

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM
QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA AMOSTRAGEM,
PROPORÇÃO MASSA/SOLVENTE E EQUIPAMENTO DE
EXTRAÇÃO NA ANÁLISE DE PESTICIDAS EM
ALIMENTOS**

WESLEY FELIPE DE PAULA JOSÉ*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

Orientador(a): Prof. Dr. PEDRO SERGIO FADINI

*** Vínculo Empregatício: BASF S.A.**

**São Carlos - SP
2025**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Wesley Felipe de Paula José, realizada em 03/06/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini (UFSCar)

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Rafael Ramon (BASF SA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

AGRADECIMENTO

A realização deste mestrado representou uma jornada de aprendizado, superação e crescimento pessoal e profissional. Ao longo desse caminho, contei com o apoio e a inspiração de pessoas que foram fundamentais para que este trabalho se concretizasse.

Agradeço ao Professor Dr. Pedro S. Fadini, meu orientador, e à Professora Dra. Roberta Urban, co-orientadora do projeto, pela orientação dedicada, paciência e disponibilidade ao longo de toda a trajetória. Suas contribuições foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, meu sincero agradecimento por compartilhar generosamente seu vasto conhecimento e por estar sempre disposto a apoiar com entusiasmo todos sempre que o procuram.

À empresa BASF S.A., pela confiança, pela disponibilização de materiais, tempo e equipamentos, que tornaram este projeto viável. Em especial, agradeço à Marcella Ferreira Cardoso, uma líder inspiradora, cuja parceria e incentivo foram determinantes para o sucesso desta jornada.

Aos colegas de equipe, meu muito obrigado pelo apoio constante e pelas palavras de incentivo desde o início do projeto.

À minha esposa, Pâmela Maria da Silva Freitas, minha eterna gratidão. Sua paciência, compreensão e amor incondicional foram o alicerce que sustentou cada passo desta caminhada. Nos momentos de cansaço, você foi meu refúgio; nos momentos de dúvida, minha motivação. Esta conquista é tão sua quanto minha.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desta trajetória, meu sincero muito obrigado.

Ao corpo técnico-administrativo do Departamento de Química da UFSCar, agradeço pelo suporte prestado ao longo do curso.

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPA	Boas Práticas Agrícolas
BPL	Boas Práticas de Laboratório
DoE	<i>Design of Experiments</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
Eq.	Equação
EU	<i>European Union</i>
g.l.	Grau de liberdade
GENCS	<i>Global Environmental and Consumer Safety Laboratory</i>
GHS	<i>Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LQ	Limite de quantificação
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada por espectrometro de massas triplo quadrupolo
MAPA	Ministério do Meio Ambiente e Pecuária
MQ	Média quadrática
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
Ppb	Partes por bilhão
Ppm	Partes por milhão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SANTE	<i>Directorate-General for Health and Food Safety</i>
SC	Suspensão concentrada
SS	Soma dos quadrados
SQ	Soma quadrática da regressão
QuECHERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i>
Qsp	Quantidade suficiente para

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Classe de agrotóxicos em relação a sua classificação toxicológica	5
TABELA 2 – Preparo de soluções de calibração	25
TABELA 3 – Preparo e aplicação do produto formulado em algodão	30
TABELA 4 – Preparo e aplicação do produto formulado em citros	30
TABELA 5 – Preparo e aplicação do produto formulado em arroz	30
TABELA 6 – Preparo e aplicação do produto formulado em tomate	31
TABELA 7 – Preparo e aplicação do produto formulado em repolho	31
TABELA 8 – Condições cromatográficas.....	36
TABELA 9 – Condições cromatográficas.....	37
TABELA 10 – Níveis máximo e mínimo das variáveis.....	38
TABELA 11 – Matriz de experimentos para avaliação das variáveis.....	40
TABELA 12 – Distribuição do tamanho de partícula das amostras.....	42
TABELA 13 – Matriz do planejamento fatorial em dois níveis (2^3) para cultivo de TOMATE – % de recuperação e desvio padrão	47
TABELA 14 – Matriz do planejamento fatorial em dois níveis (2^3) para cultivo de ARROZ – % de recuperação e desvio padrão.....	48
TABELA 15 – Matriz do planejamento fatorial em dois níveis (2^3) para cultivo de CITROS – % de recuperação e desvio padrão.....	49
TABELA 16 – Matriz do planejamento fatorial em dois níveis (2^3) para cultivo de ALGODÃO – % de recuperação e desvio padrão.....	50
TABELA 17 – Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos ingredientes ativos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostra de TOMATE	52
TABELA 18 – Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos ingredientes ativos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostra de ARROZ.....	52
TABELA 19 – Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos ingredientes ativos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostra de CITROS.....	53
TABELA 20 – Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos ingredientes ativos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostra de ALGODÃO	53
TABELA 21 – ANOVA fator único para TOMATE calculado através do Excel .	67
TABELA 22 – ANOVA fator único para ARROZ calculado através do Excel	67
TABELA 23 – ANOVA fator único para CITROS calculado através do Excel ...	68
TABELA 24 – ANOVA fator único para ALGODÃO calculado através do Excel	68
TABELA 25 – Resultados para teste de Tukey-Kramer em TOMATE	72
TABELA 26 – Resultados para teste de Tukey-Kramer em ARROZ	73
TABELA 27 – Resultados para teste de Tukey em CITROS	74
TABELA 28 – Resultados para teste de Tukey-Kramer em ALGODÃO	75

TABELA 29 – Diferença percentual da metodologia original em relação aos diferentes experimentos para amostra de tomate.....	80
TABELA 30 – Diferença percentual da metodologia original em relação aos diferentes experimentos para amostra de arroz.....	81
TABELA 31 – Diferença percentual da metodologia original em relação aos diferentes experimentos para amostra de citrus.....	82
TABELA 32 – Diferença percentual da metodologia original em relação aos diferentes experimentos para amostra de algodão.....	83
TABELA 33 – Condições cromatográficas – BAS 550 I.....	92
TABELA 34 – Condições cromatográficas – BAS 650 F.....	93
TABELA 35 – Condições cromatográficas – BAS 9068 F	94
TABELA 36 – Análise comparativa método miniaturizado vs. método original – BAS 750 F.....	96
TABELA 37 – Análise comparativa método miniaturizado vs. método original – BAS 550 I.....	97
TABELA 38 – Análise comparativa método miniaturizado vs. método original – BAS 650 F.....	99
TABELA 39 – Análise comparativa método miniaturizado vs. método original – BAS 9068 F.....	100

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Amostras vegetais homogeneizadas selecionadas para determinação do tamanho de partícula.....	29
FIGURA 2 - Aplicação de produto formulado no cultivo de algodão.....	32
FIGURA 3 - Coleta (A), Beneficiamento (B) e Armazenamento (C) das amostras de algodão	32
FIGURA 4 - Moinho de preparo (A), Adição de gelo seco para acondicionamento da temperatura pré-homogeneização (B), Adição da amostra no moinho (C), Etapa de homogeneização com gelo seco (D) e Amostra homogeneizada em pote de armazenamento (E). Fotos do laboratório da BASF de Guaratinguetá/SP	33
FIGURA 5 - Fluxograma método original – Análise de BAS 500 F, BAS 505 F, BAS 510 F, BAS 700 F, BAS 750 F e BAS 309 I	35
FIGURA 6 - Procedimento para determinação do tamanho de partícula.....	42
FIGURA 7 - Avaliação da distribuição do tamanho de partícula de sementes de algodão após homogeneização com gelo seco.....	43
FIGURA 8 - Avaliação da distribuição do tamanho de partícula de grãos de arroz após homogeneização com gelo seco	43
FIGURA 9 - Porcentagem de extração de tomate para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3	49
FIGURA 10 - Porcentagem de extração de arroz para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3	49
FIGURA 11 - Porcentagem de extração de citros para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3	50
FIGURA 12 - Porcentagem de extração de algodão para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3	50
FIGURA 13 - Projeções de Pareto para as variáveis do planejamento fatorial 2^3 para cultivo de TOMATE onde, A: BAS 750 F; B: BAS 500 F; C: BAS 700 F; D: BAS 505 F; E: BAS 510 F; F: BAS 309 I e, barras laranja: efeito positivo; barras azul: efeito negativo.	54
FIGURA 14 - Projeções de Pareto para as variáveis do planejamento fatorial 2^3 para cultivo de ARROZ onde, A: BAS 750 F; B: BAS 500 F; C: BAS 700 F; D: BAS 309 I e, barras laranja: efeito positivo; barras azul: efeito negativo.	55
FIGURA 15 - Projeções de Pareto para as variáveis do planejamento fatorial 2^3 para cultivo de CITROS onde, A: BAS 750 F; B: BAS 500 F; C: BAS 700 F; D: BAS 309 I e, barras laranja: efeito positivo; barras azul: efeito negativo.	56
FIGURA 16 - Projeções de Pareto para as variáveis do planejamento fatorial 2^3 para cultivo de ALGODÃO onde, A: BAS 750 F; B: BAS 500 F; C: BAS 700 F; D: BAS 505 F; E: BAS 510 F e, barras laranja: efeito positivo; barras azul: efeito negativo.	57
FIGURA 17 - Trombeta de Horwitz.....	62
FIGURA 18 - Desvio padrão das replicatas de extração de tomate para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3	64
FIGURA 19 - Desvio padrão das replicatas de extração de arroz para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3	64
FIGURA 20 - Desvio padrão das replicatas de extração de citros para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3	65
FIGURA 21 - Desvio padrão das replicatas de extração de algodão para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3	65

RESUMO

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA AMOSTRAGEM, PROPORÇÃO MASSA/SOLVENTE E EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO NA ANÁLISE DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS. Este trabalho teve como objetivo investigar a aplicabilidade da miniaturização de métodos analíticos convencionais para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Com a crescente demanda por métodos analíticos mais rápidos, econômicos e sustentáveis, busca-se melhorar os procedimentos utilizados para a análise de resíduos de pesticidas. Nos métodos clássicos utilizados pela indústria agroquímica e laboratórios privados, a utilização de técnicas instrumentais avançadas para a separação, detecção e quantificação de analitos contrasta com os métodos tediosos, consumidores de tempo e manuais empregados para a preparação das amostras no laboratório, retardando e onerando o processo analítico como um todo. Diante disso, este projeto de pesquisa investigou como diferentes variáveis empregadas durante a etapa de extração de resíduos de pesticidas em alimentos podem influenciar os níveis de resíduos encontrados nessas amostras, visando a automação dos métodos analíticos. Para isso, foram avaliados resultados de seis ingredientes ativos (mefentrifluconazole, piraclostrobina, fluxapiraxade, teflubenzuron, boscalida e dimoxistrobina) em quatro matrizes distintas (tomate, citros, algodão e arroz). Foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^3 , no qual foram avaliadas as técnicas de extração (Ultra turrax e agitador vórtex), massa de amostra (0,20 g e 2,50 g) e proporção massa de amostra/volume de solução de extração (1:8 e 1:20). Os resultados obtidos indicaram que, mesmo com massas pequenas de amostra, foi possível obter desvios-padrão comparáveis aos métodos convencionais. Além disso, verificou-se que a proporção massa de amostra/volume de solução de extração teve baixa significância na variação dos resultados para os níveis testados. Embora algumas variáveis, como peso de amostra e equipamento, tenham apresentado efeitos significativos, esses efeitos se encontram dentro da variabilidade esperada para análises de pesticidas. Novos experimentos foram realizados para validar a empregabilidade da miniaturização e automação dos métodos analíticos.

Palavras-chave: DoE, miniaturização, análise de pesticidas, automação

ABSTRACT

EVALUATION OF THE IMPACT OF SAMPLING, MASS/SOLVENT RATIO, AND EXTRACTION EQUIPMENT ON PESTICIDE ANALYSIS IN FOODS. This study aimed to investigate the applicability of miniaturization of conventional analytical methods for the analysis of pesticide residues in foods. With the growing demand for faster, more cost-effective, and environmentally sustainable analytical methods, there is a need to improve the procedures used for pesticide residue analysis. In classical methods employed by the agrochemical industry and private laboratories, the use of advanced instrumental techniques for separation, detection, and quantification of analytes contrasts with the tedious, time consuming and manual methods used for sample preparation, which can delay and increase the cost of the entire analytical process. Therefore, this research project investigated how different variables employed during the extraction of pesticide residues in foods can influence the levels of residues found in these samples, with the aim of automating the analytical methods. For this purpose, results of six active ingredients (mefentrifluconazole, pyraclostrobin, fluxapyroxad, teflubenzuron, boscalid, and dimoxystrobin) were evaluated in four different matrices (tomato, citrus, cotton, and rice). A full factorial design (2^3) was utilized, considering the extraction techniques (Ultra Turrax and vortex mixer), sample mass (0.20 g and 2.50 g), and mass/sample volume ratio (1:8 and 1:20). The results obtained indicated that, even with small sample masses, comparable standard deviations were achieved compared to conventional methods. Furthermore, the mass/sample volume ratio showed low significance in the variation of results for the tested levels. Although some variables, such as sample mass and equipment, presented significant effects, these effects were within the expected variability for pesticide analyses. Additional experiments were performed to validate the applicability of miniaturization and automation of the analytical methods.

Keywords: DoE, miniaturization, pesticide analysis, automation

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.1.1. AGROTÓXICOS	2
1.1.2. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	3
1.1.3. REGULAMENTAÇÃO DOS AGROTÓXICOS NO BRASIL	6
1.1.4. MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	8
1.1.5. PREPARO DE AMOSTRA	10
1.1.6. MINIATURIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	15
1.1.7. PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^k	17
1.1.8. ANÁLISE DE VARIÂNCIA COM UM FATOR – ANOVA	18
1.1.9. TESTE DE TUKEY	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVOS GERAIS	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. PARTE EXPERIMENTAL	22
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1.1. MATERIAIS	22
3.1.2. MÉTODOS	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. AVALIAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DAS AMOSTRAS	41
4.2. RESULTADOS EMPREGANDO O PLANEJAMENTO FATORIAL.....	45
4.3. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO	66
4.4. TESTE DE TUKEY	69
4.5. DIFERENÇA PERCENTUAL	78
5. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA MINIATURIZADA	85
5.1 PARTE EXPERIMENTAL	86
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	86
5.2.1. MATERIAIS	86
5.2.2. MÉTODOS	90
5.4 RESULTADO E DISCUSSÃO	95
6. CONCLUSÃO	101
7. REFERÊNCIAS	103

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por métodos analíticos mais rápidos, econômicos e sustentáveis impulsiona a melhoria dos procedimentos clássicos para a análise de resíduos de pesticidas em alimentos e solo. Embora muitos métodos tradicionais utilizados na indústria agroquímica e por laboratórios públicos e privados incorporem técnicas instrumentais modernas para a separação, a detecção e a quantificação de analitos, a preparação das amostras ainda é frequentemente realizada por métodos manuais e tediosos. Isso retarda e encarece o processo analítico como um todo. Há, portanto, a necessidade de métodos analíticos cada vez mais rápidos, de baixo custo e que utilizem menores quantidades de solvente e em contrapartida apresentem resultados robustos e precisos.

A amostragem e a preparação de amostras são os primeiros passos em um procedimento analítico para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos, envolvendo a coleta e preparação das amostras, separação dos compostos alvo, quantificação, coleta de dados e avaliação dos resultados. Embora essas etapas sejam cruciais para obter resultados precisos, sua importância tem aumentado à medida que a indústria agroquímica e laboratórios reguladores passam a adotar métodos miniaturizados e automatizados de alto rendimento, que requerem porções de amostras cada vez menores para a extração dos compostos alvo na matriz.

Se as porções de amostra tomadas para análise não representarem adequadamente como um todo a amostra original de onde essa porção foi retirada, todos os custos, tempo e esforços envolvidos na análise e implementação de métodos automatizados sofisticados podem ser desperdiçadas e produzir resultados incorretos (LEHOTAY e COOK, 2015).

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. AGROTÓXICOS

Como consequência do grande crescimento da população mundial, observa-se uma diminuição das áreas utilizadas para o cultivo agrícola. Além disso, este crescimento populacional está relacionado com um crescente aumento na busca por alimentos. Esta crescente demanda por alimentos tem impulsionado o desenvolvimento de sistemas agrícolas cada vez mais eficazes. Neste sentido, o uso de agrotóxicos utilizados para o controle de pragas durante o cultivo e após a colheita tornou-se uma importante ferramenta na busca pelo aumento e qualidade da produção agrícola (CHIARADIA, 2009).

Os agrotóxicos são substâncias químicas, físicas ou biológicas manufaturadas para a utilização na agricultura, visando prevenir ou reduzir efeitos causados por pragas consideradas nocivas, preservando-a da ação danosa das mesmas (SILVA, 2004).

A ação dos agrotóxicos ocorre por meio de um ingrediente ativo, responsável por interferir na atividade biológica de organismos sensíveis. A produção comercial começa com a síntese desse composto, cuja pureza e perfil de impurezas são definidos pelo processo químico adotado. O material obtido nessa etapa é denominado produto técnico, que servirá de base para a formulação do agrotóxico a ser aplicado no campo. Na formulação, são adicionados adjuvantes e outros componentes que favorecem a dispersão, aderência e eficácia do ingrediente ativo nas plantas-alvo. O resultado é o formulado comercial, uma mistura pronta para uso nas lavouras (PELAEZ, 2010).

O Brasil por sua extensa área territorial, aliado a um clima diversificado e favorável para a plantação de diversas culturas, é um dos maiores produtores e exportadores agrícolas do mundo, e devido a isto, existe um controle muito grande com a utilização de agrotóxicos.

1.1.2. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Segundo o decreto federal Brasileiro nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 que trata sobre esse grupo de substâncias/agentes no Brasil e "dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências", define agrotóxicos como:

“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, 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 de produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Os agrotóxicos são definidos como substâncias que agem direta ou indiretamente em um organismo vivo, podendo matá-lo ou controlá-lo de alguma maneira, por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo (JARDIM, 2009) e compreende tanto o princípio ativo da substância teste, bem como seus metabólitos relevantes, quando aplicável. O uso inadequado de agrotóxicos pode gerar um alimento com teor de resíduo acima do aceitável e isso pode causar sérios prejuízos à qualidade do solo, saúde do agricultor, assim como a saúde do consumidor e por isso deve ser regulamentado por um órgão fiscal (CHIARADIA, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde, coordena o Sistema Nacional de Vigilância Toxicológica, regulamentando, analisando, controlando e fiscalizando produtos e serviços que

envolvam risco a saúde - agrotóxicos, componentes e afins e outras substâncias químicas de interesse toxicológico.

Entre outras funções, a ANVISA, realiza a avaliação toxicológica para fins de registro dos agrotóxicos e a reavaliação de moléculas já registradas; normatiza e elabora regulamentos técnicos e monografias dos ingredientes ativos dos agrotóxicos e é o órgão responsável por estabelecer os limites máximos de resíduos (LMR) para diversas culturas de alimentos que são cultivados e comercializados no Brasil. O LMR é a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim, oficialmente permitida no alimento, em decorrência da aplicação em uma cultura agrícola, expresso em miligramas do agrotóxico por quilo do alimento (mg/kg) (ANVISA, 2006).

Além disso, a ANVISA também possui entre outras funções mencionadas anteriormente, verificar se agrotóxicos não registrados estão sendo utilizados ilegalmente, investigar se os registrados estão sendo utilizados de forma inadequada e, obter dados mais confiáveis para a estimativa da ingestão diária de resíduos de agrotóxicos pela população, sendo informação fundamental para realizar o registro de novos defensivos agrícolas e/ou renovar o registro dos já existentes (BASTOS, 2007).

Os agrotóxicos podem ser classificados de diversas maneiras, como: pela classificação toxicológica, pela natureza da praga controlada, de acordo com a classe química, pelo modo de ação no organismo alvo, quanto aos efeitos que causa à saúde humana, entre outros.

De acordo com a classificação toxicológica: O novo marco regulatório da ANVISA, estabelecido como RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 294, de 2019, baseou os novos critérios de classificação dos agrotóxicos nas premissas do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS*), que atualizou e tornou melhor definido os critérios de avaliação e de classificação toxicológica de agrotóxicos no país, passando a ter regras harmonizadas com as de países da União Europeia e da Ásia, entre outros, fortalecendo a comercialização de produtos nacionais no exterior (BRASIL, 2019).

A classificação toxicológica dos agrotóxicos, afins e preservativos de madeira em uma das cinco categorias ou como Não Classificado é feita com

base na categoria mais restritiva atribuída aos resultados dos estudos de toxicidade oral aguda, cutânea ou inalatória. A classificação toxicológica dos produtos técnicos é feita em função de cada um dos desfechos toxicológicos avaliados. O Sistema GHS ampliou, de quatro para cinco, as categorias toxicológicas, além de incluir “não classificado”, válido para produtos de baixíssimo risco, como os pesticidas biológicos e os que não foram analisados.

A classificação em função da toxicidade aguda dos agrotóxicos, afins e preservativos de madeira deve ser determinada e identificada com os respectivos nomes das categorias e cores nas faixas do rótulo dos produtos, de acordo com o estabelecido abaixo na Tabela 1.

TABELA 1 – Classe de agrotóxicos em relação a sua classificação toxicológica

Categoria	Significado	Cor da faixa
Categoria 1	Extremamente tóxico	Vermelho
Categoria 2	Altamente tóxico	Vermelho
Categoria 3	Moderadamente tóxico	Amarelo
Categoria 4	Pouco tóxico	Azul
Categoria 5	Improvável de causar dano agudo	Azul
Não classificado	Não classificado	Verde

Fonte: Adaptado de MAPA, 2019.

De acordo com a natureza do alvo controlado: Os agrotóxicos podem ser classificados segundo a natureza da praga que irão combater.

Alguns dos principais tipos de agrotóxicos compreendidos nesta classificação são:

- a) Inseticidas: Utilizados no controle de insetos que se alimentam de cultivos agrícolas, causando danos a lavoura, como larvas, lagartas, pulgões, insetos sugadores, como percevejos, moscas brancas e insetos mastigadores como gafanhotos, entre outros;

- b) Acaricida: Alguns inseticidas não são eficazes para o combate de ácaros, e com isso, acaricidas são utilizados na prevenção de ácaros em geral;
- c) Fungicidas: Utilizados para controle de fungos causadores de doenças de plantas, como manchas foliares, ferrugens, entre outros;
- d) Herbicidas: Destinados ao controle de plantas daninhas, podendo possuir diferentes modos de ação e são classificados de acordo com sua função, podendo ser seletivos ou não seletivos:
 - a. Seletivos: atuam no combate as plantas daninhas e não causam efeitos nocivos drásticos à determinada cultura agrícola que esteja sendo cultivada (CARVALHO, 2013).
 - b. Não-seletivos: atuam no combate as plantas daninhas, porém, podendo causar efeitos nocivos drásticos na cultura agrícola que está sendo cultivada (CARVALHO, 2013).
- e) Nematicidas: Utilizados no controle de nematóides (vermes microscópios abundantes no solo e água) e que podem causar doenças em plantas como o nematóide-das-galhas (*Meloidogyne* sp.).
- f) Bactericidas: utilizados exclusivamente para combate a bactérias.

De acordo com a classe química: De acordo com sua natureza química, os agrotóxicos são agrupados conforme a semelhança das estruturas moleculares do princípio ativo que as constituem (MENDES *et al.*, 2019) e possuem uma ampla gama de distintos grupos químicos, tais como: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, triazóis, entre outros.

1.1.3. REGULAMENTAÇÃO DOS AGROTÓXICOS NO BRASIL

O registro dos agrotóxicos pelas instituições governamentais competentes trata-se de instrumento básico do processo de controle governamental sobre esses produtos, visando à importação, exportação, produção, transporte, armazenamento, comercialização e uso.

A Lei 7.802, aprovada em 1989 no Congresso Nacional, conhecida como a Lei dos Agrotóxicos, substituiu o Decreto 24.114 de 1934 e foi regulamentada

pelo Decreto 4.074 em 2002. Um dos principais avanços dessa legislação foi a implementação de regras mais rigorosas para a concessão de registro de agrotóxicos. Essa nova lei proibia o registro de novos agrotóxicos com ação tóxica superior à de produtos já existentes para o mesmo fim e permitia o cancelamento do registro a pedido de entidades representativas da sociedade civil (PELAEZ, 2010).

O Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, também estabelece as competências para os três órgãos envolvidos no registro: ANVISA, vinculada ao Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), vinculado ao Ministério do Meio Ambiente; e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2002).

Entre outras competências, cabe ao ministério da agricultura avaliar a eficiência e potencial de uso na agricultura, realizando uma avaliação de desempenho agrônômico, ao IBAMA avaliar o potencial do produto de causar algum impacto negativo ao meio ambiente através da avaliação ambiental e a ANVISA realizar a avaliação e classificação toxicológica dos produtos e determinar as condições na qual seu uso é seguro para o trabalhador e consumidor.

Culturas agrícolas são incluídas no registro de um agrotóxico com base em estudos de resíduos em campo, conduzidos segundo as boas práticas agrícolas (BPA). A partir da avaliação desses estudos, a Agência estabelece o LMR e o intervalo de segurança pretendido.

O Limite Máximo de Resíduos (LMR) é definido de forma conservadora com base em estudos de resíduos realizados em campo pelos solicitantes de registro de agrotóxicos. Esses estudos visam garantir a segurança alimentar, permitindo a comercialização de alimentos dentro de padrões seguros (CROPLIFE, 2023).

O LMR representa a quantidade máxima de resíduo permitida legalmente em alimentos, considerando a aplicação correta do produto na dose máxima recomendada em bula, conforme regulamentações da ANVISA (BRASIL, 2022).

Por definição, o nível de resíduos de um pesticida no alimento não deve ultrapassar o LMR uma vez que o produtor segue todas as indicações contidas no rótulo dos produtos. O consumo de alimentos contendo resíduos de pesticidas até o LMR não deve significar um risco para a saúde humana, embora não deva

ser considerado isoladamente como uma forma de proteção à saúde humana (JARDIM, 2012).

Após o processo de regulamentação do defensivo e seu registro pelo MAPA, o defensivo pode ser utilizado nos cultivos brasileiros.

O Decreto nº 10.833, de 7 de outubro de 2021 altera as regras sobre produção, pesquisa, registro, utilização, importação e exportação de agrotóxicos no país. Os principais objetivos do decreto consistem em reformular o processo de análise de registros, facilitar a pesquisa com agrotóxicos para viabilizar inovações tecnológicas e implementar ações para proteger os aplicadores de agrotóxicos. Este decreto altera o Decreto 4.074, de 2002, que regulamenta a Lei 7.802, de 1989 sendo as mudanças realizadas para atualizar dispositivos da legislação em função de avanços práticos e tecnológicos e na ciência ocorridos no setor (MAPA, 2021).

De acordo com LEHOTAY e COOK (2015), à medida que a segurança dos alimentos se torna cada vez um tema de interesse global, os fabricantes de agrotóxicos estão buscando registrar seus produtos em vários países e ter seus dados de resíduos aceitos pelos órgãos reguladores de todo o mundo, permitindo a livre comercialização de alimentos.

É importante que os métodos analíticos empregados nos estudos analíticos gerados para este fim demonstrem exatidão e precisão aceitáveis para uso em cálculos complexos de avaliação de riscos e análises estatísticas. Os reguladores que aplicam LMRs devem ter confiança de que os resultados analíticos relatados representam as verdadeiras concentrações de resíduos.

1.1.4. MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

Segundo o documento guia de métodos analíticos para resíduos de agrotóxicos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), os métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos são usados para geração de dados para estimar as avaliações da exposição alimentar, para estabelecer os LMRs e para determinar os fatores de processamento (OECD, 2007).

Estes métodos se aplicam a todos os agrotóxicos usados em cultivos comestíveis e pecuária, assim como para subseqüentes produtos processados, e para produtos derivados de animais que podem consumir alimentos tratados com agrotóxico (por exemplo, carne, leite, ovos) (OECD, 2007).

De acordo com normativas internacionais, como parte dos requisitos para a aprovação de substâncias ativas, as empresas devem submeter métodos analíticos como parte do processo de registro. Esses métodos são fundamentais para a avaliação de risco e dão suporte a estudos em diversas áreas, como toxicologia, ecotoxicologia, meio ambiente, resíduos em produtos vegetais e de origem animal, além de frações processadas.

Os métodos analíticos apresentados devem ser específicos, ou seja, desenvolvidos para detectar e quantificar um número limitado de ingredientes ativos, especialmente quando destinados ao registro de novos produtos.

Paralelamente, também é exigida a apresentação de métodos multirresíduos, capazes de abranger uma ampla gama de ingredientes ativos. Esses métodos são utilizados rotineiramente por laboratórios de monitoramento para verificar a conformidade dos alimentos com os Limites Máximos de Resíduos (LMRs) estabelecidos para diferentes matrizes, tanto vegetais quanto de origem animal (SANTE, 2023 e EPA, 1996).

Do ponto de vista da análise de resíduos de agrotóxicos, medir os níveis de traços de diferentes compostos em uma grande variedade de matrizes vegetais é uma tarefa desafiadora.

A determinação de resíduos de agrotóxicos desempenha um papel muito importante para a avaliação da exposição humana e do meio ambiente a esses compostos, permitindo avaliar a conformidade da produção com as boas práticas agrícolas, possibilitando decisões regulatórias comerciais visando garantir a segurança alimentar (PRESTES et al, 2009).

Segundo CHIARADIA (2009), os métodos de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos compreendem, basicamente, três principais etapas:

- 1) Amostragem, que deve ser representativa de um todo;
- 2) Preparo da amostra, isto é, a extração do analito da matriz com utilização de solvente, a remoção de co-extratos interferentes (*clean-up*) e conversão dos analitos em um derivado prontamente analisado, se aplicável, e concentração das amostras;

3) Separação e determinação dos analitos.

Nesta lista de etapas, cada uma tem seu próprio papel crucial para a realização de uma análise bem-sucedida.

De acordo com LICHON (1992), embora estas etapas possam auxiliar em uma análise de resíduos, elas também podem ser responsáveis pela inserção de erros, podendo ser minimizados e quantificados pela constante observação em todas as suas etapas, replicação das análises, inclusão de testes de recuperação, utilização de materiais de referência e utilização de padrões internos e/ou externos.

Diversos fatores devem ser considerados na escolha do método analítico para determinação de resíduos de agrotóxicos. Um deles é a complexidade da matriz, como alimentos ricos em lipídeos, proteínas ou pigmentos, que podem exigir etapas adicionais de purificação. Outro fator importante é a necessidade de alta sensibilidade, especialmente quando se busca detectar resíduos em níveis de traço (ppm ou ppb), o que demanda equipamentos precisos e cuidados rigorosos com a descontaminação dos materiais utilizados. Além disso, é essencial definir claramente qual resíduo será determinado, se o ingrediente ativo original ou seus metabólitos relevantes.

A diversidade das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos também influencia diretamente na escolha do método. Por exemplo, Midio (1997) destaca que a variabilidade entre compostos pode exigir abordagens analíticas distintas, mesmo dentro de uma mesma classe de pesticidas.

1.1.5. PREPARO DE AMOSTRA

Os resíduos de agrotóxicos estão presentes em baixas concentrações, na ordem de partes por bilhão (ppb) e partes por trilhão (ppt), além de estarem em matrizes complexas, como por exemplo compostos vegetais. Assim, o preparo adequado das amostras torna-se fundamental para análises seletivas, eficientes e com resultados confiáveis.

Alguns dos principais objetivos do preparo da amostra está na etapa de extração e concentração dos analitos de interesse, assim como na eliminação, tanto quanto possível, de interferentes provenientes da matriz. Perdas de analito nesta etapa podem comprometer o resultado das análises. Desta maneira, o

preparo da amostra é uma etapa crucial dentro de todo o processo analítico (OSMAR et al., 2009).

Abaixo, alguns dos fatores a serem considerados, mas não limitados a estes, para etapa de preparo de amostra são:

Processamento da amostra: Como forma de garantir uma maior eficiência do procedimento de preparo de amostra, geralmente, é utilizada a menor quantidade possível de amostra, desde que seja garantido a representatividade estatística ao resultado (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). De uma forma geral, as amostras sólidas, como a maioria dos alimentos, requerem etapas mais complexas e exaustivas durante seu preparo (PRESTES, 2009).

Segundo LEHOTAY et al. (2020), assim como uma corrente é tão forte quanto o seu elo mais fraco, a etapa de processamento da amostra na análise de resíduos de pesticidas em alimentos é igualmente importante como qualquer outra etapa do método geral.

O processamento da amostra inclui procedimentos como corte, trituração e mistura, utilizados para tornar a amostra analítica aceitavelmente homogênea em relação à distribuição do analito, antes da retirada de uma porção analítica para análises, devendo essa etapa ser projetada para evitar a indução de mudanças na concentração do analito. O tamanho da porção analítica a ser utilizada para o método analítico dependerá do processo e eficiência da etapa de homogeneização.

No caso de frutas e vegetais, a homogeneização criogênica (por exemplo, usando gelo seco ou nitrogênio líquido) é altamente recomendada para aumentar o grau de homogeneidade da amostra, por meio da redução do tamanho de partícula da amostra e, assim, reduzir a variação da sub-amostragem, auxiliando na extração de resíduos e reduzindo variabilidade nas análises (FUSSELL, 2016 e LEHOTAY et al, 2020).

O processamento criogênico requer que a amostra seja congelada, geralmente a -20 °C ou inferior, antes de ser desintegrada em um pó fino na presença de gelo seco (CO₂ sólido) ou nitrogênio líquido. Ao reduzir a temperatura em que as amostras laboratoriais são fragmentadas, é possível retardar as reações potenciais entre os resíduos de pesticidas presentes nas amostras e substâncias/enzimas liberadas quando as células das plantas são rompidas, minimizando as perdas de pesticidas (FUSSELL et al., 2007).

A homogeneização das amostras congeladas (com adição de gelo seco ou nitrogênio líquido) é requisito da maioria das normativas internacionais para submissão de estudos para fins de registro, visando garantir a homogeneidade e integridade da amostra durante período de armazenamento até a análise (EPA, 1996, OECD, 2007 e ANVISA, 2012).

No entanto, para maioria dos laboratórios de monitoramento este não é um requisito obrigatório, sendo as amostras homogeneizadas em temperatura ambiente ou resfriadas, salvo quando houver evidência de que este procedimento possa causar uma influência significativa na degradação dos compostos de interesse (SANTE, 2021).

Geralmente, a fragmentação das amostras à temperatura ambiente pode levar a grandes perdas para agrotóxicos sensíveis à temperatura, além de também resultar em um grau insuficiente de cominuição, impedindo assim a extração de resíduos contidos nas partículas remanescentes. Além disso, o grau de homogeneidade alcançado neste tipo de preparo não é tão eficiente quanto no processamento criogênico, fazendo-se necessário o uso de quantidades maiores de amostra para análise e/ou o utilização de equipamentos que possam auxiliar numa maior trituração das amostras durante a primeira etapa de extração, como o Ultra-Turrax/Polytron, de maneira a minimizar estes problemas (FUSSELL, 2016).

Extração: A etapa de extração é considerada uma das mais críticas na análise de resíduos de agrotóxicos, pois influencia diretamente a precisão e a exatidão da quantificação.

Trata-se do processo responsável por isolar os compostos de interesse da matriz amostral, geralmente por meio do uso de solventes apropriados em contato com a amostra por um tempo determinado. O rendimento dessa etapa pode ser afetado por diversos fatores, como o tipo de solvente utilizado, o tempo e a temperatura de extração, além do sistema de agitação empregado. Idealmente, o método deveria extrair todos os analitos de interesse sem coextrair substâncias interferentes (SANTE, 2022).

No entanto, esse cenário é considerado idealizado e raramente alcançado na prática. Segundo Santana-Mayor et al (2023), mesmo métodos amplamente utilizados, como o QuEChERS, exigem etapas adicionais de purificação para garantir seletividade e sensibilidade adequadas

A escolha de um método de extração adequado é essencial para garantir a eficiência e a confiabilidade na análise de resíduos de pesticidas. Para métodos multirresíduos, é desejável que o procedimento seja capaz de extrair compostos com diferentes polaridades, abrangendo um amplo espectro de ingredientes ativos

Além disso, a seletividade do método durante a extração é um critério importante, pois interfere diretamente na pureza do extrato e, conseqüentemente, na precisão da quantificação. A compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, como LC-MS/MS e GC-MS, também é um requisito técnico relevante para garantir a aplicabilidade do método em diferentes contextos laboratoriais (SANTE, 2022).

A maioria dos métodos analíticos emprega blenders durante a etapa de extração, como o Ultra-turrax/Polytron. No entanto, o processo de agitação utilizando um Vórtex apresenta diversas vantagens em comparação a essa técnica. Entre os benefícios, destaca-se a possibilidade de realizar a extração em campo, a execução em frascos fechados, que elimina a exposição do analista, e a redução dos riscos de contaminação cruzada, uma vez que não há necessidade de lavar o homogeneizador entre as extrações, permitindo o uso de frascos descartáveis, conforme apontado por OSMAR et al. (2009). Além disso, a técnica com Vórtex facilita a automação do procedimento, tornando-o mais eficiente e seguro.

De acordo com a normativa SANTE/2017/10632 Rev.04 de fevereiro de 2022, a validação de rotina dos métodos analíticos de resíduos envolve testes de recuperação e precisão realizados com amostras fortificadas. Em geral, observa-se uma alta recuperação e boa precisão nesses testes.

No entanto, esse procedimento não fornece evidências suficientes sobre a eficiência da extração de resíduos que estão efetivamente incorporados na amostra. Isso ocorre porque os resíduos de agrotóxicos podem ser absorvidos pela matriz vegetal, em vez de estarem apenas superficialmente impregnados. Portanto, é essencial a utilização de técnicas comprovadamente eficazes para a extração desses resíduos, garantindo resultados mais representativos e confiáveis.

A formação de conjugados ou a incorporação na matriz vegetal pode ser uma razão pela qual os resíduos de pesticidas incorridos não são facilmente

acessíveis durante a extração. Desta forma, a demonstração da eficiência da extração não pode ser realizada simplesmente pela validação do método de rotina com experimentos de fortificação, devendo ser avaliada com amostras contendo resíduos incorridos.

A eficiência da extração é essencial para garantir resultados confiáveis na análise de resíduos de agrotóxicos. Para que o grau de contaminação seja corretamente estimado, os compostos devem ser completamente removidos da matriz amostral. Esse processo depende da escolha adequada do solvente, do preparo da amostra e da metodologia empregada (MASTOVSKÁ; LEHOTAY, 2004). O uso de agrotóxicos radiomarcados em associação com o produto técnico garante resultados relativamente rápidos e de alta precisão no monitoramento de todas as etapas de análise.

O regulamento da Comissão (EU) nº 283/2013 estabelece a necessidade de apresentar dados que demonstrem a eficiência de extração dos compostos de interesse a serem analisados e que serão submetidos para fins de registro.

Esses dados são geralmente fornecidos pelas empresas que solicitam novos registros ou a manutenção de registros de ingredientes ativos. As informações são baseadas em estudos de metabolismo realizados com compostos radiomarcados ou em extrapolações para outros solventes e procedimentos de extração.

A validação da eficiência de extração é feita por meio de uma comparação entre a quantidade de resíduos extraídos de uma amostra e os resíduos incorporados, utilizando o método de extração proposto em relação ao procedimento comprovadamente eficaz obtido nos estudos de metabolismo. Essa abordagem assegura que os dados apresentados sejam representativos e relevantes para a análise dos compostos em questão.

Purificação: A complexidade da composição dos alimentos ocasiona dificuldades para a determinação dos agrotóxicos, tornando necessária e essencial em muitos métodos a etapa de purificação (*clean-up*) do extrato, após extração com solvente, de maneira a promover a robustez e confiabilidade dos resultados obtidos.

É nesta etapa que os interferentes são eliminados ou reduzidos, bem como o efeito matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção técnica do sistema cromatográfico. Segundo a IUPAC (1989), efeito matriz é definido como

“o efeito combinado de todos os componentes da amostra, exceto o analito, na medição da quantidade”, sendo que um dos grandes desafios da etapa de purificação é superar ou reduzir estes efeitos da matriz durante etapa de quantificação dos resultados.

1.1.6. MINIATURIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A preparação de amostra é considerada a fase mais poluente em métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos devido a grandes quantidades de solventes orgânicos que são empregados durante as etapas de extração e purificação dos métodos analíticos e que são muitas vezes nocivos para o ser humano e meio ambiente (STOCKA et al, 2011).

Embora cada vez mais estejam sendo estudadas e desenvolvidas técnicas de miniaturização de métodos analíticos, atualmente ainda é relativamente comum encontrar métodos que utilizam centenas de mililitros de solvente para etapa de extração de amostras (LEHOTAY et al, 2020).

Segundo a RDC Nº 4, de 18 de janeiro de 2012, para fins regulatórios, geralmente amostras de campo contendo pelo menos 1 kg devem ser coletadas e processadas para obter determinações de pesticidas que correspondam com precisão ao lote original da amostra. Portanto, o procedimento de fragmentação deve produzir efetivamente porções de teste para análises que sejam representativas da amostra original.

De acordo com LEHOTAY (2020), antes da década de 90, o tamanho típico da porção de teste tomada para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos era de 50g a 100 g, na qual foi reduzido para 25g a 30 g durante a década de 1990 e com a implementação do método QuEChERS na década de 2000, o tamanho da porção de amostra tomada para as análises foi reduzido ainda mais para 10 a 15 g, embora existam diversos trabalhos envolvendo a miniaturização do método QuEChERS chegando a poucos miligramas de amostras para os mais variados tipos de matrizes (IZACARA et al., 2020; DUFOUR et al. 2021; SCHANZER et al. 2021).

Segundo DE LA GUARDIA e ARMENTA (2010), o uso de métodos verdes e rápidos de preparação de amostras é um grande problema no campo da química analítica, sendo o motivo óbvio a redução de custos em termos de

reagentes, solventes e tempo. Desta forma, uma tendência na química analítica é o desenvolvimento de sistemas miniaturizados. O termo miniaturização é realmente aplicável às técnicas de detecção, separação e preparação de amostras (RÍOS et al., 2006). Do ponto de vista da preparação da amostra, as técnicas convencionais de pré-tratamento estão sendo cada vez mais substituídas por alternativas miniaturizadas que apresentam vários benefícios quando comparadas com as técnicas clássicas de extração.

Pelo menos três opções mais sustentáveis estão disponíveis para o analista:

- (a) extração sem solvente ou virtualmente sem solvente;
- (b) uso de solventes menos nocivos e;
- (c) uso de auxiliares de extração.

Nas duas últimas opções, o uso de água superaquecida ou a aplicação de micro-ondas podem representar alguns exemplos válidos. No entanto, a primeira opção se tornou a mais difundida. A redução ou eliminação completa de solventes é uma característica distintiva das técnicas miniaturizadas, que além de melhorar o “verde” da análise, também são econômicas (COSTA, 2014).

RITER e WUJCIK (2018) descreveram ganho significativos de eficiência no processo de análise de resíduos de glifosato em matrizes vegetais, por meio do desenvolvimento e validação de um processo de moagem fina em duas etapas, no qual se produziu uma amostra uniforme e consistente que pode ser medida de forma reprodutível com porções de teste de 75 mg. Este tamanho de amostra, permitiu a pesagem direta da amostra em um formato de micro placas compatível com sistemas automatizados (Tomtec Quadra 4).

Desta forma, atendendo aos requisitos da chamada “química verde”, a miniaturização da etapa de extração de um método analítico para determinação de resíduos de agrotóxicos, pode auxiliar na sensibilidade e a seletividade dos métodos analíticos, reduzir consumo de solvente, viabilizar automação e simplificação dos métodos e conseqüentemente minimização de erros, maior agilidade e redução de custo dos processos.

1.1.7. PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^k

A extração da amostra é considerada como uma das etapas essenciais na análise de resíduos de agrotóxicos, pois fornece a base para a detecção dos pesticidas em níveis de traços.

Vários fatores precisam ser otimizados durante a extração de pesticidas devido à complexidade da matriz, o que é demorado e tedioso. Portanto, o uso de um planejamento fatorial no processo de otimização e validação da condição apropriada para uso se mostra eficaz com um mínimo de experimentos e custo, tendo sido utilizado por diversos autores para desenvolvimento de métodos analíticos (PASSEPORT et al, 2010; GOULART et al., 2010; FRIEDRICH et al., 2016 e CABRERA et al., 2016).

Conforme descrito por NARENDERAN et al. (2019), as estratégias convencionais para otimização do método de extração por meio de abordagem univariada possui algumas desvantagens, como fornecer resultados ineficientes, visto que fornecem apenas o ajuste apenas de uma variável buscando uma condição ótima. O método tradicional também ignora a interação entre vários fatores durante o processo de extração e requer múltiplas execuções desnecessariamente.

Uma técnica multivariada é rotineiramente aplicada para otimizar as diferentes condições de trabalho em vários processos de extração, a fim de melhorar seu desempenho. Os planejamentos fatoriais são considerados os mais eficientes para identificar e otimizar os fatores significativos para alcançar um resultado competente, devido às suas vantagens, como fornecer informações precisas com um número mínimo de experimentos, identificar as interações entre os fatores e permitir otimizações de várias respostas (AMIRAT et al, 2016).

Um planejamento fatorial é uma configuração de teste que avalia vários fatores em um número determinado de níveis em um número pré-definido de experimentos para otimizar o processo de extração. O planejamento de experimentos se deve a Ronald A. Fisher, que durante alguns anos foi responsável pela parte estatística e análises de dados na Estação Agrícola Experimental em Londres – Inglaterra e que desenvolveu e usou pela primeira

vez a técnica de ANOVA (*Analysis of variance*) como ferramenta para análise estatística do projeto experimental (MONTGOMERY, 1991).

O planejamento fatorial completo é uma abordagem experimental que envolve a realização de uma série de testes nos quais se introduzem variações deliberadas nas variáveis de entrada (inputs) do processo. Essa metodologia permite identificar os efeitos dessas mudanças nas respostas ou variáveis de saída (outputs). Ao manipular sistematicamente as condições experimentais, o planejamento fatorial completo possibilita uma análise abrangente das interações entre as variáveis, contribuindo para uma melhor compreensão do sistema em estudo e para a otimização dos processos envolvidos.

MONTGOMERY (1991) citado por GALDAMEZ (2002), descreve que as técnicas de planejamento fatorial são utilizadas para melhorar as características de qualidade dos produtos ou processos de fabricação, reduzir o número de testes e otimizar uso de recursos da empresa, enquanto que de acordo com BUTTON (2001), o objetivo geral pode ser dividido em outros objetivos secundários:

- Identificação das variáveis (fatores de controle) do processo que apresentam maior influência nos parâmetros de resposta;
- Atribuição de valores às variáveis influentes do processo de modo que a variabilidade da resposta de interesse seja mínima ou que o valor do resultado (parâmetro de qualidade) seja próximo do valor nominal;
- Atribuição de valores às variáveis influentes do processo de modo que o efeito das variáveis não controláveis seja reduzido.

O planejamento fatorial 2^k é uma técnica de projeto experimental que envolve a investigação de múltiplos fatores em dois níveis, alto (+1) e baixo (-1), onde k é o número de variáveis estudadas. Com essa abordagem é possível analisar efeitos dos fatores principais, bem como suas interações utilizando-se de um número relativamente pequeno de experimentos.

1.1.8. ANÁLISE DE VARIÂNCIA COM UM FATOR – ANOVA

Quando comparamos grupos, além de considerar a distribuição e a relação entre os grupos, também devemos levar em conta o número de grupos ou fatores a serem comparados. Quando a análise envolve comparar três ou

mais grupos, supondo que exista a normalidade dos dados, podemos realizar uma análise de variância (ANOVA). A ANOVA é uma generalização do teste t de Student, onde as variáveis categóricas devem ser selecionadas como fatores do modelo. Cada nível do fator pode ter um efeito diferente sobre a variável dependente.

O objetivo da ANOVA é verificar se há diferença significativa entre pelo menos duas médias dos grupos. Para isso, a ANOVA considera como hipótese nula (H_0) que não há diferença entre as médias dos grupos ($\mu_A = \mu_B = \dots = \mu?$) e, como hipótese alternativa (H_A), que há diferença entre pelo menos duas das médias dos grupos ($\mu_A \neq \mu?$). Desta forma, se não rejeitamos a H_0 ($p > 0,050$), concluímos a análise de que não há evidências significativas de diferença entre as médias dos grupos (MCHUGH, 2011).

1.1.9. TESTE DE TUKEY

A análise de variância (ANOVA) tem sido uma ferramenta importante para pesquisadores que conduzem estudos com múltiplos grupos experimentais e um ou mais grupos de controle. No entanto, a ANOVA não fornece informações detalhadas sobre as diferenças entre os vários grupos de estudo, ou sobre combinações complexas de grupos de estudo. Quando a hipótese nula (H_0) é rejeitada após a ANOVA, não é possível afirmar como um grupo difere de um determinado grupo. O resultado da ANOVA não fornece informações detalhadas sobre as diferenças entre várias combinações de grupos (MCHUGH, 2011).

Portanto, análises adicionais para esclarecer as diferenças entre pares específicos de grupos experimentais devem ser realizadas, sendo necessário aplicar o 'teste de comparação múltipla' (MCT), também é chamado de 'teste post-hoc', tais como o Teste de Tukey.

Este teste utiliza testes post-hoc de comparação em pares para determinar se há diferença entre a média de todos os pares possíveis usando uma distribuição de alcance studentizado. Este método testa todos os pares possíveis de todos os grupos.

Inicialmente, o teste de Tukey era chamado de teste de 'diferença significativa honesta' ou simplesmente 'teste T', porque esse método era baseado na distribuição t. É importante observar que o teste de Tukey é baseado

no mesmo número de amostras entre os grupos (dados equilibrados) que a ANOVA. Posteriormente, Kramer modificou esse método para aplicá-lo em dados não equilibrados, e ficou conhecido como teste de Tukey-Kramer. Este método utiliza a média harmônica do tamanho da célula das duas comparações. As suposições estatísticas da ANOVA devem ser aplicadas ao método de Tukey também (LEE e LEE, 2018).

Para proceder ao teste de Tukey, é preciso calcular a diferença mínima que deve haver entre duas médias para que elas possam ser consideradas diferentes ao nível de significância α . Para obter o valor da diferença honestamente significativa (Δ ou HSD) pelo teste de Tukey é preciso calcular:

$$HSD = q_{k,gl,\alpha} \sqrt{\frac{QMR}{r}}$$

Onde:

$q(k,gl,\alpha)$ = é denominado amplitude estudentizada e é encontrado na tabela de amplitude estudentizada q , ao nível de significância α , para k tratamentos e gl graus de liberdade do resíduo da ANOVA.

QMR = é o quadrado médio do resíduo da análise de variância;

r = é o número de repetições de cada um dos grupos.

Além disso, temos o método Tukey-Kramer, que foi desenvolvido para os casos em que os grupos em comparação têm tamanhos diferentes. Nesses casos, faz-se necessário ajustar o procedimento à situação (substituir r por r_i e r_j).

Para proceder ao teste de Tukey-Kramer, é preciso assumir que as populações têm variâncias iguais. Portanto, o quadrado médio do resíduo (QMR), obtido na ANOVA, é a estimativa da variância da variável.

O valor da diferença mínima significativa (d_{ij}) entre as médias de dois grupos de tamanhos r_i e r_j (d_{ij}), pelo teste de Tukey-Kramer, é dado por:

$$d_{i,j} = q_{\alpha(k,n-k)} \sqrt{\frac{QMR}{2} \left(\frac{1}{r_i} + \frac{1}{r_j} \right)}$$

Encontra-se o valor $q(k,gl,\alpha)$, denominado amplitude estudentizada, na tabela de amplitude estudentizada q . Procure na tabela, no nível de

significância a , o valor de q para k grupos e os graus de liberdade do resíduo da análise de variância. QMR é o quadrado médio do resíduo da análise de variância e r_i e r_j são os números de repetições de cada um dos grupos em comparação.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar empregabilidade de miniaturização da etapa de extração de métodos analíticos para análise de resíduo de pesticidas em alimentos de maneira a reduzir uso de solventes e viabilizar a implementação de métodos automatizados.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos de distintas variáveis empregadas durante a etapa de extração de resíduos de pesticidas em alimentos sobre a resposta do nível de resíduo encontrados.
- Avaliar o impacto da repetitividade dos resultados de resíduos durante análises utilizando distintas variáveis na etapa de extração.
- Implementar procedimento de análise para as combinações analitos/matrizes em LC-MS/MS.
- Realizar comparação estatística dos resultados obtidos por meio das análises utilizando o método original em comparação aos métodos miniaturizados.
- Validar os resultados por meio de comparações adicionais com maior range de m analitos/matrizes.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Nos próximos itens, estão descritos todos os materiais que foram utilizados para a realização da primeira parte desta dissertação, para condução do planejamento fatorial completo 2^3 , ANOVA fator único e teste de Tukey, tais como equipamentos, solventes, soluções, padrões e métodos analíticos, vidrarias e softwares, entre outros, os quais foram imprescindíveis para a realização desta pesquisa.

Toda a fase experimental deste projeto foi realizada no laboratório global de segurança ambiental e do consumidor (GENCS – Global Environmental and Consumer Safety Laboratory) da BASF S.A., situado em Guaratinguetá/SP. O laboratório forneceu toda a infraestrutura, equipamentos, materiais e recursos necessários para a execução do projeto.

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1. MATERIAIS

3.1.1.1. *Reagentes e Solventes*

Foram utilizados os seguintes reagentes e solventes para condução desta fase experimental:

- Água ultra-pura grau 1 obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore® Elix 05, Integral);
- Ácido clorídrico 37%, Merck
- Ácido fórmico, Merck
- Acetonitrila, J.T. Baker
- Ciclohexano, J.T.Baker
- Hidróxido de sódio, Mallinckrodt

3.1.1.2. *Misturas de soluções*

Foram preparadas as seguintes soluções para utilização durante condução da fase experimental analítica:

- Fase móvel A: 0,1% ácido fórmico em água
- Fase móvel B: 0,1% ácido fórmico em metanol / 0,1% ácido fórmico em acetonitrila
- Solução ácido clorídrico 2 mol/L: 85 mL de HCl 37% qsp 500 mL água
- Solução de hidróxido de sódio 0.2 mol/L: 2g hidróxido de sódio qsp 250 mL água
- Solução de extração: Metanol/Água/HCl 2 mol/L (70/25/5, v/v/v)
- Solução de diluição final: Metanol/Água (50/50, v/v)

3.1.1.3. *Padrões Analíticos*

Os padrões analíticos utilizados estão descritos abaixo e foram fornecidos pela BASF SE:

- Nome Comum: Mefentrifluconazole
- BAS Code: BAS 750 F
- Pureza: 99,7%
- Lote: 5834378
- Data de validade (dd/mm/aaaa): 01/04/2031

- Nome Comum: Piraclostrobina
- BAS Code: BAS 500 F
- Pureza: 100%
- Lote: L2017-012
- Data de validade (dd/mm/aaaa): 01/02/2025

- Nome Comum: Teflubenzurom
- BAS Code: BAS 309 I
- Pureza: 99,8%
- Lote: L76-78
- Data de validade (dd/mm/aaaa): 01/03/2027

- Nome Comum: Fluxapiroxade
 - BAS Code: BAS 700 F
 - Pureza: 99,9%
 - Lote: L80-170
 - Data de validade (dd/mm/aaaa): 01/09/2028
-
- Nome Comum: Dimoxistrobina
 - BAS Code: BAS 505 F
 - Pureza: 99,7%
 - Lote: 01171-55
 - Data de validade (dd/mm/aaaa): 01/02/2026
-
- Nome Comum: Boscalida
 - BAS Code: BAS 510 F
 - Pureza: 99,0%
 - Lote: L71-168
 - Data de validade (dd/mm/aaaa): 01/12/2029

3.1.1.4. *Preparo das Soluções Padrões*

Soluções padrão estoque foram preparados para cada um dos padrões analíticos na concentração de 1 mg/mL em metanol e armazenadas a 5 ± 3 °C, com exceção do preparo da solução padrão estoque de teflubenzurom que foi preparado em acetonitrila devido melhor solubilidade do ativo neste solvente.

A partir da solução padrão estoque, foram preparadas soluções padrões de fortificação nas concentrações de 10.000 ng/mL e 100 ng/mL em metanol, contendo a mistura de mefentrifluconazole, piraclostrobina, teflubenzurom, fluxapiroxade, dimoxistrobina e boscalida.

Por fim, a partir desta soluções de fortificação foram preparadas as soluções de trabalho (calibração) em metanol/água (50/50, v/v). A denominação dessas soluções de calibração, forma de preparo e a concentração correspondente a cada solução são apresentadas na Tabela 2:

TABELA 2 – Preparo de soluções de calibração

Concentração Inicial (ng/mL)	Aliquota (mL)	Volume final (mL)	Código solução calibração	Concentração Final (ng/mL)
100	0,40	20	SPC E	2,00
100	0,20	20	SPC D	1,00
100	0,10	20	SPC C	0,500
2,00	2,00	20	SPC B	0,200
2,00	1,00	20	SPC A	0,100
2,00	0,40	20	SPC F	0,0400
2,00	0,20	20	SPC G	0,0200

3.1.1.5. Formulações

Para condução da fase experimental e campo foram utilizados os seguintes produtos formulados:

- Nome comum: SPOT® SC
- Nome comum dos ingredientes ativos: Dimoxistrobina e Boscalida
- Classe agronômica: Fungicida
- Grupo químico: Estrubilurina e Anilida
- Tipo de formulação: Suspensão concentrada (SC)
- Composição: 200 g/L e 200 g/L
- Lote: 0026078732
- Data de validade (dd/mm/aaaa): 12/07/2027

- Nome comum: IMUNIT®
- Nome comum dos ingredientes ativos: Alfacipermetrina e Teflubenzurom
- Classe agronômica: Inseticida
- Grupo químico: Piretróide e benzoiluréia
- Tipo de formulação: Suspensão concentrada (SC)
- Composição: 75 g/L e 75 g/L
- Lote: 031-22-09500
- Data de validade (dd/mm/aaaa): 09/12/2025

- Nome comum: BELYAN®
- Nome comum dos ingredientes ativos: Mefentrifluconazole, Piraclostrobina e Fluxaproxade
- Classe agronômica: Fungicida
- Grupo químico: Triazol, Estrobilurina e Carboxamida
- Tipo de formulação: Suspensão concentrada (SC)
- Composição: 133,3 g/L, 177,8 g/L e 88,9 g/L
- Lote: FD-220331-1012
- Data de validade (dd/mm/aaaa): 30/04/2024

3.1.1.6. Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados para etapa de avaliação do tamanho de partícula das amostras homogeneizadas:

- Mastersizer 2000, Malvern Instruments®
- Balança semi analítica PG 5002-S, Mettler Toledo®
- Placa aquecedora em cerâmica com agitação C-MAG HS7 Digital, IKA® e barras magnéticas (peixinho) para agitação

Durante condução da etapa experimental para condução dos experimentos estatísticos como planejamento fatorial completo 2^3 , ANOVA fator único e teste de Tukey, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança semi-analítica PG 5002-S, Mettler Toledo®
- Balança analítica XS205DU, Mettler Toledo®
- Pipetas automáticas de volumes diversos (M10, M25, M100, M250, M1000), Gilson®
- Pipetas automáticas *Research Plus* 0.5-5 mL e 1-10 mL, Eppendorf®
- Sistema Milli-Q Elix 05 Integral, Millipore®
- Mesa agitadora MS2 Minishaker, IKA®
- Concentrador de amostras TurboVap LV, Zymark®

- Agitador Ultra-Turrax® HS 501 Digital (tipo Polytron), IKA®
- Agitador Ultra-Turrax® Tube Drive, IKA®
- Banho de ultrassom USC 1800, Unique®
- Centrifuga Rotina 380, Hettich®
- Dispenser de Líquidos Dispensette III, Brand®
- Agitador mecânico VX-2500 Milti Tube Vortexer, VWR®
- Hamilton Microlab STAR Liquid handling System, Hamilton®

Também foi utilizado cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas.

O cromatógrafo líquido modelo ExionLC da Sciex® é composto por organizador de amostras e injetor automático modelo *AD Multiplate Sampler* (5036655), forno de coluna modelo *AC Column Oven 240V* (5036660), bombas binárias modelo *AD Pump* (5036653), válvula seletora de solvente modelo *Selection valve* (5036647), Desgaseificador modelo *Dessager* (5036646) e Controladora modelo *Controller* (5036643).

O espectrômetro de massas modelo Triple Quad 6500+ da Sciex® é composto por analisador de massas triplo quadrupolo e fonte de ionização por eletrospray. O controle entre cromatógrafo líquido e espectromêtro de massas é realizado pelo Software Analyst (versão 1.6.3). Foi empregada as colunas analíticas Betasil® C18 (100 x 2,1 mm, 5µm) da Thermo Scientific® e Xselect® HSS T3 (100 x 2,1 mm, 2,5µm) da Waters®.

Para etapa de extração e purificação das amostras foram utilizadas vidrarias de uso comum de laboratório (tais como béqueres, tubos de ensaio, provetas, entre outros) além de consumíveis como tubos de 15mL e 50mL Falcon™, tubo micronic 6mL, frascos de polipropileno de 250 mL, filtros de membrana de celulose regenerada (0,22µm de poro, Sartorius Stedim®) entre outros materiais.

3.1.1.7. Softwares utilizados

Os *softwares* utilizados neste estudo serão descritos a seguir:

1) Microsoft Office Excel: software comercial desenvolvido pela Microsoft, que será utilizado para organização dos dados e para a realização dos testes do planejamento fatorial (regressão), ANOVA fator único e teste de Tukey conduzidos neste estudo. A versão utilizada é Microsoft 365.

2) Design-Expert 13: software comercial desenvolvido e distribuído pela empresa Stat-Ease, o qual ajusta um modelo de regressão e oferece gráficos tridimensionais para a visualização da superfície de resposta e também gráficos de contorno interativos. A versão utilizada é 13.0.4.0 64 bit.

3) GNU Octave: Octave é uma linguagem de programação de código aberto e um ambiente de computação numérica, fornecendo uma alternativa gratuita e de código aberto para análise numérica, computação científica e desenvolvimento de algoritmos. Utilizado com a função *fabi_efeito* (PEREIRA e PEREIRA-FILHO, 2018) para gerar gráficos de porcentagem de efeito e probabilidade, utilizados neste trabalho. A versão utilizada é 9.1.0.

3.1.1.8. Amostras

Para condução da primeira etapa do projeto, afim de se determinar o tamanho de partícula das amostras homogeneizadas, foram selecionadas amostras de matrizes vegetais provenientes de diferentes estudos de resíduos de agrotóxicos conduzidos pela BASF no qual a etapa de homogeneização foi realizada internamente utilizando-se gelo seco para manter as amostras em temperatura inferior a -20°C durante toda a etapa de homogeneização e com uso de moinhos GM 300, Retsch®.

As amostras selecionadas para essa determinação foram: abacate (frutos), algodão (sementes), banana (frutos), arroz (grãos), soja (sementes), feijão (sementes), tomate (frutos), pimentão (frutos), abacaxi (frutos), uva (frutos), trigo (grãos), citros (frutos), milho (grãos), conforme Figura 1.



FIGURA 1 - Amostras vegetais homogeneizadas selecionadas para determinação do tamanho de partícula

Para a condução dos experimentos estatísticos, que incluíram o planejamento fatorial completo 2^3 , ANOVA de fator único e o teste de Tukey, foi necessária a realização de uma etapa preliminar em campo. O objetivo dessa etapa foi obter amostras representativas dos grupos de cultivos descritos no documento SANTE/2020/12830 Rev.02 (2023), que abrange altos teores de ácido, água, óleo e matrizes secas. Essas amostras continham resíduos impregnados na matriz, o que permitiu uma avaliação precisa da eficiência de extração do método analítico ao testar diferentes combinações das variáveis.

Para isso, foram selecionadas três formulações distintas de agrotóxicos: SPOT® SC, IMUNIT® e BELYAN®. Aplicações foliares foram realizadas em diversas amostras de campo, incluindo algodão, citros, arroz, tomate e repolho, seguindo as boas práticas agrícolas. As informações sobre o número de aplicações, doses (em mL/ha e g i.a./ha) e o período de carência (data da coleta após a aplicação) estão detalhadas nas Tabelas 3 a 7. Todos os ensaios de campo foram conduzidos na Estação Experimental Agrícola da BASF S.A., localizada no município de Santo Antônio de Posse/SP.

TABELA 3 – Preparo e aplicação do produto formulado em algodão

Formulação	Número de aplicações	Dose (mL/ha)	Dose (g i.a./ha)	Volume de calda (L/ha)	Carência (dias)
SPOT® SC	1	1000	Vide abaixo		
IMUNIT®	1	170	Vide abaixo	200	4
BELYN®	1	660	Vide abaixo		

Dose (g i.a./ha):

Dimoxystrobina – 200; Boscalida – 200

Alfacipermetrina – 12,75; Teflubenzurom – 12,75

Mefentrifluconazole – 87,98; Piraclostrobina – 117,3; Fluxaproxade – 58,67

TABELA 4 – Preparo e aplicação do produto formulado em citros

Formulação	Número de aplicações	Dose (mL/100L água)	Dose (g i.a./ha)	Volume de calda (L/ha)	Carência (dias)
SPOT® SC	-	-	-	-	
IMUNIT®	1	25	Vide abaixo	2000	2
BELYN®	1	15	Vide abaixo		

Dose (g i.a./ha):

Dimoxystrobina – não aplicado; Boscalida – não aplicado

Alfacipermetrina – 37,5; Teflubenzurom – 37,5

Mefentrifluconazole – 40; Piraclostrobina – 53,34; Fluxaproxade – 26,67

TABELA 5 – Preparo e aplicação do produto formulado em arroz

Formulação	Número de aplicações	Dose (mL/ha)	Dose (g i.a./ha)	Volume de calda (L/ha)	Carência (dias)
SPOT® SC	-	-	-	-	
IMUNIT®	1	300	Vide abaixo	100	4
BELYN®	1	350	Vide abaixo		

Dose (g i.a./ha):

Dimoxystrobina – não aplicado; Boscalida – não aplicado

Alfacipermetrina – 22,5; Teflubenzurom – 22,5

Mefentrifluconazole – 46,66; Piraclostrobina – 62,23; Fluxaproxade – 31,12

TABELA 6 – Preparo e aplicação do produto formulado em tomate

Formulação	Número de aplicações	Dose (mL/ha)	Dose (g i.a./ha)	Volume de calda (L/ha)	Carência (dias)
SPOT® SC	1	1000	Vide abaixo	400	2
IMUNIT®	1	200	Vide abaixo		
BELYN®	1	1000	Vide abaixo		

Dose (g i.a./ha):

Dimoxystrobina – 200; Boscalida – 200

Alfacipermetrina – 15; Teflubenzurom – 15

Mefentrifluconazole – 133,3; Piraclostrobina – 177,8; Fluxaproxade – 88,9

TABELA 7 – Preparo e aplicação do produto formulado em repolho

Formulação	Número de aplicações	Dose (mL/ha)	Dose (g i.a./ha)	Volume de calda (L/ha)	Carência (dias)
SPOT® SC	1	1000	Vide abaixo	400	4
IMUNIT®	1	200	Vide abaixo		
BELYN®	1	400	Vide abaixo		

Dose (g i.a./ha):

Dimoxystrobina – 200; Boscalida – 200

Alfacipermetrina – 15; Teflubenzurom – 15

Mefentrifluconazole – 53,32; Piraclostrobina – 71,12; Fluxaproxade – 35,56

Após realização da aplicação dos produtos formulados e posterior coleta, as amostras foram armazenadas em embalagens plásticas (duplamente embaladas) e congeladas imediatamente em temperatura inferior a -20 °C e enviadas para a BASF S.A. em Guaratinguetá, onde foram homogeneizadas com gelo seco e com uso de moinhos GM 300, Retsch® para obtenção de um pó “fino” utilizado posteriormente para análise de resíduos. As Figuras 2 a 4 apresentam respectivamente exemplos das imagens coletadas durante as etapas de aplicação, coleta, beneficiamento, armazenamento e homogeneização das amostras de campo.



FIGURA 2 - Aplicação de produto formulado no cultivo de algodão.



FIGURA 3 - Coleta (A), Beneficiamento (B) e Armazenamento (C) das amostras de algodão



FIGURA 4 - Moinho de preparo (A), Adição de gelo seco para acondicionamento da temperatura pré-homogeneização (B), Adição da amostra no moinho (C), Etapa de homogeneização com gelo seco (D) e Amostra homogeneizada em pote de armazenamento (E). Fotos do laboratório da BASF de Guaratinguetá/SP

Uma vez que para repolho, ao realizar as análises preliminares da amostra, não foram encontrados nenhum resíduo para nenhum dos ativos aplicados, optou-se por não seguir com os testes para esta matriz.

Acredita-se que o motivo de não haver sido encontrado resíduos para nenhum dos ativos contidos nas formulações aplicadas em campo, é devido ao repolho possuir algumas folhas externas que lhe asseguram uma maior proteção. Como esta folhagem externa é comumente descartada e não utilizada para consumo, da mesma forma procedeu-se com a retirada dessa folhagem externa para o preparo destas amostras. Com isso acredita-se que os potenciais resíduos de agrotóxicos tenham ficado retido nestas folhas e por este motivo não foram detectados resíduos ao se analisar as amostras provenientes das cabeças do repolho.

3.1.2. MÉTODOS

3.1.2.1. *Métodos Analíticos*

Para a realização da condução dos experimentos foi utilizado metodologia interna da BASF S.A. (método original) para análises dos distintos ingredientes ativos avaliados, conforme descrito abaixo:

3.1.2.1.1. Procedimento Analítico – Análise de BAS 500 F, BAS 505 F, BAS 510 F, BAS 700 F e BAS 750 F

Uma amostra representativa de 5g de cada matriz é pesada em frasco de extração de polipropileno de 250 mL. São adicionados 100 mL de solução Metanol/Água/HCl 2 mol/L (70/25/5, v/v/v). As amostras foram extraídas usando um Ultra-turrax a aproximadamente 5000 rpm por 2 minutos. Em seguida, o extrato foi centrifugado por 5 minutos a aproximadamente 4000 rpm (etapa 1). Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um tubo de centrífuga contendo 1 mL de solução de NaOH 0,2 mol/L.

Foram adicionados 5 mL de ciclo-hexano e a partição foi feita por 30 minutos em agitador a 300 rpm. Em seguida, foi centrifugado por 2 minutos a aproximadamente 4000 rpm. Uma alíquota de 2 mL foi retirada da fase orgânica e evaporada até a secura no Turbo Vap a aproximadamente 40 °C.

O resíduo obtido foi dissolvido em 1 mL de metanol/água (50/50, v/v). Todas as matrizes foram previamente filtradas antes da injeção e transferidas para um vial de injeção. Para amostras com concentrações de analito acima da curva de calibração, foi necessário diluir conforme apropriado.

3.1.2.1.2. Procedimento Analítico – Análise de BAS 309 I

Após extração das amostras (etapa 1 do método anterior), uma alíquota de 1 mL do extrato foi diluída 1:5 com solução metanol/água (50/50, v/v). Todas as matrizes foram previamente filtradas antes da injeção e transferidos para um vial de injeção. Para amostras com concentrações de analito fora do intervalo da curva de calibração, foi necessário diluir conforme apropriado.

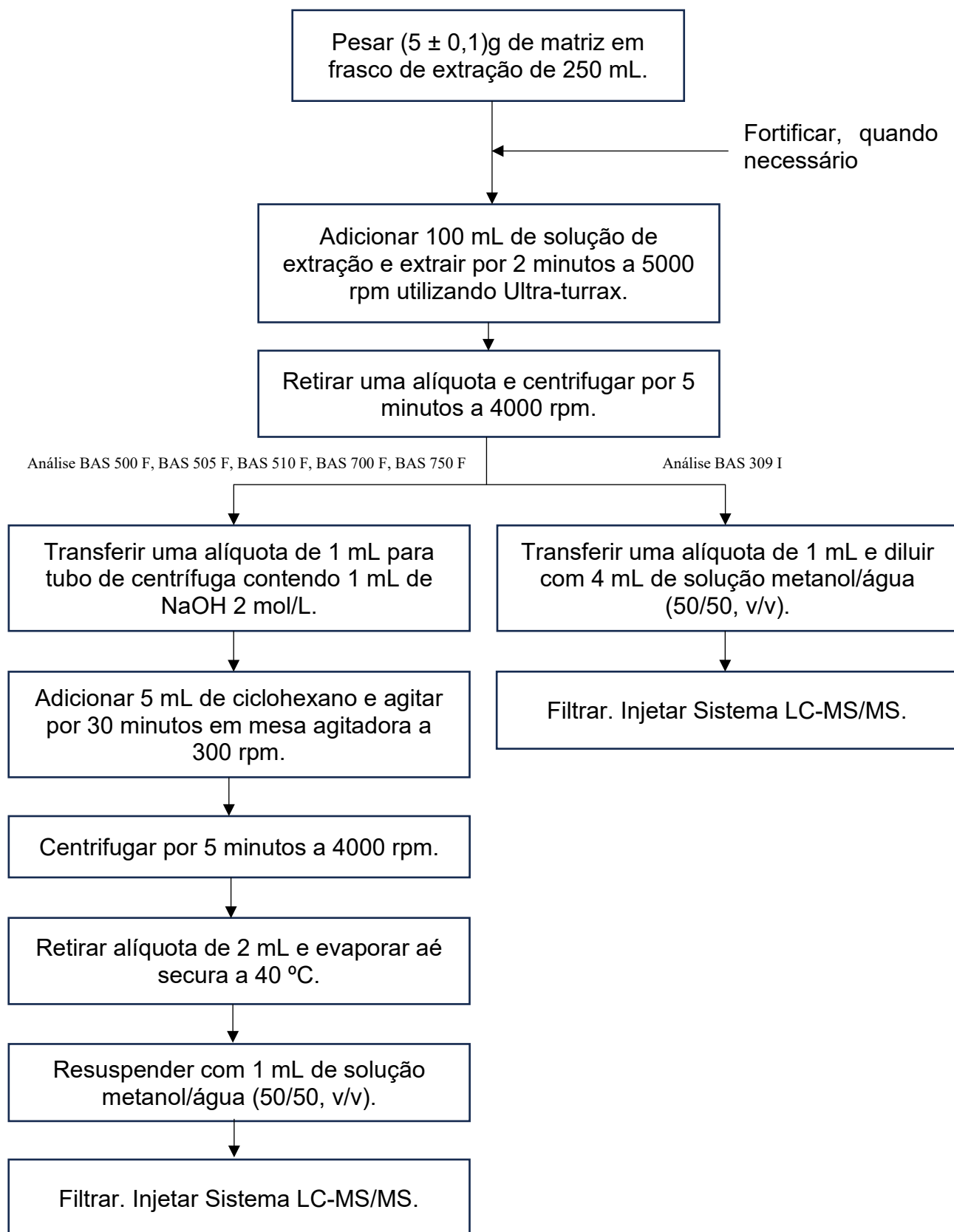


FIGURA 5 - Fluxograma método original – Análise de BAS 500 F, BAS 505 F, BAS 510 F, BAS 700 F, BAS 750 F e BAS 309 I

3.1.2.1.3. Condições cromatográficas – Análise de BAS 500 F, BAS 505 F, BAS 510 F, BAS 700 F e BAS 750 F

Para a determinação de BAS 500 F, BAS 505 F, BAS 510 F, BAS 700 F e BAS 750 F a seguinte condição cromatográfica foi utilizada.

TABELA 8 – Condições cromatográficas

Cromatógrafo Líquido	ExionLC		
Detector de massas	Triple Quad 6500+		
Coluna cromatográfica	Thermo Scientific, Betasil® C18 (100 x 2,1 mm, 5µm)		
Volume de injeção	20 µL		
Fase móvel A (FMA)	0,1% ácido fórmico em água		
Fase móvel B (FMB)	0,1% ácido fórmico em metanol		
Tempo de retenção aproximado (minutos)	BAS 500 F (3,1min); BAS 505 F (2,9min); BAS 510 F (2,5 min); BAS 700 F (2,6 min); BAS 750 F (3.1 min)		
Temperatura do forno	40 °C		
Modo de aquisição	Monitoramento de múltiplas reações (MRM)		
Modo de ionização	Modo Positivo ESI (+)		
Transições de massa	BAS 500 F: 388/194 BAS 505 F: 327/205 BAS 510 F: 343/307 BAS 700 F: 382/362 BAS 750 F: 398/182		
Gradiente (fluxo da fase móvel)			
Tempo (minutos)	Fluxo (µL/min.)	%FMA	%FMB
0,00	600	66,0	34,0
2,00	600	26,0	74,0
4,00	600	10,0	90,0
6,00	600	10,0	90,0
6,10	600	66,0	34,0
9,00	600	66,0	34,0

3.1.2.1.4. Condições cromatográficas – Análise de BAS 309 I

Para a determinação de BAS 309 I a seguinte condição cromatográfica foi utilizada.

TABELA 9 – Condições cromatográficas

Cromatógrafo Líquido	ExionLC		
Detector de massas	Triple Quad 6500+		
Coluna cromatográfica	Waters, Xselect® HSS T3 (100 x 2,1 mm, 2,5µm)		
Volume de injeção	20 µL		
Fase móvel A (FMA)	0,1% ácido fórmico em água		
Fase móvel B (FMB)	0,1% ácido fórmico em acetonitrila		
Tempo de retenção aproximado (minutos)	BAS 309 I (3,0 min)		
Temperatura do forno	30 °C		
Modo de aquisição	Monitoramento de múltiplas reações (MRM)		
Modo de ionização	Modo Negativo ESI (-)		
Transições de massa	BAS 309 I: 379/196		
Gradiente (fluxo da fase móvel)			
Tempo (minutos)	Fluxo (µL/min.)	%FMA	%FMB
0,00	500	80,0	20,0
2,00	500	20,0	80,0
5,00	500	20,0	80,0
5,01	500	80,0	20,0
6,00	500	80,0	20,0

3.1.2.2. *Planejamento Fatorial*

As amostras geradas em campo (algodão, arroz, citros e tomate), contendo resíduos de seis ingredientes ativos aplicados, foram extraídas e analisadas em quintuplicata utilizando os procedimentos analíticos descritos nos itens 3.1.2.1.1 e 3.1.2.1.2 (método original). É crucial, em análises de resíduos de pesticidas, determinar a eficiência de extração do método, que avalia sua capacidade de remover efetivamente os pesticidas da matriz, a qual pode conter componentes complexos como gorduras, proteínas e minerais que interferem na análise.

Durante os estudos de eficiência de extração, foram estabelecidas as condições ideais (equipamentos, solventes, volume de solvente, entre outros) para garantir a remoção da maior parte dos pesticidas disponíveis na amostra. Esses testes geralmente são realizados em conjunto com estudos de metabolismo utilizando compostos radiomarcados. Para este projeto, foram aplicadas as condições previamente determinadas nos estudos de eficiência de extração, com ajustes em alguns parâmetros relevantes para a etapa de extração. A quantidade da alíquota da amostra, o tipo de equipamento utilizado e a proporção de massa de amostra/volume de solvente foram ajustados para avaliar o impacto desses fatores nas respostas dos resultados durante a extração do método analítico.

Um planejamento fatorial completo $2^3 = 8$ experimentos foi utilizado para realizar essa avaliação do impacto das variáveis na resposta. As variáveis independentes testadas nos dois níveis estão descritos na Tabela 10.

TABELA 10 – Níveis máximo e mínimo das variáveis

Variáveis	Nível	
	Baixo	Alto
Amostragem (massa de amostra)	0,20 g	2,50 g
Equipamento de extração	Ultra-turrax	Agitador
Proporção massa/volume	1:8	1:20

No caso dos equipamentos, foram utilizados os dispersores Ultra-Turrax® HS 501 Digital para os testes com maior volume de extração (utilizados para a

massa de 2,50 g de amostra) e Ultra-Turrax® Tube Drive para os testes com menor volume de extração (utilizados para a massa de 0,20 g de amostra). Ambos os sistemas utilizam o mesmo princípio rotor-estator. Devido à alta velocidade circunferencial, a amostra a ser processada é aspirada axialmente para a cabeça de dispersão e depois forçado radialmente através das ranhuras na disposição rotor-estator. A alta velocidade e a mínima folga entre o rotor e o estator produz forças de cisalhamento extremamente potentes que resultam em melhor dispersão.

Em relação aos equipamentos de agitação foram utilizados os agitadores VX-2500 multi tube vortexer para os testes com maior volume de extração (utilizados para a massa de 2,50 g de amostra) e o Hamilton Microlab STAR Liquid handling System para os testes com menor volume de extração (utilizados para a massa de 0,20 g de amostra).

Com relação à proporção de solventes utilizada, considera-se uma proporção de 1:20, isto é, para cada 1g de amostra, são extraídos 20 mL de solvente de extração. Essa proporção foi comumente utilizada nos estudos de eficiência de extração para os analitos avaliados neste projeto. No entanto, também foi testado o nível baixo, utilizando uma proporção de 1:8, permitindo avaliar o impacto que o uso reduzido de solvente pode ter na remoção dos pesticidas da matriz e, conseqüentemente, no resultado final.

A variável dependente é o resíduo de cada ingrediente ativo expresso em miligrama de ingrediente ativo por quilograma de amostra (mg/kg) obtido através de cada uma destas extrações, os quais foram normalizados em termos de rendimento da extração obtida em cada teste (% de recuperação) com a média de resíduo encontrados quando empregado a metodologia original. Foram realizados 8 ensaios em quintuplicata de preparação, que correspondem a todas as combinações possíveis para os três níveis. A Tabela 11 mostra o planejamento fatorial realizada. Além disso, os resultados de resíduo encontrados para cada experimento foram normalizados com os dados obtidos através das análises utilizando-se do método original.

TABELA 11 – Matriz de experimentos para avaliação das variáveis

Ensaio	Massa (g)	Proporção (massa/volume)	Equipamento
1	0,20	1:20	Ultra-turrax
2	2,50	1:20	Ultra-turrax
3	0,20	1:8	Ultra-turrax
4	2,50	1:8	Ultra-turrax
5	0,20	1:20	Agitador
6	2,50	1:20	Agitador
7	0,20	1:8	Agitador
8	2,50	1:8	Agitador

A	B	C
-	+	+
+	+	+
-	-	+
+	-	+
-	+	-
+	+	-
-	-	-
+	-	-

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DAS AMOSTRAS

O procedimento utilizado para a determinação do tamanho de partícula nas amostras de matriz vegetal, após a etapa de homogeneização com gelo seco, foi realizado conforme descrito a seguir:

1. Inicialmente, foram pesados 2 g da amostra em duplicata utilizando uma balança semi-analítica.
2. Em seguida, o peso da amostra foi ajustado para 50 g com a adição de água, visando obter uma suspensão adequada e facilitar a dispersão dos resíduos.
3. A amostra foi agitada em uma placa de agitação com uma barra magnética, garantindo a dispersão uniforme das partículas.
4. Após a agitação, uma alíquota da amostra foi retirada e inserida no equipamento Mastersizer 2000, que é um instrumento de análise de tamanho de partícula que utiliza técnicas de difração a laser para medir o tamanho das partículas.
5. O equipamento realizou a leitura do tamanho de partícula da amostra, fornecendo informações sobre a distribuição do tamanho das partículas presentes.

Esse procedimento foi realizado em duplicata para verificar a precisão dos resultados e garantir a consistência dos dados obtidos. Um detalhamento visual das etapas realizadas está ilustrado na Figura 6.

Para a condução deste teste, foram avaliados o tamanho de partícula de 13 matrizes vegetais distintas. Os resultados referentes ao tamanho médio das partículas e ao $D(0.5)$, que representa o tamanho de partícula correspondente a 50% da distribuição acumulada, estão descritos na Tabela 12.

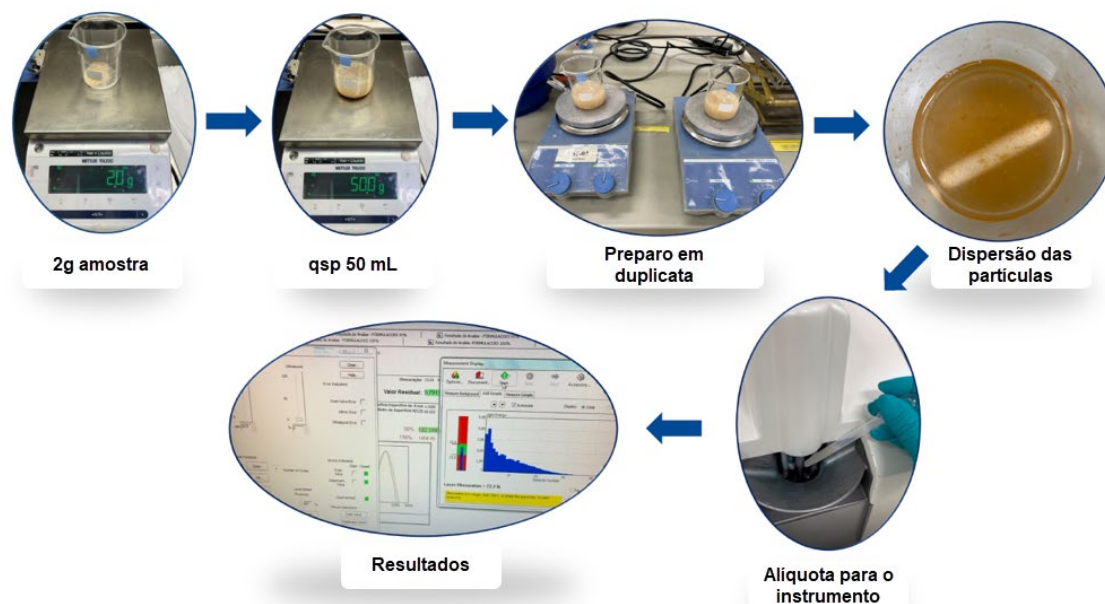


FIGURA 6 - Procedimento para determinação do tamanho de partícula

TABELA 12 – Distribuição do tamanho de partícula das amostras

Amostra	Parte da matriz	Tamanho médio da partícula (μm) D[4,3]	Mediana (D0.5) 50% do tamanho de partícula < (μm)
Uva	Fruto	347	211
Trigo	Grão	265	116
Citros	Fruto	285	189
Milho	Grão	318	136
Abacate	Fruto	446	353
Arroz	Grão	257	214
Tomate	Fruto	377	304
Pimentão	Fruto	423	342
Abacaxi	Fruto	448	377
Soja	Semente	199	146
Feijão	Semente	221	124
Banana	Fruto	398	358
Algodão	Semente	517	478

10% : 4.864 um 50% : 477.768 um 90% : 1116.... um
 20% : 29.367 um 80% : 878.385 um 100% : 1995.03

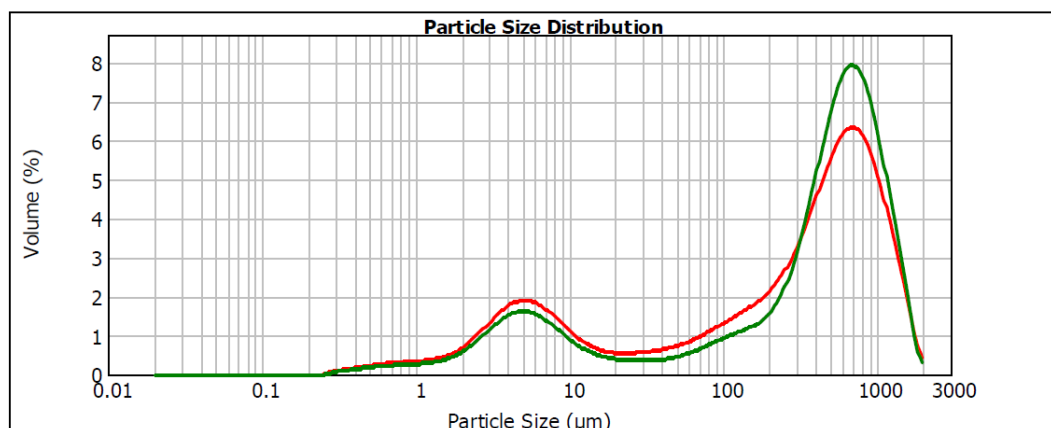


FIGURA 7 - Avaliação da distribuição do tamanho de partícula de sementes de algodão após homogeneização com gelo seco

10% : 10.447 um 50% : 214.636 um 90% : 585.181 um
 20% : 31.372 um 80% : 459.138 um 100% : 1050.55

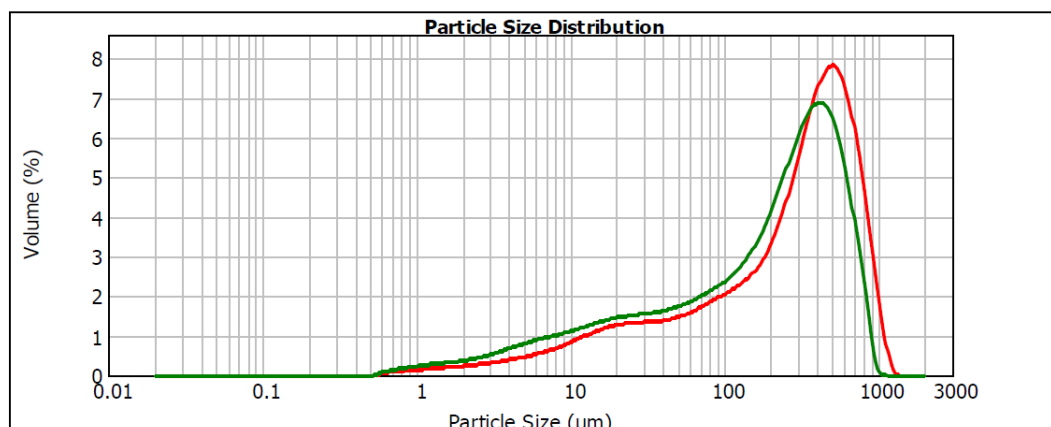


FIGURA 8 - Avaliação da distribuição do tamanho de partícula de grãos de arroz após homogeneização com gelo seco

O valor de $D[4,3]$, conhecido como média de De Brouckert, representa a média do diâmetro das partículas ponderada pelo volume. Esse parâmetro considera a distribuição de tamanhos das partículas e a quantidade de volume que cada tamanho ocupa. O cálculo de $D[4,3]$ é realizado por meio de uma média ponderada dos diâmetros das partículas, onde a ponderação é feita com base no volume que elas ocupam (HEALY, 2010).

Já o valor de $D0.5$, por outro lado, é o diâmetro mediano das partículas. Também conhecido como mediana, é o valor abaixo do qual 50% da distribuição

cumulativa de partículas está contida. Isso significa que metade das partículas são menores que o valor D0.5 e metade são maiores.

YUAN et al. (2023a) avaliaram influência do tamanho de partícula de diversos cereais após homogeneização (arroz, trigo, cevada e aveia) na eficiência de extração de distintos compostos e concluíram que para todos os pesticidas, as médias de rendimento em arroz e cevada melhoraram quando o tamanho de partícula foi reduzido de <10 para >60 mesh, e em partículas de 40-60 mesh para trigo e aveia. No geral, os rendimentos de extração de pesticidas obtidos foram ótimos ao utilizar partículas de cereais de 40-60 mesh ou >60 mesh ($p < 0,05$). No entanto, devido a dificuldade de gerar partículas de 60 mesh, rendimentos satisfatórios de extração de pesticidas também foram obtidos simplesmente usando partículas de cereal de 40 mesh ($\sim 425 \mu\text{m}$).

Em um outro estudo, YUAN et al. (2023b) avaliaram a influência do tamanho de partícula de amostras de soja após homogeneização na eficiência de extração e concluíram que para amostras com tamanho de partícula superior a 20 mesh ($\sim 850 \mu\text{m}$), as diferenças na eficiência de extração foram insignificantes enquanto que para todos os pesticidas alvo investigados, a maior eficiência de extração foi alcançada quando o tamanho de partícula estava entre 40 e 60 mesh.

HERRMANN et al. (2017) investigaram a influência de diversos tamanhos de partículas (200, 1000, 3000 e 5000 μm) em cereais e concluíram que tamanhos médios de partícula menores aumentam a eficiência de extração em até 31% com todos os outros fatores de extração mantidos constantes.

De acordo com os resultados descritos na Tabela 12, observa-se que o tamanho médio das partículas no geral variou entre ~ 70 mesh (199 μm) para semente de soja até ~ 35 mesh (517 μm) para semente de algodão utilizando-se as técnicas de homogeneização rotineiras empregadas no laboratório, atingindo-se tamanhos de partículas consideradas suficientemente pequenas para obtenção de resultados de análises satisfatórias conforme dados disponíveis na literatura (YUAN et al. 2023b, HERRMANN et al. 2017).

4.2. RESULTADOS EMPREGANDO O PLANEJAMENTO FATORIAL

A aplicação de planejamento fatorial na etapa de extração dos métodos analíticos de pesticidas em alimentos, baseia-se principalmente, no estudo prévio das principais variáveis que podem influenciar na determinação de resíduos de pesticidas (mg/kg) nas matrizes avaliadas nesta dissertação.

Na otimização das condições ideais de extração, é prática comum, inicialmente, fixar uma ou mais variáveis durante a etapa de extração, variando apenas uma variável por vez. Esse procedimento, embora simplificado, pode levar a resultados e interpretações incompletas, uma vez que não explora os efeitos de interação entre as variáveis. Essa abordagem pode limitar a compreensão abrangente do sistema, dificultando a identificação das condições que realmente maximizam a eficiência da extração.

Assim, a seleção das melhores condições experimentais pode ser otimizada por meio de um planejamento fatorial, que visa reduzir o número de experimentos necessários para o estudo. Esse método também permite a avaliação das interações secundárias e terciárias nos resultados experimentais. Neste projeto, foram analisados os impactos do equipamento, do peso da amostra e da proporção massa/volume na etapa de extração das amostras.

Inicialmente foi realizado um planejamento fatorial completo em dois níveis para três variáveis experimentais (2^3) com 5 réplicas para cada experimento, e as variáveis selecionadas em seus níveis, superior (+1) e inferior (-1).

Na execução do planejamento fatorial é importante ressaltar que os experimentos foram executados em ordem aleatória, para evitar a ocorrência de erros sistemáticos. Os resultados foram obtidos em resíduos (mg/kg) para os ingredientes ativos de BAS 750 F, BAS 500 F, BAS 700 F, BAS 510 F, BAS 505 F e BAS 309 I em matrizes de algodão, arroz, tomate e citros, apresentados nas Tabelas 13 à 16 bem como representação gráfica apresentadas nas Figuras 9 a 12.

TABELA 13 – Matriz do planejamento fatorial em dois níveis (2³) para cultivo de TOMATE – % de recuperação e desvio padrão

Ensaio	Massa (g)	Proporção (massa/volume)	Equipamento	BAS 750 F (%)	BAS 500 F (%)	BAS 700 F (%)	BAS 505 F (%)	BAS 510 F (%)	BAS 309 I (%)
1	-1 (0,20)	-1 (1:20)	+1 (Ultra-turrax)	90 ± 5,6	89 ± 8,9	94 ± 5,5	94 ± 6,5	89 ± 3,4	96 ± 9,9
2	+1 (2,50)	-1 (1:20)	+1 (Ultra-turrax)	96 ± 13	99 ± 10	100 ± 8,9	100 ± 9,6	97 ± 4,9	110 ± 4,4
3	-1 (0,20)	+1 (1:8)	+1 (Ultra-turrax)	97 ± 17	90 ± 18	99 ± 12	103 ± 14	95 ± 14	110 ± 17
4	+1 (2,50)	+1 (1:8)	+1 (Ultra-turrax)	100 ± 4,8	97 ± 5,9	100 ± 4,2	100 ± 3,5	95 ± 5,2	105 ± 9,4
5	-1 (0,20)	+1 (1:20)	-1 (Agitador)	105 ± 5,4	109 ± 3,9	104 ± 2,1	118 ± 5,1	100 ± 2,3	118 ± 8,0
6	+1 (2,50)	+1 (1:20)	-1 (Agitador)	97 ± 3,7	105 ± 5,8	94 ± 2,8	108 ± 5,9	91 ± 7,4	111 ± 8,9
7	-1 (0,20)	-1 (1:8)	-1 (Agitador)	90 ± 4,5	93 ± 5,3	92 ± 3,4	107 ± 4,6	90 ± 3,4	95 ± 7,7
8	+1 (2,50)	-1 (1:8)	-1 (Agitador)	95 ± 5,4	101 ± 5,3	94 ± 4,0	105 ± 6,4	93 ± 5,5	101 ± 8,0

Os valores entre parênteses representam os valores reais de cada variável

Os valores de recuperação (%) se referem às médias de resíduos das replicatas (n=5) normalizadas com base nos resultados experimentais ao conduzir as análises utilizando-se o método original de cada ingrediente ativo.

TABELA 14 – Matriz do planejamento fatorial em dois níveis (2³) para cultivo de ARROZ – % de recuperação e desvio padrão

Ensaio	Massa (g)	Proporção (massa/volume)	Equipamento	BAS 750 F (%)	BAS 500 F (%)	BAS 700 F (%)	BAS 505 F (%)	BAS 510 F (%)	BAS 309 I (%)
1	-1 (0,20)	-1 (1:20)	+1 (Ultra-turrax)	95 ± 5,4	91 ± 5,8	97 ± 7,8	n.d	n.d	93 ± 7,6
2	+1 (2,50)	-1 (1:20)	+1 (Ultra-turrax)	88 ± 5,1	84 ± 4,5	91 ± 5,1	n.d	n.d	85 ± 6,1
3	-1 (0,20)	+1 (1:8)	+1 (Ultra-turrax)	102 ± 1,3	84 ± 2,0	108 ± 3,5	n.d	n.d	99 ± 5,4
4	+1 (2,50)	+1 (1:8)	+1 (Ultra-turrax)	90 ± 3,1	90 ± 2,1	94 ± 8,4	n.d	n.d	91 ± 2,5
5	-1 (0,20)	+1 (1:20)	-1 (Agitador)	93 ± 1,5	92 ± 9,3	101 ± 5,0	n.d	n.d	80 ± 2,7
6	+1 (2,50)	+1 (1:20)	-1 (Agitador)	92 ± 8,9	82 ± 8,9	96 ± 8,7	n.d	n.d	85 ± 2,7
7	-1 (0,20)	-1 (1:8)	-1 (Agitador)	87 ± 9,2	91 ± 5,8	100 ± 6,9	n.d	n.d	80 ± 9,6
8	+1 (2,50)	-1 (1:8)	-1 (Agitador)	89 ± 2,1	82 ± 2,3	94 ± 1,8	n.d	n.d	81 ± 3,6

Os valores entre parêntess representam os valores reais de cada variável

n.d. = resíduos do ingrediente ativo não encontrados para matriz de arroz.

Os valores de recuperação (%) se referem às médias de resíduos das replicatas (n=5) normalizadas com base nos resultados experimentais ao conduzir as análises utilizando-se o método original de cada ingrediente ativo.

TABELA 15 – Matriz do planejamento fatorial em dois níveis (2³) para cultivo de CITROS – % de recuperação e desvio padrão

Ensaio	Massa (g)	Proporção (massa/volume)	Equipamento	BAS 750 F (%)	BAS 500 F (%)	BAS 700 F (%)	BAS 505 F (%)	BAS 510 F (%)	BAS 309 I (%)
1	-1 (0,20)	-1 (1:20)	+1 (Ultra-turrax)	113 ± 19	116 ± 11	107 ± 11	n.d	n.d	112 ± 9,3
2	+1 (2,50)	-1 (1:20)	+1 (Ultra-turrax)	104 ± 8,6	100 ± 6,8	105 ± 3,8	n.d	n.d	102 ± 5,7
3	-1 (0,20)	+1 (1:8)	+1 (Ultra-turrax)	97 ± 11	117 ± 9,5	94 ± 7,6	n.d	n.d	92 ± 14
4	+1 (2,50)	+1 (1:8)	+1 (Ultra-turrax)	78 ± 9,0	88 ± 4,2	86 ± 4,9	n.d	n.d	82 ± 3,4
5	-1 (0,20)	+1 (1:20)	-1 (Agitador)	99 ± 14	96 ± 9,1	104 ± 14	n.d	n.d	118 ± 19
6	+1 (2,50)	+1 (1:20)	-1 (Agitador)	90 ± 2,8	81 ± 3,2	91 ± 2,0	n.d	n.d	102 ± 3,6
7	-1 (0,20)	-1 (1:8)	-1 (Agitador)	118 ± 12	127 ± 13	117 ± 8,6	n.d	n.d	134 ± 8,1
8	+1 (2,50)	-1 (1:8)	-1 (Agitador)	86 ± 9,5	86 ± 6,6	87 ± 2,8	n.d	n.d	93 ± 7,6

Os valores entre parênteses representam os valores reais de cada variável

n.d. = resíduos do ingrediente ativo não encontrados para matriz de citros.

Os valores de recuperação (%) se referem às médias de resíduos das replicatas (n=5) normalizadas com base nos resultados experimentais ao conduzir as análises utilizando-se o método original de cada ingrediente ativo.

TABELA 16 – Matriz do planejamento fatorial em dois níveis (2³) para cultivo de ALGODÃO – % de recuperação e desvio padrão

Ensaio	Massa (g)	Proporção (massa/volume)	Equipamento	BAS 750 F (%)	BAS 500 F (%)	BAS 700 F (%)	BAS 505 F (%)	BAS 510 F (%)	BAS 309 I (%)
1	-1 (0,20)	-1 (1:20)	+1 (Ultra-turrax)	99 ± 3,2	114 ± 8,1	101 ± 12	109 ± 5,6	112 ± 11	n.d
2	+1 (2,50)	-1 (1:20)	+1 (Ultra-turrax)	89 ± 14	103 ± 3,2	100 ± 4,1	111 ± 7,5	109 ± 7,6	n.d
3	-1 (0,20)	+1 (1:8)	+1 (Ultra-turrax)	87 ± 5,8	87 ± 4,8	90 ± 5,3	108 ± 3,0	95 ± 3,2	n.d
4	+1 (2,50)	+1 (1:8)	+1 (Ultra-turrax)	88 ± 13	84 ± 11	94 ± 5,2	112 ± 7,6	102 ± 8,6	n.d
5	-1 (0,20)	+1 (1:20)	-1 (Agitador)	84 ± 5,4	82 ± 12	90 ± 4,7	82 ± 7,1	99 ± 6,3	n.d
6	+1 (2,50)	+1 (1:20)	-1 (Agitador)	61 ± 20	49 ± 22	70 ± 15	60 ± 15	74 ± 14	n.d
7	-1 (0,20)	-1 (1:8)	-1 (Agitador)	80 ± 5,1	68 ± 6,9	94 ± 4,1	95 ± 4,2	97 ± 5,5	n.d
8	+1 (2,50)	-1 (1:8)	-1 (Agitador)	71 ± 11	59 ± 6,0	77 ± 3,5	74 ± 3,4	85 ± 6,2	n.d

Os valores entre parênteses representam os valores reais de cada variável

n.d. = resíduos do ingrediente ativo não encontrados para matriz de algodão.

Os valores de recuperação (%) se referem às médias de resíduos das replicatas (n=5) normalizadas com base nos resultados experimentais ao conduzir as análises utilizando-se o método original de cada ingrediente ativo.

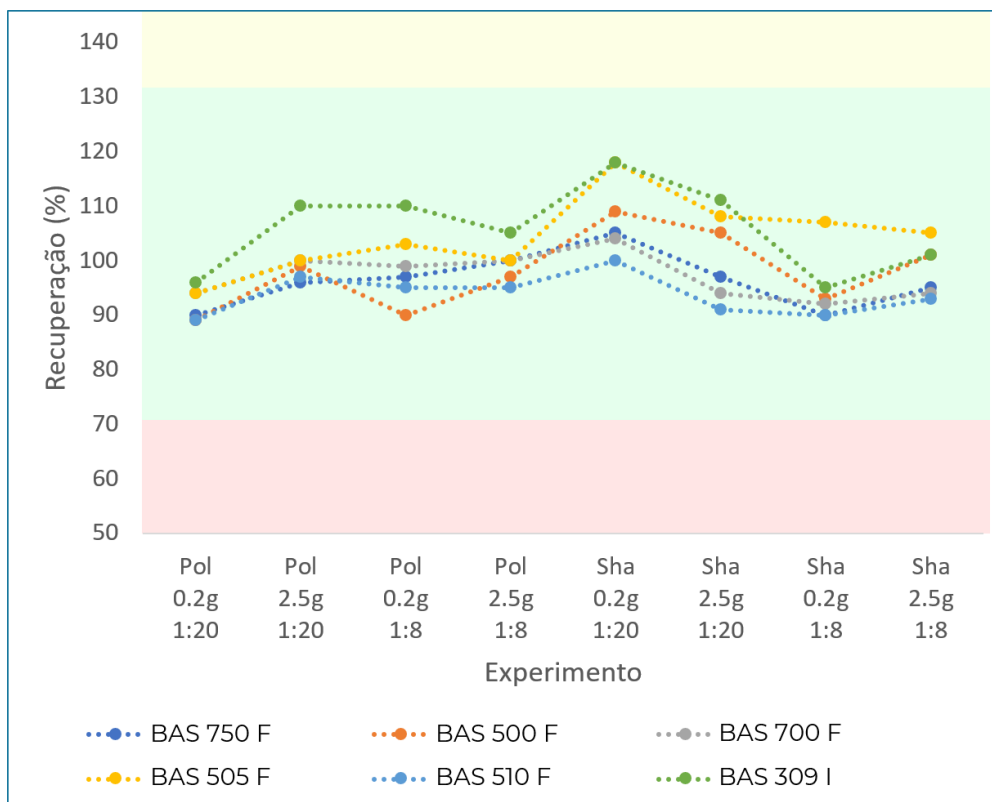


FIGURA 9 - Porcentagem de extração de tomate para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3

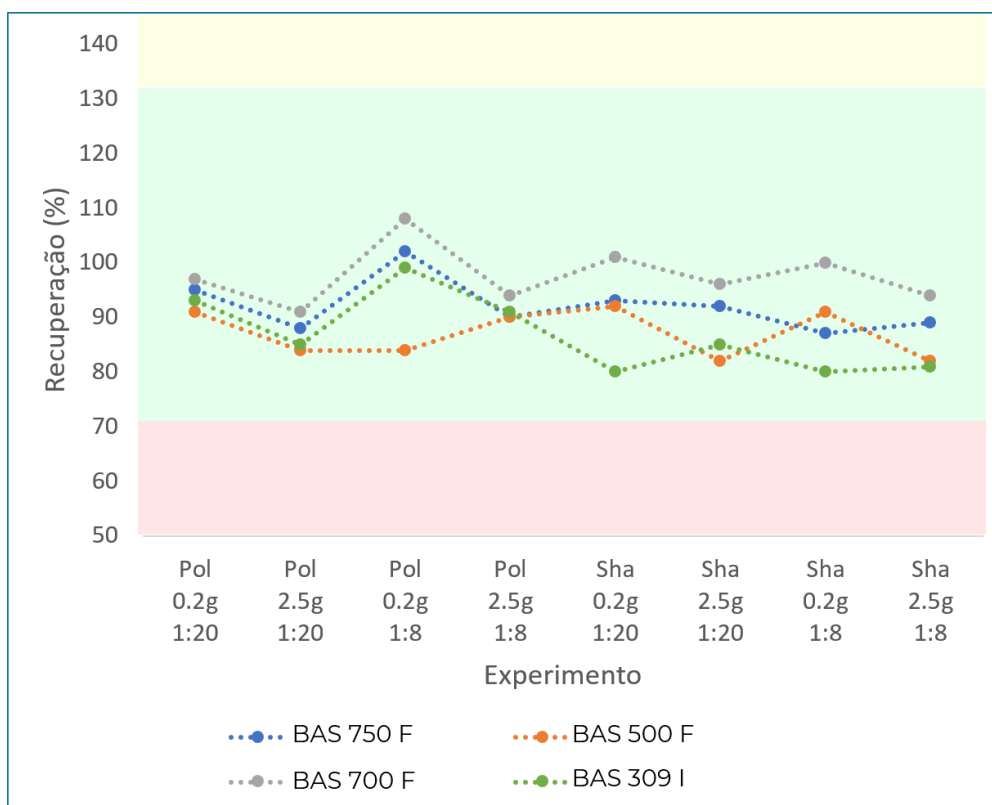


FIGURA 10 - Porcentagem de extração de arroz para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3

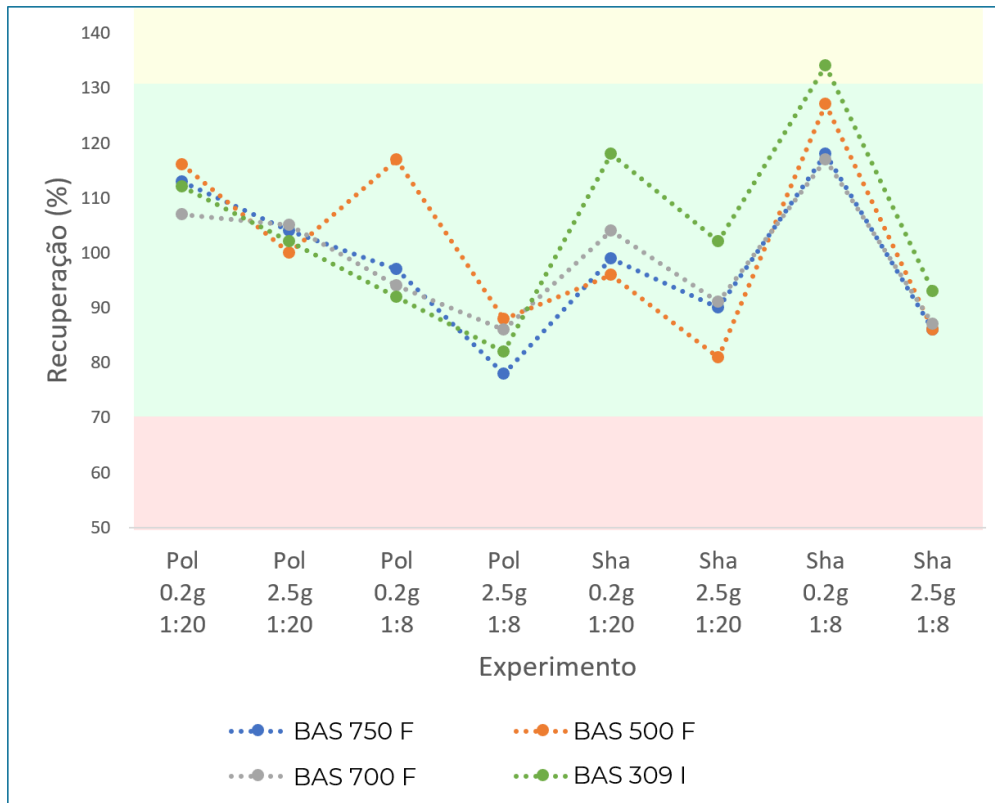


FIGURA 11 - Porcentagem de extração de citros para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3

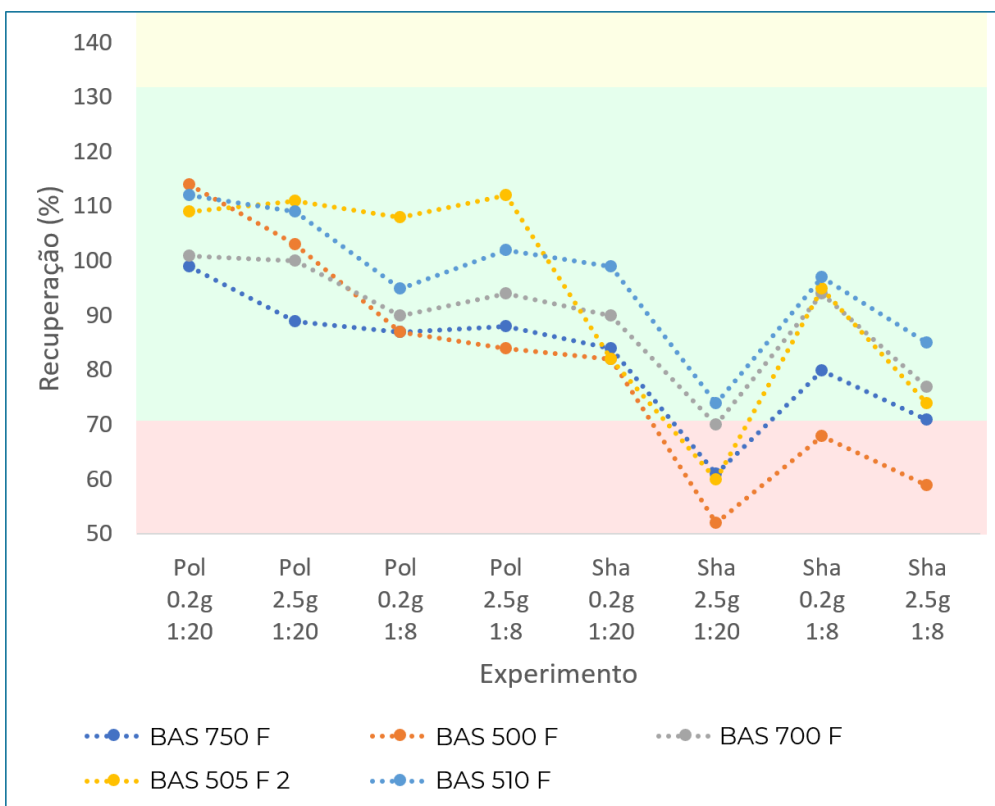


FIGURA 12 - Porcentagem de extração de algodão para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3

As análises dos resultados obtidos para a verificação das condições de extração que determinam a máxima eficiência de extração do método analítico foi realizado através de métodos estatísticos, utilizando-se o programa computacional “Design Expert® – versão 13” desenvolvido pela Stat-Ease®, Inc, de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 , bem como com o suporte e utilização do software “Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO – versão 2308 64-bit” da Microsoft com o objetivo de avaliar a influência de cada um dos fatores isoladamente bem como das interações entre os fatores em suas taxas de recuperação. Os testes foram realizados de forma aleatória, para se garantir a distribuição equânime de todos os fatores não considerados.

Após uma primeira análise visual inicial dos resultados das Tabelas 13 a 16, é possível observar que, de maneira geral, para cada matriz e ingrediente ativo avaliado, a maior eficiência do método em termos de recuperações foi alcançada nos seguintes ensaios: ensaio 5 (0,20g de amostra, proporção 1:20, agitador) para tomate, ensaio 3 (0,20g de amostra, proporção 1:20, ultra-turrax) e ensaio 5 para arroz, ensaio 1 (0,20g de amostra, proporção 1:8, ultra-turrax) e ensaio 7 (0,20g de amostra, proporção 1:8, agitador) para citros, e ensaio 1 para algodão.

Em todas as matrizes, os ensaios que apresentaram as maiores recuperações normalizadas em relação ao método original utilizaram uma massa de 0,20 g de amostra. No entanto, os resultados variaram em função da proporção de solvente e do equipamento utilizado, indicando a influência dessas variáveis na eficiência do método.

De maneira geral, todos os ensaios realizados para todas as combinações de ingrediente ativo e matriz apresentaram recuperações entre 80% e 120%, com exceção dos experimentos 6 a 8 para algodão, que apresentaram algumas recuperações abaixo da faixa de recuperação de 70%. É importante destacar que essas variações, dentro das faixas de trabalho estudadas, podem não ter um impacto significativo nos resultados, tendo em vista as faixas de aceitabilidade estabelecidas pelas normativas internacionais para análises de resíduos de pesticidas. Tais normativas permitem uma variação aceitável de até 30% em relação ao valor nominal (SANTE, 2022).

Nas Tabelas 17 a 21 estão resumidamente as taxas médias de recuperação de cada um dos ingredientes ativos para cada matriz, o efeito de

cada fator, suas interações e estimativas do erro experimental. As estimativas dos erros correspondem a influências significativas, ao nível de 95% de probabilidade.

TABELA 17 – Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos ingredientes ativos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostra de TOMATE

	BAS 750 F	BAS 500 F	BAS 700 F	BAS 505 F	BAS 510 F	BAS 309 I
Recuperação média	96,43 \pm 1,4	97,75 \pm 1,4	97,23 \pm 1,0	104,6 \pm 1,4	93,73 \pm 1,0	105,7 \pm 1,6
(A) Massa	1,75 \pm 2,8	5,43 \pm 2,8	-0,21 \pm 2,1	-2,50 \pm 2,8	0,65 \pm 2,0	1,95 \pm 3,2
(B) Proporção	1,93 \pm 2,8	5,10 \pm 2,8	1,86 \pm 2,1	1,28 \pm 2,8	0,95 \pm 2,0	6,25 \pm 3,2
(C) Equipamento	-1,25 \pm 2,8	-8,50 \pm 2,8*	2,34 \pm 2,1	-10,2 \pm 2,8*	0,25 \pm 2,0	-0,95 \pm 3,2
(A) e (B)	-2,38 \pm 2,8	-2,43 \pm 2,8	-1,86 \pm 2,1	0,63 \pm 2,8	-1,25 \pm 2,0	2,05 \pm 3,2
(A) e (C)	2,85 \pm 2,8	3,18 \pm 2,8	3,41 \pm 2,1	3,40 \pm 2,8	3,85 \pm 2,0	2,05 \pm 3,2
(B) e (C)	-6,93 \pm 2,8*	-4,90 \pm 2,8	-4,26 \pm 2,1	-5,38 \pm 2,8	-3,25 \pm 2,0	-10,5 \pm 3,2*
(A) e (B) e (C)	3,98 \pm 2,8	3,83 \pm 2,8	-4,26 \pm 2,1	4,28 \pm 2,8	4,95 \pm 2,0*	7,75 \pm 3,2*

* Efeito estatisticamente significativo ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t.

TABELA 18 – Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos ingredientes ativos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostra de ARROZ

	BAS 750 F	BAS 500 F	BAS 700 F	BAS 505 F	BAS 510 F	BAS 309 I
Recuperação média	92,00 \pm 0,8	86,85 \pm 0,8	97,55 \pm 1,0	n.d	n.d	86,73 \pm 0,8
(A) Massa	-4,80 \pm 1,5*	-5,40 \pm 1,6*	-7,80 \pm 2,0*	n.d	n.d	-2,95 \pm 1,6
(B) Proporção	-0,20 \pm 1,5	0,40 \pm 1,6	-2,60 \pm 2,0	n.d	n.d	-1,55 \pm 1,6
(C) Equipamento	3,80 \pm 1,5*	0,30 \pm 1,6	0,10 \pm 2,0	n.d	n.d	10,8 \pm 1,6*
(A) e (B)	0,60 \pm 1,5	-3,70 \pm 1,6*	1,90 \pm 2,0	n.d	n.d	1,05 \pm 1,6
(A) e (C)	-4,80 \pm 1,5*	4,40 \pm 1,6*	-2,40 \pm 2,0	n.d	n.d	-5,05 \pm 1,6*
(B) e (C)	-4,20 \pm 1,5*	-0,20 \pm 1,6	-4,40 \pm 2,0*	n.d	n.d	-3,65 \pm 1,6*
(A) e (B) e (C)	2,00 \pm 1,5	-3,10 \pm 1,6	1,30 \pm 2,0	n.d	n.d	-0,85 \pm 1,6

* Efeito estatisticamente significativo ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t.

TABELA 19 – Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos ingredientes ativos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostra de CITROS

	BAS 750 F	BAS 500 F	BAS 700 F	BAS 505 F	BAS 510 F	BAS 309 I
Recuperação média	98,15 \pm 1,9	101,4 \pm 1,5	98,98 \pm 1,3	n.d	n.d	104,4 \pm 1,8
(A) Massa	-17,3 \pm 3,8*	-24,9 \pm 3,0*	-13,2 \pm 2,6*	n.d	n.d	-19,2 \pm 3,6*
(B) Proporção	6,60 \pm 3,8	-6,45 \pm 3,0*	5,65 \pm 2,6*	n.d	n.d	8,50 \pm 3,6*
(C) Equipamento	-0,30 \pm 3,8	7,75 \pm 3,0*	-1,85 \pm 2,6	n.d	n.d	-14,5 \pm 3,6*
(A) e (B)	8,00 \pm 3,8*	9,55 \pm 3,0*	5,65 \pm 2,6*	n.d	n.d	6,30 \pm 3,6
(A) e (C)	3,30 \pm 3,8	2,75 \pm 3,0	8,55 \pm 2,6*	n.d	n.d	9,50 \pm 3,6*
(B) e (C)	14,4 \pm 3,8*	11,5 \pm 3,0*	10,0 \pm 2,6*	n.d	n.d	11,6 \pm 3,6*
(A) e (B) e (C)	-3,00 \pm 3,8	-3,05 \pm 3,0	-2,75 \pm 2,6	n.d	n.d	-6,20 \pm 3,6

* Efeito estatisticamente significativo ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t.

TABELA 20 – Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos ingredientes ativos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostra de ALGODÃO

	BAS 750 F	BAS 500 F	BAS 700 F	BAS 505 F	BAS 510 F	BAS 309 I
Recuperação média	82,35 \pm 1,3	81,00 \pm 1,1	89,65 \pm 1,1	93,88 \pm 1,0	96,53 \pm 1,3	n.d
(A) Massa	-10,9 \pm 2,6*	-13,2 \pm 2,2*	-8,60 \pm 2,2*	-9,15 \pm 2,0*	-8,25 \pm 2,6*	n.d
(B) Proporção	1,55 \pm 2,6	11,4 \pm 2,2*	1,50 \pm 2,2	-6,65 \pm 2,0*	3,35 \pm 2,6	n.d
(C) Equipamento	16,7 \pm 2,6*	32,9 \pm 2,2*	13,9 \pm 2,2*	32,3 \pm 2,0*	15,9 \pm 2,6*	n.d
(A) e (B)	-6,05 \pm 2,6*	-8,60 \pm 2,2*	-2,00 \pm 2,2	-0,75 \pm 2,0	-5,75 \pm 2,6*	n.d
(A) e (C)	5,35 \pm 2,6	7,90 \pm 2,2*	10,0 \pm 2,2*	12,5 \pm 2,0*	10,2 \pm 2,6*	n.d
(B) e (C)	4,45 \pm 2,6	10,3 \pm 2,2*	6,90 \pm 2,2*	6,15 \pm 2,0*	8,25 \pm 2,6*	n.d
(A) e (B) e (C)	1,05 \pm 2,6	3,30 \pm 2,2	-0,20 \pm 2,2	-0,15 \pm 2,0	0,35 \pm 2,6	n.d

* Efeito estatisticamente significativo ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t.

Gráficos de Pareto, mostrando a contribuição relacionada e independente das variáveis para cada ingrediente ativo presente em cada uma das amostras

durante a etapa de extração do método foram gerados e avaliados, conforme mostrado abaixo na Figura 13 a Figura 16.

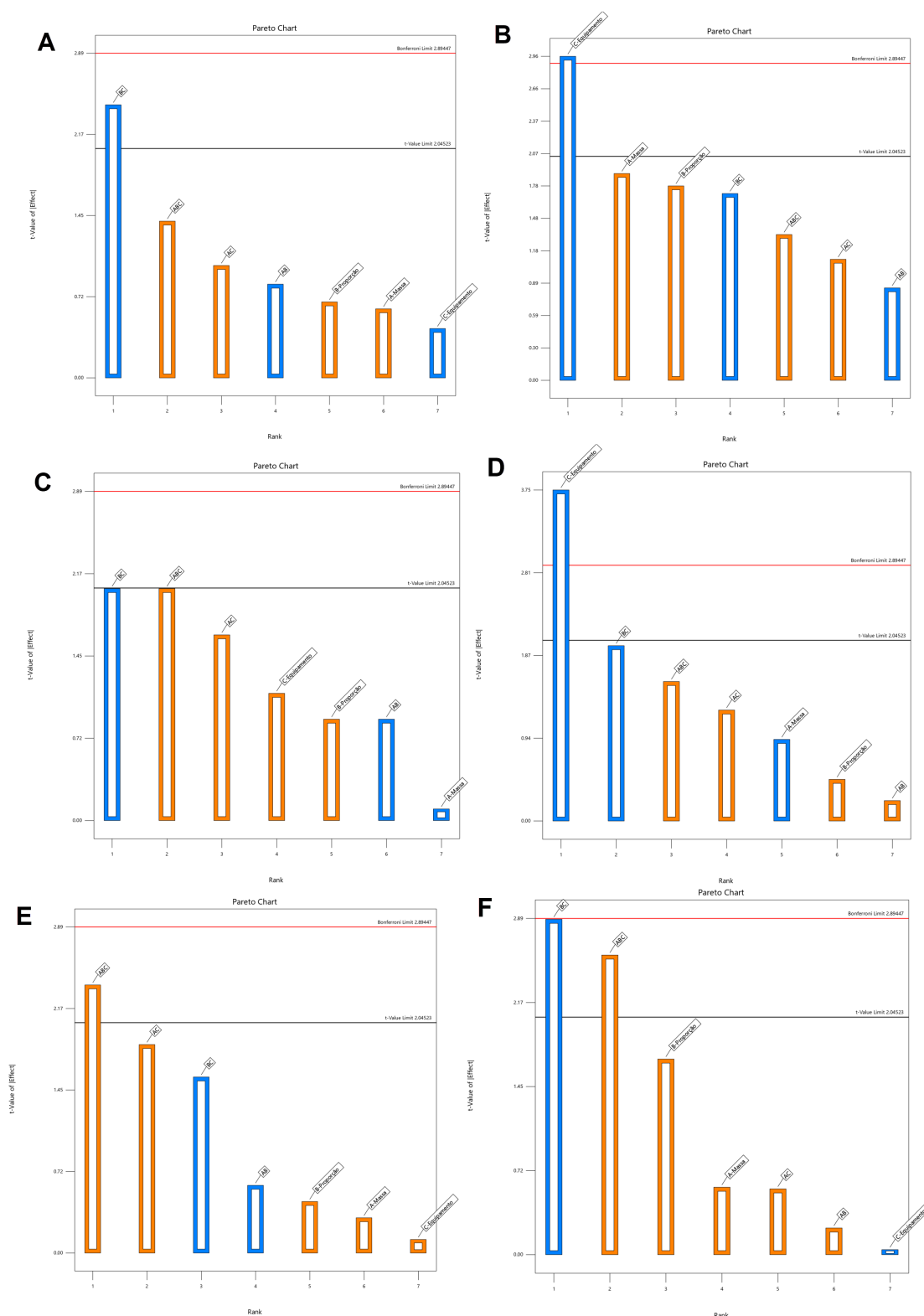


FIGURA 13 - Projeções de Pareto para as variáveis do planejamento fatorial 2^3 para cultivo de TOMATE onde, A: BAS 750 F; B: BAS 500 F; C: BAS 700 F; D: BAS 505 F; E: BAS 510 F; F: BAS 309 I e, barras laranja: efeito positivo; barras azul: efeito negativo.

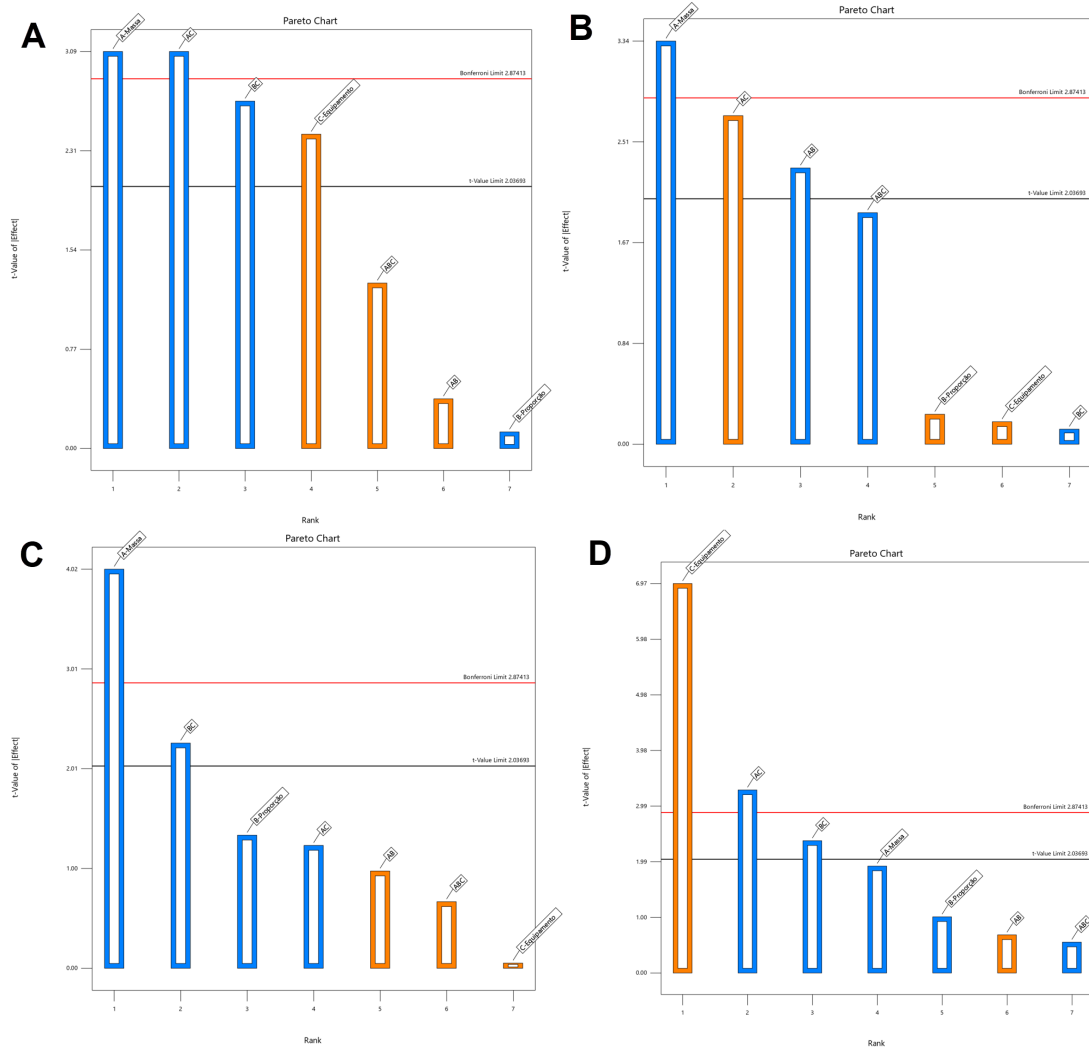


FIGURA 14 - Projeções de Pareto para as variáveis do planejamento fatorial 2^3 para cultivo de ARROZ onde, A: BAS 750 F; B: BAS 500 F; C: BAS 700 F; D: BAS 309 I e, barras laranja: efeito positivo; barras azul: efeito negativo.

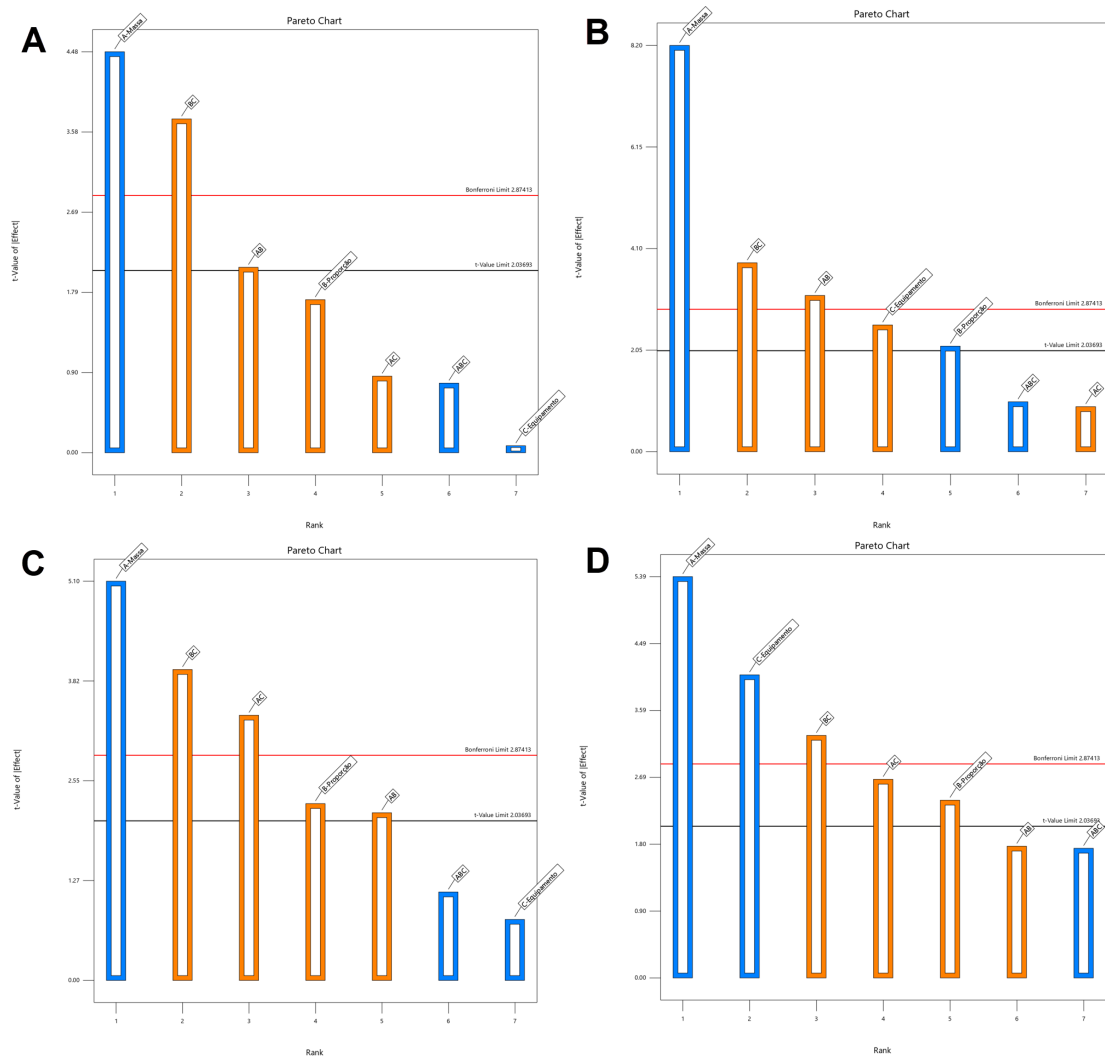


FIGURA 15 - Projeções de Pareto para as variáveis do planejamento fatorial 2^3 para cultivo de CITROS onde, A: BAS 750 F; B: BAS 500 F; C: BAS 700 F; D: BAS 309 I e, barras laranja: efeito positivo; barras azul: efeito negativo.

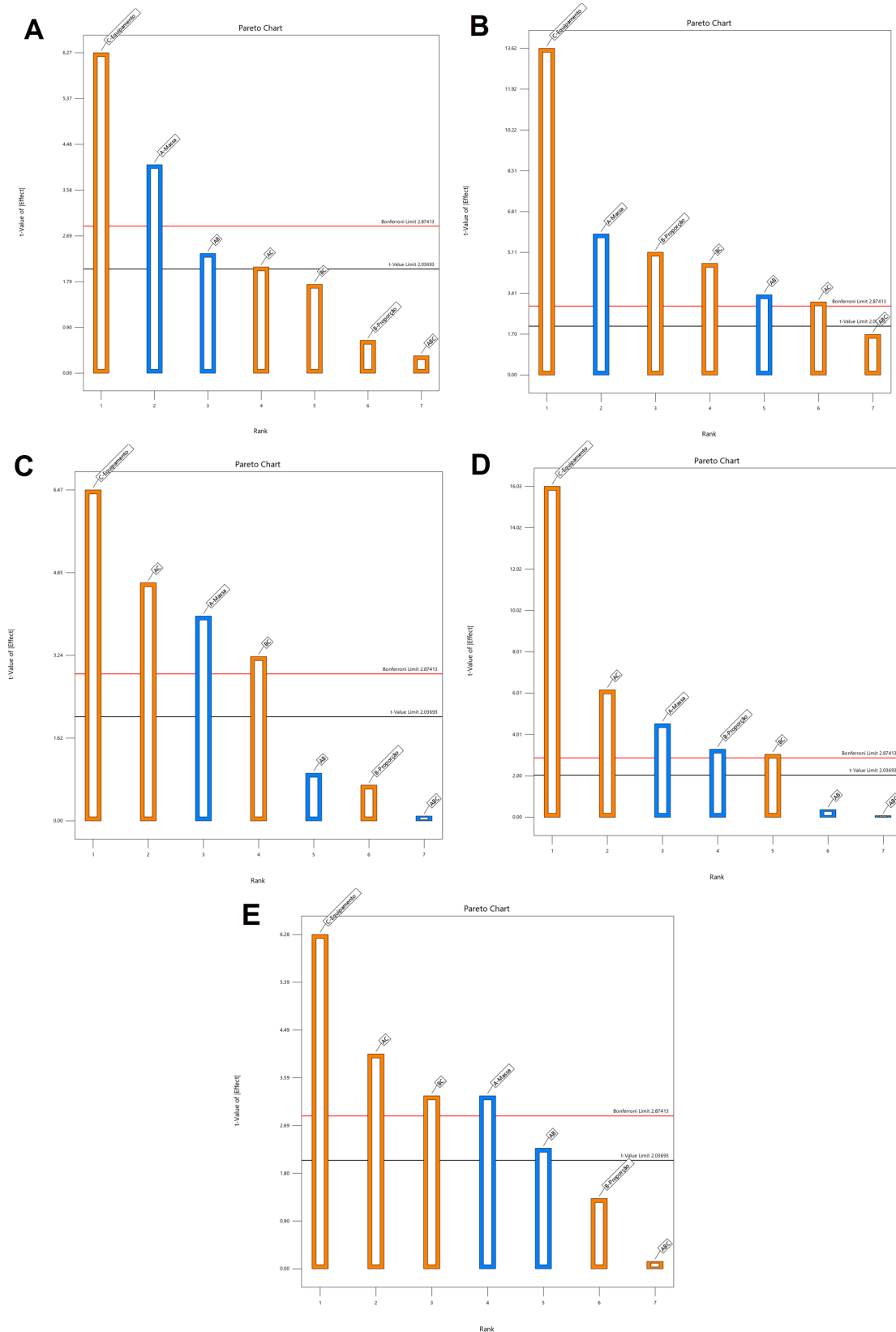


FIGURA 16 - Projeções de Pareto para as variáveis do planejamento fatorial 2^3 para cultivo de ALGODÃO onde, A: BAS 750 F; B: BAS 500 F; C: BAS 700 F; D: BAS 505 F; E: BAS 510 F e, barras laranja: efeito positivo; barras azul: efeito negativo.

Os resultados da Tabela 17 e Figura 13 para matriz de tomate permitem observar que, nos níveis avaliados, uma das variáveis isoladas afeta de forma estatisticamente significativa os resultados obtidos pela extração dos compostos. A mudança do equipamento Ultra-turrax para a agitação simples, aumentou o rendimento de extração em 10% para a dimoxistrobina (BAS 505 F) e em 8,5% para piraclostrobina (BAS 500 F), enquanto para demais compostos avaliados praticamente não houve uma variação significativa para os resultados. Também foi observado um efeito negativo significativo para a interação entre fatores de segunda ordem BC (proporção e equipamento), indicando que há um aumento de rendimento quando estes fatores se encontram em níveis opostos, na ordem de 10% para o teflubenzuron (BAS 309 I) e de 7% para o mefentrifluconazole (BAS 750 F), além de alguns efeitos significativos porém de menor impacto no rendimento para interação de terceira ordem ABC.

A massa de amostra e a proporção massa/volume apresentaram aumento no rendimento entre 0,2% e 6,2% a depender da condição avaliada porém sem apresentar nenhum efeito estatisticamente significativo para matriz de tomate. A recuperação média dos experimentos variou entre 93,7% para boscalida (BAS 510 F) e 105% para teflubenzuron (BAS 309 I), enquanto que individualmente para cada experimento às recuperações variaram entre 89% e 118% quando normalizados com os resultados médios obtidos da extração ao utilizar metodologia original, dentro da faixa de recuperação aceitável de 70-120% conforme descritos nos guidelines nacionais da RDC nº4 (ANVISA, 2012) e internacionais da SANTE/2020/12830 (SANTE, 2023).

Os resultados da Tabela 18 e Figura 14 para matriz de arroz permitem observar que, nos níveis avaliados, duas das variáveis isoladas afetam de forma estatisticamente significativa os resultados obtidos pela extração dos compostos. A mudança de equipamento alterando a agitação simples pelo uso do Ultra-turrax, aumentou o rendimento de extração em 11% para o teflubenzuron e em 3,8% para o mefentrifluconazole, enquanto o uso de massa de amostra menor (0,2g) proporcionou um aumento na taxa de rendimento de extração quando comparado com a maior massa de amostra (2,5g) para os ingredientes ativos mefentrifluconazole, piraclostrobina e fluxapiraxade na ordem de 4,8%, 5,4% e 7,8%, respectivamente.

Também foi observado alguns efeitos significativos para as interações de segunda ordem AB, AC e BC, bem como de terceira ordem ABC, porém com uma taxa de variação do rendimento entre 3,6% e 5,1%. A recuperação média dos experimentos variou entre 86,7% para teflubenzuron e 97,5% para fluxapiraxade, enquanto que individualmente para cada experimento, as recuperações variaram entre 80% e 108% quando normalizados com os resultados médios obtidos da extração ao utilizar metodologia original, dentro da faixa de recuperação aceitável de 70-120%.

Os resultados apresentados na Tabela 19 e na Figura 15 para a matriz de citros revelaram que, nos níveis avaliados, as três variáveis isoladas têm um impacto estatisticamente significativo nos resultados da extração dos compostos. O uso de uma massa de amostra menor (0,2 g) resultou em um aumento na taxa de rendimento de extração em comparação à maior massa de amostra (2,5 g) para todos os ingredientes ativos analisados, que incluem mefentrifluconazole, piraclostrobina, fluxapiraxade e teflubenzuron, com aumentos de 17%, 25%, 13% e 19%, respectivamente.

Além disso, a mudança de equipamento da agitação simples para o uso do Ultra-turrax proporcionou um aumento de 7,8% na taxa de rendimento de extração para a piraclostrobina, enquanto a agitação simples resultou em um aumento de 15% no rendimento de extração para o teflubenzuron em comparação ao uso do Ultra-turrax.

Quanto à proporção massa/volume, não foi identificado um padrão claro de impacto. Para alguns compostos, o aumento da proporção para 1:20 resultou em um incremento de rendimento de até 8,5%, enquanto, no caso da piraclostrobina, a redução da proporção aumentou a taxa de rendimento em até 6,5%.

Também foi observado alguns efeitos significativos para as interações de segunda ordem AB, AC e BC com uma taxa de variação do rendimento entre 5,6% e 14%. A recuperação média dos experimentos variou entre 98,2% para mefentrifluconazole e 104% para teflubenzuron, enquanto que individualmente para cada experimento, as recuperações variaram entre 78% e 134% quando normalizados com os resultados médios obtidos da extração ao utilizar metodologia original, dentro da faixa de recuperação aceitável de 70-120%, com exceção do experimento 7 (0,20g com proporção de 1:8 e uso de agitação

simples) no qual apresentou algumas recuperações acima de 120% no caso de piraclostrobina (127%) e teflubenzuron (134%).

Por fim, para os resultados da Tabela 20 e Figura 16 para matriz de algodão, foi possível observar que, nos níveis avaliados, tal como em arroz, as três variáveis isoladas afetam de forma estatisticamente significativa os resultados obtidos pela extração dos compostos.

O uso de uma massa de amostra menor (0,2 g) novamente resultou em um aumento na taxa de rendimento de extração em comparação com a maior massa de amostra (2,5 g) para todos os ingredientes ativos avaliados. Os aumentos observados foram de 11% para mefentrifluconazole, 13% para piraclostrobina, 8,6% para fluxapiroxade, 9,2% para dimoxistrobina e 8,3% para boscalida. Além disso, a alteração na proporção de massa/solvente também influenciou o rendimento de extração, com um aumento de 6,6% para a dimoxistrobina ao reduzir a proporção para 1:8, e um incremento de 11% para a piraclostrobina ao manter uma proporção maior de 1:20.

No entanto, no caso do algodão, o impacto mais significativo entre as variáveis estudadas foi o tipo de equipamento utilizado. O uso do Ultra-turrax em comparação à agitação simples resultou em um aumento da taxa de rendimento variando de 14% para fluxapiroxade até 33% para boscalida.

Foram observados efeitos significativos nas interações de segunda ordem AB, AC e BC, resultando em uma taxa de variação de rendimento entre 5,8% e 10%. A recuperação média dos experimentos variou de 81,0% para a piraclostrobina a 96,5% para a boscalida.

Quando analisadas individualmente, as recuperações em cada experimento oscilaram entre 49% e 114%, após normalização com os resultados médios obtidos pela metodologia original. Esses valores se encontram dentro da faixa de recuperação aceitável de 70-120%. No entanto, exceções foram observadas nos experimentos 6 (2,5g com proporção de 1:8 e agitação simples) e 8 (2,5g com proporção de 1:20 e agitação simples), que apresentaram as menores recuperações, abaixo de 70%. Isso foi especialmente notável para os compostos mefentrifluconazole, piraclostrobina e dimoxistrobina.

De forma geral, foi observado que a variável da proporção massa/volume apresentou um efeito menos significativo em relação às demais variáveis estudadas. Isso pode ser atribuído ao fato de que as proporções testadas de 1:8

e 1:20 são volumes suficientemente altos para garantir uma extração adequada dos ingredientes ativos presentes nas matrizes avaliadas.

É importante ressaltar que, em diferentes métodos de extração de pesticidas, como o método QuEChERS (ANASTASIADES et al., 2003), é comum utilizar uma proporção de 1:1 de massa de amostra para volume de solvente de extração. Essa proporção é amplamente adotada devido à sua eficácia na extração dos ingredientes ativos dos pesticidas em diversas matrizes.

Assim, os resultados obtidos neste estudo indicam que, para as matrizes vegetais avaliadas, as proporções de 1:8 e 1:20 já são suficientemente altas para garantir uma extração completa dos ingredientes ativos dos pesticidas. Portanto, a variação da proporção massa/volume não teve um impacto significativo na maioria dos resultados estudados.

Em relação à massa de amostra avaliada neste projeto, foi observado que o uso da menor massa de amostra (0,20g) teve um impacto positivo na taxa de rendimento em comparação com o uso de uma maior massa de 2,5g, em todos os experimentos nos quais foi observado um efeito significativo para a variável da massa.

Além disso, a precisão de cada experimento foi avaliada por meio do cálculo do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) a partir de cinco repetições de cada experimento, sob condições de repetibilidade.

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc) (INMETRO, 2000). A reprodutibilidade refere-se aos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como padronização de procedimentos analíticos, sendo ferramenta indispensável para avaliação de reprodutibilidade e exatidão dos métodos.

A documentação que apóia os estudos de precisão, quanto à reprodutibilidade, devem incluir estimativa do desvio padrão absoluto, estimativa do desvio padrão relativo e intervalo de confiança. HORWITZ et al. (1980) estabeleceram uma relação matemática para expressar a dependência entre valores de desvio padrão relativo e concentração da substância, pelo exame de resultados cumulativos de estudos colaborativos envolvendo grande quantidade

de compostos de interesse, matrizes e técnicas, sendo esta relação introduzida pela Trombeta de Horwitz.

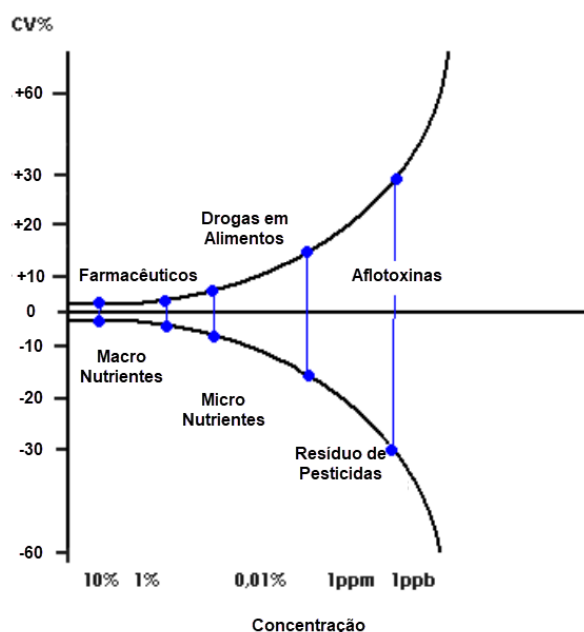


FIGURA 17 - Trombeta de Horwitz

As porcentagens de recuperação obtidas e os coeficientes de variação estão apresentados nas Tabelas 13 a 16, e uma representação gráfica dos diferentes experimentos para cada matriz pode ser encontrada nas Figuras 18 a 21.

Em geral, a maioria dos coeficientes de variação obtidos foi menor que os valores aceitáveis para amostras complexas, os quais podem ser de até 20% conforme descritos nas diretrizes nacionais da RDC nº4 (ANVISA, 2012) e internacionais da SANTE/2020/12830 (SANTE, 2023) e em conformidade com os valores descritos para a trombeta de Horwitz no nível de concentração avaliado. A exceção foi observada no ensaio 6 (2,5g, proporção 1:20 e agitação) para piraclostrobina em algodão, que apresentou um desvio padrão de 22%.

Nos experimentos realizados com uma massa de amostra miniaturizada de 0,20 g, os coeficientes de variação observados foram entre 2,1% e 18% para o tomate, 1,3% e 9,6% para o arroz, 7,6% e 19% para os citros, e 3,0% e 12% para o algodão. Embora se pudesse esperar um desvio padrão maior ao utilizar uma massa de amostra menor, devido à potencial heterogeneidade na distribuição do ingrediente ativo após a homogeneização, os experimentos que

determinaram o tamanho de partículas das amostras mostraram que estas já apresentavam uma granulometria reduzida.

Esse fator não impactou negativamente no desvio padrão dos experimentos, evidenciando a viabilidade da redução da massa de amostra na condução do método analítico. Assim, os resultados obtidos apoiam a utilização de amostras menores sem comprometer a precisão dos dados.

Esses resultados demonstram a viabilidade de reduzir a massa de amostra, o que pode trazer benefícios significativos em termos de economia de reagentes e tempo de análise, sem comprometer a precisão dos resultados obtidos nas matrizes vegetais avaliadas. Em um dos projetos internos da BASF, onde foi implementada a miniaturização do método analítico juntamente com a automatização da metodologia por meio do Liquid Handling System (Hamilton Microlab STAR), observamos uma economia de aproximadamente 90% tanto na utilização de reagentes orgânicos na etapa de extração quanto na mão de obra dos analistas durante as etapas de extração e purificação das amostras.

Ao analisar o uso dos diferentes equipamentos para a etapa de extração, não é possível observar uma tendência para um único padrão de equipamento. Em relação à matriz de tomate, o uso do agitador demonstrou ter um efeito positivo significativo em alguns dos ingredientes ativos. Por outro lado, para a matriz de algodão, o uso do ultra-turrax teve um efeito significativo na melhoria do rendimento das recuperações para todos os ativos avaliados.

No entanto, para as demais matrizes, como arroz e citros, observou-se um efeito menos significativo do equipamento em comparação com as outras matrizes. Nesses casos, não apenas a matriz, mas também o ingrediente ativo, influenciou o impacto do efeito do equipamento na taxa de rendimento.

Essas observações indicam que a escolha do equipamento adequado para a etapa de extração pode variar dependendo da matriz e do ingrediente ativo em questão.

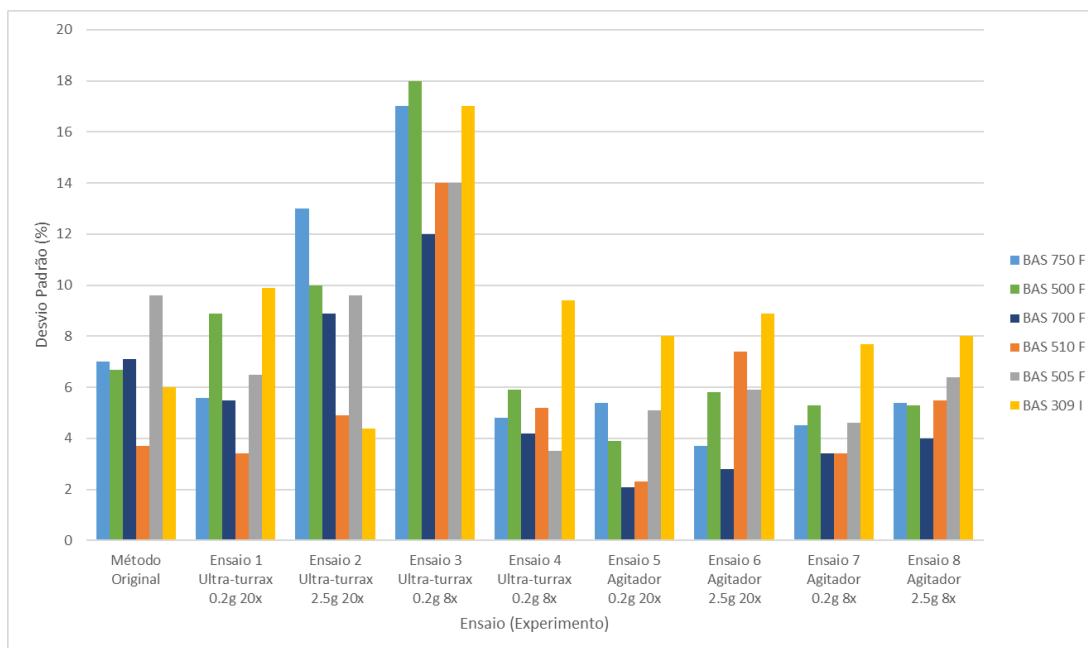


FIGURA 18 - Desvio padrão das replicatas de extração de tomate para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3

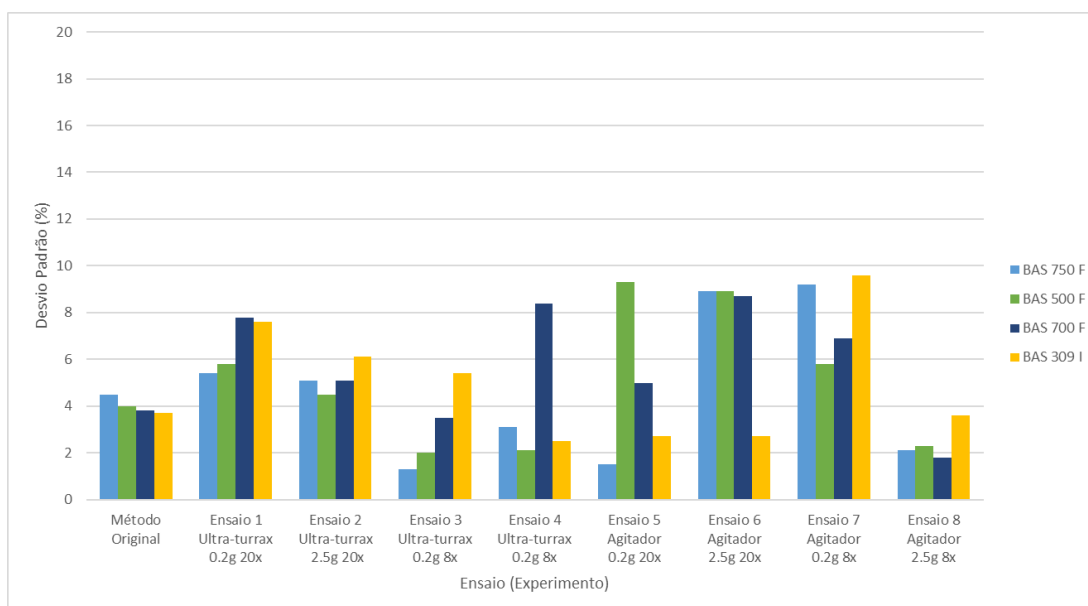


FIGURA 19 - Desvio padrão das replicatas de extração de arroz para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3

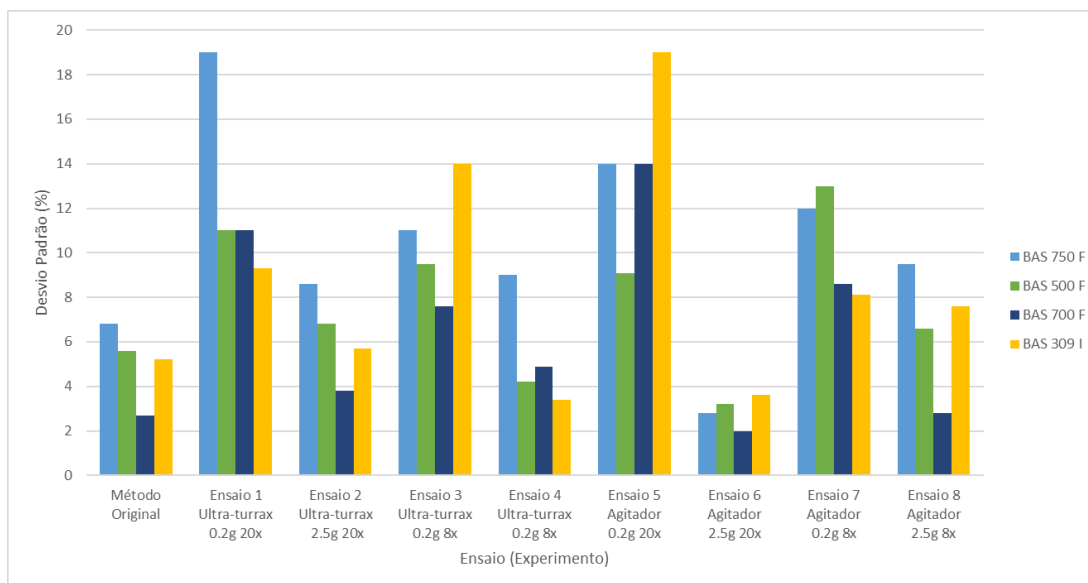


FIGURA 20 - Desvio padrão das replicatas de extração de citros para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3

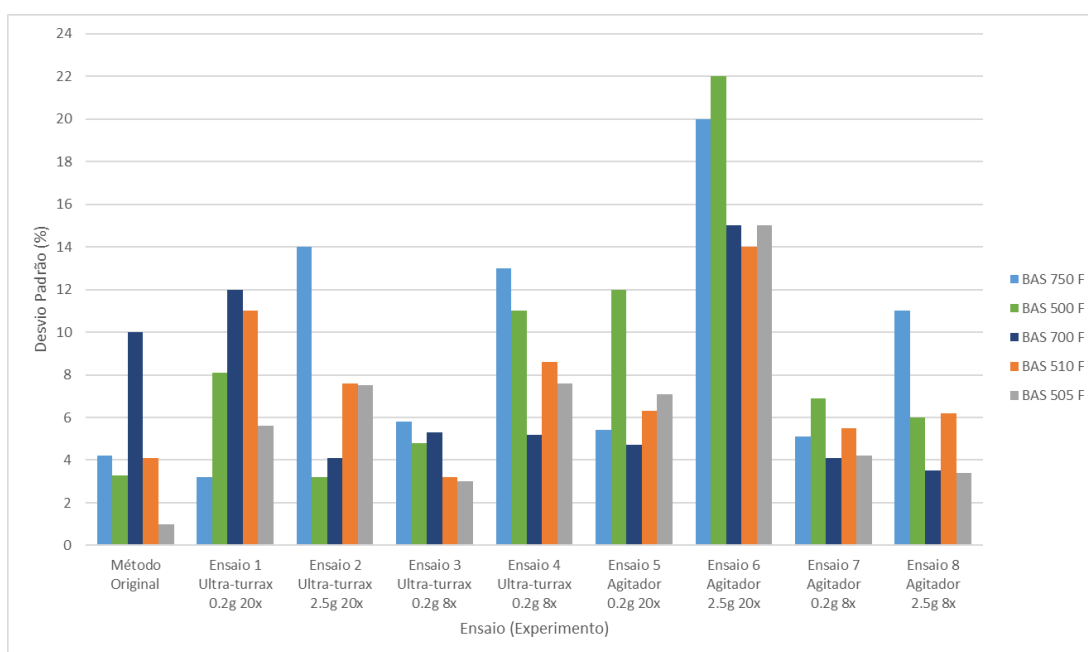


FIGURA 21 - Desvio padrão das replicatas de extração de algodão para os diferentes ensaios avaliados no planejamento fatorial 2^3

4.3. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO

Utilizando-se os dados obtidos do planejamento fatorial realizado para investigação do efeito das variáveis na etapa de extração, prosseguiu-se com uma avaliação estatística por meio da análise de variância (*One-Way ANOVA*). O objetivo foi realizar uma comparação entre os diferentes métodos avaliados no planejamento fatorial completo, a fim de determinar se eles resultaram em resultados de resíduos (mg/kg) estatisticamente iguais entre si para cada um dos ingredientes ativos avaliados nas distintas matrizes estudadas.

Nos casos em que foram observados uma diferença estatística significativa entre os métodos, foi realizado um teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. O propósito desse teste foi realizar uma comparação entre o método original e os diferentes experimentos realizados, com o intuito de complementar a análise de variância e entender as diferenças estatísticas entre a metodologia original e os diferentes ensaios realizados com as variações das variáveis investigadas.

A aplicação dessas análises estatísticas foi de suma importância para validar e fundamentar os resultados obtidos, permitindo uma análise mais robusta e confiável das diferentes metodologias de extração de pesticidas em matrizes vegetais. Ao realizar estas comparações estatísticas entre os métodos, foi possível identificar quais abordagens apresentaram melhor desempenho em termos de recuperação de resíduos extraídos das amostras vegetais, além de estabelecer critérios para a seleção do método mais adequado para análises futuras e avaliar a viabilidade de implementação de automação do método analítico miniaturizado.

Portanto, a aplicação da análise de variância e do teste de Tukey complementa o estudo, fornecendo informações valiosas sobre as diferenças estatísticas entre os métodos avaliados e contribuindo para aprimorar o conhecimento sobre a eficiência da extração de pesticidas em matrizes vegetais.

TABELA 21 – ANOVA fator único para TOMATE calculado através do Excel

COMPOSTO	FONTE DE VARIACÃO	SQ	GL	MQ	F	VALOR-p	F CRÍTICO	CONCLUSÃO
BAS 750 F	Entre grupos	0,00369	8	0,00046	1,42749	0,22198	2,234562	Não há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,01067	33	0,00032				
	Total	0,01436	41					
BAS 500 F	Entre grupos	0,01377	8	0,00172	3,06461	0,01078	2,234562	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,01853	33	0,00056				
	Total	0,03229	41					
BAS 700 F	Entre grupos	0,001114	8	0,000139	1,662122	0,145225	2,234562	Não há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,002766	33	8,38E-05				
	Total	0,00388	41					
BAS 505 F	Entre grupos	0,023063	8	0,002883	3,194822	0,008522	2,234562	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,029778	33	0,000902				
	Total	0,052841	41					
BAS 510 F	Entre grupos	0,007862	8	0,000983	2,226302	0,050779	2,234562	Não há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,014568	33	0,000441				
	Total	0,02243	41					
BAS 309 I	Entre grupos	0,000154	8	1,92E-05	3,004756	0,010923	2,208518	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,00023	36	6,40E-06				
	Total	0,000384	44					

TABELA 22 – ANOVA fator único para ARROZ calculado através do Excel

COMPOSTO	FONTE DE VARIACÃO	SQ	GL	MQ	F	VALOR-p	F CRÍTICO	CONCLUSÃO
BAS 750 F	Entre grupos	0,128905	8	0,016113	5,715694	0,000113	2,216675	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,098669	35	0,002819				
	Total	0,227574	43					
BAS 500 F	Entre grupos	0,186582	8	0,023323	7,489375	7,80E-06	2,2085181	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,112108	36	0,003114				
	Total	0,29869	44					
BAS 700 F	Entre grupos	0,040116	8	0,005014	3,728217	0,002879	2,2085181	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,04842	36	0,001345				
	Total	0,088536	44					
BAS 309 I	Entre grupos	0,110549	8	0,013819	11,63515	8,78E-08	2,22533997	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,04038	34	0,001188				
	Total	0,150929	42					

TABELA 23 – ANOVA fator único para CITROS calculado através do Excel

COMPOSTO	FONTE DE VARIÇÃO	SQ	GL	MQ	F	VALOR-p	F CRÍTICO	CONCLUSÃO
BAS 750 F	Entre grupos	0,00338054	8	0,0004226	5,9582658	7,09E-05	2,2085181	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,00255316	36	7,09E-05				
	Total	0,0059337	44					
BAS 500 F	Entre grupos	0,015196	8	0,0019	14,20703	4,46E-09	2,2085181	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,004813	36	0,000134				
	Total	0,020009	44					
BAS 700 F	Entre grupos	0,000545	8	6,81E-05	8,612819	1,79E-06	2,2085181	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,000285	36	7,91E-06				
	Total	0,00083	44					
BAS 309 I	Entre grupos	0,005199	8	0,00065	10,45366	1,99E-07	2,2085181	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,002238	36	6,22E-05				
	Total	0,007436	44					

TABELA 24 – ANOVA fator único para ALGODÃO calculado através do Excel

COMPOSTO	FONTE DE VARIÇÃO	SQ	GL	MQ	F	VALOR-p	F CRÍTICO	CONCLUSÃO
BAS 750 F	Entre grupos	0,000180	8	2,25E-05	10,85687	1,96E-07	2,22534	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,000071	34	2,07E-06				
	Total	0,000251	42					
BAS 500 F	Entre grupos	0,000245	8	3,06E-05	46,98404	3,72E-16	2,22534	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,000022	34	6,51E-07				
	Total	0,000267	42					
BAS 700 F	Entre grupos	0,000037	8	4,66E-06	12,61861	3,35E-08	2,22534	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,000013	34	3,69E-07				
	Total	0,000050	42					
BAS 505 F	Entre grupos	0,001520	8	0,00019	44,08967	9,85E-16	2,22534	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,000146	34	4,31E-06				
	Total	0,001667	42					
BAS 510 F	Entre grupos	0,000902	8	0,000113	10,93021	1,81E-07	2,22534	Há diferença entre grupos
	Dentro dos grupos	0,000351	34	1,03E-05				
	Total	0,001253	42					

4.4. TESTE DE TUKEY

Uma análise de variância (ANOVA) rejeita ou não a hipótese de igualdade de médias populacionais de diversos grupos, mas não determina quais grupos têm médias estatisticamente diferentes. Desta forma, o teste proposto por TUKEY, 1953, conhecido como teste de Tukey da diferença honestamente significativa (*honestly significant difference* – HSD), tem como objetivo realizar comparações de médias duas a duas. Com isso, esse procedimento testa as hipóteses

$$\begin{cases} H_0 : \mu_i = \mu_j \\ H_1 : \mu_i \neq \mu_j \end{cases}$$

para todas as combinações de i e j , com $i \neq j$. Assim, ao avaliar k médias de tratamentos, podem ser feitas $k(k - 1)/2$ comparações de médias.

A precisão do teste depende da satisfação de certas suposições fundamentais. Essas suposições incluem a normalidade e independência das observações, bem como a igualdade dos tamanhos das amostras e a homogeneidade das variâncias. Quando todas essas condições são atendidas, o nível de significância escolhido (α) é adequadamente refletido no resultado do teste. No entanto, se alguma dessas suposições não for satisfeita, é necessário exercer cautela na interpretação dos resultados obtidos (ZORZATTO, 1985).

O Teste de Tukey consiste em comparar todos os possíveis pares de médias e se baseia na diferença mínima significativa (DMS), considerando os percentis do grupo. No cálculo da DMS utiliza-se também a distribuição da amplitude estudentizada, o quadrado médio dos resíduos da ANOVA e o tamanho amostral dos grupos. Assim, ao avaliar k amostras, todas com tamanho r , definindo \bar{Y}_i como a média aritmética da amostra i , supõe-se que as variáveis aleatórias $\bar{Y}_1, \bar{Y}_2, \dots, \bar{Y}_k$ são independentes e normalmente distribuídas com uma média geral μ e variância σ^2/r .

Ao definir Q como a amplitude desse conjunto de k variáveis,

$$Q = \max(\bar{Y}_i) - \min(\bar{Y}_i)$$

tem-se que a distribuição da amplitude estudentizada é obtida por

$$q(k, \nu) = \frac{Q}{\hat{\sigma}}$$

em que $\hat{\sigma}$ é estimador do desvio padrão (σ), determinado com ν graus de liberdade; de modo que Q e $\hat{\sigma}$ devem ser independentemente distribuídas.

Dessa forma, o contraste entre duas médias de tratamentos \bar{Y}_i e \bar{Y}_j , pode ser testado utilizando a DMS, definida como:

$$DMS = q_{(\alpha, k, \nu)} \sqrt{\frac{1}{2} \hat{V} ar(\bar{Y}_i - \bar{Y}_j)} \quad (2.4.1)$$

em que $q(\alpha, k, \nu)$ é o quantil da distribuição da amplitude estudentizada cuja área a sua direita é α , sendo esse último o nível de significância estabelecido para o teste. O teste de Tukey declara que duas médias, μ_i e μ_j são significativamente diferentes se a estimativa do valor absoluto de suas diferenças amostrais, isto é, $|y_i - y_j|$, ultrapassar o valor da DMS. Caso contrário, não se rejeita a hipótese de igualdade entre as médias avaliadas.

No caso de dados balanceados, ou seja, todos os tratamentos com o mesmo número r de repetições e homogeneidade de variância, a equação (2.4.1) pode ser simplificada por

$$DMS = q_{(\alpha, k, \nu)} \sqrt{\frac{QMRes}{r}}$$

em que $QMRes$ representa o estimador da variância dado pelo quadrado médio do resíduo.

Entretanto, quando o tamanho das amostras são diferentes, ou seja, utiliza-se dados não balanceados, o teste de Tukey ainda pode ser utilizado porém sofre uma modificação, passando a ser denominado como teste de Tukey-Kramer. Este teste deixa de ser exato e leva em consideração em sua metodologia o tamanho amostral de cada grupo, porém segue considerado minimamente conservativo, uma vez que o nível de significância conjunto, é muitas vezes, menor que o valor α fixado.

De acordo com o teste de Tukey-Kramer, duas médias μ_i e μ_j , serão consideradas significativamente diferentes se o valor absoluto de suas diferenças amostrais ultrapassar o valor da DMS

$$DMS = q_{(\alpha, k, \nu)} \sqrt{\frac{QMRes}{2} \left(\frac{1}{r_i} + \frac{1}{r_j} \right)}$$

de modo que r_i e r_j representam, respectivamente, o número de repetições referente às amostras que receberam os tratamentos i e j .

Por fim, é possível, realizar comparações a partir da construção de intervalos de confiança para a diferença de duas médias, cujos limites são dados por

$$IC(\mu_i - \mu_j) = (\bar{y}_i - \bar{y}_j) \pm DMS$$

Através desses intervalos de confiança, as duas médias comparadas não serão consideradas diferentes se o intervalo criado contiver o valor zero (NOGUEIRA, 2017).

TABELA 25 – Resultados para teste de Tukey-Kramer em TOMATE

Composto	Comparação (Experimentos)	Número de repetições	Diferença de médias	Valor crítico	Resultado
BAS 500 F	Original e Ensaio 1	5 e 5	0,029	0,0316	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	5 e 5	0,009	0,0316	Não há diferença
	Original e Ensaio 3	5 e 5	0,032	0,0316	Há diferença
	Original e Ensaio 4	5 e 5	0,004	0,0316	Não há diferença
	Original e Ensaio 5	5 e 5	0,025	0,0316	Não há diferença
	Original e Ensaio 6	5 e 4	0,014	0,0356	Não há diferença
	Original e Ensaio 7	5 e 4	0,020	0,0356	Não há diferença
	Original e Ensaio 8	5 e 4	0,003	0,0356	Não há diferença
BAS 505 F	Original e Ensaio 1	5 e 5	0,012	0,0401	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	5 e 5	0,001	0,0401	Não há diferença
	Original e Ensaio 3	5 e 5	0,020	0,0401	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	5 e 5	0,001	0,0401	Não há diferença
	Original e Ensaio 5	5 e 5	0,064	0,0401	Há diferença
	Original e Ensaio 6	5 e 4	0,029	0,0451	Não há diferença
	Original e Ensaio 7	5 e 4	0,027	0,0451	Não há diferença
	Original e Ensaio 8	5 e 4	0,019	0,0451	Não há diferença
BAS 309 I	Original e Ensaio 1	5 e 5	0,0026	0,0034	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	5 e 5	0,0012	0,0034	Não há diferença
	Original e Ensaio 3	5 e 5	0,0010	0,0034	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	5 e 5	0,0026	0,0034	Não há diferença
	Original e Ensaio 5	5 e 5	0,0045	0,0034	Há diferença
	Original e Ensaio 6	5 e 5	0,0029	0,0034	Não há diferença
	Original e Ensaio 7	5 e 5	0,0012	0,0034	Não há diferença
	Original e Ensaio 8	5 e 5	0,0002	0,0034	Não há diferença

Amplitude total estudentizada (q) = 4,72, ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 26 – Resultados para teste de Tukey-Kramer em ARROZ

Composto	Comparação (Experimentos)	Número de repetições	Diferença de médias	Valor crítico	Resultado
BAS 750 F	Original e Ensaio 1	5 e 5	0,023	0,0709	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	5 e 5	0,105	0,0709	Há diferença
	Original e Ensaio 3	5 e 5	0,049	0,0709	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	5 e 5	0,127	0,0709	Há diferença
	Original e Ensaio 5	5 e 5	0,077	0,0709	Há diferença
	Original e Ensaio 6	5 e 5	0,091	0,0709	Há diferença
	Original e Ensaio 7	5 e 5	0,138	0,0709	Há diferença
	Original e Ensaio 8	5 e 5	0,121	0,0709	Há diferença
BAS 500 F	Original e Ensaio 1	5 e 5	0,177	0,0745	Há diferença
	Original e Ensaio 2	5 e 5	0,114	0,0745	Há diferença
	Original e Ensaio 3	5 e 5	0,102	0,0745	Há diferença
	Original e Ensaio 4	5 e 5	0,185	0,0745	Há diferença
	Original e Ensaio 5	5 e 5	0,088	0,0745	Há diferença
	Original e Ensaio 6	5 e 5	0,204	0,0745	Há diferença
	Original e Ensaio 7	5 e 5	0,099	0,0745	Há diferença
	Original e Ensaio 8	5 e 5	0,207	0,0745	Há diferença
BAS 700 F	Original e Ensaio 1	5 e 5	0,050	0,0490	Há diferença
	Original e Ensaio 2	5 e 5	0,035	0,0490	Não há diferença
	Original e Ensaio 3	5 e 5	0,016	0,0490	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	5 e 5	0,058	0,0490	Há diferença
	Original e Ensaio 5	5 e 5	0,006	0,0490	Não há diferença
	Original e Ensaio 6	5 e 5	0,026	0,0490	Não há diferença
	Original e Ensaio 7	5 e 5	0,002	0,0490	Não há diferença
	Original e Ensaio 8	5 e 5	0,040	0,0490	Não há diferença
BAS 309 I	Original e Ensaio 1	3 e 5	0,0086	0,0613	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	3 e 5	0,0663	0,0613	Há diferença
	Original e Ensaio 3	3 e 5	0,0480	0,0613	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	3 e 5	0,1041	0,0613	Há diferença
	Original e Ensaio 5	3 e 5	0,1418	0,0613	Há diferença
	Original e Ensaio 6	3 e 5	0,1111	0,0613	Há diferença
	Original e Ensaio 7	3 e 5	0,1405	0,0613	Há diferença
	Original e Ensaio 8	3 e 5	0,1393	0,0613	Há diferença

Amplitude total estudentizada (q) = 4,72, ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 27 – Resultados para teste de Tukey em CITROS

Composto	Comparação (Experimentos)	Número de repetições	Diferença de médias	Valor crítico	Resultado
BAS 750 F	Original e Ensaio 1	5 e 5	0,0022	0,0112	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	5 e 5	0,0161	0,0112	Há diferença
	Original e Ensaio 3	5 e 5	0,0093	0,0112	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	5 e 5	0,0031	0,0112	Não há diferença
	Original e Ensaio 5	5 e 5	0,0005	0,0112	Não há diferença
	Original e Ensaio 6	5 e 5	0,0076	0,0112	Não há diferença
	Original e Ensaio 7	5 e 5	0,0131	0,0112	Há diferença
	Original e Ensaio 8	5 e 5	0,0099	0,0112	Não há diferença
BAS 500 F	Original e Ensaio 1	5 e 5	0,0212	0,0154	Há diferença
	Original e Ensaio 2	5 e 5	0,0147	0,0154	Não há diferença
	Original e Ensaio 3	5 e 5	0,0199	0,0154	Há diferença
	Original e Ensaio 4	5 e 5	0,0000	0,0154	Não há diferença
	Original e Ensaio 5	5 e 5	0,0051	0,0154	Não há diferença
	Original e Ensaio 6	5 e 5	0,0239	0,0154	Há diferença
	Original e Ensaio 7	5 e 5	0,0334	0,0154	Há diferença
	Original e Ensaio 8	5 e 5	0,0170	0,0154	Há diferença
BAS 700 F	Original e Ensaio 1	5 e 5	0,0021	0,0038	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	5 e 5	0,0049	0,0038	Há diferença
	Original e Ensaio 3	5 e 5	0,0025	0,0038	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	5 e 5	0,0019	0,0038	Não há diferença
	Original e Ensaio 5	5 e 5	0,0015	0,0038	Não há diferença
	Original e Ensaio 6	5 e 5	0,0032	0,0038	Não há diferença
	Original e Ensaio 7	5 e 5	0,0061	0,0038	Há diferença
	Original e Ensaio 8	5 e 5	0,0047	0,0038	Há diferença
BAS 309 I	Original e Ensaio 1	5 e 5	0,0059	0,0105	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	5 e 5	0,0129	0,0105	Há diferença
	Original e Ensaio 3	5 e 5	0,0090	0,0105	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	5 e 5	0,0017	0,0105	Não há diferença
	Original e Ensaio 5	5 e 5	0,0133	0,0105	Há diferença
	Original e Ensaio 6	5 e 5	0,0014	0,0105	Não há diferença
	Original e Ensaio 7	5 e 5	0,0250	0,0105	Há diferença
	Original e Ensaio 8	5 e 5	0,0053	0,0105	Não há diferença

Amplitude total estudentizada (q) = 4,72, ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 28 – Resultados para teste de Tukey-Kramer em ALGODÃO

Composto	Comparação (Experimentos)	Número de repetições	Diferença de médias	Valor crítico	Resultado
BAS 750 F	Original e Ensaio 1	3 e 5	0,0028	0,0026	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	3 e 5	0,0026	0,0026	Há diferença
	Original e Ensaio 3	3 e 5	0,0004	0,0026	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	3 e 5	0,0024	0,0026	Não há diferença
	Original e Ensaio 5	3 e 5	0,0033	0,0026	Há diferença
	Original e Ensaio 6	3 e 5	0,0073	0,0026	Há diferença
	Original e Ensaio 7	3 e 5	0,0040	0,0026	Há diferença
	Original e Ensaio 8	3 e 5	0,0055	0,0026	Há diferença
BAS 500 F	Original e Ensaio 1	3 e 5	0,0019	0,0014	Há diferença
	Original e Ensaio 2	3 e 5	0,0024	0,0014	Há diferença
	Original e Ensaio 3	3 e 5	0,0014	0,0014	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	3 e 5	0,0001	0,0014	Não há diferença
	Original e Ensaio 5	3 e 5	0,0026	0,0014	Há diferença
	Original e Ensaio 6	3 e 5	0,0063	0,0014	Há diferença
	Original e Ensaio 7	3 e 5	0,0041	0,0014	Há diferença
	Original e Ensaio 8	3 e 5	0,0051	0,0014	Há diferença
BAS 700 F	Original e Ensaio 1	3 e 5	0,0009	0,0306	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	3 e 5	0,0005	0,0306	Não há diferença
	Original e Ensaio 3	3 e 5	0,0000	0,0306	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	3 e 5	0,0000	0,0306	Não há diferença
	Original e Ensaio 5	3 e 5	0,0009	0,0306	Não há diferença
	Original e Ensaio 6	3 e 5	0,0028	0,0306	Há diferença
	Original e Ensaio 7	3 e 5	0,0006	0,0306	Não há diferença
	Original e Ensaio 8	3 e 5	0,0021	0,0306	Há diferença
BAS 505 F	Original e Ensaio 1	3 e 5	0,0028	0,0037	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	3 e 5	0,0041	0,0037	Há diferença
	Original e Ensaio 3	3 e 5	0,0029	0,0037	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	3 e 5	0,0037	0,0037	Há diferença
	Original e Ensaio 5	3 e 5	0,0061	0,0037	Há diferença
	Original e Ensaio 6	3 e 5	0,0013	0,0037	Há diferença
	Original e Ensaio 7	3 e 5	0,0020	0,0037	Não há diferença
	Original e Ensaio 8	3 e 5	0,0086	0,0037	Há diferença

(continuação tabela...)

Composto	Comparação (Experimentos)	Número de repetições	Diferença de médias	Valor crítico	Resultado
BAS 510 F	Original e Ensaio 1	3 e 5	0,0023	0,0057	Não há diferença
	Original e Ensaio 2	3 e 5	0,0006	0,0057	Não há diferença
	Original e Ensaio 3	3 e 5	0,0046	0,0057	Não há diferença
	Original e Ensaio 4	3 e 5	0,0032	0,0057	Não há diferença
	Original e Ensaio 5	3 e 5	0,0008	0,0057	Não há diferença
	Original e Ensaio 6	3 e 5	0,0110	0,0057	Há diferença
	Original e Ensaio 7	3 e 5	0,0014	0,0057	Não há diferença
	Original e Ensaio 8	3 e 5	0,0065	0,0057	Há diferença

Amplitude total estudentizada (q) = 4,72, ao nível de 5% de probabilidade.

A avaliação comparativa dos resultados foi realizada por meio de uma análise de variância de fator único (ANOVA) seguida de um teste de Tukey nos casos em que foi observada variância estatística entre os métodos.

Os resultados obtidos para tomate na Tabela 21 indicaram a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os experimentos de extração avaliados para os ingredientes ativos mefentrifluconazole (BAS 750 F), fluxapiraxade (BAS 700 F) e boscalida (BAS 510 F). No entanto, observou-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para os ingredientes ativos piraclostrobina (BAS 500 F), dimoxistrobina (BAS 505 F) e teflubenzuron (BAS 309 I).

Devido à limitação do teste ANOVA de fator único em identificar quais grupos apresentam diferenças significativas de variância, foi empregado o teste de Tukey-Kramer para avaliar quais experimentos, realizados no contexto do planejamento fatorial, apresentaram resultados estatisticamente distintos em comparação com os dados obtidos de resíduos utilizando o método original de extração. Essa análise é apresentada na Tabela 25.

Os resultados revelaram que, no caso do ingrediente ativo piraclostrobina, apenas o experimento 3 (com massa de amostra de 0,20g, utilizando proporção 1:20 e extração com ultra-turrax) apresentou diferenças estatisticamente distintas em relação ao método original, sendo que a diferença percentual entre o resultado encontrado de resíduo para o método original e o experimento 3 foi de -11%. Por outro lado, para os ingredientes ativos dimoxistrobina e

teflubenzuron, o único ensaio que demonstrou diferença estatística em comparação ao método original foi o experimento 5 (com massa de amostra de 0,20g, utilizando proporção 1:20 e extração com agitador) com diferença percentual de 18% para ambos os ativos.

No caso do cultivo de arroz, os resultados obtidos na Tabela 22 revelaram que, no caso da matriz de arroz, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para todos os ingredientes ativos avaliados. Através do uso do Teste de Tukey-Kramer, detalhado na Tabela 26, constatou-se que a maioria dos experimentos apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com o método original, com exceção do fluxapirroxade, no qual apenas os experimentos 1 e 4 apresentaram diferenças significativas.

Ao avaliar a diferença percentual estatística entre o método original e cada um dos experimentos realizados no planejamento fatorial, observou-se uma variação nos resultados de -12% a 2% para o ingrediente ativo mefentrifluconazole. Já para o ingrediente ativo piraclostrobina, a variação ficou entre -18% e -8%. Para o fluxapirroxade, a variação foi de -9% a 8%. E, por fim, para o teflubenzuron, a variação foi de -20% a -1%.

Para as matrizes de citros e algodão, os resultados obtidos nas Tabelas 22 e 23, respectivamente, indicam que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para todos os ingredientes ativos avaliados, de forma semelhante ao que foi observado anteriormente para a matriz de arroz.

No caso dos citros, ao realizar o teste de Tukey, conforme Tabela 27, verificou-se que, para o mefentrifluconazole, os experimentos 2 e 7 apresentaram diferenças estatisticamente distintas em relação ao método original. A diferença percentual entre os resultados de resíduos obtidos pelo método original e esses experimentos foi de -22% e 18%, respectivamente. Para a piraclostrobina, foram observadas diferenças estatísticas nos experimentos 1, 3, 6, 7 e 8, com variações percentuais entre -19% e 27%. Em relação ao fluxapyroxade, foram encontradas diferenças estatísticas nos resultados dos experimentos 2, 7 e 8, com variações percentuais entre -14% e 17%. Por fim, para o teflubenzuron, foram observadas diferenças nos experimentos 2, 5 e 7, com variação percentual entre -18% e 34%.

No caso do algodão, ao realizar o teste de Tukey-Kramer, conforme dados descritos na Tabela 28, a maior parte dos experimentos apresentou diferenças significativas nos resultados em comparação ao método original para a piraclostrobina, dimoxistrobina e mefentrifluconazole, com variações percentuais entre -51% e -13% para a piraclostrobina, entre -40% e 12% para a dimoxistrobina e entre -39% e -13% para o mefentrifluconazole. Para o fluxapyroxade e boscalida, apenas os experimentos 6 e 8 apresentaram variações estatisticamente significativas em comparação ao método original, com diferenças percentuais entre -30% e -23% e -26% e -15%, respectivamente.

É importante ressaltar que, no caso do algodão, tanto a piraclostrobina quanto o fluxapyroxade apresentaram resultados de resíduos iguais ou inferiores ao limite de quantificação de 0,01 mg/kg do método analítico, limitando a confiabilidade da variação desses resultados.

4.5. DIFERENÇA PERCENTUAL

A análise de defensivos agrícolas em matrizes complexas, como tecido vegetal, tal como realizado nesta dissertação, apresenta desafios adicionais devido à presença de outros compostos e componentes que podem interferir nos resultados analíticos. Essa complexidade pode levar a uma maior variabilidade nos resultados tanto intra quanto inter ensaios, quando comparados a compostos com concentrações mais altas ou em amostras puras. Portanto, é importante considerar essa variabilidade ao interpretar os resultados, e com isso a diferença estatística por si só não deve ser considerada como um critério absoluto para a seleção ou rejeição de um método analítico alternativo. É necessário levar em consideração o contexto do estudo, a finalidade da análise e as diretrizes aplicáveis à área de pesquisa.

A variabilidade dos resultados em matrizes complexas pode ser atribuída a diversos fatores, como a heterogeneidade da amostra, a presença de interferentes inerentes da amostra de interesse, tais como lipídios, proteínas, carboidratos, entre outros, a influência de diferentes componentes da matriz e a complexidade dos processos de extração e análise. Esses fatores podem

contribuir para uma maior dispersão dos resultados e para diferenças estatísticas entre os métodos avaliados.

O guia técnico na avaliação de eficiência de extração de métodos analíticos de resíduos da comissão europeia SANTE/2017/10632 rev.05 (SANTE, 2023) descreve que a etapa de extração é a parte crucial dos métodos analíticos e tem grande influência na correta quantificação de resíduos de pesticidas, sendo que rendimento da extração pode ser afetado por diversos fatores, como tempo de extração, temperatura de extração, agitação, bem como o tipo de solvente de extração.

Conforme descrito no documento SANTE/2017/10632 (SANTE, 2023), a validação cruzada envolve a comparação das quantidades de resíduos relevantes extraídos de amostras com os resíduos incorporados, utilizando o sistema de solvente do método a ser testado e aplicando as mesmas condições utilizadas durante os estudos de metabolismo (neste projeto, referindo-se ao método original). Para que a eficiência de extração seja considerada suficientemente comprovada, a quantidade de resíduos encontrada deve diferir em no máximo 30% (para resíduos > 0,01 mg/kg) em comparação com os resultados obtidos usando o solvente no estudo de metabolismo (método original).

Isso significa que é possível realizar uma comparação da eficiência de extração entre dois métodos, desde que a diferença na quantidade de resíduos extraídos entre o método desejado e o método original (utilizado no estudo de metabolismo) não exceda 30%. Essa comparação é feita utilizando os solventes correspondentes a cada método e considerando as mesmas condições experimentais aplicadas durante os estudos de metabolismo. A validação cruzada permite avaliar se o método desejado é capaz de extrair quantidades relevantes de resíduos de forma comparável ao método original, garantindo assim a eficiência de extração adequada.

No caso desta dissertação, foram mantidos os mesmos solventes em todas as metodologias testadas, variando-se fatores como equipamento utilizado, massa de amostras e proporção massa amostra/solvente de extração. Ao comparar a diferença percentual de cada experimento em relação ao método original, observa-se que na maioria dos casos a diferença absoluta de resíduos entre os métodos foi inferior a 30%, conforme detalhado nas tabelas 29 a 33.

TABELA 29 – Diferença percentual da metodologia original em relação aos diferentes experimentos para amostra de tomate

* Não houve diferença estatística entre ensaio e método original.

Para a matriz de tomate, constata-se que em apenas três situações houve

Experimento	BAS 750 F	BAS 500 F	BAS 700 F	BAS 505 F	BAS 510 F	BAS 309 I
Ensaio 1	*	*	*	*	*	*
Ensaio 2	*	*	*	*	*	*
Ensaio 3	*	-11%	*	*	*	*
Ensaio 4	*	*	*	*	*	*
Ensaio 5	*	*	*	18%	*	18%
Ensaio 6	*	*	*	*	*	*
Ensaio 7	*	*	*	*	*	*
Ensaio 8	*	*	*	*	*	*

uma diferença estatisticamente significativa entre o método original e os diferentes experimentos avaliados. No ensaio 5 (massa 0,20g, proporção 1:20, agitador), tanto para o dimoxistrobina quanto para o teflubenzuron, os resultados de resíduos encontrados foram 18% maiores em comparação ao método original. No entanto, em todos os casos, a variação foi inferior a 30%, demonstrando que todas as metodologias avaliadas são compatíveis com o método original e podem ser consideradas como substitutas viáveis.

TABELA 30 – Diferença percentual da metodologia original em relação aos diferentes experimentos para amostra de arroz

Experimento	BAS 750 F	BAS 500 F	BAS 700 F	BAS 505 F	BAS 510 F	BAS 309 I
Ensaio 1	*	-9%	8%	n.d	n.d	*
Ensaio 2	-10%	-16%	*	n.d	n.d	-9%
Ensaio 3	*	-16%	*	n.d	n.d	*
Ensaio 4	-12%	-10%	-9%	n.d	n.d	-15%
Ensaio 5	-7%	-8%	*	n.d	n.d	-20%
Ensaio 6	-8%	-18%	*	n.d	n.d	-15%
Ensaio 7	-13%	-9%	*	n.d	n.d	-20%
Ensaio 8	-11%	-18%	*	n.d	n.d	-19%

* Não houve diferença estatística entre ensaio e método original.

n.d. – não determinado (BAS 505 F e BAS 510 não foram avaliados para matriz de arroz).

Para a matriz de arroz, é observado que, na maioria dos ensaios e ingredientes ativos avaliados, ocorreu uma diferença estatística entre o método original e os diferentes ensaios avaliados. No entanto, é importante ressaltar que a diferença percentual entre esses métodos ficou abaixo de 20% em todas as situações analisadas. Esses valores estão dentro dos limites estabelecidos pela Comissão Europeia e estão de acordo com os dados detalhados na Trompeta de Horwitz.

Esses resultados demonstram mais uma vez que todas as metodologias avaliadas são compatíveis com o método original e podem ser consideradas como substitutas viáveis. Apesar das diferenças estatísticas observadas, a magnitude dessas diferenças é aceitável e não compromete a confiabilidade e a comparabilidade dos resultados. Essa consistência indica que as metodologias alternativas são capazes de fornecer resultados semelhantes ao método original, garantindo assim a validade e a aplicabilidade dos resultados obtidos.

TABELA 31 – Diferença percentual da metodologia original em relação aos diferentes experimentos para amostra de citrus

Experimento	BAS 750 F	BAS 500 F	BAS 700 F	BAS 505 F	BAS 510 F	BAS 309 I
Ensaio 1	*	17%	*	n.d	n.d	*
Ensaio 2	-22%	*	-14%	n.d	n.d	-18%
Ensaio 3	*	16%	*	n.d	n.d	*
Ensaio 4	*	*	*	n.d	n.d	*
Ensaio 5	*	*	*	n.d	n.d	18%
Ensaio 6	*	-19%	*	n.d	n.d	*
Ensaio 7	18%	27%	17%	n.d	n.d	34%
Ensaio 8	*	-14%	-13%	n.d	n.d	*

* Não houve diferença estatística entre ensaio e método original.

n.d. – não determinado (BAS 505 F e BAS 510 não foram avaliados para matriz de citrus).

No caso dos citros, é observada uma certa similaridade entre os ensaios e analitos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao método original e aqueles que não apresentaram. Além disso, é possível notar que todos os valores, mesmo quando estatisticamente diferentes em relação ao método original, apresentam uma variação inferior a 30%. Vale ressaltar que há uma única exceção no ensaio 7 (massa 0,20g, proporção 1:8, agitador), em que o resultado de resíduo foi 34% superior em relação ao encontrado no método original.

Esses resultados demonstram que, apesar das diferenças estatísticas, a variação percentual entre os métodos é geralmente baixa e está dentro dos limites estabelecidos pela Comissão Europeia e outros critérios de aceitação.

TABELA 32 – Diferença percentual da metodologia original em relação aos diferentes experimentos para amostra de algodão

Experimento	BAS 750 F	BAS 500 F	BAS 700 F	BAS 505 F	BAS 510 F	BAS 309 I
Ensaio 1	*	-13%	*	*	*	n.d
Ensaio 2	-13%	-17%	*	12%	*	n.d
Ensaio 3	*	*	*	*	*	n.d
Ensaio 4	*	*	*	-11%	*	n.d
Ensaio 5	-17%	-19%	*	-19%	*	n.d
Ensaio 6	-39%	-51%	-30%	-40%	-26%	n.d
Ensaio 7	-21%	-32%	*	*	*	n.d
Ensaio 8	-29%	-41%	-23%	-26%	-15%	n.d

* Não houve diferença estatística entre ensaio e método original.

n.d. – não determinado (BAS 309 I não foi avaliado para matriz de algodão).

Ao avaliar a matriz de sementes de algodão, observa-se que, na maioria dos ensaios e ingredientes ativos avaliados, ocorreu uma diferença estatística entre o método original e os diferentes ensaios avaliados.

No entanto, é importante destacar que, no caso da piraclostrobina (BAS 500 F), apesar da diferença de resíduos em vários dos experimentos ter sido superior a 30% em relação ao método original, é necessário levar em consideração que o resíduo encontrado para esse ativo no algodão estava muito próximo ao limite de quantificação de 0,01 mg/kg do método analítico. Isso naturalmente aumenta a incerteza dos resultados e pode influenciar nas diferenças observadas.

Por outro lado, no experimento 6 (massa 2,5g, proporção 1:20, agitador), observa-se que, para quase todos os analitos, a diferença nos resíduos foi superior a 30% em comparação ao método original. Essa situação indica que pode ter ocorrido algum problema durante a condução analítica desse método específico, visto que essa discrepância não foi observada em outras matrizes.

De qualquer forma, excluindo-se essa situação específica com o experimento 6, nota-se novamente que todos os demais experimentos apresentam diferenças de resultados inferiores a 30% em relação ao método original. Isso indica que, na maioria dos casos, as metodologias alternativas são compatíveis com o método original e podem ser consideradas como substitutas viáveis, mantendo-se dentro dos limites aceitáveis de variação.

É importante ressaltar que a interpretação desses resultados deve levar em consideração as particularidades da matriz de algodão, como a proximidade do limite de quantificação do método analítico e possíveis problemas específicos com o experimento 6. Uma análise mais aprofundada dessas questões pode fornecer insights adicionais sobre a confiabilidade e a aplicabilidade das metodologias alternativas nessa matriz específica.

5. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA MINIATURIZADA

Com base nos resultados avaliados anteriormente durante a condução do planejamento fatorial e levando em consideração as avaliações adicionais realizadas, como a análise do desvio padrão dos métodos, teste de ANOVA fator único, teste de Tukey e diferença percentual entre os diferentes experimentos em relação ao método original, é possível concluir que, mesmo ao utilizar uma massa miniaturizada de 0,25g de amostra, foi obtido resultados de resíduos para todos os ingredientes ativos avaliados, compatíveis com aqueles encontrados ao empregar a metodologia original. Esses resultados demonstram que o uso de métodos miniaturizados é completamente viável, uma vez que foi possível obter resultados comparáveis ao método original. Portanto, os métodos miniaturizados demonstraram ser uma alternativa eficaz e confiável para a análise de resíduos, mesmo com a redução da massa de amostra.

Após verificar a aplicabilidade de métodos miniaturizados por meio da avaliação de experimentos anteriores, foi decidido realizar uma validação adicional da metodologia, incluindo novos ingredientes ativos e metodologias. Para isso, realizou-se uma comparação direta entre as metodologias originais de cada ingrediente ativo e um experimento miniaturizado, no qual foi utilizada uma massa de amostra de 0,25g e agitador, mantendo-se a mesma proporção massa/solvente em relação ao método original.

Essa abordagem permitiu uma avaliação mais ampla da aplicabilidade dos métodos miniaturizados, incluindo diferentes ingredientes ativos e suas respectivas metodologias originais. Ao realizar a comparação direta entre as metodologias originais e os experimentos miniaturizados, foi possível verificar a consistência dos resultados obtidos e avaliar a viabilidade do uso dos métodos miniaturizados para análise de resíduos.

Ao manter a proporção massa/solvente no experimento miniaturizado, buscou-se preservar as condições de extração sem introduzir alterações significativas. Dessa forma, foi possível avaliar se os métodos miniaturizados são capazes de fornecer resultados comparáveis aos obtidos com as metodologias originais, sem comprometer a confiabilidade e a precisão dos resultados.

Essa validação adicional permitiu ampliar o escopo da aplicação dos métodos miniaturizados, demonstrando sua adequação para diferentes

ingredientes ativos e metodologias específicas. Os resultados obtidos nessa comparação direta serão essenciais para confirmar a viabilidade e a confiabilidade dos métodos miniaturizados, fornecendo dados relevantes para a adoção dessas abordagens em análises de resíduos em diferentes contextos.

Desta forma, a seguir estão apresentados os experimentos e resultados obtidos desta aplicação do método miniaturizado.

5.1 PARTE EXPERIMENTAL

Nos próximos itens, estão descritos todos os materiais que foram utilizados para a realização da aplicabilidade das metodologias miniaturizadas para análise de resíduos de defensivos agrícolas em matrizes vegetais.

Toda condução da fase experimental deste projeto foi conduzida no laboratório global de segurança ambiental e do consumidor (GENCS) da BASF S.A., localizado no município de Guaratinguetá/SP, bem como disponibilização de toda estrutura, equipamentos, materiais e demais recursos necessários para execução do projeto.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. MATERIAIS

5.2.1.1. Reagentes e Solventes

Foram utilizados os seguintes reagentes e solventes para condução desta fase experimental:

- Água ultra-pura grau 1 obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore® Elix 05, Integral);
- Ácido clorídrico 37%, Merck
- Ácido fórmico, Merck
- Acetonitrila, J.T. Baker
- Ciclohexano, J.T.Baker
- Hidróxido de sódio, Mallinckrodt
- Metanol, J.T.Baker

5.2.1.2. Misturas de soluções

Foram preparadas seguintes soluções para utilização durante condução da fase experimental analítica:

- Fase móvel A: 0,1% ácido fórmico em água
- Fase móvel B: 0,1% ácido fórmico em metanol / 0,1% ácido fórmico em acetonitrila
- Solução ácido clorídrico 2 mol/L: 85 mL de HCl 37% qsp 500 mL água
- Solução de hidróxido de sódio 0.2 mol/L: 2g hidróxido de sódio qsp 250 mL água
- Solução de extração (BAS 750 F): Metanol/Água/HCl 2 mol/L (70/25/5, v/v/v)
- Solução de extração (BAS 550 I): Metanol
- Solução de extração (BAS 650 F): Metanol/Água (50/50, v/v)
- Solução de extração (BAS 9068 F): Metanol/Água/HCl 2 mol/L (80/15/5, v/v/v)
- Solução de diluição final (BAS 750 F): Metanol/Água (50/50, v/v)
- Solução de diluição final (BAS 750 F): Metanol/Água (80/20, v/v)
-
- Solução de diluição final (BAS 650 F): Metanol/Água/Ácido Fórmico (50/50/0,1, v/v/v)

5.2.1.3. Padrões Analíticos

Os padrões analíticos utilizados estão descritos abaixo e foram fornecidos pela BASF SE:

- Nome Comum: Mefentrifluconazole
- BAS Code: BAS 750 F
- Pureza: 99,7%
- Lote: 5834378
- Data de validade (dd/mm/aaaa): 01/04/2031

- Nome Comum: Dimpropyridaz
- BAS Code: BAS 550 I
- Pureza: 99,7%
- Lote: L2017-051
- Data de validade (dd/mm/aaaa): 01/11/2025

- Nome Comum: Ametoctradin
- BAS Code: BAS 650 F
- Pureza: 99,8%
- Lote: L86-28
- Data de validade (dd/mm/aaaa): 01/11/2030

- Nome Comum: Propamocarb
- BAS Code: BAS 9068 F
- Pureza: 98,8%
- Lote: L2020-129
- Data de validade (dd/mm/aaaa): 01/02/2025

5.2.1.4. *Preparo das Soluções Padrões*

Soluções padrão estoque foram preparados para cada um dos padrões analíticos na concentração de 1 mg/mL em metanol e armazenadas a 5 ± 3 °C.

A partir da solução padrão estoque, foram preparadas soluções padrões de fortificação individuais nas concentrações de $1,0 \times 10^4$ ng/mL (STDF F) e 100 ng/mL (STDF A) em metanol.

Por fim, a partir desta soluções de fortificação foram preparadas as soluções de trabalho (calibração) em metanol/água (50/50, v/v) para BAS 750 F e BAS 9068 F, metanol/água (80/20, v/v) para BAS 550 I, e metanol/água/ácido fórmico (50/50/0,1, v/v/v) para BAS 650 F. O range de concentração da curva para cada ingrediente ativo está descrito a seguir:

BAS 750 F – 0,0200 a 2,00 ng/mL

BAS 550 I – 0,0400 a 5,00 ng/mL

BAS 650 F – 0,0500 a 5,00 ng/mL

BAS 9068 F – 0,0300 a 3,00 ng/mL

5.2.1.5. Amostras

Para conduzir os testes para verificação da aplicabilidade da metodologia miniaturizada e comparar os resultados obtidos pelos métodos originais, foram selecionadas amostras de matrizes vegetais provenientes de diferentes estudos de resíduos de agrotóxicos conduzidos pela BASF. Durante a etapa de homogeneização, foi utilizado gelo seco para manter as amostras em temperatura inferior a -20°C e moinhos GM 300 da marca Retsch®.

As amostras selecionadas para a realização dos testes foram baseadas em uma busca no banco de dados interno da BASF e foram as seguintes:

BAS 750 F:

- 2 amostras de algodão
- 2 amostras de abacaxi

BAS 550 I:

- 2 amostras de algodão
- 2 amostras de citros
- 2 amostras de melão

BAS 650 F:

- 2 amostras de tomate

BAS 9068 F:

- 2 amostras de tomate
- 2 amostras de batata

Essas amostras foram selecionadas por conterem resíduos impregnados dos respectivos ingredientes ativos para a determinação de resíduos de agrotóxicos. Através da aplicação da metodologia miniaturizada e da comparação com os métodos originais, é possível avaliar a eficácia e a precisão da nova abordagem utilizando-se uma quantidade de massa de amostra reduzida em relação a metodologia original.

5.2.2. MÉTODOS

5.2.2.1. *Métodos Analíticos*

Para a realização da condução dos experimentos foi utilizado metodologia interna da BASF S.A. (método original) para análises dos distintos ingredientes ativos avaliados, conforme descrito abaixo:

5.2.2.1.1. Procedimento Analítico – Análise de Dimpropyridaz (BAS 550 I)

Uma amostra representativa de 2,5g de cada matriz é pesada em frasco de extração de polipropileno de 250 mL. São adicionados 50 mL de Metanol e agitado por 30 minutos a aproximadamente 250 rpm em agitador mecânico. Em seguida, o extrato foi centrifugado por 5 minutos a aproximadamente 4000 rpm. O extrato é filtrado em algodão, sendo coletado em balão volumétrico de 100 mL. A extração é repetida com outros 50 mL de metanol e novamente extrato é agitado, centrifugado e filtrado para mesmo balão de 100 mL, sendo completado até menisco. Uma alíquota de 0,8 mL é transferida para um vial e completado com 0,2 mL de água.

Para amostras com concentrações de analito fora da curva de calibração, foi necessário diluir conforme apropriado.

5.2.2.1.2. Procedimento Analítico – Análise de Ametoctradin (BAS 650 F)

Uma amostra representativa de 2,5g de cada matriz é pesada em frasco de extração de polipropileno de 250 mL. São adicionados 50 mL de Metanol/água (50/50, v/v) e homogeneizados com Ultra-turrax por 3 minutos a aproximadamente 10000 rpm. Em seguida, o extrato é centrifugado por 5 minutos a aproximadamente 4000 rpm. Uma alíquota de 0,25 mL é transferida para um vial e completado com 0,25 mL de metanol/água/ácido fórmico (50/50/0,1, v/v/v).

Para amostras com concentrações de analito fora da curva de calibração, foi necessário diluir conforme apropriado.

5.2.2.1.3. Procedimento Analítico – Análise de Propamocarb (BAS 9068 F)

Uma amostra representativa de 2,5g de cada matriz é pesada em frasco de extração de polipropileno de 250 mL. São adicionados 50 mL de Metanol/água/HCl 2 Mol/L (80/15/5, v/v/v) e homogeneizados com Ultra-turraz por 3 minutos a aproximadamente 5000 rpm. Em seguida, o extrato é centrifugado por 5 minutos a aproximadamente 4000 rpm e coletado em balão volumétrico de 100 mL. A extração é repetida com outros 50 mL de solução de extração e novamente extrato é agitado, centrifugado e filtrado para mesmo balão de 100 mL, sendo completado até menisco. Uma alíquota de 0,4 mL é transferida para um vial e completado com 0,6 mL de água.

Para amostras com concentrações de analito fora da curva de calibração, foi necessário diluir conforme apropriado.

5.2.2.1.4. Procedimento Analítico – Análise de Mefentrifluconazole (BAS 750 F)

Procedimento analítico detalhado no item 3.1.2.1.1.

5.2.2.1.5. Procedimento Analítico – Métodos miniaturizados

Para todos os métodos analíticos miniaturizados de todos os ingredientes ativos descrito previamente, foi utilizado uma massa de 0,25g de amostra e extraídos por 5 minutos sob agitação a 1200 rpm utilizando-se o Hamilton Microlab STAR Liquid handling System. A proporção de massa de amostra/volume de solvente de extração foi mantido inalterado para cada um dos métodos bem como todas demais etapas de extração e purificação dos métodos analíticos.

5.2.2.1.6. Condições cromatográficas – Análise de BAS 550 I

Para a análise de BAS 550 I a seguinte condição cromatográfica foi utilizada.

TABELA 33 – Condições cromatográficas – BAS 550 I

Cromatógrafo Líquido	ExionLC		
Detector de massas	Triple Quad 6500+		
Coluna cromatográfica	Phenomenex, Kinetex XB-C18 100A (100 mm x 4.6 mm, 2.6 µm)		
Volume de injeção	10 µL		
Fase móvel A (FMA)	0,1% ácido fórmico em água		
Fase móvel B (FMB)	0,1% ácido fórmico em acetonitrila		
Tempo de retenção aproximado (minutos)	BAS 550 I (3.5 min)		
Temperatura do forno	40 °C		
Modo de aquisição	Monitoramento de múltiplas reações (MRM)		
Modo de ionização	Modo Positivo ESI (+)		
Transições de massa	BAS 550 I: 302/109		
Gradiente (fluxo da fase móvel)			
Tempo (minutos)	Fluxo (µL/min.)	%FMA	%FMB
0,00	700	80	20
5,00	700	20	80
5,01	700	1	99
7,00	700	1	99
7,01	700	80	20
9,00	700	80	20

5.2.2.1.7. Condições cromatográficas – Análise de BAS 650 F

Para a análise de BAS 650 F a seguinte condição cromatográfica foi utilizada.

TABELA 34 – Condições cromatográficas – BAS 650 F

Cromatógrafo Líquido	ExionLC		
Detector de massas	Triple Quad 6500+		
Coluna cromatográfica	YMC, Triat PFP (100 mm x 3.0mm, 1.9 µm)		
Volume de injeção	20 µL		
Fase móvel A (FMA)	0,1% ácido fórmico em água		
Fase móvel B (FMB)	0,1% ácido fórmico em metanol		
Tempo de retenção aproximado (minutos)	BAS 650 F (5.5 min)		
Temperatura do forno	40 °C		
Modo de aquisição	Monitoramento de múltiplas reações (MRM)		
Modo de ionização	Modo Positivo ESI (+)		
Transições de massa	BAS 650 F: 276/149		
Gradiente (fluxo da fase móvel)			
Tempo (minutos)	Fluxo (µL/min.)	%FMA	%FMB
0,00	800	80	20
3,00	800	25	75
4,50	800	25	75
5,00	800	5	95
6,00	800	5	95
6,01	800	80	20
7,00	800	80	20

5.2.2.1.8. Condições cromatográficas – Análise de BAS 9068 F

Para a análise de BAS 9068 F a seguinte condição cromatográfica foi utilizada.

TABELA 35 – Condições cromatográficas – BAS 9068 F

Cromatógrafo Líquido	ExionLC		
Detector de massas	Triple Quad 6500+		
Coluna cromatográfica	Waters, XSelect HSS PFP (100 mm x 2.1mm, 2.5 µm)		
Volume de injeção	5 µL		
Fase móvel A (FMA)	0,1% ácido fórmico em água		
Fase móvel B (FMB)	0,1% ácido fórmico em metanol		
Tempo de retenção aproximado (minutos)	BAS 9068 F (2.0 min)		
Temperatura do forno	40 °C		
Modo de aquisição	Monitoramento de múltiplas reações (MRM)		
Modo de ionização	Modo Positivo ESI (+)		
Transições de massa	BAS 9068 F: 189/102		
Gradiente (fluxo da fase móvel)			
Tempo (minutos)	Fluxo (µL/min.)	%FMA	%FMB
0,00	500	95	5
1,50	500	60	40
4,00	500	48	52
4,50	500	10	90
5,00	500	10	90
5,10	500	95	5
6,00	500	95	5

5.2.2.1.9. Condições cromatográficas – Análise de BAS 750 F

Condições cromatográficas para BAS 750 F detalhadas no item 3.1.2.1.3.

5.4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Para avaliar a aplicabilidade do método miniaturizado, foi realizado um estudo detalhado para cada matriz e metodologia. Para cada uma das amostras, a análise foi conduzida em triplicata utilizando o método miniaturizado, no qual foi utilizada uma massa de 0,25g de amostra. Os resultados obtidos foram então comparados com os valores obtidos ao realizar a metodologia convencional para cada ingrediente ativo.

Para realizar a comparação, os resíduos de cada ingrediente ativo encontrados utilizando o método original foram considerados como 100%. Os dados obtidos através do método miniaturizado foram então normalizados utilizando esses valores como referência.

Além da comparação dos resultados, também foi avaliado o impacto da redução da massa de amostra em termos do coeficiente de variação das replicatas. Esse coeficiente de variação é um indicador da precisão do método, e a redução da massa de amostra pode influenciar nesse aspecto.

Portanto, esse estudo abrangeu uma análise minuciosa das diferentes matrizes e metodologias, incluindo a comparação dos resultados entre o método miniaturizado e o convencional, bem como a avaliação do impacto da redução da massa de amostra em termos do coeficiente de variação das replicatas.

TABELA 36 – Análise comparativa método miniaturizado vs. método original – BAS 750 F

Matriz	Amostra	Metodologia	Resíduo (mg/kg)	Média (mg/kg)	CV (%)	Resultados	Resultados
						normalizados (% método original)	normalizados (% média método original)
Algodão	Amostra 1	Original	0,042; 0,045; 0,046	0,044	4,7	95; 101; 104	100
		Miniaturizado	0,037; 0,040; 0,048	0,042	14	83; 91; 108	94
	Amostra 2	Original	0,037; 0,037; 0,032	0,035	8,8	106; 104; 90	100
		Miniaturizado	0,042; 0,033; 0,030	0,035	17	119; 94; 85	99
Abacaxi	Amostra 1	Original	0,29; 0,30; 0,30	0,30	1,2	99; 101; 100	100
		Miniaturizado	0,30; 0,34; 0,29	0,31	7,6	102; 113; 97	104
	Amostra 2	Original	0,093; 0,11; 0,10	0,10	7,1	92; 106; 102	100
		Miniaturizado	0,11; 0,11; 0,12	0,11	8,7	106; 107; 123	112

Para o mefentrifluconazole, foram realizados testes comparativos em duas amostras distintas de algodão e duas de abacaxi, todas contendo resíduos impregnados de mefentrifluconazole. Os resultados obtidos demonstraram um coeficiente de variação entre 1,2% e 8,8% para o método original e de 7,6% a 17% para a metodologia miniaturizada. Ambos os valores estão dentro da faixa de aceitação de 20%.

Observou-se que, para o algodão, o método miniaturizado apresentou resíduos de 94% e 99% em relação aos resultados obtidos com a metodologia original. Já para o abacaxi, os valores do método miniaturizado em relação à metodologia original foram de 104% e 112%. Esses resultados indicam que ambas as metodologias são comparáveis entre si.

TABELA 37 – Análise comparativa método miniaturizado vs. método original – BAS 550 I

Matriz	Amostra	Metodologia	Resíduo (mg/kg)	Média (mg/kg)	CV (%)	Resultados	Resultados
						normalizados (% método original)	normalizados (% média método original)
Algodão	Amostra 1	Original	0,021; 0,023; 0,021	0,022	5,9	95; 106; 99	100
		Miniaturizado	0,019; 0,024; 0,023	0,022	13	85; 110; 105	100
	Amostra 2	Original	0,028; 0,030; 0,035	0,031	13	90; 96; 114	100
		Miniaturizado	0,045; 0,031; 0,038	0,038	18	146; 101; 122	123
Citros	Amostra 1	Original	0,045; 0,039; 0,039	0,041	8,1	109; 96; 94	100
		Miniaturizado	0,043; 0,035; 0,036	0,038	11	105; 85; 89	93
	Amostra 2	Original	0,13; 0,11; 0,14	0,13	12	102; 88; 111	100
		Miniaturizado	0,14; 0,15; 0,19	0,16	17	109; 117; 148	125
Melão	Amostra 1	Original	0,077; 0,075; 0,050	0,067	22	114; 111; 74	100
		Miniaturizado	0,041; 0,039; 0,056	0,045	21	61; 58; 84	67
	Amostra 2	Original	0,022; 0,020; 0,024	0,022	9,3	100; 91; 109	100
		Miniaturizado	0,024; 0,019; 0,019	0,021	13	109; 88; 86	94

Para o dimpropyridaz, foram realizados testes comparativos em duas amostras distintas de algodão, duas de citros e duas de melão, todas disponíveis no laboratório da BASF e contendo resíduos impregnados. Os resultados obtidos demonstraram um coeficiente de variação entre 5,9% e 22% para o método original e de 11% a 21% para a metodologia miniaturizada. Todos os valores

estão dentro da faixa de aceitação de 20%, com exceção de uma das amostras de melão que apresentaram uma variação um pouco superior a 20% em ambos os métodos avaliados.

Observou-se que, para o algodão, o método miniaturizado apresentou resíduos na faixa de 100% e 123% em relação aos resultados obtidos com a metodologia original. Já para os citros, os valores do método miniaturizado em relação à metodologia original foram de 93% e 125%, enquanto que para melão os valores foram de 67% e 94%. De forma geral, ainda que para uma das amostras de melão o resultado de resíduo tenha sido de 67% em comparação ao método original, desviando em um valor superior a 30% do resultado esperado, os resultados obtidos para este analito reforçam que os resultados indicam que ambas as metodologias são comparáveis entre si, sendo que em alguns casos o método miniaturizado apresentou resíduos inclusive superiores ao esperado, tal como encontrado previamente durante condução do design de experimentos.

TABELA 38 – Análise comparativa método miniaturizado vs. método original – BAS 650 F

Matriz	Amostra	Metodologia	Resíduo (mg/kg)	Média (mg/kg)	CV (%)	Resultados	Resultados
						normalizados (% método original)	normalizados (% média método original)
Algodão	Amostra 1	Original	0,27; 0,28; 0,28	0,28	2,0	98; 101; 102	100
		Miniaturizado	0,23; 0,23; 0,24	0,23	3,3	84; 81; 87	84
	Amostra 2	Original	0,084; 0,087; 0,088	0,086	2,9	97; 101; 102	100
		Miniaturizado	0,091; 0,093; 0,085	0,089	4,7	106; 107; 98	103

Para o ametoctradin, foram realizados testes comparativos em duas amostras distintas de algodão contendo resíduos impregnados. Os resultados obtidos demonstraram um coeficiente de variação de 2,0% e 2,9% para o método original e de 3,3% e 4,7% para a metodologia miniaturizada.

O método miniaturizado apresentou resíduos de 84% e 103% em relação aos resultados obtidos com a metodologia original.

TABELA 39 – Análise comparativa método miniaturizado vs. método original – BAS 9068 F

Matriz	Amostra	Metodologia	Resíduo (mg/kg)	Média (mg/kg)	CV (%)	Resultados	Resultados
						normalizados (% método original)	normalizados (% média método original)
Tomate	Amostra 1	Original	0,66; 0,69; 0,70	0,68	2,7	97; 101; 102	100
		Miniaturizado	0,59; 0,59; 0,55	0,58	3,4	86; 86; 81	84
	Amostra 2	Original	0,24; 0,24; 0,25	0,25	2,3	99; 99; 102	100
		Miniaturizado	0,22; 0,23; 0,18	0,21	12	90; 93; 74	86
Batata	Amostra 1	Original	0,029; 0,028; 0,027	0,028	2,7	103; 100; 97	100
		Miniaturizado	0,020; 0,021; 0,026	0,022	14	74; 75; 94	81
	Amostra 2	Original	0,095; 0,096; 0,098	0,096	1,4	99; 100; 101	100
		Miniaturizado	0,086; 0,081; 0,088	0,085	4,3	89; 84; 92	88

Para o propamocarb, foram realizados testes comparativos em duas amostras distintas de tomate e duas de batata, todas contendo resíduos impregnados. Os resultados obtidos demonstraram um coeficiente de variação entre 1,4% e 2,7% para o método original e de 3,4% a 14% para a metodologia miniaturizada. Ambos os valores estão dentro da faixa de aceitação de 20%.

Observou-se que, para o tomate, o método miniaturizado apresentou resíduos de 84% e 86% em relação aos resultados obtidos com a metodologia original. Já para a batata, os valores do método miniaturizado em relação à metodologia original foram de 81% e 88%. Esses resultados indicam que ambas as metodologias são comparáveis entre si.

6. CONCLUSÃO

A determinação de pesticidas em matrizes complexas, como tecido vegetal, a níveis de traços (mg/kg, µg/kg), apresenta desafios adicionais devido à presença de outros compostos e componentes que podem interferir nos resultados. Essa complexidade pode levar a uma maior variabilidade nos resultados quando comparados a amostras com concentrações mais altas ou a amostras puras. Portanto, é importante considerar essa variabilidade ao interpretar os resultados e não descartar imediatamente um método que tenha sido estatisticamente distinto em relação ao método original testado.

A variabilidade dos resultados em matrizes complexas pode ser atribuída a diversos fatores, como a heterogeneidade da amostra, a presença de interferentes, a influência de diferentes componentes da matriz e a complexidade dos processos de extração e análise. Esses fatores podem contribuir para uma maior dispersão dos resultados e para diferenças estatísticas entre os métodos avaliados.

No entanto, é importante ressaltar que a diferença estatística por si só não deve ser considerada como um critério absoluto para a seleção ou rejeição de um método. É necessário levar em consideração o contexto do estudo, a finalidade da análise e as diretrizes aplicáveis à área de pesquisa.

Resultados estatisticamente distintos podem ser uma indicação de que o método avaliado pode apresentar vantagens ou desvantagens em relação ao método original. No entanto, é essencial considerar a magnitude da diferença e sua relevância prática. Uma diferença estatística pode não ter significado clínico ou prático se estiver dentro de limites aceitáveis ou se não afetar a interpretação dos resultados.

Portanto, ao avaliar a aplicabilidade de um método, é necessário considerar não apenas a diferença estatística, mas também a relevância clínica, a incerteza de medição, a confiabilidade dos resultados e a conformidade com as diretrizes e regulamentos aplicáveis. Uma avaliação completa e criteriosa permitirá a tomada de decisões informadas sobre a utilização dos resultados obtidos em matrizes complexas, como tecido vegetal, e garantirá a interpretação adequada dos mesmos.

Com base nos resultados avaliados durante a condução do planejamento fatorial, é possível constatar que, apesar de terem sido observados efeitos significativos para algumas variáveis primárias e secundárias, a magnitude desses efeitos foi inferior a 20%. Essa variação encontra-se dentro da faixa considerada aceitável para métodos de análise de resíduos, não impactando de forma significativa os resultados.

Adicionalmente, ao considerar as avaliações complementares realizadas, tais como a análise do desvio padrão dos métodos, teste de ANOVA e diferença percentual entre os diferentes experimentos em relação ao método original, pode-se concluir que, mesmo utilizando uma massa miniaturizada de 0,2g de amostra e agitação simples, obtiveram-se resultados de resíduos para todos os ingredientes ativos avaliados que se mostraram compatíveis com aqueles obtidos utilizando a metodologia original.

Esses resultados, aliados aos testes adicionais conduzidos para a validação da metodologia com diferentes ingredientes ativos e matrizes, evidenciam que a utilização de métodos miniaturizados é plenamente viável. Foi possível obter resultados comparáveis aos obtidos por meio do método original, o que confirma que os métodos miniaturizados são uma alternativa eficaz e confiável para a análise de resíduos, mesmo com a redução da massa de amostra.

Dessa forma, conclui-se que os métodos miniaturizados representam uma opção válida para a análise de resíduos, proporcionando resultados confiáveis e comparáveis aos obtidos por meio do método original, além de gerar uma redução significativa no tempo gasto pelo analista para condução das análises, bem como no uso dos solventes para etapa de extração.

Em conclusão, a viabilização da miniaturização dos métodos analíticos trouxe ganhos significativos em termos práticos, destacando-se uma redução de até 90% no uso de solventes orgânicos durante a etapa de extração. Além disso, essa abordagem resultou em uma diminuição considerável da carga de trabalho do analista, sendo que para um projeto específico da empresa, é esperado uma economia de até € 500.000,00 no qual automação foi implementada. Esses resultados não apenas otimizam os recursos utilizados, mas também contribuem para a eficiência operacional e a sustentabilidade dos processos analíticos.

7. REFERÊNCIAS

AMIRAT, K.; ZIANI, N.; MESSADI, D. Chemometric modeling to predict retention times for a large set of pesticides or toxicants using hybrid genetic algorithm/multiple linear regression approach. *Management of Environmental Quality: An International Journal*, 27(3), 313-325, 2016.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *Journal of AOAC International*, Vol. 86, No. 2, pp. 412-431, 2003.

ANVISA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. *Rev. Saúde Públ.*, v. 40, n.2, p. 361-363, 2006.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos e Toxicologia. Portal ANVISA. [Online] [acessado em: 01 de maio de 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 4 de 18 de janeiro de 2012

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. *Química Nova* vol. 30, nº 1, São Paulo, 2007.

BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. Lei federal de agrotóxicos, Brasília, DF; [Online] [acessado em: 30 de abril de 2023]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm

BRASIL. Decreto n 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei n 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 jan. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 4, de 18 de janeiro de 2012. Diário Oficial da União (DOU). [Online] [acessado em: 29 de março de 2024]. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/res0004_18_01_2012.html

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 294, de 29 de julho de 2019. Diário Oficial da União (DOU). Página 78 da Seção 1 de 31 de julho de 2019. [Online] [acessado em: 01 de maio de 2023]. Disponível em: https://www.jusbrasil.com.br/diarios/254028411/dou-secao-1-31-07-2019-pg-78?ref=previous_button

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Gerência de Processos Regulatórios – GPROR. Biblioteca de Agrotóxicos. Brasília: M, 8 p. 2019, [Online] [acessado em: 01 de maio de 2023]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/4967127/Biblioteca+de+Agrot%C3%B3xicos+Portal.pdf>

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). DECRETO Nº 10.833, DE 7 DE OUTUBRO DE 2021 [Online] [acessado em: 01 de maio de 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/decreto-estabelece-novas-regras-para-o-registro-e-pesquisa-de-agrotoxicos>

BUTTON, S. T. Metodologia para planejamento experimental e análise de resultado. São Paulo, Universidade Estadual de Campinas, 2001

CABRERA, L. C.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. S.; PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R. Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in the QuEChERS method for the determination of pesticides residues in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, J. Sep. Sci, 39, p. 1945-1954, 2016

CARVALHO, L.B. Herbicidas, 1.ed. Lages: editado pelo autor, 2013

CHIARADIA, M. C. Desenvolvimento, Validação e Aplicação de Métodos para Análise Multirresidual de Agrotóxicos em Suco de Laranja e Tangerina Utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD. Campinas, SP, 2009

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

DE LA GUARDIA M., ARMENTA S. Green analytical chemistry – Theory and Practice. Elsevier Science, 2010

DUFOUR, V. *et al.* Miniaturization of an extraction protocol for the monitoring of pesticides and polar transformation products in biotic matrices. Chemosphere, 284. 2021.

Environmental Protection Agency, EPA. Residue Chemistry Test Guidelines – OPPTS 860.1340 Residue Analytical Method, 2016

Environmental Protection Agency, EPA. Residue Chemistry Test Guidelines – OPPTS 860.1360 Multiresidue Method, 2016

Environmental Protection Agency, EPA. Residue Chemistry Test Guidelines – OPPTS 860.1380 Storage Stability Data, 2016

European Commission Directorate General for Health and Food Safety, Guidance Document on Pesticide Analytical Methods for Risk Assessment and Post-Approval Control and Monitoring Purposes. SANTE/2020/12830 (combined guidance), Rev. 2, 2023

European Commission Directorate General for Health and Food Safety, Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed. SANTE 11312/2021, 2021

European Commission Directorate General for Health and Food Safety, Technical Guideline on the Evaluation of Extraction Efficiency of Residue Analytical Methods. SANTE 2017/10632, rev.04, 2022

FRIEDRICH, M. T.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Use of factorial design in the development of multiresidue method for determination of pesticide residue in wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Anal. Methods*, 9, p. 2541-2551, 2016

FUSSELL, R. J.; HETMANSKI, M. T.; MACARTHUR, R.; FINDLAY, D.; SMITH, F.; AMBRUS, A.; BRODESSER, P. J. Measurement Uncertainty Associated with Sample Processing of Oranges and Tomatoes for Pesticide Residue Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 55, p. 1062-1070, 2007.

GALDÁMEZ, E. W. C. Aplicações das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos. São Carlos. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. Tese de Mestrado. 2002

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H.; ASSIS, T. C.; QUEIROZ, M. E. L. R. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with

low temperature partitioning for determination of carbamates in water. *Analytical Chimica Acta* 671, p.41-47, 2010

HARRIS, D.C. *Análise Química Quantitativa*, 7ª edição, New Yor, LTC, 2008

HEALY, A. M. *Particle Size Analysis*, 2010 [Online] [acessado em: 01 de abril de 2024]. Disponível em: www.tcd.ie/CMA/misc/particle.ppt

HERRMANN, S. S.; HAJEB, P.; ANDERSEN, G.; POULSEN, M. E. Effects of milling on the extraction efficiency of incurred pesticides in cereals. *Food Additives & Contaminants: Part A - Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 34(11), 1948-1958, 2017.

HORWITZ, W.; KAMPS, L.R.; BOYER, K.W. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* V.63, p.1344, 1980

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). *Volabulário Internacional de termos Fundamentais e Gerais de Metrologia*, 2ª ed., 2000

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. *Nomenclature for automated and Mechanised Analysis*. *Pure & Appl. Chem.*, vol. 61, No. 9, pp. 1657-1664. 1989

IZCARA, S.; CASADO, N.; ZARCERO, S.M.; SIERRA, I. A Miniaturized QuEChERS Method Combined with Ultrahigh Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids in Oregano Samples, *Foods*, 9, p. 1319, 2020.

JARDIM, A.N.O. *Resíduos de pesticidas em alimentos: validação de metodologia analítica, análise em frutas e avaliação da exposição da população brasileira pelo método probabilístico*. 2017. 150 f. *Dissertação (Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.*

JOSÉ, W.F.P. Comparação de diferentes metodologias multi-resíduo para análise de defensivos agrícolas em matriz vegetal. 2017. 55f. Dissertação (Pós-Graduação em Análise Instrumental Avançada) – Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, São Paulo, 2017.

LEE, S.; LEE, D. K What is the proper way to apply the multiple comparison test? Korean Journal of Anesthesiology, vol. 71, No. 5, 2018.

LEHOTAY, S. J.; COOK, J. M. Sampling and Sample Processing in Pesticide Residue Analysis. J. Agric. Food Chem., 63, p. 4395-4404, 2015.

LEHOTAY, S. J.; MICHLIG, N.; LIGHTFIELD, A. R. Assessment of Test Portion Sizes after Sample Comminution with Liquid Nitrogen in an Improved High-Throughput Method for Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables. J. Agric. Food Chem. 33f, 2020.

LICHON, M. J. Sample preparation for chromatographic analysis of food. J Chromatogr A, p. 624, 1992.

MASTOVSKÁ, K; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 1040, n. 2, p. 259-272, 2004.

MCHUGH, M. L Multiple comparison analysis testing in ANOVA. Biochemia Medica, 21(3), p. 203-209, 2011.

MENDES, C.R.A. *et al.* AGROTÓXICOS: principais classificações utilizadas na agricultura brasileira – uma revisão da literatura. Revista Maestria, v. 17, p. 95-107, 2019

MIDIO A.F., MARTINS D.I. Herbicidas em Alimentos: aspectos gerais, toxicológicos e analíticos. São Paulo: Livraria Varela; 1997. 108 p.

NARENDERAN, S. T; MEYYANATHAN, S. N. KARRI, V. V. S. R. Experimental design in pesticide extraction methods: A review. Food Chemistry, 03.045, 2019.

NOGUEIRA, C. H. Testes para comparações múltiplas de médias em experimentos com tendência e dependência espacial. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, 2017.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2007. 34f. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 495 72 and Series on Pesticides No. 39. Guidance Document on Pesticide Residue Analytical methods. ENV/JM/MONO (2007)17. 2007

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2007. 12f. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, Section 5. Test No. 506. Stability of Pesticide Residues in Stored Commodities. 2007

OSMAR D. P. et al. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multi-resíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas, Quim. Nova, vol. 32, No. 6, p. 1620-1634, 2009

PASSEPORT, E.; GUENNE, A.; CULHAOGLU, T.; MOREAU, S. Design of experiments and detailed uncertainty analysis to develop and validate a solid-phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 16 pesticides in water, Journal of Chromatography A, 1217, p. 5317-5327, 2010

PELAEZ, V.; TERRA, F.H.B.; SILVA, L.R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. Revista de Economia, v. 36, n.1 (ano 34), p. 27-48, 2010.

PEREIRA F.M.V., PEREIRA-FILHO, E.R. Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: Um tutorial, Quim. Nova, Vol. 41, No.9, 2018.

PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. 15th ed. Piracicaba: FEALQ, 2009.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. Quim. Nova, Vol. 32, No. 6, 1620-1634, 2009.

RIOS, A.; ESCARPA, A; GONZÁLEZ, M.C.; CREVILLÉN, A.G. Trends in Analytical Chemistry, v.25, p.467, 2006.

RÜEGG, E.F. Técnicas de radioisótopos para estudar os efeitos residuais de agrotóxicos em plantas alimentícias. Biológico, São Paulo, v.12, p.341-345, 1975

SANTANA-MAYOR, A., *et al.* Updated overview of QuEChERS applications in food, environmental and biological analysis (2020–2023), TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2023.

SCHANZER, S. *et al.* Miniaturized multiresidue method for the analysis of pesticides and persistent organic pollutants in non-target wildlife animal liver tissues using GC-MS/MS. Chemosphere, 279. 2021.

SENAR – Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Agrotóxicos: uso correto e seguro. 3. ed. Brasília. 64f. 2015.

SILVA, C.M.S.S; FAY, E. F. Agrotóxicos e Ambiente, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

STOCKA, J; TANKIEWICA, M; BIZIUK, M; NAMIESNIK, J. Green aspects of techniques for the determination of currently used pesticides in environmental samples, Int J Mol Sci. 2011

TUKEY, J. W. The problem of multiple comparisons. Unpublisher Dittoed Notes, Princeton University, 1953.

YUAN, X.; KIM, C. J.; JEONG, W. T.; KYUNG, K. S.; NOH, H. H. Factors Affecting Incurred Pesticide Extraction in Cereals. *Molecules* 28, 5774, 2023.

YUAN, X.; KIM, C. J.; NOH, H. H. An LC-MS/MS Method for the Simultaneous Analysis of 380 Pesticides in Soybean, Kidney Beans, Black Soybeans, and Mung beans: The Effect of bean griding on Incurred Residues and Partitioning. *Foods* 12, 4477, 2023.

ZORZATTO, J. R. Comparações múltiplas em pares de médias. 1985. 77 p. Dissertação (Mestrado em Estatística) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.