	estufa	-0,000764	\pm 0,000978	0,000310	30	0,0888
	*ambiente 2	-0,003748	\pm 0,004380	0,001020	14	0,0665
Clorpirifós	freezer	-0,000131	\pm 0,000137	0,000058	273	0,0574
	geladeira	-0,000047	\pm 0,000083	0,000035	273	0,2228
	ambiente	-0,000104	\pm 0,000126	0,000052	219	0,0893
	estufa	-0,000101	\pm 0,000124	0,000051	219	0,0932
	*ambiente 2	-0,000070	\pm 0,000124	0,000051	219	0,2198
Procimidona	freezer	-0,000021	\pm 0,000040	0,000017	273	0,2452
	geladeira	-0,000117	\pm 0,000127	0,000054	273	0,0644
	ambiente	-0,000142	\pm 0,000183	0,000075	219	0,1062
	estufa	-0,000369	\pm 0,002033	0,000472	14	0,5166
	*ambiente 2	-0,000179	\pm 0,000242	0,000099	219	0,1196

*ambiente 2 = amostra não irradiada armazenada à temperatura ambiente.

Considera-se estável o agrotóxico que apresenta o valor-P maior que 0,05 (95%), indicando que a inclinação da regressão linear é insignificante (LINSINGER et al, 2001; ISO GUIDE 35, 2006). A partir da tabela gerada com os dados da regressão e ANOVA, calcula-se a incerteza inerente a estabilidade multiplicando o valor do erro padrão da inclinação pelo tempo de estudo, de acordo com a Equação 1.

$$u_{\text{est}} = \text{erro padrão} \times \text{tempo de estudo} \quad (1)$$

Os resultados obtidos pelo tratamento estatístico dos dados gerados pelos Estudos piloto I e II, conforme apresentado nas Tabelas 1 e 2, mostraram que os valores de P calculados (valor-P) foram maiores que 0,05 (em nível de confiança de 95%), podendo-se concluir que não houve diferenças significativas entre os valores. Por conseguinte, os agrotóxicos estudados foram considerados estáveis nas condições de uso para o período de estabilidade apresentado nas Tabelas 1 e 2. Levando-se ainda em consideração que as inclinações da reta na análise de regressão foram aproximadamente zero para todas as substâncias nas condições avaliadas, as amostras foram consideradas estáveis em relação aos agrotóxicos nela presente.

As amostras branco e as amostras fortificadas nos dias de cada experimento estavam de acordo com o perfil cromatográfico obtido na avaliação inicial da polpa de tomate e as taxas de recuperação situaram-se na faixa aceitável de 70 a 110% para os agrotóxicos nas concentrações estudadas (DG-SANCO, 2006), não apresentando indícios de falha no processo experimental.

Embora as amostras submetidas ao tratamento térmico de pasteurização tenham sido monitoradas durante um período mais longo, foi possível observar que as degradações das substâncias ocorreram em intervalos de tempo menores, quando comparadas àquelas amostras submetidas à irradiação gama, demonstrando ser este último tratamento mais indicado ao objetivo proposto. O γ -HCH, por exemplo, se manteve estável por 273 dias sob as diferentes condições de estocagem após irradiação. Este fato é esperado já que uma substância da classe dos organoclorados possui longa estabilidade e que provavelmente não se degradaria sob tais condições.

Diante da preocupação de simular condições extremas durante o transporte do material as medições isocrônicas indicaram que a fenitrotona e a procimidona submetidas a temperaturas entre 38 a 52 °C, durante o Estudo piloto I, mantiveram-se íntegras apenas durante período de até 7 dias. Esta situação pode ser evitada, definindo condições ideais para o transporte do material. Nas amostras irradiadas no Estudo piloto II, apenas a procimidona apresentou sinais de degradação nas mesmas condições. Indícios de degeneração também foram achados após 14 dias na fenitrotona das amostras não irradiadas, mantidas em temperatura ambiente (20 a 27 °C).

A contribuição da incerteza referente ao curto tempo de estocagem (condições extremas) não será considerada (LINSINGER et al, 2001), pois a amostra se manteve estável por períodos semelhantes, nas demais condições indicadas, de acordo com as Figuras 1 e 2.

Para obter-se a incerteza associada à estabilidade, buscou-se o critério clássico, do longo tempo de estocagem, ou seja, o valor do erro padrão obtido no experimento, conduzido em freezer (-10 a - 25°C), foi multiplicado pelo tempo de estocagem, conforme a Equação 1.

Na Tabela 3, são apresentados os valores das incertezas referentes à estabilidade ao longo tempo de estocagem da amostra candidata a material de referência. Os cálculos foram feitos usando-se a Equação 1 para os quatro agrotóxicos utilizados com dados das Tabelas 1 e 2.

Tabela 3: Incerteza padrão calculada para os agrotóxicos: γ -HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona pelos tratamentos de pasteurização e radiação gama.

Incerteza Padrão (u_{est}) (mg/kg)		
Tratamento		
Agrotóxico	Pasteurização (372 dias)	Radiação gama (273 dias)
γ -HCH	0,0150	0,0088
Fenitrotiona	0,0157	0,0160
Clorpirifós	0,0191	0,0158
Procimidona	0,0153	0,0046

Diante dos resultados obtidos, preparou-se o material INCQS-MRC01 com base nos dados gerados nos testes prévios de estabilidade das amostras tratadas por irradiação gama na dose de 2 kGy.

Embora o estudo de estabilidade tenha ocorrido durante 372 e 273 dias, para os tratamentos de pasteurização e irradiação gama, respectivamente, uma extrapolação permite o cálculo para o futuro, tendo em vista que a estabilidade observada durante esses períodos não asseguraria a priori a estabilidade nos períodos vindouros. Por conseguinte, a rigor, o INCQS-MRC01, deverá ter sua estabilidade monitorada também ao longo do período de estocagem (LINSINGER et al, 2001).

4 Conclusões

Conclui-se que os quatro agrotóxicos analisados (γ -HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona, adicionadas à polpa de tomate na faixa de concentração de 0,1 a 0,2 mg/kg), tratados por pasteurização ou irradiação, mantiveram-se relativamente estáveis durante os

períodos de monitoração nas condições de armazenamento em freezer, 372 e 273 dias, respectivamente. No entanto, as variações indicativas de instabilidade foram menores no tratamento por irradiação com dose de 2 kGy, sugerindo a seleção desse processo na produção de material de referência.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. R. Microbiología de la Conservación de los Alimentos. In: **Microbiología de la Conservación de los Alimentos. Microbiología de los Alimentos.** Zaragoza: Acribia, 1995, p. 88-98.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/21_01rdc.htm>. Acesso em: 23 out. 2006.
- ARMISHAW, P.; MILLAR, R. A natural matrix (pureed tomato) candidate reference material containing residue concentrations of pesticide chemicals. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 370, p. 291-296, 2001.
- CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A.; VITAL, H. C.; ABRANTES, S. Preparação de um material de referência para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 1; estudo da homogeneidade. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, submetido.
- CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A.; VITAL, H. C.; ABRANTES, A. Aplicação da radiação gama na preservação de material de referência a ser usado na análise de resíduos de agrotóxicos. **Analytica**, no prelo.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention. Frequently Asked Questions about Irradiation. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 23 out. 2006.
- CENA – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Divulgação da Tecnologia da Irradiação de Alimentos e outros materiais. Disponível em: <<http://www.cena.usp.br/irradiação>>. Acesso em: 27 out. 2006.
- DG-SANCO, EUROPEAN COMMISSION, **Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis. Document No. SANCO/10232/2006**, Brussels, 24 March 2006.
- GAVA, A. J.; Métodos de Conservação de Alimentos. In: GAVA, A. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos.** São Paulo: Nobel, 1999. cap. 7.
- HERNANDES, N. K; VITAL, H. C; SAABA-SRUR, A. U. O. Irradiação de alimentos: Vantagens e Limitações. **Bol. SBCTA**, v. 37, n. 2, p. 154-159, 2003.

- ISO GUIDE 35 - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION -. **Reference materials – General and statistical principles for certification.** Switzerland, 2006.
- LAMBERTY, A, SCHIMMEL, H.; PAUWELS, J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 360, p. 359-361, 1998.
- LINSINGER, T. P. J.; PAUWELS, J.; LAMBERTY, A; SCHIMMEL, H. G.; VAN DER VEEN, A. M. H; SIEKMANN, L. Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs. **Fresenius J. Anal. Chem.** v 370, p. 183-188, 2001.
- LINSINGER, T. P. J.; PAUWELS, J.; VAN DER VEEN, A. M. H; SCHIMMEL, H.; LAMBERTY, A. Homogeneity and stability of reference materials. **Accred. Qual. Assur.** v. 6, p. 20-25, 2001.
- LINSINGER, T. P. J.; VAN DER VEEN, A. M. H.; GAWLIK, B. M.; PAUWELS, J.; LAMBERTY, A. Planning and combining of isochronous stability studies of CRMs. **Accred. Qual. Assur.**, v. 9, p. 464-472, 2004.
- SILVA, A C. O.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; MORAES, C. F. A. M. P; SOUZA, M. R., FERNANDEZ, A. T. et al. Radiação em Alimentos. Uma Revisão. **Higiene Alimentar**, v. 20, p. 17-23, 2006.
- SANT’ANA, A. S.; ARAÚJO, I. O. Irradiação e a segurança e qualidade microbiológica dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 21, p. 37-51, 2007.
- VAN DER VEEN, A. M. H; LINSINGER, T. P. J.; LAMBERTY, A; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials 3. Stability study. **Accred. Qual. Assur.**, v. 6, p. 257-263, 2001.
- VITAL, H. C.; PIRES, L. F. G.; LIMA, R. Q.; VELLOSO, S. O., Experimentos Dosimétricos no Irradiador Gama do IPE. In: ENCONTRO NACIONAL DE APLICAÇÕES NUCLEARES (ENAN). V. 2000, Rio de Janeiro. **Anais**Rio de Janeiro: 2000.

Agradecimentos

À Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, pelos auxílios financeiros concedidos ao projeto “Estruturação de uma rede de laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos para apoio à exportação de alimentos (REAGROEX)”.

3.6 – **MANUSCRITO 6** – Relatório de certificação de material de referência: Resíduos de agrotóxicos em purê de tomate.

Relatório restrito ao INCQS, elaborado por Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso; Armi Nóbrega e Shirley Abrantes.



INCQS-MRC01

RELATÓRIO DE CERTIFICAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PURÊ DE TOMATE

Contendo concentrações certificadas de resíduos de agrotóxicos

Março, 2008

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE

AGRADECIMENTOS

Este material de referência foi preparado e certificado no Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ.

Agradecimentos especiais:

- À Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP pelos auxílios financeiros concedidos ao projeto “*Estruturação de uma rede de laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos para apoio à exportação de alimentos (REAGROEX)*”.
- Ao Centro Tecnológico do Exército, na pessoa do Dr. Hélio Vital pela gentileza e apoio na utilização do irradiador de alimentos, etapa fundamental deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. John Gilbert, do *Central Science Laboratory do Department for Environment Food and Rural Affairs (CSL/DEFRA, York, Reino Unido)* pela hospitalidade e disponibilidade de tempo para o treinamento recebido.
- Ao Dr. Paul Armishaw, do *National Measurement Institute (NMI, Austrália)*, pelas informações e orientações prontamente respondidas.
- A Dra. Amanda Earshaw, representante do *Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS/CSL/DEFRA, York, Reino Unido)* pelo apoio e parceria nas análises finais realizadas.
- A equipe do laboratório de resíduos de agrotóxicos do INCQS pelo apoio durante todo o trabalho.

Responsável Técnica:

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso

Supervisão:

Dr. Armi W. Nóbrega

Dra. Shirley M. P. Abrantes

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo	132
1. Introdução	133
1.1 Especificação do Material - polpa de tomate fortificada	133
2. Preparação do material: polpa de tomate	134
2.1. Preparação do teste piloto	134
2.2. Preparação do material INCQS-MRC01	134
3. Teste de Homogeneidade	137
3.1. Tratamento estatístico dos dados	137
3.2. Método multiresíduos de extração	137
3.3. Resultados do teste de homogeneidade com suas respectivas incertezas	137
3.4. Avaliação das amostras de ampolas branco	138
4. Teste de Estabilidade	139
4.1 – Amostras controle	140
5. Estudo interlaboratorial para certificação	141
5.1. Tratamento estatístico dos dados do estudo interlaboratorial	141
6. Atribuição dos valores de propriedade – Certificação do Material INCQS-MRC01	143
7. Referências	144
8. ANEXOS	
ANEXO 1 – Resultados do teste de homogeneidade e tratamento estatístico	145
ANEXO 2 – Resultados do teste de estabilidade	150
ANEXO 3 – Resultados do estudo de certificação interlaboratorial	152
ANEXO 4 – Atribuição dos valores de propriedade e estimativa da incerteza	158

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

RESUMO

Este relatório descreve as etapas de preparação e certificação de um lote de material - matriz purê de tomate, candidata a material de referência, nomeada INCQS-MRC01.

O conjunto de amostra enviada aos laboratórios consistiu de:

- seis ampolas de vidro âmbar seladas contendo, cada uma, aproximadamente 15 a 20g de polpa de tomate fortificada com resíduos de quatro agrotóxicos de classes variada.
- Duas ampolas de vidro âmbar seladas contendo, cada uma, aproximadamente 15 a 20g polpa de tomate Branco.

Duzentos e vinte ampolas contendo o material INCQS-MRC01 foram preparadas.

Os agrotóxicos e suas concentrações são listados abaixo, na Tabela 1.

Tabela 1: Concentrações de certificação do material INCQS-MRC01.

Agrotóxico	Concentração certificada (mg/kg)	Incerteza expandida ¹ (mg/kg)
γ-HCH	0,192	0,049
Fenitrotiona	0,194	0,070
Clorpirifós	0,233	0,082
Procimidona	0,186	0,049

1. O cálculo da estimativa da incerteza expandida utilizou o fator de abrangência, $k = 2$.

O conjunto de material de referência é indicado ao uso para os seguintes propósitos:

- Validação e verificação de métodos para determinação de γ-HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona em hortifrutigranjeiros da classe dos vegetais frutíferos
- Preparação de material de referência secundário de composição similar.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de materiais de referência é um dos requisitos necessários para garantir a confiabilidade de resultados analíticos. Esses materiais são classificados como materiais de referência (MR) e materiais de referência certificado (MRC).

Os MR e MRC vêm sendo cada vez mais utilizados nos laboratórios para o controle de análises; calibração de equipamentos; identificação e caracterização quantitativa de materiais e desenvolvimento de metodologias, atividades que demandam medidas confiáveis, comparáveis e rastreáveis.

Em vista a dar suporte a essas atividades o INCQS conduziu uma série de estudos para a produção de uma matriz referência certificada – polpa de tomate, contendo quatro agrotóxicos de diferentes classes.

O lote de material preparado consiste de ampolas de vidro âmbar seladas:

- Ampolas contendo polpa de tomate com quatro agrotóxicos;
- Ampolas contendo polpa de tomate sem os agrotóxicos (amostra branco).

Foram preparadas 220 ampolas com os agrotóxicos e 100 ampolas branco, neste lote para certificação.

1.1 Especificação do Material – Polpa de Tomate Fortificada

Os agrotóxicos e suas concentrações teóricas específicas para o material INCQS-MRC01, bem como os limites máximo de resíduo permitido – LMR para a cultura de tomate são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações Teóricas dos agrotóxicos γ -HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona na polpa de tomate e respectivos LMRs.

Agrotóxico	Concentração teórica na polpa de tomate (mg/kg)	Limite Máximo de Resíduo permitido para cultura de tomate, no Brasil (mg/kg) (ANVISA, 2008)
γ -HCH	0,20	Não indicado
fenitrotiona	0,18	Não indicado
clorpirifós	0,20	0,5
procimidona	0,18	2,0

2. PREPARAÇÃO DO MATERIAL: POLPA DE TOMATE

2.1 – Preparação do teste piloto

O estudo piloto realizado previamente não foi o mesmo utilizado para a certificação, porém forneceu dados fundamentais e imprescindíveis à elaboração do material INCQS-MRC01. Foi possível investigar o processo de produção e identificar problemas inerentes a ele, no que se refere ao tamanho do particulado adequado da amostra, a solubilidade do solvente indicado para preparo da solução de fortificação e ao uso de soluções individuais dos agrotóxicos que garantiram a homogeneidade do lote produzido, bem como avaliar previamente sua estabilidade durante condições de tempo e de temperatura pré-determinados. Detalhes sobre este estudo são apresentados por Cardoso et al. (submetidos).

2.2 – Preparação do material INCQS-MRC01

A produção do material, indicado a certificação, foi realizada em novembro de 2007 no laboratório de resíduos de agrotóxicos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ. O lote preparado foi envasado em ampolas de vidro âmbar.

Aproximadamente 15 kg de tomates provenientes de agricultura orgânica foram utilizados para o preparo do material. Os tomates foram lavados, descascados e suas sementes retiradas antes de processados em liquidificador. Em seguida foram passados através de uma peneira, de abertura de malha de 0,84 mm. Este volume de polpa de tomate foi homogeneizado com o auxílio de um agitador mecânico e após 30 minutos retirou-se quantidade suficiente para servir como branco da amostra e determinação do valor do pH. O pH foi medido na polpa processada antes e após a adição dos agrotóxicos, correspondendo aos valores de 4,01 e 4,02. Em seguida foram mantidos em congelador sob temperaturas entre -10 a -25 °C até o momento de fortificação. O volume de polpa preparada para fortificação foi de 6193,96 g e 1677,77g para servir como branco da amostra.

As substâncias utilizadas com as referidas purezas são apresentadas na Tabela 2 e na Tabela 2.1 as soluções individuais de fortificação preparadas em acetona.

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Tabela 2 – Referência das substâncias utilizadas

Agrotóxico	Produtor	Referência do Produtor	Pureza (%)
γ -HCH	Dr. Ehrentorfer, Alemanha	30415	99,5
fenitrotiona	Dr. Ehrentorfer, Alemanha	31029	97,7
clorpirifós	Riedel-de Haen, Alemanha	3027X	99,2
procimidona	Dr. Ehrentorfer, Alemanha	31210	98,0

Tabela 2.1 – Preparo das soluções de fortificação.

Agrotóxico	Volume (mL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
γ -HCH	25	56,52
fenitrotiona	25	44,26
clorpirifós	25	51,58
procimidona	25	42,73

Cerca de 500g da polpa preparada foi transferida para liquidificador, de copo de vidro, e 25 mL de cada solução individual de agrotóxico foi adicionada lentamente e em seguida mantida por 1 hora homogeneizando.

Logo após essa etapa de homogeneização, esse volume de polpa contaminada foi adicionado à massa restante, para homogeneização em batedeira industrial (capacidade para 20 litros) por mais três horas, a fim de proporcionar uma melhor interação da polpa de tomate com os padrões de agrotóxicos. Em seguida, o material foi envasado em ampolas de vidro inequivocamente identificadas, as quais foram armazenadas em congelador após serem seladas, até o tratamento por irradiação gama visando à conservação da amostra. A capacidade de cada ampola é de 30 mL, o que corresponde à massa de 14 a 20g/ampola. Durante a transferência do volume necessário para as 220 ampolas de vidro, a agitação da batelada de amostra não foi

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

interrompida e a velocidade da hélice da bateadeira foi ajustada de modo a proporcionar agitação sem provocar respingos do líquido.

Para a amostra branco, o quantitativo da polpa permaneceu em homogeneização por uma hora em bateadeira industrial (capacidade de 6 litros) antes do envase em 100 ampolas de vidro.

As ampolas fortificadas e brancas foram irradiadas com dose de 2 kGy, no irradiador de pesquisa com fonte de césio-137 (com atividade atual de 46 kCi) localizado no Centro Tecnológico do Exército. A taxa de dose foi 1,7 kGy/h.

3. TESTE DE HOMOGENEIDADE

O teste de homogeneidade foi executado no laboratório de resíduos de agrotóxicos do INCQS, antes e após o tratamento com radiação, entretanto os valores considerados para esta etapa foram os obtidos após radiação.

3.1 – Tratamento estatístico dos dados

Para avaliação da homogeneidade do lote preparado, 10 ampolas, foram aleatoriamente selecionadas, usando-se uma função do Excel®, antes do início do envasamento, de modo a facilitar a identificação dos frascos destinados ao teste. Os agrotóxicos foram extraídos da amostra de acordo com o método multiresíduos proposto e foram analisadas por cromatografia à gás de alta resolução equipada com detector por captura de elétrons - CGAR-DCE. Cada ampola lacrada originou duas alíquotas resultantes do mesmo extrato da amostra, denominadas de A e B. O teste de homogeneidade foi realizado segundo recomendação da ISO Guide 35 (2006). Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente, utilizando a análise de variâncias (ANOVA) com fator único (ISO GUIDE 35, 2006), a qual informou se a variação na composição das amostras distribuídas nos recipientes foi suficientemente pequena para o objetivo proposto.

3.2 – Método multiresíduos de extração

Resumidamente, 15 g da amostra são extraídas com 30 mL de acetona e, em seguida, com 60 mL de uma mistura diclorometano:éter de petróleo (1:1, v:v). O recipiente é levado à centrifugação e a fase orgânica filtrada sob sulfato de sódio. Desse volume coletado, 1 mL é evaporado e dissolvido em 1 mL de isooctano para análise por CGAR/DCE (CARDOSO et al, submetido).

3.3 – Resultados do teste de homogeneidade com suas respectivas incertezas

Usando-se o modelo ANOVA fator único, como ferramenta estatística para avaliação dessa característica nas ampolas, o teste F indica se os resultados da homogeneidade são significantes. Quando $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico, } (\alpha=5\%)}$ não há motivo para a não aceitação da homogeneidade entre as ampolas contendo a amostra.

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Para os quatro agrotóxicos citados neste trabalho, o teste F confirmou não haver diferenças significativas, com $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, estando a amostra homogênea em relação as substâncias nela presente.

A incerteza da homogeneidade é função dos valores da média quadrática (MQ) entre as ampolas (MQ_{entre}) e dentro das ampolas (MQ_{dentro}), a qual também é fornecida pelo teste de análise de variância. Quando o valor de MQ_{entre} as ampolas for maior que MQ_{dentro} das ampolas, a incerteza padrão devido à não homogeneidade ($u_{\text{homogeneidade}}$) é equivalente ao desvio padrão (S_{bb}) entre as ampolas.

No anexo 1 são apresentados os resultados de homogeneidade e incerteza para cada agrotóxico. Na Tabela 3 são apresentados de forma resumida esses resultados.

Tabela 3 - Resultados do teste de homogeneidade e suas incertezas

Agrotóxico	Resultado médio (mg/kg)	F_{cal} ($F_{\text{crit}} = 3,02$)	$S_{bb} = u_{\text{hom}}$ (mg/kg)	$U_{\text{hom}} (k = 2)^1$ (mg/kg)
γ -HCH	0,1730	1,79	0,0069	0,0138
fenitrotiona	0,2001	1,41	0,0079	0,0158
clorpirifós	0,2094	1,89	0,0093	0,0186
procimidona	0,1999	1,42	0,0055	0,0110

1. O cálculo da estimativa da incerteza expandida utilizou o fator de abrangência, $k = 2$.

3.4 – Avaliação das amostras de ampolas branco

As amostras envasadas nas ampolas contendo a polpa de tomate sem agrotóxicos foram analisadas cromatograficamente após o tratamento com radiação. Não foram detectadas a presença de respectivos resíduos de agrotóxicos na faixa dos limites de detecção do método de 0,005 a 0,01 mg/kg.

4. TESTE DE ESTABILIDADE

Foram realizadas avaliações preliminares de modo a obter uma visão geral sobre o comportamento dos agrotóxicos durante período de armazenamento, após tratamento de radiação.

A condição clássica para armazenamento das amostras é em 'freezer' sob temperaturas na faixa de -10 a -25 °C.

A ISO Guide 35 (2006), estabelece que a avaliação da estabilidade do material seja realizada pela análise de resíduos da regressão linear e a análise de variância (ANOVA), que consiste em observar se a regressão linear dos valores de concentração dos analitos ao longo do tempo apresenta alguma tendência. Se a inclinação da reta ou a não linearidade da mesma não forem significativas, ou seja, se a concentração do agrotóxico não variar em função do tempo, o material é considerado estável. Considera-se estável o agrotóxico que apresenta o valor-P maior que 0,05 (95%), indicando que a inclinação da regressão linear é insignificante.

Na tabela 4 são apresentados os resultados do teste de estabilidade.

Tabela 4 - Resultados do teste de estabilidade das amostras, submetidas à radiação gama na dose de 2 kGy, armazenadas em 'freezer' (-10 a -25 °C), e suas respectivas incertezas.

Agrotóxico	Resultado médio	$U_{\text{hom}}(k = 2)^1$	Resultado médio	$U_{\text{hom}}(k = 2)^1$	Valor-P (95%)
	Dia zero (mg/kg)	(mg/kg)	Dia 273 (mg/kg)	(mg/kg)	
γ -HCH	0,1567	0,0128	0,1482	0,0176	0,1644
fenitrotiona	0,2086	0,0179	0,2265	0,0320	0,2662
clorpirifós	0,1800	0,0190	0,1497	0,0316	0,0574
procimidona	0,2389	0,0130	0,2326	0,0090	0,2452

1. O cálculo da estimativa da incerteza expandida utilizou o fator de abrangência, $k = 2$.

O dia zero apresentado na Tabela 4, corresponde aos resultados obtidos no teste de homogeneidade do lote preparado previamente para o estudo piloto.

Os resultados obtidos pelo tratamento estatístico dos dados gerados pelo estudo de estabilidade, conforme apresentado na Tabela 4, mostraram que os valores de P calculados (valor-P) foram maior que 0,05 (em nível de confiança de 95%), podendo-se

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

concluir que não houve diferenças significativas entre os valores e desse modo, os agrotóxicos estudados são considerados estáveis nas condições de uso para o período de estabilidade avaliado. Entretanto, a estabilidade dos mesmos continuará a ser monitorada pelo produtor do material de referência, bem como, para o lote do material INCQS-MRC01.

No anexo 2, são apresentados os resultados do teste de estabilidade em gráficos do desempenho de tendência para essas amostras armazenadas de acordo com o modelo clássico.

4.1 – Amostras controle

Nos dias de realização do ensaio designado a estabilidade, realizou-se paralelamente ao mesmo, análises em amostras branco e fortificadas, na mesma faixa de concentração do lote preparado, em vista de avaliar alguma falha ou deficiência do processo. Os resultados demonstraram que estavam de acordo com o perfil cromatográfico obtido na avaliação inicial da polpa de tomate e as taxas de recuperação na faixa aceitável de 70 a 110% para os agrotóxicos nas concentrações estudadas, não apresentando indícios de falha no processo experimental.

5. ESTUDO INTERLABORATORIAL PARA CERTIFICAÇÃO DO MATERIAL

Sete laboratórios foram convidados a participar da etapa de certificação do material INCQS-MRC01. Os laboratórios foram escolhidos por apresentarem a certificação da norma ISO 17025 (2005) e/ou por terem demonstrado performances satisfatórias em estudos de proficiência organizados pelo INCQS. Três laboratórios apenas enviaram seus resultados.

Foram enviados aos laboratórios dois conjuntos de amostras:

- um com seis ampolas de vidro âmbar seladas, contendo, cada uma, aproximadamente 15 a 20g de polpa de tomate fortificada com resíduos de quatro agrotóxicos de classes variada.
- Outro com duas ampolas de vidro âmbar seladas, contendo, cada uma, aproximadamente 15 a 20g polpa de tomate Branco.

Cada laboratório recebeu instruções de como proceder ao preparo das ampolas para amostragem: homogenizar a(s) ampola(s) contendo o purê de tomate antes de abri-la e realizar a análise preparando 3 porções individuais (replicatas) da amostra de purê de tomate com resíduos de quatro agrotóxicos (ampolas identificadas numericamente) e pelo menos 1 amostra Branco; utilizar o método de rotina de laboratório.

Os resultados enviados estão apresentados na íntegra no anexo 3 com o respectivo tratamento dos dados.

5.1 – Tratamento estatístico dos dados do estudo interlaboratorial.

O procedimento experimental para análise de dados segue indicação do item 10.5.2 da ISO Guide 35 (2006; VAN DER VEEN et al, 2001), a qual indica que a média das médias dos laboratórios é a melhor escolha para ser o valor de propriedade do material. As equações utilizadas são apresentadas abaixo.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^{n_i} x_j \quad \text{Equação 5.1}$$

$$\bar{x} = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p Y_i \quad \text{Equação 5.2}$$

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Onde: x_{ij} = os resultados j^{th} reportados pelos laboratórios i .

p = o número de laboratórios participantes

n_i = o número de resultados reportados pelos laboratórios i .

$$\bar{x} = \bar{Y}$$

Desse modo, a base para a incerteza padrão combinada associada com a média das médias é o desvio padrão obtido através da equação 5.3.

$$s^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (Y_i - \bar{Y})^2 \quad \text{Equação 5.3}$$

$$\text{Onde: } (Y_i - \bar{Y})^2 = (\bar{x}_i - \bar{x})^2$$

A incerteza padrão combinada é calculada através da equação 5.4.

$$u_{\text{carac}} = \frac{s}{\sqrt{p}} \quad \text{Equação 5.4}$$

Para avaliação dos valores aberrantes utilizaram-se os testes de Cochran e de Grubbs.

O teste de Cochran é aplicado quando se deseja comparar variâncias, ou seja, verificar se a variância dos resultados obtidos por um laboratório é diferente da variância dos demais laboratórios.

O teste de Grubbs verifica se as médias obtidas pelos laboratórios são compatíveis, após a aplicação do teste de Cochran (ISO 5725).

6. ATRIBUIÇÃO DOS VALORES DE PROPRIEDADE – CERTIFICAÇÃO DO MATERIAL INCQS-MRC01

Para cálculo dos valores de propriedades de cada agrotóxico no material de referência preparado utilizou-se a média ponderada dos dois valores independentes: resultado do laboratório provedor e resultado do estudo interlaboratorial.

Cada estimativa de incerteza foi obtida por combinação, de acordo com o item 10.8.3, da ISO Guide 35 (2006), das incertezas padrão ponderadas, acrescidas das incertezas padrão associadas a homogeneidade e a estabilidade conforme demonstrado na Equação 6.1.

$$u_c^2 = u_{hom}^2 + u_{est}^2 + \sum_{i=1}^n w_i^2 u_i^2 \quad \text{Equação 6.1}$$

Onde: u_i = incerteza padrão dos valores de propriedades contribuintes

w_i = peso dos valores contribuintes (1/2)

u_{hom} = incerteza padrão associada a homogeneidade.

u_{est} = incerteza padrão associada a estabilidade.

Na Tabela 6 são apresentados os valores de propriedades que contribuíram para a certificação do material INCQS-MRC01 e incertezas associadas.

Tabela 6 – Valores atribuídos as propriedades do material INCQS-MRC01 e suas incertezas

Agrotóxico	Resultado INCQS (mg/kg)	Resultado Interlaboratorial (mg/kg)	U_{hom}^1 (mg/kg)	U_{est}^1 (mg/kg)	Valor certificado (mg/kg)
γ -HCH	0,1730 ± 0,070	0,211 ± 0,053	0,0137	0,0176	0,192 ± 0,049
fenitrotiona	0,2001 ± 0,110	0,188 ± 0,051	0,0158	0,0320	0,194 ± 0,070
clorpirifós	0,2094 ± 0,109	0,257 ± 0,099	0,0186	0,0316	0,233 ± 0,082
procimidona	0,1999 ± 0,088	0,172 ± 0,035	0,0110	0,0090	0,186 ± 0,050

1. O cálculo da estimativa da incerteza expandida utilizou o fator de abrangência, $k = 2$.

7. REFERÊNCIAS

- CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A.; ABRANTES, S. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: Uma experiência laboratorial. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, submetido.
- CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A.; ABRANTES, S. Preparação de um material de referência certificado para o controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 1. Estudo da homogeneidade. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, submetido.
- CARDOSO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A.; ABRANTES, S. Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 2. Estudo da estabilidade. **Ciênc. Tecnol. Alim**, submetido.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO/DIS 5725. **Accuracy (trueness and precision) of measurement Methods and results. Part 2.** A basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva: Switzerland, 1990.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO GUIDE 35. **Reference materials – General and statistical principles for certification.** 2006.
- NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais sobre a competência dos laboratórios de ensaio e calibração. **ISO Guia 17025.** Brasil, 2005.
- VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T P. J.; SCHIMMEL, H.; LAMBERTY, A.; PAUWELS. J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 4. Characterisation and certification. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, p. 290-294, 2001.

ANEXO 1

Resultados do Teste de homogeneidade e tratamento estatísticos dos dados.

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Tabela A1.1 - γ -HCH – Resultados do Teste de homogeneidade e tratamento estatístico.

Identidade da amostra	Agrotóxicos	
	γ -HCH (mg/kg)	
	Resultado A	Resultado B
1	0,17885	0,18255
19	0,17030	0,18340
36	0,17370	0,16940
44	0,17070	0,16350
46	0,16800	0,16435
93	0,18150	0,18300
127	0,16445	0,15515
133	0,17250	0,17160
172	0,18500	0,15975
207	0,17385	0,18805
Média	0,17298	
Desvio padrão	0,00907	

Análise de variância das amostras de polpa de tomate gerada a partir do software Microsoft Excel® para o γ -HCH.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i> <i>calculado</i>	<i>Valor-P</i>	<i>F</i> <i>crítico</i>
Entre ampolas	0,000964	9	0,000107	1,788234	0,189081	3,02038
Dentro das ampolas	0,000599	10	0,000060			
Total	0,001563	19				

A incerteza padrão associada a homogeneidade (u_{hom}) foi calculada a partir da equação:

$$u_{\text{hom}} = \sqrt{\frac{MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}}{n}} = 0,00687 \text{ mg / kg}$$

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Tabela A1.2 – Fenitrotiona – Resultados do Teste de homogeneidade e tratamento estatístico.

Identidade da amostra	Agrotóxicos	
	Fenitrotiona (mg/kg)	
	Resultado A	Resultado B
1	0,18150	0,20655
19	0,17745	0,19370
36	0,17575	0,21520
44	0,20545	0,20295
46	0,19025	0,20020
93	0,19820	0,19765
127	0,19425	0,19950
133	0,18950	0,20315
172	0,21165	0,22090
207	0,22615	0,21225
Média	0,20011	
Desvio padrão	0,01348	

Análise de variância das amostras de polpa de tomate gerada a partir do software Microsoft Excel® para a fenitrotiona.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor-P	F crítico
Entre ampolas	0,001931	9	0,0002146	1,408979	0,29951	3,02038
Dentro das ampolas	0,001523	10	0,0001523			
Total	0,003454	19				

A incerteza padrão associada a homogeneidade (u_{hom}) foi calculada a partir da equação:

$$u_{\text{hom}} = \sqrt{\frac{MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}}{n}} = 0,007892 \text{ mg / kg}$$

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Tabela A1.3 – Clorpirifós – Resultados do Teste de homogeneidade e tratamento estatístico.

Identidade da amostra	Agrotóxicos	
	Clorpirifós (mg/kg)	
	Resultado A	Resultado B
1	0,19970	0,21665
19	0,18645	0,20375
36	0,18500	0,21895
44	0,21720	0,20950
46	0,20070	0,20905
93	0,21460	0,20730
127	0,20225	0,20440
133	0,20480	0,20740
172	0,22355	0,22500
207	0,22390	0,22695
Média	0,20936	
Desvio padrão	0,01175	

Análise de variância das amostras de polpa de tomate gerada a partir do software Microsoft Excel® para o clorpirifós.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor-P	F crítico
Entre ampolas	0,001651	9	0,0001834	1,886883	0,168315	3,02038
Dentro das ampolas	0,000972	10	0,0000972			
Total	0,002623	19				

A incerteza padrão associada a homogeneidade (u_{hom}) foi calculada a partir da equação:

$$u_{\text{hom}} = \sqrt{\frac{MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}}{n}} = 0,009285 \text{ mg / kg}$$

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Tabela A1.4 – Procimidona – Resultados do Teste de homogeneidade e tratamento estatístico.

Identidade da amostra	Agrotóxicos	
	Procimidona (mg/kg)	
	Resultado A	Resultado B
1	0,18665	0,20715
19	0,18600	0,19360
36	0,18985	0,20525
44	0,20690	0,20045
46	0,19180	0,19670
93	0,19440	0,20280
127	0,19320	0,19820
133	0,19160	0,20795
172	0,21235	0,21330
207	0,20185	0,21860
Média	0,19993	
Desvio padrão	0,009245	

Análise de variância das amostras de polpa de tomate gerada a partir do software Microsoft Excel® para a procimidona.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F calculado	Valor-P	F crítico
Entre ampolas	0,000911	9	0,0001013	1,421168	0,295041	3,02038
Dentro das ampolas	0,000713	10	0,0000713			
Total	0,001624	19				

A incerteza padrão associada a homogeneidade (u_{hom}) foi calculada a partir da equação:

$$u_{\text{hom}} = \sqrt{\frac{MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}}{n}} = 0,005478 \text{ mg / kg}$$

ANEXO 2

Resultados do Teste de estabilidade

Gráficos do desempenho de tendência

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

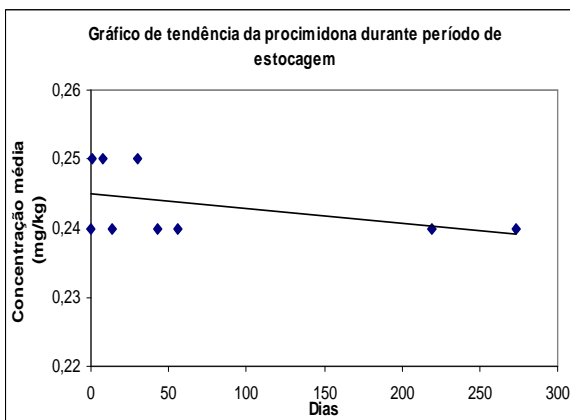
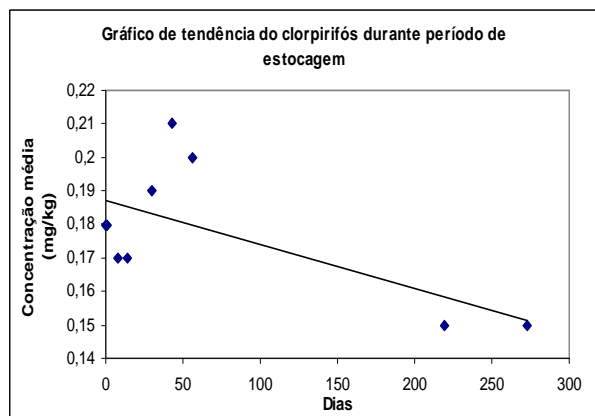
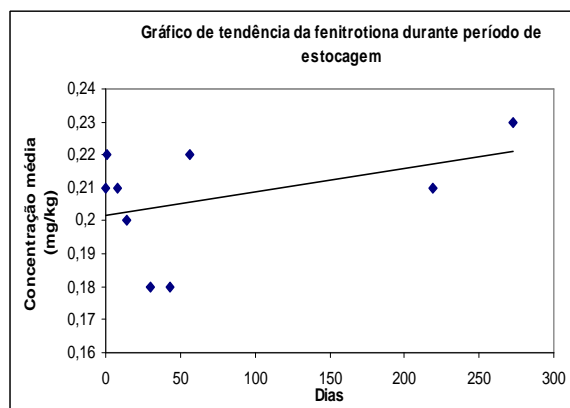
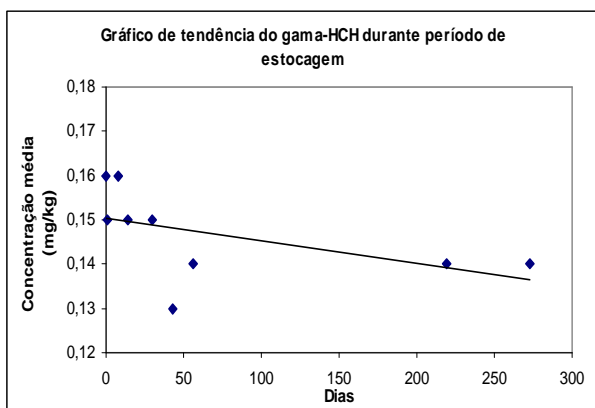


Tabela A2.1 – Avaliação estatística da estabilidade da polpa de tomate candidato a material de referência durante estudo preliminar.

agrotóxico	Inclinação da linha de regressão (mg/kg)	Intervalo Superior de confiança da inclinação (mg/kg)	Intervalo Inferior de confiança da inclinação (mg/kg)
γ -HCH	-0,000050	0,000026	-0,000125
Fenitrotiona	0,000071	0,000209	-0,000068
Clorpirifós	-0,000131	0,000005	-0,000268
Procimidona	-0,000021	0,000018	-0,000061

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

ANEXO 3

Resultados do Estudo Interlaboratorial para certificação do
material INCQS-MRC01

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Tabela A3.1 - γ -HCH – Resultados do estudo interlaboratorial e tratamento estatístico dos dados.

Código do Laboratório	Resultados (mg/kg)		
	01	02	03
Replicata 1 (valor médio da ampola 1)	0,193	0,165	0,260
Replicata 2 (valor médio da ampola 2)	0,193	0,181	0,270
Replicata 3 (valor médio da ampola 3)	0,200	0,180	0,260
Média	0,195	0,175	0,263
Desvio padrão	0,004	0,009	0,006
Variância	0,00002	0,00008	0,00003

Verificação de valores aberrantes:

- Através do teste de Cochran

Valores de $C_{\text{calculado}}$	0,122	0,601	0,249
Valor de $C_{\text{crítico}}$ (95%); $k = 3$, $n = 5$	0,871	0,871	0,871
Presença de valor aberrante	não	não	não

Análise dos resultados do estudo interlaboratorial para certificação do γ -HCH em polpa de tomate.

Código do laboratório	Média do laboratório (\bar{x}_i) (mg/kg)	Soma Quadrática dos Resíduos $(\sum (x_i - \bar{x})^2)$	Valor Aberrante
1	0,195	0,00026	-
2	0,175	0,00130	-
3	0,263	0,00270	-
Média das médias (\bar{x})	0,211		-
Variância da média s^2	0,0021		
u_{carac}	0,0266		
U ($k = 2$, 95%)	0,0533		

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Tabela A3.2 - Fenitrotiona – Resultados do estudo interlaboratorial e tratamento estatístico dos dados.

Código do Laboratório	Resultados (mg/kg)		
	01	02	03
Replicata 1 (valor médio da ampola 1)	0,193	0,145	0,22
Replicata 2 (valor médio da ampola 2)	0,183	0,147	0,24
Replicata 3 (valor médio da ampola 3)	0,187	0,139	0,24
Média	0,188	0,144	0,233
Desvio padrão	0,0050	0,0042	0,0115
Variância	0,00003	0,00002	0,00013

Verificação de valores aberrantes:

- Através do teste de Cochran

Valores de $C_{\text{calculado}}$	0,144	0,099	0,758
Valor de $C_{\text{crítico}}$ (95%); k = 3, n = 3	0,871	0,871	0,871
Presença de valor aberrante	não	não	não

Análise dos resultados do estudo interlaboratorial para certificação da fenitrotiona em polpa de tomate.

Código do laboratório	Média do laboratório $\left(\bar{x}_i\right)$ (mg/kg)	Soma Quadrática dos Resíduos $\left(\bar{x} - x_i\right)^2$	Valor Aberrante
1	0,188	1,11E-07	-
2	0,144	0,00197	-
3	0,233	0,00200	-
Média das médias $\left(\bar{\bar{x}}\right)$	0,188		-
Variância da média s^2	0,0020		
u_{carac}	0,0257		
U (k = 2, 95%)	0,0514		

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Tabela A4.3 - Clorpirifós – Resultados do estudo interlaboratorial e tratamento estatístico dos dados.

Código do Laboratório	Resultados (mg/kg)		
	01	02	03
Replicata 1 (valor médio da ampola 1)	0,285	0,160	0,320
Replicata 2 (valor médio da ampola 2)	0,289	0,163	0,320
Replicata 3 (valor médio da ampola 3)	0,301	0,158	0,400
Média	0,292	0,158	0,347
Desvio padrão	0,008	0,0068	0,046
Variância	0,00007	0,00005	0,00213

Verificação de valores aberrantes:

- Através do teste de Cochran:

Valores de $C_{\text{calculado}}$	0,031	0,021	0,949
Valor de $C_{\text{crítico}}$ (95%); $k = 3$, $n = 3$	0,871	0,871	0,871
Presença de valor aberrante	não	não	sim

- Através do teste de Grubbs:

Valores de $G_{\text{calculado}}$	-	-	1,154
Valor de $G_{\text{crítico}}$ (95%); $n = 3$	-	-	1,150
Presença de valor aberrante	não	não	sim

Análise dos resultados do estudo interlaboratorial para certificação da fenitrotona em polpa de tomate.

Código do laboratório	Média do laboratório (\bar{x}_i) (mg/kg)	Soma Quadrática dos Resíduos $(\bar{x} - x_i)^2$	Valor Aberrante
1	0,287	0,00410	-
2	0,160	0,00410	-
3	0,320		Retirado 1 aberrante do lab. 03
Média das médias $(\bar{\bar{x}})$	0,257		-
Variância da média s^2	0,0075		
u_{carac}	0,0500		
U (k = 2, 95%)	0,0999		

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Tabela A4.4 - Procimidona – Resultados do estudo interlaboratorial e tratamento estatístico dos dados.

Código do Laboratório	Resultados (mg/kg)		
	01	02	03
Replicata 1 (valor médio da ampola 1)	0,193	0,149	-
Replicata 2 (valor médio da ampola 2)	0,187	0,159	-
Replicata 3 (valor médio da ampola 3)	0,187	0,156	-
Média	0,189	0,155	-
Desvio padrão	0,004	0,005	-
Variância	0,00001	0,00003	-

Verificação de valores aberrantes:

- Através do teste de Cochran

Valores de $C_{\text{calculado}}$	0,313	0,687	-
Valor de $C_{\text{crítico}}$ (95%); $k = 2$, $n = 3$	0,975	0,975	-
Presença de valor aberrante	não	não	-

Análise dos resultados do estudo interlaboratorial para certificação da fenitrotiona em polpa de tomate.

Código do laboratório	Média do laboratório (\bar{x}_i) (mg/kg)	Soma Quadrática dos Resíduos $\left(\bar{x} - x_i\right)^2$	Valor Aberrante
1	0,189	0,0003	-
2	0,155	0,0003	-
3	-	-	-
Média das médias (\bar{x})	0,172		-
Variância da média s^2	0,0006		
u_{carac}	0,0173		
U ($k = 2$, 95%)	0,0346		

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

Tabela A4.5 – Resumo dos métodos utilizados para análise pelos colaboradores.

Cód. Lab	Massa de amostra (g)	Extração	'Clean-up'	Curva analítica (mg/kg)	Equipamento analítico	Recuperação (%)	Limites de detecção e de quantificação (mg/kg)
1	-	-	-	-	CG/DCE/DCE, colunas HP5 (30x0,32x0,25) e DB1701 (30x0,32x0,25) e CLAE-EM/EM, coluna Alltima C ₁₈ (5µm x 150 x 3,0 mm)	γ-HCH = 92; clorpirifós = 97; fenitrotona = 84; procimidona = 87	γ-HCH = 0,008 e 0,01; clorpirifós = 0,008 e 0,01; fenitrotona = 0,01 e 0,02 e procimidona = 0,008 e 0,01
2	15	Acetona, diclorometano : Hexano	não	Não. Análise pontual sem efeito matriz	CG/DCE e CG/DFC/DNF, colunas HP5 (30x0,32x0,25) e DB1701 (30x0,32x0,25)	γ-HCH = 115; clorpirifós = 96; fenitrotona = 103; procimidona = 98.	γ-HCH = 0,01 e 0,02; clorpirifós = 0,005 e 0,01; fenitrotona = 0,005 e 0,01 e procimidona = 0,02 e 0,04
3	10	QuEChERS modificado	SPE dispersivo	Sim, 5 pontos na faixa de 0,01 a 0,5 com efeito matriz.	CG/DSM, coluna VF5MS (30x0,25x0,25)	3 níveis avaliados 0,05; 0,1 e 0,25 mg/kg. γ-HCH = 86 a 89; clorpirifós = 98 a 112; fenitrotona = 96 a 111.	γ-HCH = 0,001 e 0,005; clorpirifós = 0,001 e 0,005; fenitrotona = 0,001 e 0,005

ANEXO 4

Atribuição dos valores de propriedades do material
e
estimativa da incerteza de medição

Material de Referência Certificado – INCQS-MRC01

A4.1 – Valores referências do INCQS e suas incertezas.

Na tabela A5.4.1 são apresentados os parâmetros avaliados para cálculo da estimativa de incerteza dos valores encontrados através do ensaio do laboratório provedor.

Tabela A5.4.1 – Dados para estimativa da incerteza dos valores analíticos da INCQS para o γ -HCH.

Fontes de incerteza	Incerteza padrão (u)	Fonte dos dados para incerteza
Preparação da solução estoque e diluição dos padrões	0,052	Pureza, massa de agrotóxico pesada e volume de diluição.
Precisão do método analítico	0,001	Determinado com n = 6 amostras
Taxa de recuperação (%)	0,034	Determinada com n = 6 amostras em 3 diferentes concentrações
Função de calibração	0,007	Regressão linear com 5 pontos de concentração
Incerteza padrão combinada (u_{ref})	0,033	-
Incerteza expandida (U_{ref}) (mg/kg)	0,065	K = 2; 95%

A estimativa da incerteza devido à homogeneidade e estabilidade foi combinada como um componente separado.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de contribuir com as ações de Vigilância Sanitária, com relação ao consumo de alimentos, que visa prevenir e minimizar riscos à saúde e está apresentado em cinco manuscritos e um relatório de acesso restrito ao INCQS, e suas principais discussões são expostas a seguir.

1 – A etapa de validação é pré-requisito em laboratórios preocupados com a qualidade de seus resultados e é exigido pela norma ISO/IEC 17025 (2006).

Este tema tem recebido considerável atenção em literaturas científicas, comitês industriais e agências regulamentadoras, com grande procura por parte dos laboratórios e organismos acreditadores por protocolos de planejamento e controle desses processos. No entanto, existem na literatura vários procedimentos de como este processo deve ser realizado, bem como de terminologias de definições e de parâmetros de desempenho a serem avaliados. Este fato tem dificultado a harmonização dos processos de validação. Na área de alimentos, por exemplo, a validação de métodos está estritamente relacionada com segurança alimentar e comércio internacional.

O objetivo do manuscrito “*Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: Uma experiência laboratorial*” foi apresentar todo o detalhamento para uma avaliação segura e consistente de um exemplo prático adotado para esta finalidade.

Vale salientar que o processo de validação de uma metodologia é exaustivo, demandando tempo específico a este propósito.

Neste trabalho foram realizadas as etapas para a validação da metodologia empregada para análise dos agrotóxicos γ -HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona e seus respectivos parâmetros de desempenho avaliados.

Os resultados encontrados, baseados em fundamentos teóricos, demonstraram a adequação do método ao objetivo proposto.

Embora a estimativa da incerteza seja uma necessidade exigida no contexto de um método de ensaio ela não é considerada pela ISO/IEC 17025 (2006) como parâmetro de desempenho e desse modo não foi demonstrada neste manuscrito.

Entretanto, o valor desta estimativa foi calculado para o referido ensaio e está apresentada no Relatório interno restrito ao INCQS para os agrotóxicos em questão.

2 – No artigo “*Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: Estudo em caso de tomates*”, são apresentados os resultados de uma das etapas do processo de validação, o efeito matriz.

Dependendo de como a identidade de um analito é estabelecida, alguns interferentes podem inibir a detecção do mesmo distorcendo o sinal proveniente dele. Muitas vezes esta distorção pode provocar um aumento ou diminuição na concentração do analito. Esta medição pode ser alterada porque a matriz, reagente ou outros componentes podem afetar a sensibilidade do sistema de detecção que mede o analito. Uma vez detectados esses problemas, podem ser resolvidos pelo uso de curvas analíticas preparadas na mesma matriz que se está analisando.

Apesar de serem extremamente importantes não é comum encontrar na literatura protocolos de validação com ênfase a este efeito. Desse modo, o efeito da matriz é de suma importância desde que influencia diretamente o resultado de uma medição analítica e por isso a preocupação em apresentá-lo separadamente.

Embora esse efeito seja predominante em agrotóxicos organofosforados, buscou-se avaliar o comportamento das demais substâncias diante do mesmo.

Os resultados obtidos confirmaram ser esse efeito mais acentuado nos agrotóxicos classificados como organofosforados, o clorpirifós e a fenitrotiona e que desse modo deve ser considerado para realização do ensaio. Entretanto, de modo a manter a igualdade nas condições de tratamento das amostras decidiu-se por considerar este efeito para os quatro agrotóxicos em questão, γ -HCH, fenitrotiona, clorpirifós e procimidona.

3 – Visando manter a integridade do material de referência durante o período de armazenamento buscou-se através da utilização de um tratamento de esterilização de alimentos alcançar esse objetivo.

Desse modo, no artigo “*Aplicação da radiação gama na preservação de material de referência a ser usado na análise de resíduos de agrotóxicos*”, a preocupação foi em obter dados preliminares do comportamento dessas substâncias após serem submetidas à radiação gama em diferentes doses.

Para algumas substâncias, os efeitos da radiação gama foram mais acentuados na polpa de tomate do que nas soluções preparadas em solvente isooctano, como por exemplo a fenitrotiona na polpa de tomate que apresentou acentuada degradação a partir da dose de 3,0 kGy. Entretanto a procimidona em solução de isooctano apresentou perda a partir da dose inicial de 0,3 kGy, fato este que não se repetiu quando o meio era a polpa de tomate. Esse resultado é razoável já que o teor de água da polpa de tomate é de aproximadamente 90%, o que proporciona a formação e a ação de radicais radiolíticos e, conseqüentemente maior decomposição das substâncias adicionadas.

Os resultados preliminares indicaram a possibilidade do uso da dose de 2,0 kGy à polpa de tomate candidata a material de referência contaminada com os agrotóxicos estudados.

4 – No Manuscrito 4 “*Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 1: Estudo da homogeneidade*”, é apresentado como se realizou o estudo de homogeneidade da polpa de tomate contaminada com os agrotóxicos.

Durante o Estudo Piloto I foi possível avaliar o tamanho do particulado ideal da polpa de tomate bem como o solvente mais adequado para o preparo da solução de fortificação.

Os resultados foram essenciais para elaboração do lote do material INCQS-MRC01.

Para avaliação da homogeneidade do material INCQS-MRC01 foi possível um trabalho em parceria com laboratório do Central Science Laboratory – York/Reino Unido.

Os recipientes utilizados para envase do material foram ampolas de vidro âmbar com capacidade entre 14 a 20g, aproximadamente. Esse volume impossibilitou a realização de duas amostragens por ampola, já que o método multirésíduos empregado indica o emprego de 15g. Entretanto, esta condição não impossibilitou a avaliação da homogeneidade do lote preparado.

Contudo, as amostras enviadas ao CSL estavam em frascos, capacidade aproximada de 100g/cada e receberam a mesma numeração dos frascos aleatoriamente selecionados para o estudo no INCQS. Desse modo, o referido

laboratório pode realizar duas amostragens por frasco para realização do estudo. Os resultados encontrados pelo CSL estão apresentados na Tabela 6 e na Tabela 7 os resultados do laboratório provedor.

Tabela 6: Resultados do teste de homogeneidade apresentados pelo Central Science Laboratory – York/Reino Unido.

	γ-HCH		Fenitrotiona		Clorpirifós		Procimidona	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
	0,239	0,231	0,197	0,180	0,226	0,232	0,171	0,187
	0,224	0,268	0,213	0,189	0,232	0,213	0,186	0,175
	0,228	0,258	0,185	0,173	0,203	0,210	0,171	0,161
	0,201	0,223	0,186	0,187	0,211	0,216	0,160	0,164
	0,232	0,222	0,170	0,217	0,195	0,232	0,166	0,191
	0,240	0,204	0,186	0,204	0,211	0,231	0,172	0,191
	0,222	0,222	0,203	0,198	0,217	0,219	0,172	0,184
	0,250	0,234	0,228	0,184	0,220	0,215	0,180	0,167
	0,212	0,206	0,193	0,169	0,223	0,192	0,183	0,165
	0,261	0,222	0,186	0,182	0,234	0,217	0,179	0,18
Média	0,22985		0,19150		0,21745		0,17525	
Desvio padrão	0,01862		0,01549		0,01199		0,00980	
variância	0,00035		0,00024		0,00014		0,00010	

Tabela 7: Resultados do teste de homogeneidade apresentados pelo Laboratório provedor do material de referência - INCQS.

	γ-HCH		Fenitrotiona		Clorpirifós		Procimidona	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
	0,17885	0,18255	0,18150	0,20655	0,19970	0,21665	0,18665	0,20715
	0,15385	0,17685	0,17745	0,19370	0,18645	0,20375	0,18600	0,19360
	0,12550	0,17155	0,17575	0,21520	0,18500	0,21895	0,18985	0,20525
	0,17070	0,16350	0,20545	0,20295	0,21720	0,20950	0,20690	0,20045
	0,1680	0,16435	0,19025	0,2002	0,20070	0,20905	0,19180	0,19670
	0,18225	0,14505	0,19820	0,19765	0,21460	0,20730	0,19440	0,20280
	0,16445	0,15515	0,19425	0,19950	0,20225	0,20440	0,19320	0,19820
	0,17205	0,1396	0,1895	0,20315	0,20480	0,20740	0,19160	0,20795
	0,18405	0,15975	0,21165	0,22090	0,22355	0,22500	0,21235	0,21330
	0,17385	0,18805	0,22615	0,21225	0,22390	0,2269	0,20185	0,21860
Média	0,16599		0,19150		0,20935		0,19993	
Desvio padrão	0,01603		0,01549		0,01175		0,00925	
variância	0,00026		0,00240		0,00014		0,00008	

Embora os resultados de homogeneidade realizados pelo laboratório produtor terem sido satisfatórios com o emprego de uma amostragem por recipiente (ampola), os mesmos resultados foram confirmados por outro laboratório que pode adotar o procedimento padrão de efetuar duas amostragens por recipiente.

Os resultados enviados pelo laboratório do CSL tiveram apenas o objetivo de corroborar com os resultados do laboratório provedor e desse modo não foram incluídos para cálculo do valor de propriedade do material de referência INCQS-MRC-01.

No que se refere a estabilidade do MRC os resultados são apresentados no Manuscrito 5 "*Preparação de um material de referência certificado para o controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: Parte 2: Estudo da estabilidade*".

Decorrentes dos resultados apresentados no Manuscrito 3 realizaram-se estudos pilotos visando garantir a integridade da amostra através de tratamentos de esterilização térmica, a radiação gama na dose de 2 kGy e a pasteurização a 90 °C por 4 minutos aproximadamente, baseado em trabalho de Armishaw e Millar (2001).

As amostras contaminadas com os agrotóxicos foram submetidas aos dois tratamentos e armazenadas sob diferentes condições de temperatura com a finalidade de avaliar os efeitos da mesma na degradação das substâncias.

Os resultados encontrados para as amostras armazenadas em 'freezer' após ambos tratamentos se mantiveram estáveis durante 372 dias (tratamento de pasteurização) e 273 dias (tratamento por radiação). Entretanto, quando observamos as demais condições de armazenagem as amostras submetidas ao tratamento por radiação gama permanecem mais tempo sem sofrer alteração significativa. Este fato influenciou a decisão ao uso da radiação gama como tratamento da amostra INCQS-MRC01.

De modo a complementar os dados para o estudo de estabilidade, realizaram-se paralelamente aos estudos piloto, citados anteriormente, avaliações com a polpa de tomate envasada em frascos de vidro, selados com tampa de teflon e selo de alumínio, de capacidade aproximada de 20g. Estes frascos foram submetidos aos mesmos tratamentos de esterilização. Nas amostras armazenadas à temperatura ambiente (20 a 27 °C), sob ambas as condições, foi possível observar o crescimento microbiano a partir do quinto dia de armazenamento. Entretanto, para as amostras armazenadas em geladeira (4 a 6 °C), a partir do segundo mês e para as amostras armazenadas em estufa (38 a 52 °C) a partir do trigésimo dia. As amostras armazenadas sob as condições padrão, freezer (- 10 a -25 °C), não demonstraram alteração durante o período de um ano.

Os ensaios realizados pelo departamento de microbiologia foram: contagem de aeróbios mesófilos viáveis, contagem de bactérias ácido lácticas e contagem de bolores e leveduras. Nas amostras de polpa de tomate submetidas à radiação gama, foram avaliadas nas doses de 2 kGy e 10 kGy além da amostra branco.

Embora os resultados para os ensaios realizados apresentem a unidade formadora de colônia menor que 1 UFC/g, a presença de diferentes fungos foi identificada em todas as amostras testadas.

Esses resultados sugerem com a adoção do uso de ampolas de vidro ao invés de frascos de vidro. Provavelmente os frascos não estavam adequadamente lacrados, proporcionando assim o crescimento dos fungos. Embora durante o período de um ano, para as amostras armazenadas em freezer (- 10 a -25 °C), não foi observada qualquer

alteração deve-se levar em consideração as condições de transporte que podem alcançar temperaturas bem mais altas que as ideais, o que favoreceria o crescimento de fungos e conseqüentemente a degradação dos agrotóxicos.

Após as condições de homogeneidade e estabilidade serem definidas necessita-se efetuar a caracterização no material. Para esta finalidade optou-se pela elaboração de um ensaio interlaboratorial.

De posse dos resultados enviados foi possível então determinar os valores de propriedades do material INCQS-MRC01.

No "*Relatório interno restrito ao INCQS*" são apresentadas todas as informações relevantes a esse material. Esse relatório é enviado junto com o material de referencia certificado ao laboratório que faça essa aquisição.

Diante de todos os resultados obtidos pode-se observar que o processo que envolve o preparo de um material de referência é bastante exaustivo, demanda muito tempo para sua obtenção e conseqüentemente envolve alto custo ao laboratório. Isso porque são necessárias realizações de estudos preliminares de homogeneidade e estabilidade, de modo a conhecer a matriz e analitos que se está trabalhando.

Cada alimento/matriz e agrotóxico/analito apresenta particularidades diferentes. Não é possível estender o conhecimento de uma matriz para outra, bem como de um analito para outro. É possível ter uma idéia do comportamento deles entretanto, somente após longo estudo pode-se concluir a respeito do mesmo. O fato é que, mesmo após a realização desses estudos preliminares, quando se prepara o lote do material candidato a certificação é necessário monitorar sua estabilidade pois não há garantias que o mesmo material manterá o mesmo comportamento que antes.

A realização de uma análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos na matriz de referência certificada apresenta caráter destrutivo, ou seja, é uma análise única. Desse modo devem ser avaliadas as vantagens e desvantagens no preparo da mesma. É fato que não há muitos provedores deste tipo de material, principalmente no Brasil e talvez esse seja um dos motivos principais apesar de sua importância.

O tempo dispensado para o preparo de um material de referência a ser utilizado em ensaios de proficiência envolve no máximo quatro meses, correspondendo a etapa de preparo, teste de homogeneidade, envio aos laboratórios participantes e recebimento dos resultados. Durante este período também está inserido o

monitoramento da estabilidade dos analitos. Entretanto, este tempo comparado a um estudo de maior período de estabilidade, pré-requisito do material de referência certificado é bem inferior e envolve menores custos. O laboratório produtor desse tipo de material pode considerar vantajoso o preparo apenas de materiais para ensaios de proficiência, o que proporcionaria por exemplo três produções por ano contra nenhuma do material de referência certificado.

O propósito do estudo para produção de um material de referência a ser utilizado em análise de resíduos de agrotóxicos em hortifrutigranjeiro usando a matriz tomate seguiu o protocolo indicado na ISO Guide 35 (2006) para avaliação da homogeneidade e estabilidade. Contudo, no que se refere ao estudo por longo tempo de estocagem só foi possível realizar monitoramento por 273 dias (ampolas submetidas à radiação gama), embora os resultados apresentados pelo estudo por tempo curto de estocagem terem apresentados uma estimativa do comportamento dos agrotóxicos na amostra sob condições extremas.

As conclusões alcançadas através do objetivo proposto neste trabalho são apresentadas a seguir e foram demonstradas nos cinco Manuscritos preparados bem como no relatório de certificação do material de referência:

- O protocolo proposto foi adequado para a validação da metodologia multirésíduos aplicada para a matriz tomate contendo os agrotóxicos alvo do estudo. Os parâmetros de desempenho do método bem como os critérios de aceitação sugeridos para a realização deste objetivo confirmaram a adequação para uso do mesmo.
- O efeito da matriz avaliado para os agrotóxicos objetos de estudo confirmou a importância de sua verificação para os agrotóxicos organofosforados, indicando nesta situação a utilização de curva analítica preparada na mesma matriz que se está analisando. Por outro lado, o analista deve considerar este efeito para outros analitos levando em consideração a relação custo *versus* benefício.
- Com a preocupação em se manter a integridade de material de referência durante o período de armazenamento buscou-se através da utilização da radiação gama um tratamento que inibisse o crescimento microbiano que poderia causar a degradação do material.
As diferentes doses aplicadas a polpa de tomate contendo os analitos demonstraram o efeito deste tratamento nos mesmos. Os efeitos mais acentuados foram para a fenitrotiona submetida à dose de 3 kGy na polpa de tomate. Comportamento diferente pode ser observado nas soluções em solvente, demonstrando que a constituição mais complexa da polpa de tomate e sua textura pastosa reduziram as perdas dos agrotóxicos em relação ao que ocorreu nas soluções em isooctano. Desse modo, a indicação ao uso da dose de 2 kGy pode ser empregada para o estudo de estabilidade.

- Os Estudos Piloto realizados para avaliação do preparo da polpa de tomate em relação à homogeneidade da mesma forneceram dados fundamentais e imprescindíveis à elaboração do material de referência, no que se refere à granulometria da amostra, a solubilidade do solvente da solução de fortificação bem como, ao uso de soluções individuais de fortificação. Essas três características definidas garantiram a homogeneidade do lote preparado do material de referência.

- Em continuidade ao trabalho de avaliação da estabilidade do material de referência foi possível avaliar através de dois tratamentos de esterilização de alimentos esta característica. Contudo, com a preocupação em avaliar também as condições de transporte buscou-se através de condições extremas de armazenamento (geladeira, temperatura ambiente e estufa) avaliar este mesmo comportamento.

Para o tratamento de pasteurização a polpa de tomate contendo os analitos na faixa de 0,1 a 0,2 mg/kg se manteve inalterada pelo período de 372 dias armazenadas em freezer. Para as amostras submetidas a pasteurização foi possível observar alteração a partir do sétimo dia (armazenada em estufa).

Por outro lado, o tratamento por radiação gama na dose de 2 kGy, indicado previamente, foi realizado durante 273 dias. As amostras mantiveram-se inalteradas por este período em freezer. Entretanto, as variações indicando instabilidade foram menores por este tratamento quando comparado as pasteurizadas, ocasionando o emprego deste tratamento para a produção do material de referência.

- A partir das condições ideais definidas para o preparo do material de referência preparou-se o material INCQS-MRC01.

Para a atribuição do valor de propriedades do mesmo seguiu-se a indicação por elaboração de um estudo interlaboratorial. Apesar da participação de poucos laboratórios nesta etapa foi possível chegar a um valor estatisticamente comprovado.

- O objetivo principal deste trabalho foi alcançado com a preparação e certificação do material de referência INCQS-MRC01.

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. R. Microbiologia de la Conservación de los Alimentos. In: **Microbiología de la Conservación de los Alimentos. Microbiología de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1995, p. 88-98.
- ALVES, N. P. e MORAES, D. N. **Metrologia Química e a Utilização de Materiais de Referência em medições Químicas**. [on-line]. 2004. Disponível: <http://www.quimlab.com.br>. Acesso em: 02 fev. 2004.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001 [on-line]. 2001. Disponível: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/21_01rdc.htm. Acesso em: 23 out. 2006.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [on-line]. 2008. Disponível: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias>. Acesso em: 06 mar. 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [on-line]. 2008. Disponível: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>. Acesso em: 24 abr. 2008.
- APVMA – Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. [on-line]. 2008. Disponível: <http://www.apvma.gov.au/residues>. Acesso em: 06 mar. 2008.
- ARMISHAW, P.; WARD, J.; MILLAR, R. G. Development of a reference material for residues of chlorfluazuron and fluazuron in beef fat ACSL CRM 3. Part I. Preparation, homogeneity and stability. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 356, p. 10-12, 1996.
- ARMISHAW, P.; WARD, J.; MILLAR, R. G. Development of a reference material for residues of chlorfluazuron and fluazuron in beef fat ACSL CRM 3. Part II.

Certification. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 356, p. 13-16, 1996.

- ARMISHAW, P.; MAJEWSKI, J. M.; McLAY, P. J.; MILLAR, R. G. Development and certification of reference materials for residues of organochlorine and organophosphorus pesticides in beef fat ACSL CRM 1 and 2. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, p. 630-639, 1998.
- ARMISHAW, P. & MILLAR, R. A natural matrix (pureed tomato) candidate reference material containing residue concentrations of pesticide chemicals. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, p.291-296, 2001.
- BASTOS, L. H. P.; GÓES, H. C. A.; CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; DIAS, D. P.; ALMEIDA, R. R. R.; NÓBREGA, A.; ABRANTES, S. Ensaio de Proficiência para análise de ditiocarbamatos em polpa de banana. **Quimica Nova**, v. 30 n. 1, p. 32-35, 2007.
- BRASIL. Decreto nº 4074/02, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan. 2002.
- BRASIL. Resolução RDC nº 119, de 19 de maio de 2003. Ministério da Saúde, Agência de Vigilância Sanitária. Criação do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 de maio de 2003, Seção 1.
- CASTRICINI, A.; MEDEIROS, S. F; CONEGLIAN, R. C. C.; VITAL, H. C. Uso da radiação gama na conservação pós-colheita do tomate de mesa (*Lycopersicum esculentum* MILL.): “fruto de vez”. **Revista Universidade Rural, Séries Ciências da Vida**, v. 22, n. 2, p. 223-229, 2002.

- CDC – Center for Disease Control and Prevention. Frequently Asked Questions about Irradiation. [on-line]. 2006. Disponível: <http://www.cdc.gov>. Acesso em: 23 out. 2006.
- CENA – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Divulgação da Tecnologia da Irradiação de Alimentos e outros materiais. [on-line]. 2006. Disponível: <http://www.cena.usp.br/irradiação>. Acesso em: 27 out. 2006.
- CFIA – The Canadian Food Inspection Agency. [on-line]. 2008. Disponível: <http://www.inspection.gc.ca>. Acesso em: 13 mar. 2008.
- CHUI, Q. S. H.; IAMASHITA, C. O. e BISPO, J. M. A. Estudo de homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 497-501, 2005.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1984. **Guide to Codex recommendations concerning pesticide residues. Part 1. General notes and guidelines**. The Hague: Codex Alimentarius Commission (Report CAC/PRI – 1984) *apud* WHO (World Health Organization), 1990. **Public health impact of pesticides used in agriculture**. WHO. 128 pp.
- COSTA, M. A.; TORNISIELO, V. L.; WALDER, J. M. M. Resíduos de ¹⁴C-Prochloraz em mangas Irradiadas. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.11, p. 105-114, 2001.
- DGADR – Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural / Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, PORTUGAL, [on-line] 2008. Disponível: <http://www.dgadr.pt>. Acesso em: 16 mar. 2008.
- ELLISON, S. L. R.; BURKE, S.; WALKER, R. F.; HEYDON, K.; MÅNSSON, M.; PAUWELS, J.; WEGSCHEIDER, W.; B. te NIJENHUIS. Uncertainty for reference materials certified by interlaboratory study: recommendations of an

international study group. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, p. 274-277, 2001.

- EDWARDS, C. A., 1994. Pesticides as environmental pollutants. In: **World Directory of Pesticides Control Organizations**. 2 ed. pp. 1-23, United Kingdom : crop Protection Publications.
- EMONS, H.; FAJGELJ, A.; VAN DER VEEN, A. M. H.; WATTERS, R. New definitions on reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 10, p. 576-578, 2006.
- EUROPEAN UNION COMMISSION, [on-line] 2008. Disponível: http://ec.europa.eu/food/fvo/specialreports/pesticides_index_en.htm. Acesso em: 13 mar. 2008.
- FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, [on-line] 2008. Disponível: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 23 abr. 2008.
- FAPAS – Food Analysis Performance Assessment Scheme. [on-line]. 2008. Disponível: <http://www.fapas.com>. Acesso em: 21 abril 2008.
- GAVA, A. J. Métodos de Conservação de Alimentos. In: GAVA, A. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Nobel, 1999. cap. 7.
- GOLAN, R. B.; PADOVA, R.; ROSS, I.; LAPIDOT, M.; DAVIDSON, H.; COPEL, A. Combined hot water and radiation treatments to control decay of tomato fruits. **Scientia Horticulturae**, v.56, n. 2, p. 101-105, 1993.
- HERNANDES, N. K; VITAL, H. C.; SAABAA-SRUR, A. U. O. Irradiação de alimentos: vantagens e limitações. **Boletim SBCTA**. v. 37, n. 2, p. 154-159, 2003.

- IAMASHITA, C. O. **Materiais de Referência, O uso nos processos analíticos**. [on-line]. 2004. Disponível: http://www.crq4.org.br/informativo/16_01_00/pagina05.html. Acesso em: 02 fev. 2004.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [on-line]. 2008. Disponível: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 23 abr. 2008.
- ILAC Guidelines for the Requirements for the Competence of Reference Material Producers. ILAC G-12, 2000. [on-line]. 2000. Disponível: <http://www.ilac.org>. Acesso em: 11 dez. 2007.
- INMETRO. **Vocabulário internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (VIM)**. 5. ed. Rio de Janeiro, 2007. 72p.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO GUIDE 35. **Reference materials – General and statistical principles for certification**. 2006.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 8402:1994 – **Quality Management and Quality Assurance – Vocabulary (Glossary)**.
- IRMM – Institute for Reference Materials and Measurements. [on-line]. 2008. Disponível: <http://www.irmm.jrc.be/html/homepage.htm>. Acesso em: 23 abr. 2008.
- JAVARONI, R. C. A.; TALAMONI, J.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Estudo da degradação de lindano em solução aquosa através de radiação gama. **Química Nova**, v. 14, n. 4, p. 237-239, 1991.

- JUÁREZ, J. C. G.; BECERRIL, J. J. Gamma radiation-induced catalytic degradation of 4-chlorophenol using SiO₂, TiO₂, and Al₂O₃. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 75, p. 768-772, 2006.
- LAMBERTY, A, SCHIMMEL, H. & PAUWELS, J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, p. 359-361, 1998.
- LARA, W. A tolerância tem limites. In: **Ciência Hoje**, v.4, n. 22, p. 63-64, 1986.
- LUCHINI, L. C.; LANDGRAF, M. D.; VIEIRA, E. M.; REZENDE, M. O. O. Estudo da degradação do inseticida paration através da radiação gama do cobalto-60. **Química Nova**, v. 19, n. 4, 353-356, 1996.
- LINSINGER, T. P. J.; PAUWELS, J.; LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H. G.; VAN DER VEEN, A. M. H.; SIEKMANN, L. Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 370, p. 183-188, 2001.
- MELNIKOVA, T. V.; POLYAKOVA, L. P.; KOZMIN, G. V. Radiation biotechnonology, influence of gamma-irradiation on stability of organochlorinated pesticides contaminating food. **Toxicology Letters**, v. 144, sup. 1, p. 561, 2003.
- MENZER, R.E. Water and soil pollutants. In: AMDUR, M.O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C.D., (Ed.). **Cassaret & Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. 4 ed. New York: Pergamon Press, 1991. p. 872-902.
- MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000, 295p.
- MINISTERE DE L'AGRICULTURE et DE la PÊCHE - FRANÇA, [on-line] 2008. Disponível: <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/lmr/vegres/02030101.htm>. Acesso em: 16 mar. 2008.

- MIRANDA, M. B.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Estudo do efeito da irradiação gama (^{60}CO) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 772-778, 2006.
- MOREIRA, G. C.; VIEITES, R. L.; CAMPOS, A. J.; JÚNIOR, E. D. Efeito da radiação gama na sanitização do tomate minimamente processado e acondicionado à vácuo. **Higiene Alimentar**, v. 19, p. 29-32, 2005.
- MORELLI-CARDOSO, M. H. W.; CARDOZO, R. T. M.; MELLO, J. L.; ABRANTES, S.; MENEZES, K. M. P. Extraction and clean-up method for the determination of twenty organochlorine pesticide residues in tomatoes by GLC-ECD. **Journal of High Resolution chromatography**, v. 22, n. 11, p. 619-622, 1999.
- MUKHERJIE, I.; GOPAL, M. Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residue. **Journal of Chromatography A**, v.754, p.33-42, 1996.
- OLIVEIRA, J. A., PINTO, A. G. & TEIXEIRA, J. E., 1996. **Uma mensagem ao agricultor – Projeto Escola no Campo**. 3 ed. São Paulo : Zeneca. 68 pp.
- NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais sobre a competência dos laboratórios de ensaio e calibração. **ISO Guia 17025**. Brasil, 2005.
- NBR ISO/GUIA 31. Materiais de referência – Conteúdo de certificados e rótulos. **ISO Guia 31**. Brasil, 2004.
- NBR ISO/GUIA 34. requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. **ISO Guia 34**. Brasil, 2004.
- NIST – National Institute of Standards and Technology. [on-line]. 2008. Disponível: <http://www.nist.gov>. Acesso em: 13 mar. 2008.

- PINHEIRO, S. NASR, N. Y. e LUZ. D. **A agricultura ecológica e a máfia dos agrotóxicos no Brasil**. Rio de Janeiro: Edição dos Autores, 1998.
- PMRA – Pest Management Regulatory Agency – CANADÁ, [on-line] 2008. Disponível: <http://www.pmra-arla.gc.ca/english/legis.maxres-e.html>. Acesso em: 16 mar. 2008.
- PSD - Pesticides Safety Directorate, UK. [on-line]. 2008. Disponível: <http://www.pesticides.gov.uk/home.asp>. Acesso em: 16 mar. 2008.
- PSD - Pesticides Safety Directorate, UK/CODEX [on-line]. 2008. Disponível: <https://secure.pesticides.gov.uk/MRLs/Codex/MRLlist.asp>. Acesso em: 16 mar. 2008.
- RIKILT – Institute of Food Safety, The Netherlands. [on-line], 2008. Disponível: <http://www2.rikilt.dlo.nl/vws/asp/gfmrl.asp>. Acesso em: 16 mar. 2008.
- SANT'ANA, A. S.; ARAÚJO, I. O. Irradiação e a segurança e qualidade microbiológica dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 21, p. 37-51, 2007.
- SCHINDLER, M.; SOLAR, S.; SONTAG, G. Phenolic compounds in tomatoes. Natural variations and effect of gamma-irradiation. **European Food Research and Technology**, v. 221, p. 439-445, 2005.
- SILVA, A. C. O.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; MORAES, C. F. A. M. P; SOUZA, M. R., FERNANDEZ, A. T. et al. Radiação em Alimentos. Uma Revisão. **Higiene Alimentar**, v. 20, p. 17-23, 2006.
- VALENTE SOARES, L. M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60: 1, p. 79-84, 2001.

- VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T. P. J.; LAMBERTY, A.; PAUWELS. J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Stability study. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, p. 257-263, 2001.
- VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T.; PAUWELS. J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Homogeneity study. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, p. 26-30, 2001.
- VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T. P. J.; SCHIMMEL, H.; LAMBERTY, A.; PAUWELS. J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 4. Characterisation and certification. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, p. 290-294, 2001.
- USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – Pesticide Data Program. [on-line]. 2008. Disponível: <http://www.usda.gov>. Acesso em: 13 mar. 2008.
- ZAMBRONE, F. A. D. Perigosa Família. In: **Ciência Hoje**. v. 4, n. 2, p.44-47, 1986.
- ZUCCHINI, R. R. **Bate-Papo Programado: Materiais de Referência Certificados**. [on-line]. 2004. Disponível: <http://www.ipt.br>. Acesso em: 02 fev. 2004.

REGISTRO DE RECEBIMENTO DE AMOSTRA

**CERTIFICAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA
REGISTRO DE RECEBIMENTO DE AMOSTRA**



NOME DO MATERIAL DE REFERÊNCIA

INCQS – MRC01 – RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PURÊ DE TOMATE

DADOS DO PARTICIPANTE

Nome do laboratório:

Nome do Responsável pela análise:

DADOS DO RECEBIMENTO

AMOSTRA: INCQS-MRC01, X ampolas numeradas aleatoriamente e X ampolas Branco

Data de recebimento: / /

Nome do Responsável pelo recebimento da amostra:

INSPEÇÃO DE RECEBIMENTO DA AMOSTRA

A amostra foi recebida pelo laboratório:

Em mãos Por transportadora Outra Forma

Discriminar:

Foi observado dano físico evidente? Sim Não

Se positivo, discriminar:

A amostra estava embalada adequadamente? Sim Não

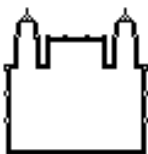
Se negativo, discriminar:

DATA: _____

ASSINATURA: _____

Nota: Após o recebimento, encaminhar à Vice Diretoria Finalística 2 – INCQS, via fax nº (0XX21) 2290-0915.

DESCRIÇÃO DE MATERIAIS ENVIADOS E INSTRUÇÕES



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO PARA ANÁLISE EM RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS INCQS – MRC01

Certificação de Material de Referência Resíduos de Agrotóxicos em Purê de Tomate

Descrição de Materiais Enviados e Instruções

Material de Referência:

Estão sendo enviados:

- 6 ampolas de vidro âmbar contendo, cada uma, aproximadamente 15 a 20g de polpa de tomate com resíduos de quatro agrotóxicos.
- 2 ampolas de vidro âmbar contendo, cada uma, aproximadamente 15 a 20g de polpa de tomate Branco.

Confirmação do Recebimento da Amostra:

Quando a amostra chegar no laboratório preencher o formulário de registro de recebimento de amostra, enviado via e.mail, imprima e o envie pelo fax n.º (0XX21) 2290-0915 confirmando o recebimento.

Instruções de Uso:

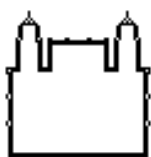
- Os frascos selados, como recebidos, deverão ser armazenados a temperatura entre -5°C e -15°C até o momento da análise;

- No momento da execução do ensaio, retire a amostra do congelador e proceda a determinação analítica segundo os procedimentos do laboratório;
- Homogenize a (s) ampola (s) contendo o purê de tomate antes de abri-la;
- Realizar a análise preparando 3 porções individuais (replicatas) da amostra de purê de tomate com resíduos de quatro agrotóxicos (ampolas identificadas numericamente) e pelo menos 1 amostra Branco;
- A massa a ser pesada da polpa de tomate compreenderá o volume total de uma única ampola ou o somatório de mais unidades, dependendo da metodologia adotada no laboratório. Caso o laboratório necessite juntar o conteúdo de duas ou três ampolas, o volume final das mesmas deverá ser homogeneizado e em seguida pesado em 3 porções individuais (replicatas).
- As amostras de polpa de tomate deverão ser analisadas usando o método de rotina do seu laboratório e a quantificação final expressa em mg/kg.

Os laboratórios deverão fazer os registros das medições no formulário para envio dos resultados do ensaio, enviado por e.mail. O formulário deve ser preenchido, impresso e enviado à Vice Diretoria Finalística 2/INCQS, via fax, para o nº (0XX21) 2290-0915, até a data prevista no cronograma apresentado na carta convite: dia XX/XX/XXXX.

Colocamo-nos à disposição para informações adicionais e esclarecimentos de dúvidas, através do telefone: (0XX21)-3865.5187 ou e.mail para helena.wohlers@incqs.fiocruz.br.

FORMULÁRIO PARA ENVIO DO RESULTADO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

FORMULÁRIO PARA ENVIO DO RESULTADO

CERTIFICAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PURÊ DE TOMATE

Identificação do material de referência: INCQS-MRC01

Amostra: Purê de Tomate

Ensaio: Determinação de Resíduos de Agrotóxicos

Data de remessa da amostra: XX/XX/XXXX

Os resultados devem ser enviados até o dia: 31/01/2008

FAVOR PREENCHER OS SEGUINTE DADOS:

Nome do laboratório: XXX – Código Laboratório XX

Data de recebimento da amostra: _____

Data de envio do resultado: _____

SISTEMA DA QUALIDADE:

- O Laboratório é acreditado pela NBR/ISO/IEC 17025? _____
- O Laboratório é acreditado por outro organismo certificador, qual? _____
- O ensaio utilizado neste trabalho faz parte do escopo de acreditação? _____
- Se o laboratório ainda não é acreditado, tem a norma implementada? _____
- A vidraria utilizada na execução do ensaio está calibrada? Sim Não
- Os certificados são da Rede Brasileira de Calibração (RBC)?
 Sim Não
- O(s) equipamento(s) utilizado(s) para a execução do ensaio estão qualificados?
 Sim Não
- Os materiais de referência utilizados são Certificados? Sim Não
- Os materiais de referência utilizados encontram-se no prazo de validade do provedor ou do laboratório?
 Sim Não (Provedor)
 Sim Não (Laboratório)

METODOLOGIA:

Ensaio: DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

Matriz: PURÊ DE TOMATE

ATENÇÃO: A METODOLOGIA ANALÍTICA A SER UTILIZADA SERÁ DE ESCOLHA DO LABORATÓRIO, DEVENDO SER CONSISTENTE COM OS PROCEDIMENTOS DE ROTINA DO MESMO.

Favor responder os questionamentos abaixo e na Tabela 1 sobre material e métodos utilizados no ensaio:

- Referência bibliográfica da metodologia analítica utilizada

1) Revista / Livro / POP / Legislação: _____

Volume / Complemento: _____

Ano: _____

Página(s): _____

2) Revista / Livro / POP / Legislação: _____

Volume / Complemento: _____

Ano: _____

Página(s): _____

Caso tenha utilizado outra(s) referência(s) bibliográficas favor acrescentar folha anexa ao formulário para envio de resultados.

- Peso da Amostra:

- Extração:

- “Clean-up” :
- Base do cálculo para estimativa da incerteza ou dispersão dos resultados:

Tabela 1 – Informações analíticas relevantes sobre o ensaio realizado:

AGROTÓXICO	GAMA-HCH	CLORPIRIFÓS	FENITROTIONA	PROCIMIDONA
Equipamento:				
Fabricante				
Modelo				
Detector:				
Fabricante				
Coluna (s):				
A – Natureza				
Filme, μm				
Comp, m				
Φ_i , mm				
B – Natureza				
Filme, μm				
Comp, m				
Φ_i , mm				
Método de Quantificação: (padrão interno ou externo)				
Curva Analítica:				
Foi utilizado efeito matriz? (sim ou Não)				
Número de Pontos				
Faixa de Concentração (mg/kg)				

Observações relevantes:

RESULTADOS

Ensaio: DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

Matriz: Purê de Tomate

AGROTÓXICO	RESULTADO (mg/kg)	DISPERSÃO DOS RESULTADOS	RECUPERAÇÃO (%)	LIMITE DE DETECÇÃO (mg/kg)	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (mg/kg)
Gama-HCH Replicata 1 Replicata 2 Replicata 3					
Clorpirifós Replicata 1 Replicata 2 Replicata 3					
Fenitrotiona Replicata 1 Replicata 2 Replicata 3					
Proclimidona Replicata 1 Replicata 2 Replicata 3					

OBS: Não corrigir o resultado para a recuperação

Comentários Adicionais:

Data de execução do ensaio: _____

Analista: _____

Assinatura: _____