

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANDREIA NUNES OLIVEIRA JARDIM

**RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA, ANÁLISE EM FRUTAS E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DA
POPULAÇÃO BRASILEIRA PELO MÉTODO PROBABILÍSTICO.**

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

ORIENTADORA: Dr^a Eloisa Dutra Caldas

Brasília – DF

2012

ANDREIA NUNES OLIVEIRA JARDIM

**RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ALIMENTOS: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA, ANÁLISE EM FRUTAS E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DA
POPULAÇÃO BRASILEIRA PELO MÉTODO PROBABILÍSTICO.**

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

Aprovada em 12 de dezembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE

Profª Drª Eloisa Dutra Caldas – Presidente
Universidade de Brasília

Profª Drª Ionara Regina Pizzutti
Universidade Federal de Santa Maria

Profª Drª Susanne Rath
Universidade Estadual de Campinas

Profª Drª Maria Hosana Conceição
Universidade de Brasília

Profº Dr Carlos José Sousa Passos
Universidade de Brasília

Profº Dr Carlos Martín Infante Córdoba
Universidade de Brasília

*Ao Fernando pelo amor, carinho e
companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, em especial à minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão Pedro pela força e motivação.

À professora Eloisa pela orientação, incentivo e confiança. Serei eternamente grata a todos os ensinamentos e oportunidades recebidos. Levarei esse aprendizado por toda a vida.

À Agência Nacional de Vigilância Sanitária e ao Ministério da Agricultura e Abastecimentos por disponibilizarem os dados brutos dos programas de análise de resíduos de pesticidas em alimentos.

À Polly Boon, Gerda van Donkersgoed e Jacob van Klaveren por me receberem no RIVM e pelo treinamento no MCRA.

Aos professores Dr^a. Susanne Rath, Dr^a. Ionara Regina Pizzutti, Dr^a. Maria Hosana Conceição e Dr. Carlos José Sousa Passos por aceitarem o convite de participação na banca.

À Erica e Camile pela amizade, apoio e conforto.

À Diana, Márcia, Mari, Paty, Jéssica e Juju pela amizade e companhia nas longas horas de trabalho.

À Denise, Fernanda, Elcio, Cristiano, João e David pelo auxílio com as análises das amostras.

À Alessandra pela colaboração na extração dos dados de consumo da POF.

A todos os colegas do LabTox.

À Babi, Dieguinho, Márcia e Rodrigo pelo acolhimento na Holanda.

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE TABELA..... | x |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | xiv |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| OBJETIVOS | 2 |
| APRESENTAÇÃO DA TESE | 3 |
| I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 1. Regulamentação do uso de pesticidas no Brasil..... | 4 |
| 2. Toxicidade dos pesticidas | 6 |
| 3. Métodos analíticos para determinação de resíduos de pesticidas em alimentos | 12 |
| 3.1. Métodos multirresíduos..... | 12 |
| 3.2 Fungicidas ditiocarbamatos | 14 |
| 4. Resíduos de pesticidas em alimentos..... | 16 |
| 5. Exposição humana as pesticidas na dieta e os riscos para saúde | 17 |
| 5.1 Identificação do dano e Caracterização da relação dose/resposta..... | 19 |
| 5.2 Avaliação da exposição na dieta | 23 |
| 5.3 Caracterização do risco | 32 |
| 5.4 Exposição e riscos da presença de resíduos de pesticidas na dieta brasileira | 33 |
| Referências..... | 36 |
| II. BRAZILIAN MONITORING PROGRAMS FOR PESTICIDE RESIDUES IN FOOD – RESULTS FROM 2001 TO 2010 | 49 |
| 1. Introduction | 50 |
| 2. Material and methods..... | 51 |
| 2.1. The monitoring programs..... | 51 |
| 2.2. Analytical methods..... | 52 |
| 3. Results | 52 |
| 4. Discussion..... | 64 |
| References..... | 68 |
| III. MÉTODO ANALÍTICO MULTIRRESÍDUOS E ANÁLISE DE INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS, CARBAMATOS, PIRETRÓIDES E OUTROS EM ALIMENTOS..... | 73 |
| 1. Estudos preliminares..... | 73 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.1 Materiais | 73 |
| 1.2 Procedimento..... | 75 |
| 1.3 Resultados..... | 78 |
| 1.4 Conclusões | 80 |
| 2. Multiresidue analysis of pesticides in seasonal fruits using ethyl acetate extraction and GC-ECD-FPD, GC-MS/MS and LC-MS/MS | 81 |
| Introduction | 82 |
| Materials and Methods..... | 83 |
| Results and Discussion..... | 89 |
| Conclusion | 109 |
| References | 110 |
| IV. AVALIAÇÃO PROBABILÍSTICA DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA AOS RESÍDUOS DE PESTICIDAS NA DIETA E OS RISCOS PARA A SAÚDE | 114 |
| 1. Introdução | 114 |
| 2. Metodologia | 115 |
| 2.1 Fatores de potência tóxica..... | 115 |
| 2.2 Dados de resíduos de pesticidas..... | 120 |
| 2.3 Dados de consumo de alimentos..... | 123 |
| 2.4 Cálculo da exposição probabilística a pesticidas na dieta | 129 |
| 2.5 Caracterização do risco da exposição | 133 |
| 3. Resultados e discussão | 133 |
| 3.1 Organofosforados e carbamatos | 133 |
| 3.2. Piretróides..... | 136 |
| 3.3 Triazóis | 138 |
| 3.4 Ditiocarbamatos..... | 140 |
| Conclusão | 142 |
| Referências..... | 143 |
| CONCLUSÕES FINAIS..... | 148 |

LISTA DE FIGURAS

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Ácidos utilizados como matéria prima na produção dos pesticidas organofosforados e carbamatos..... | 6 |
| Figura 2. Inseticidas organofosforados..... | 8 |
| Figura 3. Carbamatos e seus metabólitos..... | 9 |
| Figura 4. Inseticidas piretróides. Com exceção da bifentrina, todos possuem toxicidade tipo II por conterem CN ⁻ na molécula..... | 10 |
| Figura 5. Fungicidas triazóis..... | 11 |
| Figura 6. Estruturas e características dos ditiocarbamatos..... | 12 |
| Figura 7. Sistema vertical de hidrólise de fungicidas ditiocarbamatos para análise espectrofotométrica (a); reação de hidrólise do ditiocarbamato ziram e formas de determinação do CS ₂ formado (b)..... | 15 |
| Figura 8. Etapas da análise e avaliação do risco..... | 18 |
| Figura 9. Estimativa da IDA (Ingestão Diária Aceitável) ou ARfD (<i>Acute Reference Dose</i>), aplicando fator de segurança igual a 100, a partir dos valores de NOAEL (<i>No Observed Adverse Effect Level</i>) obtidos de experimentos com animais de laboratório..... | 21 |
| Figura 10. Modelo probabilístico para estimar a exposição humana a substâncias químicas na dieta..... | 30 |

II. BRAZILIAN MONITORING PROGRAMS FOR PESTICIDE RESIDUES IN FOOD E RESULTS FROM 2001 TO 2010

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 1. <i>Percentage by which the MRLs is exceeded in the samples analyzed of the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010. Dithiocarbamates had its LMR established as CS₂ only as of 2003.....</i> | 58 |
| Fig. 2. <i>Levels of pesticides found in the 11 highest positive crops samples analyzed by the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010.....</i> | 59 |
| Fig. 3. <i>Crops with multiple pesticide residues in the samples analyzed by the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010, s % of positive samples....</i> | 60 |
| Fig. 4. <i>The 15 pesticides most frequently detected in the samples analyzed by the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010.....</i> | 60 |

III. METODOLOGIA ANALÍTICA MULTIRRESÍDUOS E ANÁLISE DE INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS, CARBAMATOS, PIRETRÓIDES E OUTROS EM ALIMENTOS

1. Estudos preliminares

- Figura 1.** Cromatogramas da amostra de tomate extraída com acetato de sódio e acetato de etila acidificado injetadas no GC-FPD. (a) branco do tomate; (b) ponto de 150 pg/μL para compostos organofosforados do grupo 1 (b) e 2 (c) em extrato de matriz tomate branco. Injetado na coluna OV-5... 76
- Figura 2.** Média de recuperação no nível de 20 μg/kg dos compostos organofosforados do grupo 1 na matriz tomate – as barras de erros representam os desvios padrão. GC-FPD, coluna OV-5..... 79
- Figura 3.** Teste de recuperação no nível de 20 μg/kg dos compostos organofosforados do grupo 2, na matriz tomate – as barras de erros representam os desvios padrão. GC-FPD, coluna OV-5..... 79
- Figura 4.** Teste de recuperação no nível de 20 μg/kg dos compostos das classes dos piretróides, dinitroanilinas e isoftalonitrilas – as barras de erros representam os desvios padrão. GC-μECD, coluna OV-5..... 80
2. *Multiresidue analysis of pesticides in seasonal fruits using ethyl acetate extraction and GC-ECD/FPD, GC-MS/MS and LC-MS/MS*
- Figure 1.** *Flowchart of the multiresidue method*..... 87
- Figure 2.** *GC-FPD chromatograms (OV-17 column) of a khaki matrix mach calibration curve (50pg/μL)*..... 89
- Figure 3.** *GC-ECD chromatograms (OV-5 column) of blank (red) and matrix mach calibration curve (50 pg/μL) (blue) of pyrethroids, dinitroanilines and chlorotalonil* 91
- Figure 4.** *LC-MS/MS chormatograms for carbamate determination (Synergi 4u Fusion RP column) of a guava blank extract* 93
- Figure 5.** *Distribution of the linear regression residues calculated for matrix match calibration curve for terbufos ($y = 10.966x + 32.576$) prepared in guava blank extracts*..... 102
- Figure 6.** *GC-MS/MS chromatograms (TR-Pesticide II column) and spectrums of a khaki sample containing lambda-cyalothrin. The chromatograms and mass spectrum of the first transition are illustrated in the figures (a) and (b) and for the second transition in the figures (c) and (d)*..... 104
- Figure 7.** *The pesticides most found in the analyzed samples. The percentage of the pesticides found in the total analysed sample (yellow) and total positive samples (blue)*..... 105
- Figure 8.** *Pesticides residues found in khaki samples. *Only one positive sample*.... 106
- Figure 9.** *Pesticides residues found in cashew samples. *Only one positive sample* 106
- Figure 10.** *Pesticides residues found in guava samples. *Only one positive sample* 107
- Figure 11.** *Pesticides residues found in peach samples. *Only one positive sample* 107

| | |
|--------------------------------------------------------------------|------------|
| Figure 12. Multiple residues found in positive samples..... | 109 |
|--------------------------------------------------------------------|------------|

IV. AVALIAÇÃO PROBABILÍSTICA DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA AOS RESÍDUOS DE PESTICIDAS NA DIETA E OS RISCOS PARA A SAÚDE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figura 1. Página inicial do MCRA (https://mcra.rivm.nl/)..... | 129 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

| | |
|--------------------------------------------|------------|
| Figura 2. Menu central do MCRA..... | 131 |
|--------------------------------------------|------------|

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figura 3. Os dez alimentos que mais contribuíram para ingestão de organofosforados e carbamatos (em porcentagem) pela população geral e adolescentes; metamidofós (a - b) e acefato (c - d)..... | 136 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figura 4. Os dez alimentos que mais contribuíram para ingestão total (em porcentagem) de piretróides pela população geral e adolescentes usando como a deltametrina como composto indicador..... | 137 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figura 5. Os seis alimentos que mais contribuíram para ingestão total (em porcentagem) de triazóis (exposição aguda) por mulheres entre 12-45 anos e grávidas usando o fluzilazol como composto indicador..... | 139 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figura 6. Os seis alimentos que mais contribuíram para ingestão cumulativa crônica (em porcentagem) de triazóis (exposição aguda) pela população geral e adolescentes usando o ciproconazol como composto indicador..... | 140 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figura 7. Os dez alimentos que mais contribuíram para ingestão cumulativa crônica (em porcentagem) dos ditiocarbamatos (expresso como CS₂) pela população geral e adolescentes..... | 142 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

LISTA DE TABELA

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Avaliação de risco probabilístico aos pesticidas no Brasil e outros países (adaptado de Caldas e Jardim, 2012)..... | 36 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

II. BRAZILIAN MONITORING PROGRAMS FOR PESTICIDE RESIDUES IN FOOD E RESULTS FROM 2001 TO 2010

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1. Samples analyzed by the Brazilian monitoring programs from 2001-2010, as percent of positive and irregular samples..... | 53 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 2. Food commodities analyzed by the Brazilian monitoring programs from 2001-2010, as percent of positive and irregular samples..... | 55 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 3. Results obtained by the PARA and PNCRC monitoring programs from 2006-2010..... | 57 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 4. Classes of pesticides most found in the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010, as % of positive samples..... | 62 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 5. Samples with multiple residues from the same class found in the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010..... | 63 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

III. MÉTODO ANALÍTICO MULTIRRESÍDUOS E ANÁLISE DE INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS, CARBAMATOS, PIRETRÓIDES E OUTROS EM ALIMENTOS

| | |
|-------------------------|----|
| 1. Estudos preliminares | 73 |
|-------------------------|----|

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Preparo das soluções padrão de trabalho dos pesticidas..... | 74 |
|------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 2. Solventes e sais utilizados nos estudos preliminares..... | 75 |
|----------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2. Multiresidue analysis of pesticides in seasonal fruits using ethyl acetate extraction and GC-ECD-FPD, GC-MS/MS and LC-MS/MS..... | 81 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1. LC-MS/MS conditions for carbamates determination..... | 86 |
|-----------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 2. Mean % recoveries and RSD (%) of organophosphorus pesticides in khaki, cashew, guava and peach analyzed by GC-FPD (n=5 at each level)... | 95 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 3. Mean % recoveries and RSD (%) for pyrethroids, chlorothalonil, pendimethalin and trifluralin analyzed by GC- μ ECD) in khaki, cashew, guava and peach (n=5 at each level)..... | 97 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 4. Mean % recoveries and RSD (%) for carbamate pesticides in khaki, cashew, guava and peach analyzed by LC-MS/MS (n=5 at each level)..... | 98 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 5. The LOQ (μ g/kg) for each crop/compound..... | 99 |
|--------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Table 6. Results of quality control recovery and RSD (%) at 20 μ g/kg (GC compounds) and 10 μ g/kg (CB) performed during sample extractions and intermediate precision..... | 100 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Table 7. Mean recoveries and RSD of dithiocarbamates pesticides in khaki, cashew, guava and peach analyzed as CS ₂ by spectrophotometry..... | 103 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

IV. AVALIAÇÃO PROBABILÍSTICA DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA AOS RESÍDUOS DE PESTICIDAS NA DIETA E OS RISCOS PARA A SAÚDE

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1. Fatores de potência tóxica (FPT) após exposição aguda calculados para os compostos organofosforados e carbamatos utilizando NOAEL ou BMD10, considerando o acefato (ACE) e o metamidofós (MET) como compostos indicadores (adaptado de Caldas et al., 2006a)..... | 116 |
| Tabela 2. Fatores de potência tóxica (FPT) calculados para os compostos piretróides utilizando BMD20 e deltametrina como composto indicador (EPA, 2011)..... | 118 |
| Tabela 3. Valores de NOAEL e BMD e FPT para exposição aguda e crônica a triazóis (EFSA, 2009)..... | 119 |
| Tabela 4. Dados de resíduos de pesticidas em alimentos analisados pelo PARA, PNCRC e LabTox entre 2005 e 2012..... | 120 |
| Tabela 5. Fatores de processamento (FP) utilizados nos cálculos de exposição aos organofosforados e carbamatos em alimentos..... | 123 |
| Tabela 6. Alimentos, número de dias reportados, média e desvio padrão de consumo, segundo a POF 2008/2009 (IBGE, 2011). Em destaque, os 26 alimentos para os quais dados de resíduos estão disponíveis..... | 124 |
| Tabela 7. Proporções dos alimentos nas preparações selecionadas neste estudo..... | 127 |
| Tabela 8. Parâmetros do MCRA utilizados para estimativa da exposição..... | 132 |
| Tabela 9. Percentis da distribuição de ingestão aguda cumulativa de organofosforados e carbamatos utilizando o acefato e metamidofós como compostos indicadores..... | 134 |
| Tabela 10. Percentis da distribuição de ingestão cumulativa aguda de piretróides tendo deltametrina como composto indicador (ARfD=10 µg/kg pc; EPA, 2011)..... | 137 |
| Tabela 11. Percentis da distribuição de ingestão aguda cumulativa dos triazóis por mulheres em idade reprodutiva e grávidas tendo como composto indicador o fluzilazol (ARfD=5 µg/kg pc; EFSA, 2009)..... | 138 |
| Tabela 12. Percentis da distribuição de ingestão cumulativa crônica dos triazóis pela população geral e adolescentes usando o ciproconazol como composto indicador (IDA =20 µg/kg pc/dia; EFSA, 2009)..... | 139 |
| Tabela 13. Percentis de distribuição da ingestão crônica de CS ₂ pela população geral e adolescentes..... | 141 |

RESUMO

O uso de pesticidas no campo pode levar a presença de resíduos desses compostos nos alimentos, o que pode representar um risco para a saúde humana. Para avaliar este risco são necessários dados de resíduos de pesticidas em alimentos, de consumo desses alimentos e de toxicidade dos pesticidas. Dados de resíduos de pesticidas para 22 alimentos da dieta brasileira obtidos de programas de monitoramento do MAPA e ANVISA mostraram que os fungicidas ditiocarbamatos (possíveis carcinogênicos) e os inseticidas organofosforados (neurotóxicos) foram os mais presentes nas 13556 amostras analisadas entre 2001 e 2010 (41,6 e 30,7%, respectivamente). Múltiplos resíduos de organofosforados foram encontrados em 18,6% das amostras positivas para esta classe, seguido dos triazóis (16,1%). Um método multirresíduo foi validado para determinação de 46 pesticidas e metabólitos em caqui, caju, goiaba e pêsego utilizando extração com acetato de etila e purificação por extração dispersiva em fase sólida com amina primária secundária. Os compostos foram analisados por CG-FPD (organofosforados), CG- μ ECD (piretróides) e LC-MS/MS (carbamatos), com LOQs entre 1,0 e 8,0 μ g/kg. Cerca de 60% das 238 amostras analisadas apresentaram resíduos de pesticidas, a maioria de uso não autorizado. A avaliação probabilística cumulativa da exposição foi conduzida no programa *Monte Carlo Risk Assessment* (MCRA 7.1) para organofosforados e carbamatos (aguda), triazóis (crônica e aguda), piretróides (aguda) e ditiocarbamatos (crônica). Foram utilizados dados de consumo individual da POF 2008/2009 (≥ 10 anos), dados de resíduos de 26 alimentos e 73 preparações e fatores de potência tóxica publicados na literatura. A ingestão cumulativa aguda ultrapassou o parâmetro toxicológico (ARfD) apenas para os compostos organofosforados e carbamatos nos P99,9 da curva de distribuição. Em geral, o arroz, feijão e laranja foram os alimentos que mais contribuíram para a ingestão dos compostos avaliados. Uma limitação importante deste estudo foi a ausência de dados de consumo para crianças, grupo da população ainda em desenvolvimento que possui maior consumo de alimento por peso corpóreo. Este é o primeiro estudo no país que avaliou a exposição cumulativa a piretróides e triazóis e seus resultados podem auxiliar as autoridades governamentais na tomada de decisões relacionadas ao uso de pesticida no Brasil.

Palavras chave: resíduos de pesticidas; método multirresíduos; avaliação da exposição probabilística; exposição cumulativa.

ABSTRACT

The presence of pesticide residues in food as a consequence of their agricultural use may represent a human health risk. To estimate this risk, data on pesticide residues in food, food consumption data and information regarding the pesticide toxicity are necessary. In this study, monitoring residue data for 22 crops obtained from the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supplies and the National Sanitary Surveillance Agency showed that the dithiocarbamate fungicides (possible human carcinogens) and organophosphorous insecticides (neurotoxic compounds) were the most detected pesticides found in the 13556 samples analyzed between 2001 and 2010 (41.6 e 30.7%, respectively). Multiple residues of organophosphorus compounds were found in 18.6% of the samples positive for these compounds, followed by triazoles (16.1%). A multiresidue method was validated for the determination of 46 pesticides and metabolites in khaki, cashew, peach and guava using ethyl acetate extraction and dispersive clean up with primary secondary amine. The compounds were analyzed by GC/FPD (organophosphorous), GC- μ ECD (pyrethroids) and LC-MS/MS (carbamates), with LOQs ranging from 0.001 to 0.008 mg/kg. About 60% of the 238 samples analyzed contained at least one residue, mostly from non-authorized use. Probabilistic cumulative exposure assessments using the Monte Carlo Risk Assessment (MCRA 7.1) program were conducted for organophosphorous and carbamates (acute), triazoles (chronic and acute), pyrethroids (acute) and dithiocarbamates (chronic). Individual consumption data were obtained from the POF 2008/2009 (≥ 10 years old) and residue data for 26 crops and 73 food preparations. The acute cumulative exposure exceeded the ARfD only for the organophosphorus and carbamates at the 99.9 percentile of the distribution curve. An important limitation of this study is the lack of consumption data for children, a population subgroup that is still under development and has higher food consumption per body weight. The results of this study can help governmental authorities in the decision making process regarding pesticide use in Brazil.

Key words: pesticide residues, multiresidue methods, probabilistic exposure assessment, cumulative exposure.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ ECD - *μ Electron Capture Detector*

ACE – Acefato

AChE – acetilcolinesterase

AcOEt – Acetato de etila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARfD – *Acute Reference Dose*

BMD – *Benchmark Dose*

BMDL – *Benchmark Dose Lower Confidence Limit*

BPA – Boas Práticas Agrícolas

CB – Carbamatos

CCPR – *Codex Committee on Pesticide Residues*

CEAGESP – Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo

CI – Composto Indicador

DMD – Dimetilditiocarbamates

DT – Ditiocarbamatos

EBDC – Etilenobisditiocarbamatos

EDT – Estudo de Dieta Total

EPA – *U.S. Environmental Protection Agency*

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FET – Fator de Equivalência Tóxica

FP – Fatores de processamento

FPD – *Flame Photometric Detector*

FPT – Fator de potência tóxica

GAC – Grupo de compostos com avaliação comum

GC – *Gas Chromatography*

GCB – *Grafitized Carbon Black*

GEMs/Food – *Global Environmental Monitoring System*

GMC – Grupo de compostos com mecanismo comum

GPC – *Gel Permeation Chromatography*

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IDA – Ingestão Diária Aceitável

IDTM – Ingestão Diária Teórica Máxima

IESTI – *International Estimated Short-Term Intake*
JECFA – *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*
JMPR – *Joint Meeting on Pesticide Residues*
LC – *Liquid Chromatography*
LMR – Limite Máximo de Resíduos
LOAEL – *Lowest Observed Adverse Effect Level*
LOD – Limite de detecção
LOQ – Limite de quantificação
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimentos
MCRA – *Monte Carlo Risk Assessment*
MET – Metamidofós
MOE – *Margin of Exposure*
MRL – *Maximum Residue Level*
MS – *Mass Spectrometer*
NOAEL – *No Observed Adverse Effect Level*
NPD – *Nitrogen-Phosphorus Detector*
OF – Organofosforados
OMS – Organização Mundial de Saúde
PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PBDC – Propilenobisditiocarbamatos
PMTDI – *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*
PNCRC – Programa Nacional de Resíduos e Contaminantes
POF – Pesquisa de Orçamento Familiar
PSA – *Primary Secondary Amine*
PTWI – *Provisional Tolerable Weekly Intake*
QFA – Questionário de Frequência Alimentar
QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*
RU – Restaurante universitário da Universidade de Brasília
SAR – *Structure-Activity Relationship*
SPME – *Solid-Phase Micro Extraction*

INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas ou agrotóxicos no campo ainda é a forma mais utilizada no combate e na prevenção de doenças causadas por pragas que podem comprometer a produção agrícola e levar a uma escassez de alimentos no mercado. Adicionalmente, estes produtos também são usados para o controle de vetores capazes de transmitir doenças infecciosas e epidemias, como malária e dengue (ANVISA, 2012). No Brasil, mais de 90% dos produtores agrícolas fazem uso de pesticidas de diferentes classes químicas, que agem no combate de diversas pragas, incluindo insetos, fungos e plantas daninhas (IBGE, 2006). A presença de resíduos de pesticidas nos alimentos é resultado direto do uso desses compostos no campo e a dieta é uma via potencial de exposição humana. Segundo Marrs (2000), algumas intoxicações agudas devido à ingestão de pesticidas por meio do consumo de um alimento contaminado podem passar despercebidas por serem diagnosticadas como contaminação microbiológica.

Entre as classes de compostos mais tóxicos com uso autorizado na agricultura e com maior incidência nos alimentos no Brasil encontram-se os inseticidas com ação neurotóxica organofosforados e carbamatos, que inibem a enzima acetilcolinesterase causando desde dor de cabeça e náusea até taquicardia, fraqueza muscular e coma em indivíduos expostos (Ecobichon, 2001). Os inseticidas piretróides e os fungicidas triazóis e ditiocarbamatos são também largamente encontrados nos alimentos. O mecanismo de neurotoxicidade dos piretróides envolve a inibição dos canais de sódio, cálcio e cloreto voltagem dependentes, podendo prejudicar a atividade motora de mamíferos (EPA, 2011). Os fungicidas triazóis podem causar efeitos de malformação crânio facial e hepatotoxicidade (Zarn et al., 2003). Alguns ditiocarbamatos podem apresentar toxicidade crônica, pois seus metabólitos (etilenotiouréia e propilenotiouréia) mostraram propriedades carcinogênicas em estudos com animais (Doerge e Takazawa, 1990).

Métodos multirresíduos para análise de resíduos de pesticidas têm como objetivo analisar uma grande quantidade de pesticidas (pertencentes a diferentes classes) em diferentes matrizes em uma única etapa de extração. As técnicas de detecção e determinação mais utilizadas são a cromatografia gasosa (GC – *gas chromatography*) acoplada aos detectores FPD (*Flame Photometric Detector*), NPD

(*Nitrogen-Phosphorus Detector*), ECD (*Electron Capture Detector*) e MS (*Mass spectrometer*), e a cromatografia líquida (LC – *Liquid Chromatography*) acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). Desde 2003, o método multirresíduo QuEChERS (Anastassiades et al., 2003) e suas modificações passaram a ser aplicados amplamente pelos laboratórios em diversos países (Lehotay et al., 2005a; Liu et al., 2005; Banerjee et al., 2007; Okihashi et al., 2005).

Para avaliar se a presença de resíduos de pesticidas nos alimentos pode causar algum efeito adverso na população que os consome é necessário conduzir estudos de avaliação de risco. Nestes estudos são necessários dados de resíduos de pesticidas em alimentos e dados de consumo de alimentos pela população. Uma das maneiras de calcular a exposição é utilizando o modelo probabilístico. Nos estudos de avaliação de risco cumulativo é possível avaliar a exposição às substâncias que possuem o mesmo mecanismo de ação tóxica e/ou o mesmo efeito adverso, como é o caso dos organofosforados e carbamatos, dos piretróides e dos triazóis.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar a exposição da população brasileira aos pesticidas das classes dos organofosforados e carbamatos, piretróides, triazóis e ditiocarbamatos presentes na dieta.

Específicos

1. Avaliar os dados de resíduos de pesticidas obtidos nos programas de monitoramento PNCRC, do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e PARA, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
2. Otimizar e validar método analítico multiresíduos para análise de inseticidas organofosforados, carbamatos, piretróides e outros em caqui, caju, pêssigo e goiaba;
3. Determinar os pesticidas de várias classes pelo método multiresíduo validado e da classe ditiocarbamatos por método individual validado nas amostras coletadas;

4. Avaliar a exposição cumulativa a pesticidas pelo método probabilístico na dieta brasileira:
- Exposição aguda aos inseticidas organofosforados e carbamatos;
 - Exposição aguda aos inseticidas piretróides;
 - Exposição crônica e aguda aos fungicidas triazóis;
 - Exposição crônica aos fungicidas ditiocarbamatos

APRESENTAÇÃO DA TESE

Este é um estudo multidisciplinar que envolve diferentes ferramentas para atingir seus objetivos. A tese está dividida em quatro capítulos e cada um deles, exceto o primeiro, são referentes a cada etapa do estudo e apresentam uma introdução geral, materiais e métodos, resultados, conclusões e referências.

O primeiro capítulo (I. Revisão Bibliográfica) é uma revisão dos temas que são abordados no estudo.

O segundo capítulo (II. *Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food – results from 2001 to 2010*) trata dos resultados da primeira etapa do trabalho, atendendo ao primeiro objetivo do estudo. Estes resultados foram publicados no periódico *Food Control* (Jardim e Caldas; 25:607-616, 2012).

O terceiro capítulo (III. Método analítico multirresíduos e análise de inseticidas ou pesticidas organofosforados, carbamatos, piretróides e outros em alimentos) refere-se aos objetivos 2 e 3 do estudo. Este capítulo é composto por duas partes. A primeira contém os testes preliminares do procedimento de extração e purificação dos extratos de alimentos, para estabelecimento do método analítico. A segunda trata do procedimento de validação do método e análise das amostras de alimentos coletadas. Esta parte do capítulo está na língua inglesa para futura submissão a um periódico internacional para publicação.

O quarto e último capítulo (IV. Avaliação probabilística da exposição da população brasileira aos resíduos de pesticidas na dieta e os riscos para a saúde) apresenta a terceira etapa do trabalho atendendo aos itens do objetivo 4 do estudo.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Regulamentação do uso de pesticidas no Brasil

O uso de pesticidas no Brasil tem seu marco legal definido pela Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. O Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 que regulamenta a referida Lei, em seu inciso IV do artigo 1º define agrotóxicos e afins, *in verbis*:

Art. 1º

[...]

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

Em 2008, o Brasil passou a liderar o ranking de comercialização de pesticidas (Rebello et al., 2010) e em 2010 detinha 19% (cerca de U\$ 7,3 bilhões) de participação no mercado mundial, seguido pelos Estados Unidos (17%). Até novembro de 2012 havia 422 ingredientes ativos permitidos para uso agrícola e domissanitário no país (ANVISA, 2012). O processo de registro dos pesticidas envolve três esferas governamentais. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabelece o Limite Máximo de Resíduo (LMR), a Ingestão Diária Aceitável (IDA) dos ingredientes ativos e a classificação toxicológica dos produtos formulados; o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) avalia a eficiência agrônômica e aprova o rótulo do produto; e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) avalia o impacto do pesticida no meio ambiente e em outros organismos vivos (Brasil, 2002).

Ainda em relação ao decreto supramencionado, resíduo de pesticida e limite máximo de resíduos (LMR) são definidos como

Art 1º

[...]

XLIV - substância ou mistura de substâncias remanescente ou existente em alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso ou da presença

de agrotóxicos e afins, inclusive, quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas, consideradas toxicológica e ambientalmente importantes.

[...]

XXII - LMR é a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes (em peso) do agrotóxico e afim ou seus resíduos por milhão de partes de alimento ppm ou mg/kg. (Brasil, 2002)

Na prática, o nível de resíduos de um pesticida no alimento não deve ultrapassar o LMR quando o produtor segue as indicações de uso contidas no rótulo dos produtos, ou as boas práticas agrícolas (BPA). Entre estas recomendações estão a concentração da calda, a forma e frequência de aplicação e o intervalo de carência (tempo entre a última aplicação e a colheita do produto). As BPA são utilizadas pelas indústrias produtoras de pesticidas nos estudos supervisionados de campo conduzidos para cada combinação cultura/pesticida. Os resultados desses estudos são submetidos aos governos para estabelecimentos do LMR. Assim, a presença em uma determinada cultura de resíduos de pesticidas acima dos limites legais estabelecidos é uma indicação do mau uso do produto no campo (FAO, 2009). Em princípio, o consumo de alimento contendo resíduos até o LMR não deve significar um risco para a saúde humana (Codex, 2011).

O Comitê de Resíduos de Pesticidas do *Codex Alimentarius* (CCPR – *Codex Committee on Pesticide Residues*) estabelece LMRs no âmbito internacional, com base nas recomendações do Grupo de Peritos em Resíduos de Pesticidas da FAO (Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas) e OMS (Organização Mundial de Saúde) (JMPR – *Joint Meeting on Pesticide Residue*). Essas recomendações são elaboradas a partir dos resultados dos estudos supervisionados de campo conduzidos em vários países e, em princípio, cobre o uso em qualquer país. O estabelecimento de LMR pelo *Codex* tem como objetivos facilitar o comércio internacional de alimentos, eliminando barreiras sanitárias e garantir um produto seguro para a população (Codex, 2011)

2. Toxicidade dos pesticidas

Organofosforados e carbamatos

Os organofosforados (OF) e carbamatos (CB) são compostos amplamente utilizados como inseticidas e estão entre os mais tóxicos atualmente em uso na agricultura. Os organofosforados são ésteres dos ácidos fosfóricos e tiosfosfórico (seus derivados também são chamados organotiosfosforados) enquanto que os carbamatos são ésteres do ácido carbâmico (Figura 1). Os OF foram sintetizados pela primeira vez em 1937 na Alemanha, e mais tarde foram usados como arma química na segunda guerra mundial (Ecobichon, 2001).

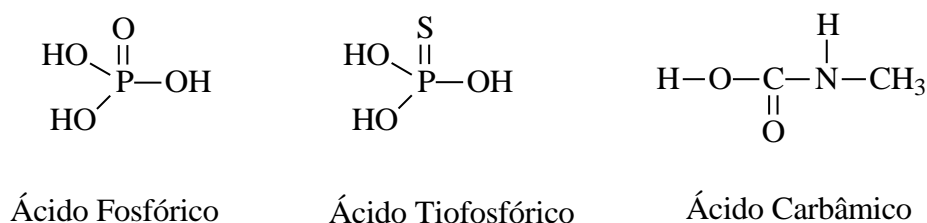


Figura 1. Ácidos utilizados como matéria prima na produção dos pesticidas organofosforados e carbamatos.

Os primeiros compostos da classe dos carbamatos, ésteres alifáticos, foram sintetizados nos anos 30 e inicialmente comercializados como fungicidas por possuírem baixa atividade inseticida. Já na década de 50 foram sintetizados aril ésters derivados do ácido metilcarbâmico, os quais apresentavam potente ação inseticida (Ecobichon, 2001).

Os organofosforados e carbamatos possuem o mesmo mecanismo de ação tóxica no organismo - inibem a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. O acúmulo deste neurotransmissor nas terminações nervosas leva a uma contínua estimulação dos receptores muscarínicos, atingindo o sistema nervoso autônomo parassimpático, seguida da estimulação dos receptores nicotínicos, atingindo o sistema simpático e sistema nervoso central (Ecobichon, 2001). Entre os efeitos de intoxicação aguda mais frequentemente associados à exposição a esses compostos (exposição oral

voluntária ou acidental ou exposição dérmica e inalatória durante a aplicação) estão disfunções neurocomportamentais, cognitivas e neuromusculares. Embora ambos os compostos possam inibir a atividade da acetilcolinesterase, a inibição causada pelos organofosforados é quase irreversível enquanto que nos carbamatos a inibição é reversível (Ecobichon, 2001). Alguns estudos relataram intoxicação humana após o consumo de alimentos contaminados com estes compostos (Tsai *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2005). Exemplos de organofosforados e carbamatos e seus metabólitos são apresentados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

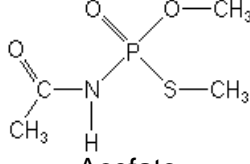
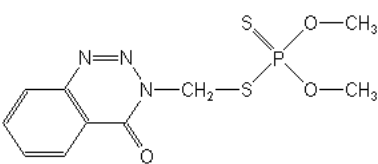
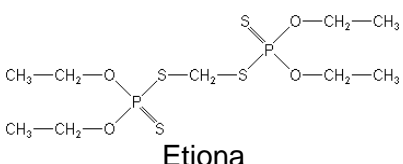
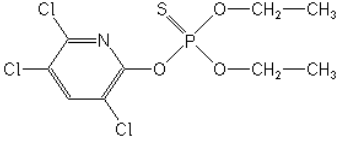
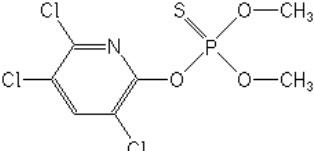
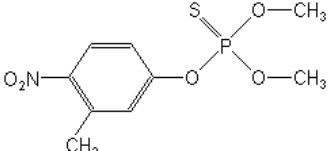
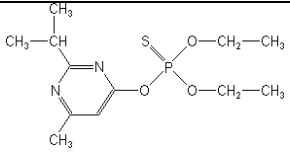
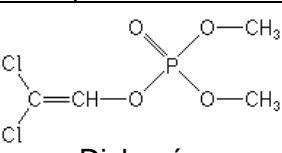
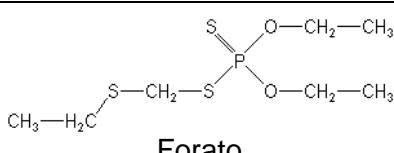
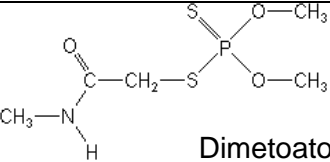
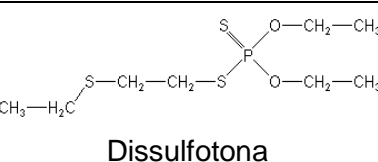
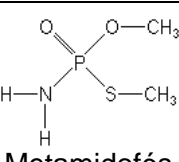
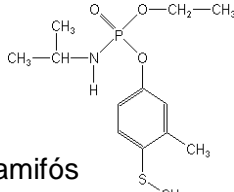
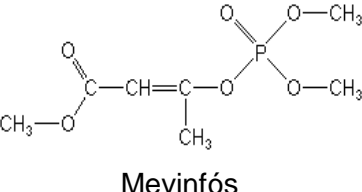
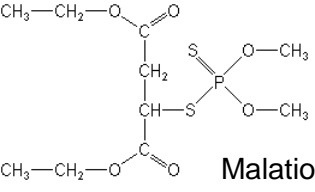
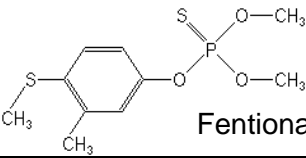
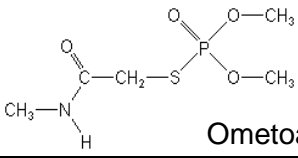
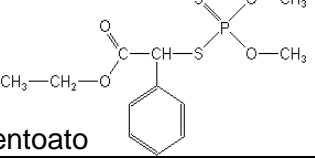
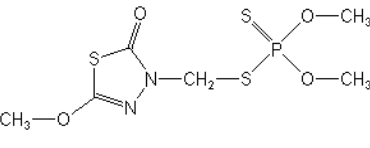
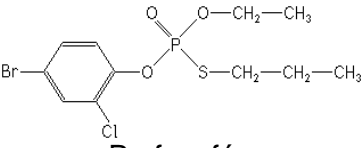
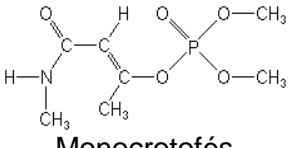
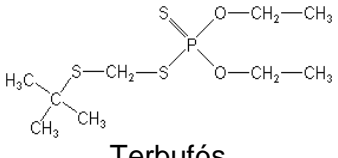
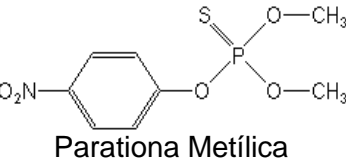
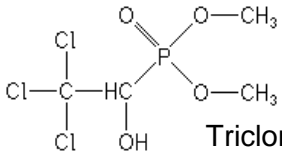
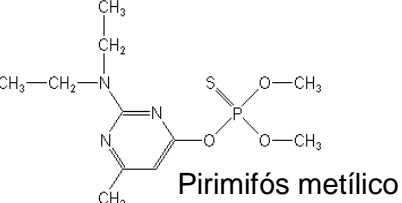
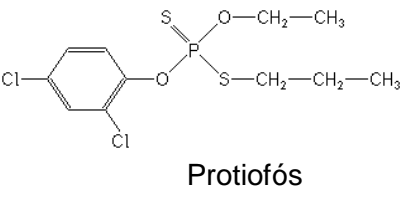
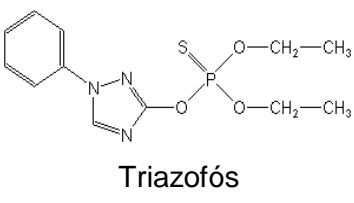
| | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>Acefato</p> |  <p>Azinfos Metílico</p> |  <p>Etiona</p> |
|  <p>Clorpirifós</p> |  <p>Clorpirifós Metílico</p> |  <p>Fenitrotiona</p> |
|  <p>Diazinon</p> |  <p>Diclorvós</p> |  <p>Forato</p> |
|  <p>Dimetoato</p> |  <p>Dissulfotona</p> |  <p>Metamidofós</p> |
|  <p>Fenamifós</p> |  <p>Mevinfós</p> |  <p>Malatona</p> |
|  <p>Fentiona</p> |  <p>Ometoato</p> |  <p>Fentoato</p> |
|  <p>Metidatona</p> |  <p>Profenfós</p> |  <p>Monocrotofós</p> |
|  <p>Terbufós</p> |  <p>Paratona Metilica</p> |  <p>Triclorfom</p> |
|  <p>Pirimifós metílico</p> |  <p>Protiofós</p> |  <p>Triazofós</p> |

Figura 2. Inseticidas organofosforados.

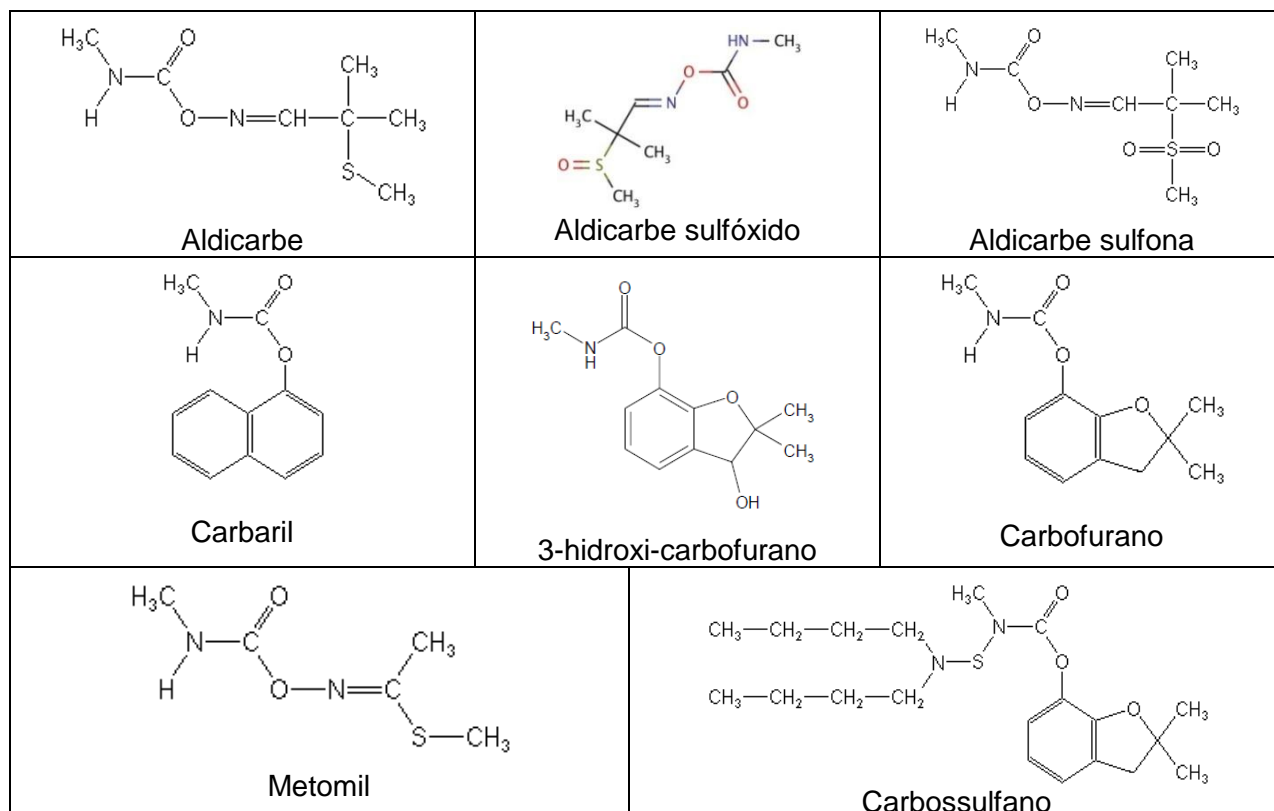


Figura 3. Carbamatos e seus metabólitos.

Piretróides

Os piretróides são compostos sintéticos análogos às piretrinas, substâncias extraídas das flores do *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Bradberry et al., 2005). Embora as piretrinas possuam ação inseticida, são instáveis e se degradam facilmente quando expostas à luz (Shafer et al., 2005). Os mamíferos são três ordens de magnitude menos sensíveis aos piretróides que os insetos (Ray e Fry, 2006) e por isso, seu uso vem aumentando na substituição de outros compostos mais tóxicos, como os organofosforados.

O principal alvo de ação tóxica dos piretróides nos insetos e mamíferos é o bloqueio dos canais de sódio, cálcio e cloreto (Soderlund et al., 2002). Os piretróides se ligam aos receptores dos canais de sódio e diminuem sua taxa de inativação aumentando o influxo de íons Na^+ no neurônio (Shafer et al., 2005). Os piretróides podem ser classificados como tipo I e tipo II, que se diferenciam pela presença do grupo ciano no carbono α do 3-fenoxibenzil (na porção álcool da molécula) nos piretróides do tipo II (Figura 4). Os efeitos da intoxicação aguda pelos piretróides do tipo I e II são a Síndrome-T (*tremor*) e Síndrome-CS (*coreoatetose com salivação*),

respectivamente. Entre os sintomas relacionados à síndrome-T estão agressividade, tremores leves, prostração e hipertermia, já a síndrome-CS estão tremores fortes, salivação, convulsões e hipotermia. Compostos como esfenvalerato e fenpropatrina são considerados misturas dos tipos I e II por apresentarem sintomas de ambas as síndromes (EPA, 2011)

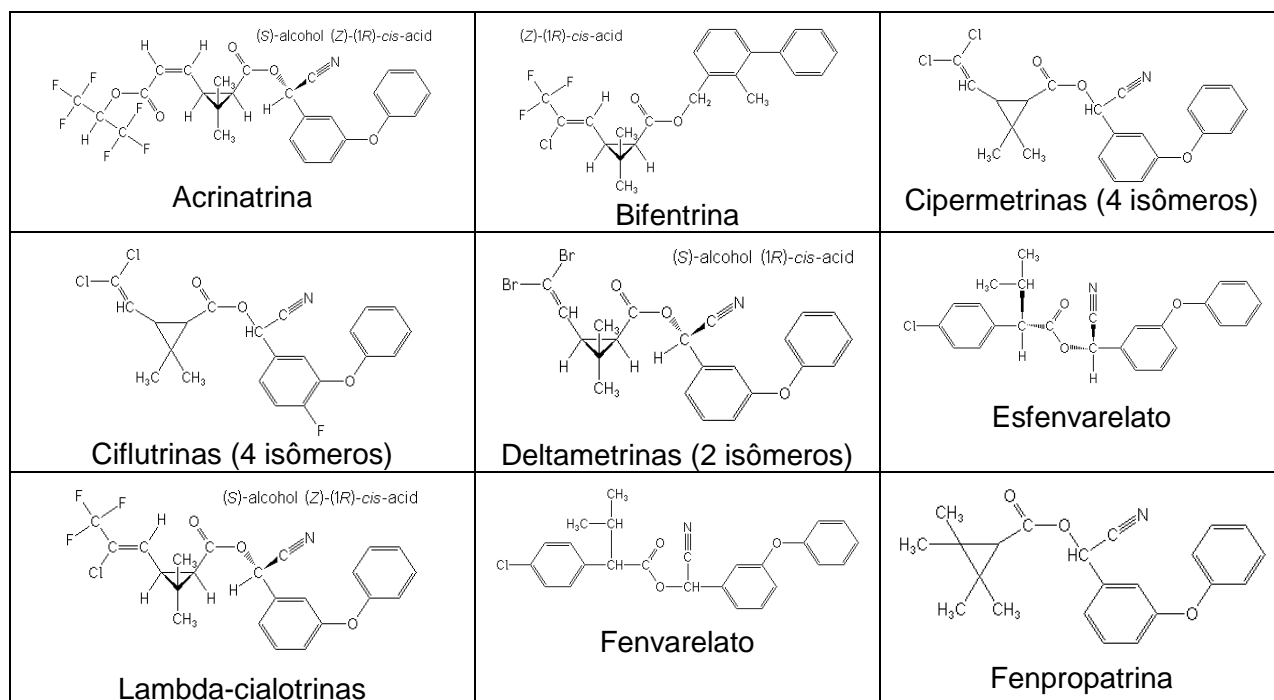


Figura 4. Inseticidas piretróides. Com exceção da bifentrina, todos possuem toxicidade tipo II por conterem o grupo CN⁻ na molécula.

Triazóis

A presença do anel triazol nas moléculas desta classe é responsável por seu mecanismo de ação fungicida. A atividade fungicida é desempenhada pela inibição direta da enzima lanosterol 14-alfa-desmetilase (CYP51), responsável por uma das etapas de biossíntese do ergosterol – derivado do colesterol – e cuja ausência prejudica a fluidez e integridade das células dos fungos (Zarn et al., 2003). Em seres humanos a enzima esterol 14-alfa-desmetilase é expressa em diferentes tecidos e, por isso, há a probabilidade que o mesmo mecanismo de ação fungicida seja também responsável por efeitos tóxicos observados em mamíferos. Entre os efeitos adversos observados nos estudos com animais de laboratório estão efeitos no desenvolvimento, reprodutivos, hepatotoxicidade, hepatocarcinogenicidade, e produção de tumores na tireoide e testículos por via não-genotóxica (EFSA, 2009). A Figura 5 mostra algumas moléculas do grupo dos fungicidas triazóis.

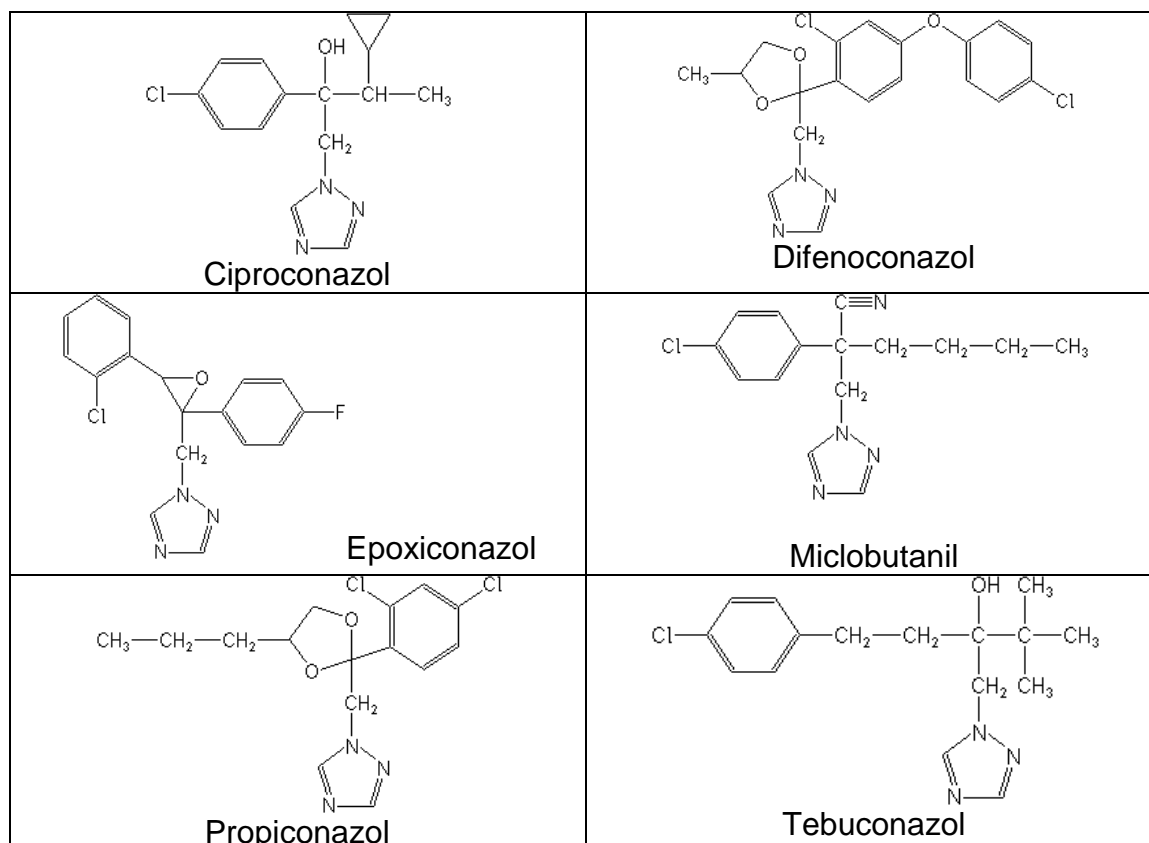


Figura 5. Fungicidas triazóis.

Ditiocarbamatos

Os fungicidas ditiocarbamatos (DT) possuem toxicidade aguda relativamente baixa, mas seus metabólitos etileno ou propilenotiuréia mostraram ser carcinogênicos em animais de laboratório (Doerge e Takazawa, 1990), podendo ser de potencial risco para a saúde humana. Estudos observaram efeitos na tireóide em roedores cronicamente expostos à etilenotiuréia por meio da dieta, e também demonstrou ter efeitos teratogênicos em ratos expostos por via oral ou cutânea (EPA, 1992). Estudos de avaliação toxicológica do propinebe indicam que os efeitos desse composto, também na tireóide de ratos, podem ser causados primariamente pelo seu metabólito propilenotiuréia (IPCS, 1993). Belpoggi et al. (2002), demonstraram que a exposição de ratos a mancozebe na dieta aumentou a quantidade de tumores malignos na mama, pâncreas e tireóide. A Figura 6 mostra as estruturas químicas e informações adicionais dos compostos ditiocarbamatos autorizados para uso no Brasil.

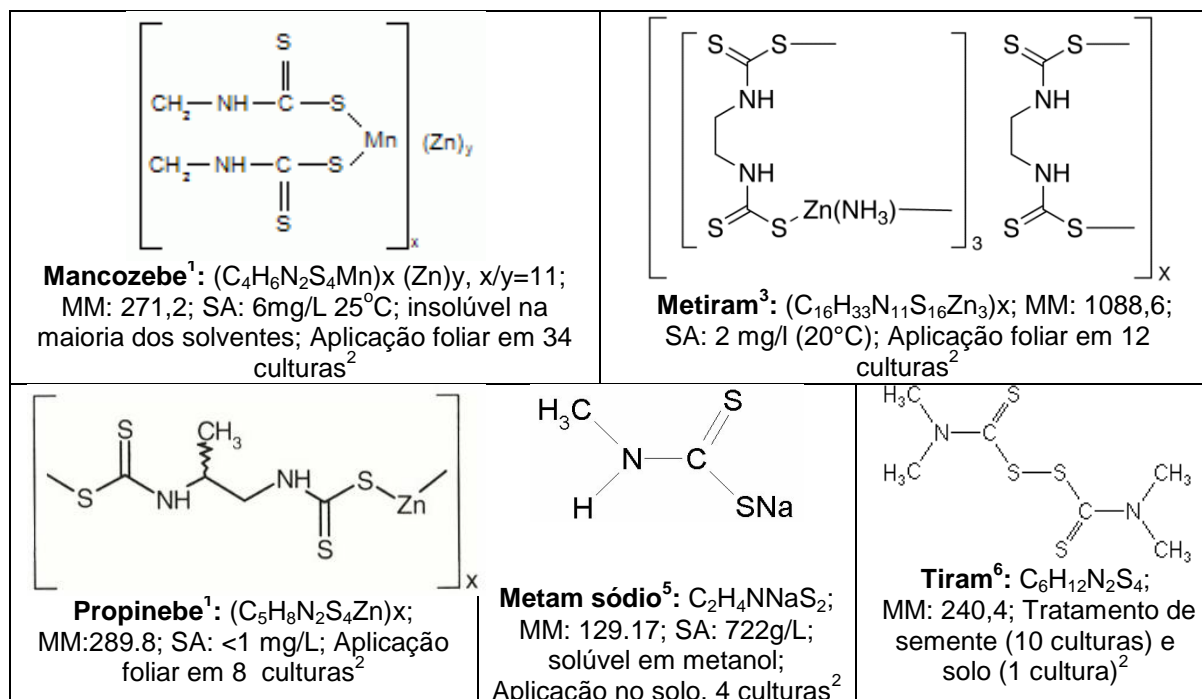


Figura 6. Estruturas e características dos ditiocarbamatos. MM: massa molecular do monômero (g/mol); SA: solubilidade em água. 1. FAO, 1993; 2. ANVISA, 2012; 3. FAO, 1995; 4. <http://www.skybluechem.com/propineb.html>; 5. <http://www.cn-agro.com/fungicidas/Metam-sodium.html>; 6. FAO, 1996.

3. Métodos analíticos para determinação de resíduos de pesticidas em alimentos

3.1. Métodos multirresíduos

Durante o manejo de pragas no campo, muitas vezes há necessidade da aplicação de vários pesticidas numa mesma cultura. Para que seja possível monitorar o uso dessas substâncias nos diversos alimentos são necessários métodos analíticos capazes de analisar vários resíduos num mesmo procedimento analítico. Estes métodos são conhecidos como métodos multirresíduos (MMR).

Há mais de 40 anos MMR são desenvolvidos para analisar resíduos de pesticidas em alimentos para que os governos possam monitorar o uso destes produtos no campo. Os primeiros MMR não tinham a preocupação com o tempo de análise, baixos limites de quantificação e quantidade de solventes e reagentes empregados (Anastassiades et al., 2003). Recentemente, o método conhecido como QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), desenvolvido

por Anastassiades et al. (2003) vem sendo cada vez mais adotado na análise de resíduos de pesticidas em alimentos (Prestes et al., 2009). A proposta é ser um MRM de ampla aplicação, rápido, com resultados confiáveis e com viabilidade econômica. O método original é baseado em uma extração por agitação manual com acetonitrila, adição NaCl e MgSO₄, e purificação por extração dispersiva em fase sólida com PSA (*primary-secondary amine*) e MgSO₄. Para amostras com clorofila e carotenóides é adicionado GCB (*Grafitized Carbon Black*) na etapa de purificação. A detecção e determinação são feitas por cromatografia gasosa e cromatografia líquida acopladas a espectrometria de massas (GC-MS e LC-MS).

Vários trabalhos têm sido conduzidos com aplicação do método QuEChERS para diferentes matrizes e pesticidas, inclusive no Brasil (Fleury Filho et al., 2012; Pizzuti et al., 2012; Queiroz et al., 2012). Outros autores publicaram modificações do método, com diferentes solventes e volumes para extração, tipos de sais utilizados na extração e diferentes adsorventes para purificação (Banerjee et al., 2007; Aysal et al., 2007; Mol et al., 2007). Duas modificações foram publicadas por seus autores. A primeira (CVUA-Stuttgart) utiliza na extração os sais tamponantes citrato trissódico dihidratado e hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado para manter valores de pH entre 5 e 5,5, que possibilita a extração de herbicidas ácidos e protege os compostos lábeis em meio ácido e básico. Na segunda modificação, a acetonitrila foi acidificada (1%) com ácido acético e o cloreto de sódio substituído por acetato de sódio (Lehotay et al., 2005b). Com essas alterações foi possível aumentar as extrações e estabilidade de alguns compostos mantendo tamponado (pH entre 4-5) os extratos de matrizes que possuem pH entre 2-7.

Além da acetonitrila, o acetato de etila tem sido utilizado por vários autores na extração dos resíduos de pesticidas de alimentos, principalmente frutas e verduras, utilizando cromatógrafos a gás acoplados a detectores específicos (FPD, *Flame Photometric Detector*; NPD, *Nitrogen-Phosphorus Detector*; ou ECD, *Electron Capture Detector*) ou a espectrômetros de massas (Caldas et al. 2005, Banerjee et al., 2007; Aysal et al., 2007; Mol et al., 2007, Pihlström et al., 2007; Berrara et al., 2010). A grande vantagem do uso do acetato de etila com relação à acetonitrila é seu menor custo (Aysal et al., 2007; Pihlström et al., 2007).

Outros métodos multiresíduos têm sido descritos na literatura. Rissato et al. (2005) utilizaram a extração com fluido supercrítico e análise por GC-ECD e GC-MS para determinação de 32 pesticidas (organoclorados, organonitrogenados,

organofosforados e piretróides) em amostras de alface, batata, maçã e tomate, reportando LOQs menores que 0,01 mg/kg. Filho et al. (2011) desenvolveu um método multiresíduo para dez pesticidas em manga utilizando micro extração em fase sólida (SPME) acoplado a HPLC-UV, proposto como método de triagem para ser utilizado antes de LC-MS; LOQs ficaram entre 2 e 10 µg/kg. Li et al. (2012) desenvolveram um método baseado na extração com acetonitrila e purificação com MgSO₄, PSA e GCB em pipeta descartável (*disposable pipet extraction*; DPX) e determinação por GC-MS para análise de 58 pesticidas em soja e feijão, com LOQ de 0,02 mg/kg.

3.2 Fungicidas ditiocarbamatos

A maioria dos compostos ditiocarbamatos (DT) são polímeros complexados com metais de transição, e podem ser agrupados em três subclasses de acordo com a cadeia carbônica: os dimetilditiocarbamatos (DMD), os etilenobisditiocarbamatos (EBDC) e propilenobisditiocarbamatos (PBDC) (Crnogorac e Schwack, 2009). A determinação dessa classe de pesticidas não é possível utilizando os métodos multiresíduos, pois apenas os DT não poliméricos são solúveis em solventes orgânicos (Figura 6). Os EBDCs (mancozebe, metiram) e o propinebe são polímeros e insolúveis nos solventes usados normalmente em análises de resíduos de pesticidas. O método mais adotado para análise dos DT em alimentos é a sua determinação indireta por meio da liberação de CS₂ após digestão a quente da amostra em uma solução ácida. O CS₂ liberado pode ser quantificado por espectrofotometria, ou por cromatografia gasosa, sendo o resultado expresso em mg CS₂/kg de alimento (Figura 7). Na análise espectrofotométrica, o CS₂ é complexado com uma solução de acetato cúprico, dietanolamina e etanol e o complexo formado analisado em 435 nm. A Figura 7a ilustra o sistema vertical de hidrólise ácida e formação do complexo desenvolvido por Caldas et al. (2001). Nas determinações por cromatografia gasosa, o CS₂ pode ser injetado diretamente na forma de gás (*headspace*) ou em solução com isooctano (Figura 7b). Limite de quantificação (LOQ) reportados pelos estudos utilizando diferentes formas de detecção do CS₂ normalmente se encontra na faixa entre 0,05 e 0,1 mg/kg (Royer et al., 2001; Caldas et al., 2001; Vareli et al., 2007; Silva et al., 2007).

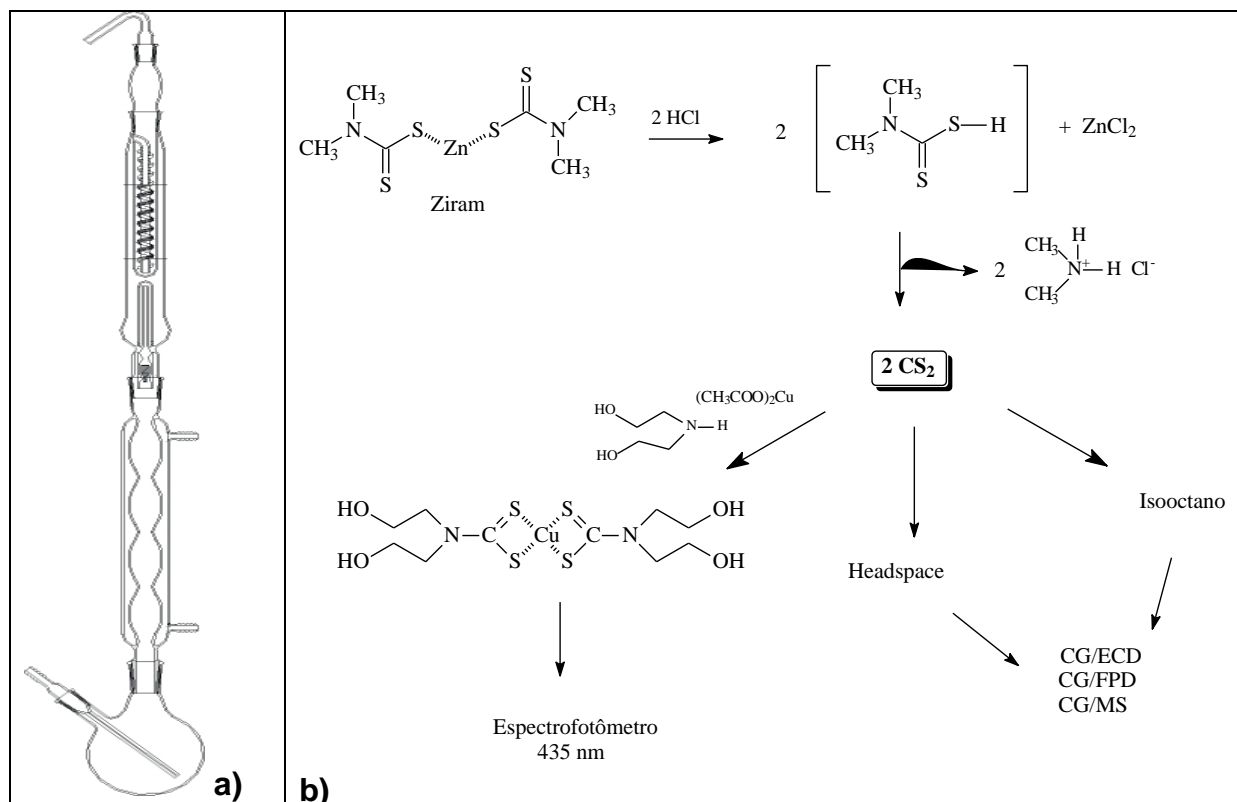


Figura 7. Sistema vertical de hidrólise de fungicidas ditiocarbamatos para análise espectrofotométrica (a); reação de hidrólise do ditiocarbamato ziram e formas de determinação do CS₂ formado (b).

É importante ressaltar, porém, que por não ser específico, estes métodos podem fornecer resultados falso positivos devido à presença natural de compostos sulfurados em alimentos, que também geram CS₂ sob as condições de hidrólise utilizada, principalmente brássicas, como repolho e brócolis, e cebola (FAO, 1993). Alguns autores desenvolveram metodologias para a determinação dos compostos ditiocarbamatos (Crnogorac, 2009). Bardarov et al. (1989) determinaram propinebe após a dissolução da amostra na presença de EDTA e anti-oxidante seguido de cromatografia de troca iônica com detecção eletroquímica ou UV. Van Lishaut e Schwack (2000) determinaram três subclasses de ditiocarbamatos: DMDC (ziram, ferbam), EBDC (mancozebe) e PBDC (propinebe), utilizando um método rápido de cromatografia de par iônico. Nenhum destes métodos, porém, são utilizados em estudos de monitoramento já que os LMRs nacionais e no *Codex Alimentarius* são definidos para o grupo dos compostos ditiocarbamatos, expressos em CS₂ (ANVISA, 2012; FAO, 2003).

4. Resíduos de pesticidas em alimentos

No Brasil, são poucos os laboratórios que publicam resultados das análises de pesticidas em alimentos. Entre 1994 e 2004, o Laboratório de Resíduos de Pesticidas do Instituto Biológico-SP, analisou 30 pesticidas em cerca de 7300 amostras de frutas e vegetais coletadas na CEAGESP (Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo). Cerca de 1% das amostras analisadas continham pesticidas acima dos LMR e 13% apresentaram resíduos para compostos não permitidos para a cultura (Gebara et al, 2005). O mesmo laboratório analisou 2067 amostras coletadas entre 2004 e 2007 utilizando acetona, cloreto de sódio, acetato de etila e ciclohexano na extração, e GPC (*Gel Permeation Chromatography*) e sílica desativada na etapa de purificação. Os pesticidas foram analisados por GC-FPD-NPD-ECD e LC-MS/MS, com LOQs entre 0,001 mg/kg e 0,05 mg/kg. Dos 140 pesticidas pesquisados, 40 foram encontrados em 28% das amostras analisadas (Gebara et al., 2011).

Furlani et al. (2011) analisaram os pesticidas trifluralina, acetocloro, alacloro, α -endossulfan, β -endossulfan, endossulfan-sulfato (LOQ=0,025 mg/L) e atrazina (LOQ=0,1 mg/L) em amostras de cana-de-açúcar utilizando o método QuEChERS original e determinação por GC-ECD. Nenhuma das 80 amostras coletadas apresentou resíduos acima do LOQ.

Filho et al (2010) analisaram 16 amostras de manga obtidas no mercado de Salvador, Bahia. As amostras foram extraídas e analisadas por SPME (*Solid-Phase Micro Extraction*) acoplado a GC-MS. Em todas as amostras analisadas foram encontrados resíduos dos pesticidas bifentrina e azoxistrobina com concentração entre 18,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 57,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 12,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 55,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. As concentrações para ambos os pesticidas estão abaixo dos LMRs.

Em um estudo conduzido no restaurante universitário da Universidade de Brasília, foram analisadas 177 amostras de alimentos prontos para consumo (incluindo arroz, salada, vegetais, carne e sopa) quanto à presença de dez organofosforados e ditiocarbamatos. Os OF foram extraídos com acetato de etila e sulfato de sódio anidro e analisados, sem purificação, por GC-FPD (LOQ de 0,002 mg/kg para todos os compostos). Ditiocarbamatos foram analisados como CS_2 por espectrofotometria (LOQ=0,05 mg/kg). Resíduos de organofosforados e de

ditiocarbamatos foram detectados em 43% e 70% das amostras analisadas, respectivamente (Caldas et al, 2011).

No Brasil atualmente há dois programas nacionais de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, o PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos), coordenado pela ANVISA e o PNCRC (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes), pelo MAPA. Uma avaliação dos resultados das análises realizadas entre 2001-2010 (Jardim e Caldas, 2012, Cap. III) identificou que entre os grupos de compostos mais encontrados e com maior relevância toxicológica então os fungicidas ditiocarbamatos (41,6% das amostras analisadas) e triazóis (10,2%), os inseticidas organofosforados (30,8 %), piretróides (8,3%) e carbamatos (2,4%)

5. Exposição humana as pesticidas na dieta e os riscos para saúde

Uma grande variedade de substâncias químicas potencialmente tóxicas está presente nos alimentos que consumimos, como micotoxinas, resíduos de pesticidas, aditivos e metais pesados, que pode significar risco à saúde humana. O processo de avaliação de risco objetiva estimar o risco a um dado organismo alvo, sistema ou (sub)população, incluindo a identificação das incertezas esperadas, após a exposição a um agente particular, levando em consideração as características inerentes ao agente e as do sistema alvo (IPCS, 2009). Avaliar o risco causado pela exposição humana a substâncias químicas na dieta é amplamente reconhecido como um processo fundamental no desenvolvimento de padrões alimentares seguros (WHO, 1997a). A avaliação é conduzida, por exemplo, pelos governos durante o processo de registro de aditivos alimentares ou de substâncias que serão utilizadas no manejo agropecuário, como pesticidas e drogas veterinárias. No caso de contaminantes presentes nos alimentos, os estudos subsidiam ações gerenciais que levem ao controle da contaminação e diminuição da exposição humana (Jardim e Caldas, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pelo processo de registro de aditivos, pesticidas e drogas veterinárias e pela condução de avaliação do risco da exposição humana a estas substâncias e a contaminantes em alimentos (ANVISA, 2012a). Internacionalmente, procedimentos

de avaliação do risco são conduzidos pelos comitês científicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization* - FAO) para subsidiar o estabelecimento de padrões alimentares pelo *Codex Alimentarius* (WHO, 2007). O JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) avalia questões relativas a aditivos alimentares, contaminantes e drogas veterinárias e o JMPR (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*) aquelas relacionadas a resíduos de pesticidas (Jardim e Caldas, 2009).

Enquanto a avaliação do risco é um processo de base científica, o *gerenciamento do risco* envolve tomada de decisões pelas agências reguladoras que levam em consideração, além de informações técnicas relevantes relacionadas ao dano à saúde e ao risco, fatores políticos, sociais e econômicos. A troca de informações sobre o risco entre avaliadores, gerenciadores, mídia, grupos de interesse e público em geral se dá no âmbito da comunicação de risco (IPCS, 2004). A avaliação, o gerenciamento e a comunicação do risco são processos que interagem entre si, sendo partes de um processo maior, a análise do risco (Figura 8).

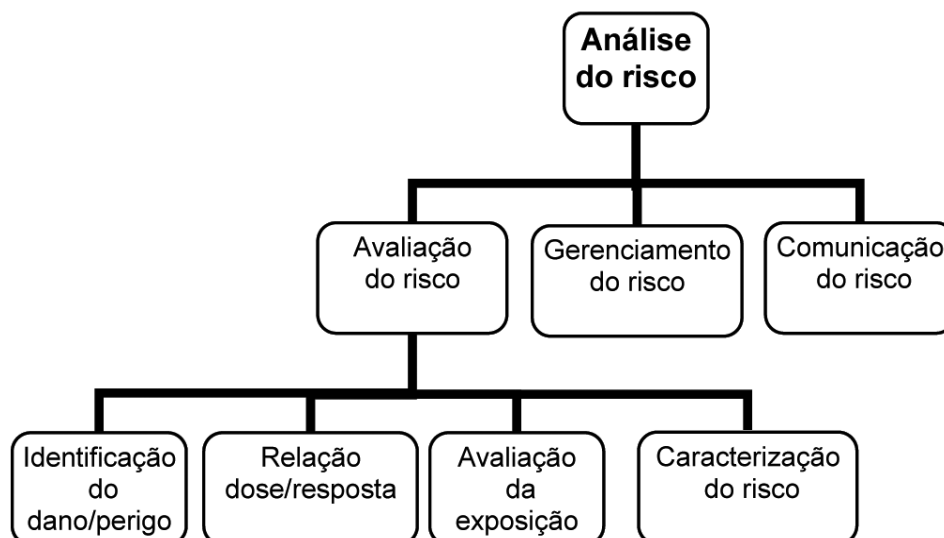


Figura 8. Etapas da análise e avaliação do risco.

Risco pode ser definido como a probabilidade de um efeito adverso ocorrer em um organismo, sistema ou (sub)população causado sob condições específicas pela exposição a um agente (WHO, 1997a). O risco dependerá do grau de toxicidade da substância e da quantidade à qual a população foi exposta. O risco é então função da toxicidade e da exposição (Equação 1).

$$\text{Risco} = f(\text{toxicidade, exposição}) \quad (\text{Eq. 1})$$

A exposição a substâncias químicas na dieta pode ser crônica ou aguda. A exposição crônica é caracterizada pela ingestão de pequenas quantidades da substância durante um longo período, e a exposição aguda pela ingestão de quantidades grandes durante um intervalo de até 24 horas. Enquanto algumas substâncias apresentam maior risco de exposição crônica, como aquelas potencialmente carcinogênicas, outras podem oferecer risco durante uma exposição aguda, como algumas neurotóxicas.

Dentre as substâncias que podem estar presentes nos alimentos e apresentar um potencial risco à saúde humana estão as advindas do processamento e estocagem dos alimentos, como acrilamida e nitrosaminas, toxinas de fungos (micotoxinas), de bactérias e de outros organismos, metais pesados presentes naturalmente no ambiente e compostos orgânicos ou inorgânicos advindos da atividade industrial e/ou doméstica, como metais pesados e dioxinas. Resíduos de pesticidas e de drogas veterinárias podem ser encontrados nos alimentos após o manejo agrícola e/ou pecuário com estas substâncias, visando o controle de pragas e doenças. Por outro lado, aditivos são adicionados aos alimentos com objetivos tecnológicos definidos, como manter as características químicas, físicas e biológicas dos alimentos processados ou imprimir outras, como sabor, cor ou textura. O processo de avaliação do risco envolve 4 etapas, ilustradas também na Figura 8: identificação do dano (ou perigo), caracterização do dano/relação dose-resposta, avaliação da exposição e caracterização do risco.

5.1 Identificação do dano e Caracterização da relação dose/resposta

A identificação do dano, primeira etapa do processo de avaliação do risco, tem como objetivo identificar os potenciais efeitos adversos à saúde humana associados à exposição a uma dada substância química (WHO, 1995; Dybing et al., 2002). Nesse processo, podem ser utilizadas diferentes fontes de informações, incluindo a relação estrutura molecular e atividade (*Structure-Activity Relationship - SAR*) (ECS, 2003), testes *in vitro* (Eisebrand et al., 2002), estudos com animais de laboratório e estudos com seres humanos, como no caso do inseticida

organofosforado acefato, avaliado pelo JMPR em 2005 (FAO, 2012). Estudos com animais de laboratório são atualmente as principais fontes de informação para identificar e caracterizar o dano ao homem de substâncias químicas presentes em alimentos. O uso de dados de estudos em humanos tem um valor importante uma vez que reduz a incerteza relacionada aos achados em ensaios com animais. Esses dados são principalmente derivados de estudos com desenho experimental ou epidemiológico observacional (caso controle ou *cohorte*) (Van den Brandt et al., 2002). Uma exceção tem sido os estudos de inibição de acetilcolinesterase utilizados na avaliação de inseticidas organofosforados e carbamatos (Solecki et al., 2005).

Após a etapa de identificação do dano, a relação quantitativa entre a exposição e a incidência de resposta de um efeito adverso é avaliada. Estudos com animais de laboratório são as principais fontes de informação na caracterização da dose-resposta de substâncias potencialmente tóxicas presentes nos alimentos. Nesse processo, e conseqüentemente na posterior caracterização do risco, são adotadas estratégias diferentes quando os efeitos adversos possuem limiar de dose ou não, que são carcinogênicas e genotóxicas, como as micotoxinas do grupo das aflatoxinas (EPA, 2005; Edler et al., 2002).

Para substâncias com limiar de dose para efeito adverso, que inclui os pesticidas, nenhuma resposta biológica será evidente abaixo de uma dose específica (Dybing et al., 2002). Nessa etapa, são estimadas as doses que não causaram um efeito adverso nos animais testados (*No Observed Adverse Effect Level* – NOAEL) e/ou a menor dose na qual o efeito adverso foi observado (*Lowest Observed Adverse Effect Level* – LOAEL). O NOAEL pode ser definido como o nível de exposição no qual não existe aumento significativo na frequência ou severidade do efeito adverso entre a população exposta e a população controle. O NOAEL e o LOAEL, obtidos dos estudos mais críticos conduzidos na espécie mais sensível testada, são utilizados no cálculo dos parâmetros seguros de ingestão crônica e aguda no homem. Esses parâmetros, expressos em mg/kg de peso corpóreo, são calculados dividindo-se o NOAEL ou o LOAEL por um fator de incerteza, ou de segurança, para se extrapolar os resultados obtidos com animais de laboratório para a espécie humana (Dybing et al., 2002; Herrman e Younes, 1999).

O fator de segurança 100, proposto em 1945 e adotado no segundo encontro do JECFA em 1957, é o valor normalmente utilizado no estabelecimento da ingestão

segura de resíduos de pesticidas e drogas veterinárias, aditivos e contaminantes em alimentos (Herrman e Younes, 1999). Esse valor assume que o ser humano pode ser até 10 vezes mais sensível ao agente que a espécie testada, e que alguns indivíduos da população humana podem ser até 10 vezes mais sensíveis que a média da população (Figura 9). Fatores de segurança maiores ou menores que 100 podem ser considerados em cada caso pelo comitê científico que avalia os estudos toxicológicos. Esse fator pode ser maior que 100 quando os estudos são incompletos ou inadequados, quando se quer acrescentar um fator adicional de proteção a um grupo altamente sensível da população, como crianças ou indivíduos com alguma patologia, ou na ausência de NOAEL; pode ser menor quando dados de toxicocinética e toxicodinâmica demonstram que o homem possa ser menos sensível que a espécie animal na qual o produto foi testado ou quando o efeito observado é reversível ou pouco severo (Herrman e Younes, 1999; FAO, 2012).

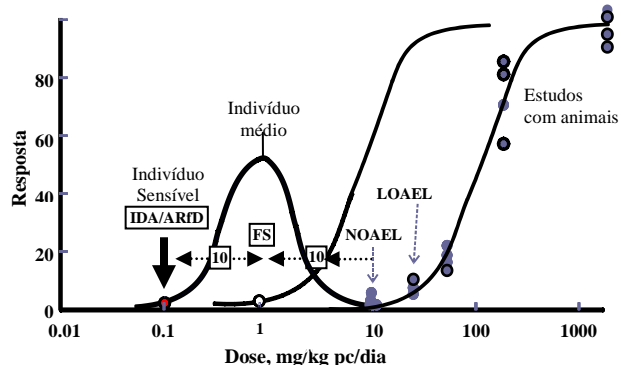


Figura 9. Estimativa da IDA (Ingestão Diária Aceitável) ou ARfD (*Acute Reference Dose*), aplicando fator de segurança igual a 100, a partir dos valores de NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) obtidos de experimentos com animais de laboratório.

Dentre os parâmetros de ingestão crônica segura estimados para o homem estão a IDA, também chamada de dose de referência pelo EPA (*U.S. Environmental Protection Agency*) (IRIS, 2012), a ingestão diária tolerável máxima provisória (*Provisional Maximum Tolerable Daily Intake* - PMTDI) e a ingestão tolerável semanal provisória (*Provisional Tolerable Weekly Intake* - PTWI).

Esses parâmetros de ingestão representam a quantidade da substância presente no alimento e/ou água que pode ser ingerida diariamente ao longo da vida sem que ocorram efeitos adversos à saúde (IPCS, 2009). A IDA é normalmente

definida para aditivos alimentares, drogas veterinárias e pesticidas, substâncias cuja concentração nos alimentos pode ser controlada pelas autoridades reguladoras (Herrman e Younes, 1999). Para contaminantes, parâmetros de ingestão crônica segura são a PMTDI e a PTWI (para substâncias com potencial de acumulação no organismo). Nesse caso, o termo tolerável significa permissibilidade, não a aceitabilidade para a ingestão de contaminantes, cuja associação com os alimentos não pode ser evitada ou totalmente controlada (Herrman e Younes, 1999; IPCS, 1994).

Somente a partir da década de 1990 que a necessidade de se acessar o risco da exposição aguda a substâncias químicas na dieta foi reconhecida internacionalmente, especificamente com relação à exposição a pesticidas (IPCS, 1994). A Dose de Referência Aguda (*Acute Reference Dose - ARfD*) indica a quantidade de uma substância presente no alimento e/ou água que pode ser ingerida num período de 24 horas ou menos sem que haja apreciável risco para a saúde do consumidor (Solecki et al., 2005). A maioria dos princípios aplicáveis para estimar a IDA são também aplicados para estimar a ARfD, nesse caso utilizando preferencialmente os estudos críticos de curta duração. Em geral, o estabelecimento de ARfD é considerado não necessário para pesticidas cujos estudos toxicológicos indicariam um valor acima de 1 ou 5 mg/kg pc (Solecki et al., 2005). Pesticidas organofosforados e carbamatos, que apresentam alta toxicidade aguda via inibição da acetilcolinesterase, normalmente apresentam ARfD menores que 0,1 mg/kg pc (IPCS, 2012).

O conceito de BMD (*Benchmark Dose*) foi originalmente proposto em 1984 (Crump, 1984) como uma alternativa ao uso de NOAEL/LOAEL para derivação dos níveis seguros de exposição humana. Enquanto NOAEL e LOAEL são doses discretas de um estudo, a estimativa de BMD envolve modelagem matemática da curva de dose-resposta para interpolar uma dose estimada que corresponda a um nível particular de resposta (p.ex., a dose que causou um aumento de 10% na incidência de tumores – BMD10). Normalmente, a incerteza desta interpolação também é estimada e o limite de confiança inferior desta dose denominado BMDL (*Benchmark Dose Lower Confidence Limit*) (Setzer e Kimmel, 2003). Enquanto o NOAEL depende do desenho do experimento (i.e., pode ser maior ou menor dependendo da menor dose testada no estudo), o uso de BMD elimina qualquer limitação relacionada ao experimento e diminui a necessidade de se aplicarem

fatores de segurança adicionais (EPA, 2000). A BMD pode ser usada em modelos de dose-resposta para todos os tipos de substâncias e indicadores de toxicidade (*endpoints*), incluindo substâncias carcinogênicas e genotóxicas, independente da suposição de linearidade ou não da curva dose-resposta.

5.2 Avaliação da exposição na dieta

Avaliação da exposição é definida como a estimativa qualitativa e/ou quantitativa da ingestão provável de agentes biológicos, químicos ou físicos via alimento, bem como a exposição de outras fontes, se relevante (WHO, 1997b). Para estimar a exposição humana às substâncias químicas presentes nos alimentos são necessários três dados essenciais: a concentração da substância no alimento (mg/kg), o consumo do alimento (kg) e o peso corpóreo (kg) (individual ou da população em estudo). A estimativa da exposição, dada em mg/kg peso corpóreo, pode ser definida de uma maneira geral pela Equação 2

$$\text{Exposição} = \frac{\text{Concentração da substância} \times \text{consumo do alimento}}{\text{Peso corpóreo}} \quad (\text{Eq. 2})$$

A forma de obtenção dos dados a serem inseridos na Equação 2 depende primariamente dos propósitos da avaliação do risco, se a exposição é crônica ou aguda e do quão precisa e detalhada a estimativa deve ser (Kroes et al., 2002). Além disso, a estimativa pode ser direcionada à população geral ou a determinados subgrupos populacional, como crianças (Petersen e Barraç, 1996) Em todos os casos, as incertezas envolvidas no cálculo da ingestão dependerão das incertezas envolvidas em cada um dos dados inseridos na Equação 2.

Concentração da substância no alimento

Vários fatores influenciam a concentração de uma substância medida no alimento, incluindo o método analítico utilizado, sua precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e/ou quantificação (LOQ). A fonte dos dados de concentração deve fornecer valores confiáveis, caso contrário o resultado da avaliação da exposição poderá apresentar um alto grau de incerteza.

A avaliação da exposição humana aos aditivos, pesticidas e drogas veterinárias pode ocorrer quando se quer avaliar a exposição potencial antes da substância ser registrada para uso (pré-registro), ou depois da mesma já estar presente nos alimentos disponíveis para consumo (pós-registro). No caso de contaminantes, o nível da substância no alimento não pode ser totalmente controlado/eliminado e a estimativa da exposição subsidia o estabelecimento de limites máximos esperados/permitidos nos alimentos. Dependendo do alvo do estudo, diferentes bases de dados podem ser empregadas como parâmetro de concentração da substância no alimento, incluindo o LMR, dados de monitoramento e de dieta total.

Em estudos de monitoramento, amostras de alimentos coletadas aleatoriamente no comércio são analisadas. Quando comparados ao LMR, esses dados refletem melhor os níveis das substâncias encontradas nos alimentos comercializados. Nestes estudos, as amostras a serem analisadas devem representar o melhor possível a situação a ser avaliada, sendo necessário observar variáveis como quantidade, local de coleta e origem da amostra. Uma limitação encontrada no uso de limites legais estabelecidos ou de dados de monitoramento, como parâmetros de concentração da substância para cálculo da ingestão, é que os mesmos refletem aqueles encontrados nos alimentos como comercializados, não como consumidos. O processamento do alimento, como descasque, lavagem e/ou cozimento, pode alterar o nível das substâncias presente e/ou sua natureza química. O processamento normalmente leva a uma diminuição dos níveis de resíduos e contaminantes nos alimentos devido a sua degradação química, com consequente diminuição da exposição e risco. Algumas exceções incluem o processo de desidratação, quando a concentração da substância aumenta no produto final, ou quando a degradação da substância leva a um composto mais tóxico que o original (ex., formação de etilenotioreia a partir de fungicidas etilenobisditiocarbamatos).

Em estudo de dieta total (EDT), os alimentos são processados antes da análise. As frutas com casca não comestível são descascadas e somente a polpa analisada; os alimentos normalmente consumidos cozidos são preparados de acordo com procedimentos padrões antes da análise. EDTs fornecem a estimativa mais próxima dos níveis de substâncias químicas presentes nos alimentos no momento do consumo, refletindo melhor a exposição (WHO, 2005).

A metodologia utilizada na análise de resíduos e contaminantes em amostras de alimentos deve ser validada de acordo com procedimentos internacionalmente aceitos (EC, 2007; INMETRO, 2011). Dados provenientes de laboratórios que possuem o sistema de gestão da qualidade implementado (ISO/IEC 17025) possuem alta credibilidade, uma vez que os procedimentos adotados já foram avaliados por órgãos competentes. Os métodos analíticos selecionados devem ser aqueles que melhor se aplicam ao analito e aos objetivos do estudo, e nem sempre o método mais sensível é necessariamente a melhor escolha. Por exemplo, aditivos alimentares normalmente não estão presentes nos alimentos em concentrações baixas, porque nesses níveis eles não agregam nenhum benefício tecnológico. Para esses compostos, técnicas com sensibilidade moderada são suficientes para fornecer dados para a condução de estudos de avaliação da exposição. Em outros casos, métodos rápidos e robustos são necessários para responder a uma demanda emergencial que necessite ações de gerenciamento de risco rápidas. Métodos multirresíduos são normalmente necessários no caso de pesticidas, principalmente em programas de monitoramento, uma vez que o leque de substâncias que podem estar presentes nos alimentos pode ultrapassar 200 compostos (Takatori et al., 2008). Análise de contaminantes ambientais e estudos de dieta total normalmente exigem métodos analíticos com alta sensibilidade, porque os analitos podem estar presentes nos alimentos em concentrações menores que 10 µg/kg (Zhang et al., 2008).

Um aspecto importante que deve ser observado nos dados obtidos em laboratório é como lidar com amostras que não apresentaram níveis detectáveis/quantificáveis do analito, isto é, quando os resultados são reportados como menor que o LOD (Limite de detecção) ou LOQ. Essa questão tem sido largamente considerada por vários autores, sendo consenso que o procedimento de escolha deve ser conservativo o suficiente para manter a precaução em relação a substâncias tóxicas, mas também cientificamente justificável (Kroes et al., 2002; Renwick et al., 2003), a não ser que existam evidências suficientes para se ter certeza de que nenhum resíduo da substância é esperado no alimento. Um procedimento largamente aplicado é considerar que substâncias reportadas como menores que o LOQ apresentem níveis correspondentes a 0,5 x LOQ (Kroes et al., 2002; Baert et al., 2007). Outra estratégia, aplicada principalmente no caso de contaminantes, é considerar os dois limites da estimativa: o inferior como zero para

amostras não detectadas (< LOD) e o superior, com amostras nos níveis do LOD ou LOQ (IPCS, 2009). É claro que a incerteza envolvida em qualquer estratégia será maior quanto menor for a detectabilidade do método analítico utilizado.

Consumo de alimentos e peso corpóreo

Existem quatro tipos de dados que podem ser usados para acessar o consumo de alimentos de uma população: dados de suprimento de alimentos, de disponibilidade de alimento no domicílio, de consumo individual e de dieta duplicada. A escolha da fonte de dados irá depender principalmente dos objetivos do estudo, dos alimentos de interesse, da necessidade de acessar a exposição de grupos específicos da população e das fontes disponíveis. Idealmente, dados de consumo devem estar diretamente relacionados ao de peso corpóreo de um indivíduo ao qual o consumo está associado; no caso desse dado não estar disponível, o peso médio da população em estudo pode ser usado (WHO, 1997b).

Dados de suprimentos de alimentos são calculados a partir dos balancetes da produção agropecuária do país, que leva em consideração a produção anual do alimento, importações, exportações, perda no campo e uso na pecuária e indústria. O resultado reflete a média de disponibilidade do alimento não processado disponível por habitante (WHO, 2003a). As 13 dietas agrupadas (*cluster*) do GEMs/Food (*Global Environmental Monitoring System*) são atualmente utilizadas pelo JMPR e pelo JECFA para cálculo de exposição crônica a substâncias químicas no âmbito internacional. Dados de disponibilidade de alimento no domicílio são obtidos nacionalmente a partir de pesquisas nos domicílios que reportam a quantidade de cada alimento adquirida pela família durante um determinado período. Esses dados, em geral, não informam a distribuição de consumo entre os indivíduos e não consideram o consumo fora do domicílio nem a quantidade de alimento desperdiçada (Serra-Majem et al., 2003). No Brasil, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) conduz periodicamente a coleta de dados de disponibilidade de alimento por meio da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF). Nesta pesquisa, domicílios pesquisados reportam durante sete dias consecutivos a quantidade de cada alimento aportado ao domicílio, seja pela compra, doação ou produção própria (IBGE, 2012). Outros dados coletados incluem idade, sexo e peso corpóreo de cada indivíduo do domicílio. Na POF 2008-2009, a aquisição de dados de consumo individual de indivíduos com idade a partir de 10 anos, moradores de

30% dos 60.000 domicílios pesquisados também é acessada (Caldas et al., 2004). Dados da POF têm sido utilizados, entre outros, por nutricionistas para acessar a disponibilidade de nutrientes na população brasileira (Levy-Costa et al., 2005) e para avaliar a exposição a substâncias químicas na dieta (Caldas e Jardim, 2012).

Dados de consumo individual são a fonte ideal para avaliar a exposição humana a substâncias químicas na dieta, pois permitem acessar o consumo de subgrupos específicos da população e estabelecer a relação consumo/peso corpóreo para cada indivíduo. Entre as metodologias para coleta desses dados está o registro individual de consumo durante um período (normalmente entre um e sete dias), o recordatório 24 horas, onde o indivíduo reporta o tipo e quantidade de alimentos consumidos nas últimas 24 horas, e o Questionário de Frequência Alimentar (QFA) constituído de uma lista estruturada de alimentos com o objetivo de acessar sua frequência de consumo diário ou semanal (Kroes et al., 2002).

Em estudos de dieta duplicada, os indivíduos coletam uma segunda porção de todos os alimentos que consomem durante certo período (normalmente de um a sete dias), incluindo o que é consumido fora do domicílio. Os alimentos são pesados e as porções são analisadas em laboratório para as substâncias de interesse. Esses estudos, então, fornecem ao mesmo tempo dados de consumo por peso corpóreo e de concentração para uma dada população/substância. Estudos de dieta duplicadas são complexos e onerosos e seus dados são normalmente restritos a grupos específicos da população, principalmente crianças (Tomas et al., 1997; Boon et al., 2003; Velasco-Reynold et al., 2008).

Exposição cumulativa

A exposição simultânea a várias substâncias químicas na dieta (cumulativa) e suas consequências para a saúde humana, tem sido objeto de preocupação de órgãos reguladores e da população em geral. Os efeitos tóxicos de duas ou mais substâncias no organismo podem ser independentes, aditivos ou interativos (como sinergismo, potenciação ou antagonismo) (Feron e Groten, 2002). O efeito aditivo ocorre quando os compostos individuais de uma mistura possuem o mesmo mecanismo de ação tóxica (grupo de compostos com mecanismo comum - GMC), diferindo apenas da potência desse efeito (Boobis et al., 2007). Nesse caso, o efeito

final da exposição a um GMC é equivalente à soma dos efeitos de cada composto do grupo corrigido para sua potência tóxica equivalente. A exposição a um GMC é chamada de *cumulativa*.

Diferentes métodos têm sido utilizados para acessar a toxicidade final de GMCs, incluindo índices de dano, de ponto de partida, de exposição cumulativa, margem de exposição combinada e fator de equivalência tóxica. O fator de equivalência tóxica (FET) foi primeiramente proposto na década de 1980 pelo EPA (1986) e aplicado para o grupo das dioxinas e compostos similares (dibenzofuranos e bifenilas policlorados), que agem no organismo como agonistas de receptores de hidrocarboneto de arila (Safe, 1990). O FET é a razão entre o valor da potência tóxica do composto indicador e a potência tóxica do composto do GMCs. O composto indicador é escolhido com base na disponibilidade de dados de dose resposta de alta qualidade para o *endpoint* escolhido como mecanismo de ação tóxica (EPA, 2002). Nesse método, o FET de cada composto do grupo foi calculado normalizando sua toxicidade em relação ao composto indicador, a 2,3,7,8-tetraclorobenzo-p-dioxina (TCDD). O equivalente tóxico total foi definido como a soma dos produtos da concentração de cada composto do grupo numa amostra multiplicado pelo seu FET, e expresso como TCDD (Safe, 1998). Essa metodologia foi posteriormente aplicada a pesticidas, com a introdução do fator de potência tóxica (FPT), para avaliar a exposição cumulativa de crianças a inseticidas organofosforados (Milesen et al., 1998), sendo hoje empregada rotineiramente pelo EPA para avaliar a exposição cumulativa a esse GMC (EPA, 2001b). Outros autores incluíram nesse grupo os inseticidas carbamatos, também inibidores da acetilcolinesterase (Jensen et al., 2003; Caldas et al., 2006a). Mais recentemente, estudos para avaliar a exposição cumulativa a compostos do grupo dos triazóis (EFSA, 2009) e piretróides (EPA, 2011) foram publicados.

Modelos para cálculo da exposição (ingestão)

De maneira geral, dois modelos podem ser utilizados para o cálculo da exposição como descrito na Equação 2 - o modelo determinístico e o probabilístico. A escolha do modelo depende de vários fatores, incluindo o objetivo do estudo, os dados disponíveis e a exatidão exigida nos resultados.

No modelo *determinístico*, valores fixos, pontuais, de concentração e consumo são utilizados no cálculo da ingestão, como a média, mediana, 97,5

percentil ou valor máximo. As grandes vantagens desse método são a rapidez e a simplicidade dos cálculos. Por outro lado, esse modelo presume que todos os indivíduos de uma população em estudo possuem o mesmo peso corpóreo, consomem a mesma quantidade de um alimento que contém sempre a mesma concentração da substância de interesse. Apesar dos resultados obtidos no modelo determinístico serem facilmente comunicados e compreendidos pelas várias partes interessadas, os valores utilizados no cálculo são conservadores e a exposição estimada reflete uma situação irreal. Adicionalmente, eles não fornecem informação da faixa dos níveis possíveis de exposição que pode ocorrer em toda a população, limitando a identificação do cenário de exposição que pode representar um risco potencial e da exposição de grandes consumidores (Kroes et al., 2002; Petersen, 2000). Apesar das limitações, a avaliação determinística da exposição é importante para um diagnóstico inicial de uma situação de risco, indicando a necessidade de gerar dados adicionais para refinar o estudo (por exemplo, quando o mesmo é conduzido utilizando disponibilidade de alimentos no domicílio e/ou limites legais da substância no alimento) e/ou de se aplicar o modelo probabilístico.

O modelo *probabilístico* de avaliação da exposição envolve a descrição das variáveis de consumo/peso corpóreo e concentração em termos de distribuição para caracterizar sua variabilidade e/ ou incerteza (EPA, 2001b). A exposição pode ser simulada retirando valores aleatórios de cada variável na curva de distribuição utilizando modelos matemáticos adequados. Existe uma variedade de softwares disponíveis para aplicação desses modelos, que utilizam principalmente técnicas probabilísticas de Monte Carlo (Figura 10). Nos Estados Unidos os modelos DEEM/Calendex, CARES e Lifeline são utilizados pelo EPA (EPA, 2004). Na Europa, os modelos disponíveis incluem o MCRA (Holanda), CREMe (Irlanda), UniHB (Alemanha) e o CSL (Inglaterra) (Boobis et al., 2007).

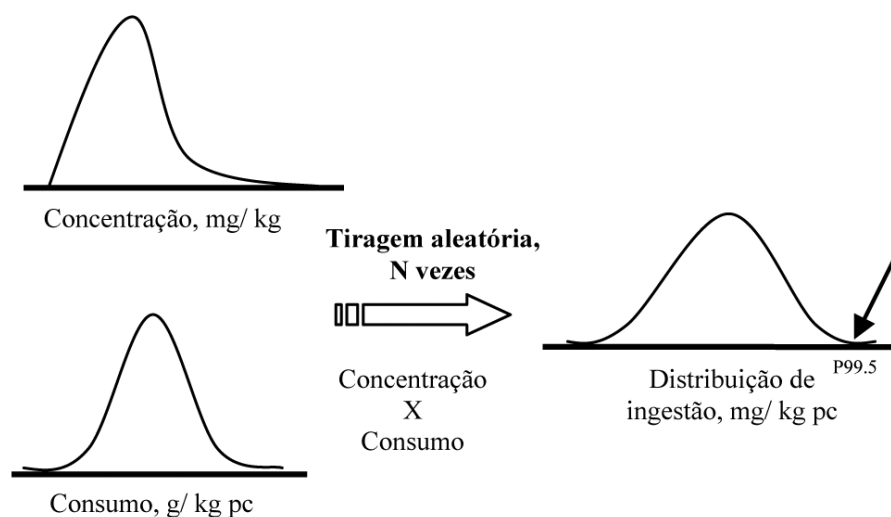


Figura 10. Modelo probabilístico para estimar a exposição humana a substâncias químicas na dieta.

Na avaliação probabilística, a curva de distribuição resultante representa um panorama de exposição mais realista, fornecendo ao gerenciador de risco maior subsídio para tomada de decisões (Finley e Paustenback, 1994). Adicionalmente, existe a possibilidade de avaliar o impacto de cada parâmetro na avaliação (análise de sensibilidade), bem como as incertezas de cada resultado. Dessa maneira, a exposição em vários percentis da curva de distribuição pode ser acessada, bem como a incerteza associada a esta estimativa (de Boer, 2011). Métodos probabilísticos, porém, só podem ser utilizados quando dados brutos de consumo/peso corpóreo e de concentração estão disponíveis, o que limita sua aplicação. O uso dessa ferramenta exige do avaliador conhecimentos de como lidar com as limitações e incertezas do modelo utilizado. O método probabilístico é o método de escolha para estimar a exposição cumulativa e agregada a resíduos e contaminantes (Boobis et al., 2007; EPA, 2001b).

A exposição crônica

A exposição crônica a substâncias químicas na dieta ocorre diariamente, por um período longo, inclusive durante toda a vida. O cálculo da Ingestão Diária, em mg/kg peso corpóreo/dia, de uma determinada substância ou GMC é feito

considerando o somatório da ingestão pelo consumo de todos os alimentos da dieta da população em estudo, de acordo com a Equação 3,

$$\text{Ingestão} = \frac{\sum(R_i \times C_i)}{\text{Peso Corpóreo}} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde R é o valor da concentração da substância ou GMC, no alimento *i*, em mg/kg e C é o consumo diário, em kg, desse alimento pela população/indivíduo em estudo (WHO, 1997c). Na metodologia determinística, normalmente se consideram valores médios desses parâmetros no cálculo, pois eles refletem melhor as variações de exposição que podem ocorrer durante um período longo.

A estimativa da ingestão crônica dependerá da disponibilidade e da qualidade dos dados envolvidos no seu cálculo; quanto mais próximos da realidade esses dados forem, mais significativo será o resultado. Por exemplo, a Ingestão Diária Teórica Máxima (IDTM) para pesticidas é estimada utilizando o limite máximo permitido pela legislação para cada composto/alimento. Em geral, essa estimativa é bastante conservadora, pois presume que todos os alimentos contêm a substância no nível do limite máximo e que o indivíduo os consome diariamente durante toda a vida. No caso de pesticidas e drogas veterinárias, presume-se ainda que não exista nenhuma degradação do composto durante o transporte, armazenamento e processamento desses alimentos.

A exposição aguda

A significância da exposição aguda a pesticidas foi reconhecida no início da década de 1990, depois de relatos de intoxicação pelo consumo de alimentos altamente contaminados devido ao uso inadequado desses produtos no campo (HMSO, 1992). Mais recentemente, foi reportada a intoxicação humana com inseticidas organofosforados e carbamatos presentes na dieta (Tsai et al., 2003; Mendes et al., 2005).

Enquanto a avaliação do risco crônico estima a ingestão média pelo consumo de alimento durante um longo período, a avaliação do risco agudo avalia a exposição pelo consumo de uma única refeição ou durante 24 horas. Nesse caso, um indivíduo pode consumir uma porção muito maior de um determinado alimento durante um dia do que a média consumida durante a vida e, adicionalmente, a porção pode conter uma determinada substância em níveis muito maiores do que os

valores médios normalmente utilizados para avaliar uma exposição crônica (WHO, 1997c; Hamilton et al., 2004). O objetivo é avaliar o risco do indivíduo de ingerir num só dia uma grande quantidade de uma substância pelo consumo de uma grande quantidade de alimento altamente contaminado. Dessa forma, os valores de consumo/peso corpóreo e concentração são representados por valores extremos, ou altos percentis (97,5 P ou maior).

Duas metodologias podem ser utilizadas nessa estimativa. A primeira utiliza a Equação 3 e o modelo probabilístico, selecionando os mais altos percentis de ingestão. A segunda metodologia, descrita para ser utilizada com o modelo determinístico, considera o consumo de cada alimento separadamente, sendo remota a possibilidade de um indivíduo consumir num mesmo dia quantidades grandes de todos os alimentos da dieta e que todos esses alimentos estejam altamente contaminados. A ingestão aguda de pesticidas pelo consumo de cada alimento é denominada IESTI (*International ou National Estimated Short-Term Intake*) e é utilizada na avaliação de risco a pesticida no âmbito internacional conduzida pelo JMPR (WHO, 2003b).

5.3 Caracterização do risco

A caracterização do risco pode ser definida como a estimativa qualitativa ou, sempre que possível, quantitativa, incluindo as incertezas esperadas, da probabilidade de ocorrência de um efeito adverso de um dado agente num dado organismo ou população sob condições definidas de exposição (IPCS, 2004).

As metodologias utilizadas para caracterizar o risco variam de acordo com as características toxicológicas da substância, isto é, se a substância necessita de um limiar de dose no organismo para exercer sua ação tóxica (substâncias não genotóxicas) ou não (substâncias carcinogênicas e genotóxicas). Para se avaliar o risco da exposição a substâncias não genotóxicas, como os pesticidas, a ingestão é comparada ao parâmetro de ingestão segura; o risco pode existir quando a ingestão calculada ultrapassa esse parâmetro (WHO, 1997c). Esse risco pode ser expresso em % do parâmetro toxicológico como, por exemplo, em porcentagem da IDA numa exposição crônica (Equação 4). Nesse caso, o risco pode existir quando a porcentagem ultrapassa 100.

$$\% \text{ IDA} = \frac{\sum \text{Ingestão}}{\text{IDA}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Para a exposição aguda aos pesticidas, a ingestão é comparada à ARfD, e a caracterização do risco pode ser feita considerando a ingestão total num alto percentil estimada com o método probabilístico (Clayton et al., 2003) ou para cada alimento separadamente, a partir do cálculo da IESTI. Nos últimos anos, vários pesticidas/alimentos avaliados pelo JMPR apresentaram a IESTI excedendo a ARfD. Nesses casos, mesmo que limites máximos de resíduos sejam estimados pelo JMPR, o Comitê de Resíduos de Pesticidas do *Codex Alimentarius* não os recomenda como LMR *Codex* (Codex, 2009).

5.4 Exposição e riscos da presença de resíduos de pesticidas na dieta brasileira

No Brasil, os primeiros estudos para avaliar a exposição da população brasileira à resíduos de pesticidas e o risco para a saúde foram conduzidos por Caldas e Souza (Caldas e Souza, 2000; Caldas e Souza, 2004). Nesses estudos, a Ingestão Diária Teórica Máxima (IDTM) foi estimada utilizando os valores de LMR estabelecidos pela legislação brasileira como parâmetro de concentração e dados de consumo de alimentos estimados da Pesquisa de Orçamento Familiar de 1995/1996 do IBGE. Estes estudos mostraram que o consumo de alimentos contendo inseticidas organofosforados e alguns fungicidas ditiocarbamatos poderiam indicar risco para a saúde do brasileiro. Frutas cítricas e tomate foram os alimentos que mais contribuíram para a ingestão. A avaliação de risco baseado na IDTM, porém, é conservadora, pois assume que todos os alimentos apresentam resíduos dos pesticidas registrados para as culturas no país e que os resíduos presentes estão sempre nos níveis do LMR. Ao mesmo tempo, a IDTM não prevê a ingestão de compostos presentes nos alimentos que não apresentem LMR, que refletem o uso ilegal do produto no campo. Posteriormente, estes estudos foram parcialmente refinados utilizando dados de resíduos obtidos para alguns compostos e culturas em 2001 e 2002 pelo PARA. O refinamento conduzido por Caldas e Sousa (2004) mostrou que a %IDA calculada foi menor que 100 para todos os compostos, com exceção do fenitrothion, para quem dados de resíduos em arroz e feijão não estavam

disponíveis. Num outro estudo conduzido com ditiocarbamatos, (Caldas et al., 2004) a maior %IDA obtida após o refinamento foi 41%, indicando que a presença dos DC nos alimentos não representa um risco para a saúde.

Caldas et al. (2011) estimaram a exposição cumulativa aos pesticidas organofosforados e ditiocarbamatos em um estudo de dieta total. No período de agosto de 2005 e março de 2007, amostras de 177 alimentos prontos para consumo foram coletas no restaurante universitário da Universidade de Brasília (RU), tanto na ala de refeições vegetarianas como não-vegetarianas. Dados de consumo dos alimentos foram estimados pela observação das porções servidas pelos usuários do restaurante durante seis dias não consecutivos. A maioria (70%) das amostras foram positivas quanto a presença de ditiocarbamatos, mas a exposição crônica aos ditiocarbamatos não representou um risco para os usuários do RU (Max de 8,9% da IDA). A exposição aos organofosforados ultrapassou a dose de referência aguda (ARfD) apenas na dieta vegetariana (116%), principalmente pelo consumo de uma porção extra de vegetais fornecida a este grupo. A exposição aguda cumulativa aos organofosforados considerou o maior valor de resíduo calculado por categoria de alimento e o valor de consumo equivalente ao 97,5 percentil da distribuição de consumo no RU. Embora a exposição aos organofosforados tenha ultrapassado modestamente a ARfD em 16%, é importante considerar as incertezas envolvidas na estimativa, tanto nos dados de consumo como nos de concentração de resíduos nos alimentos. Adicionalmente, o benefício do consumo de frutas e verduras pode ser muito maior que o risco de exposição a pesticidas (Reiss et al., 2012).

Os estudos conduzidos por Caldas e colaboradores utilizaram a metodologia determinística no cálculo da ingestão, que considera valores únicos de concentração e consumo de alimentos para todos os indivíduos da população em estudo. Esta metodologia é rápida e simples, e seus resultados são facilmente comunicados e compreendidos pelas várias partes interessadas (IPCS, 2009). Porém, esse modelo presume que todos os indivíduos possuem o mesmo peso corpóreo, consomem a mesma quantidade de um alimento que contém sempre a mesma concentração da substância de interesse. Esta estimativa não reflete uma situação real e não fornece informação da faixa dos níveis possíveis de exposição que pode ocorrer em toda a população, limitando a possibilidade de identificar qual cenário de exposição pode representar um risco potencial e, como identificar a exposição de altos consumidores (Kroes et al., 2000; IPCS, 2009).

No modelo probabilístico as variáveis de concentração de resíduos e de consumo/peso corpóreo são descritos em termos de distribuição, possibilitando caracterizar sua variabilidade e ou/incerteza (Kroes et al., 2000). A exposição pode ser simulada retirando valores aleatórios de cada variável na curva de distribuição utilizando modelos matemáticos adequados. Na avaliação probabilística, a curva de distribuição resultante representa um panorama de exposição mais realista, fornecendo ao gerenciador de risco maior subsídio para tomada de decisões (Finley & Paustenbach, 1993; IPCS, 2009). Adicionalmente, existe a possibilidade de se avaliar o impacto de cada parâmetro na avaliação (análise de sensibilidade), bem como as incertezas de cada resultado. Dessa maneira, a exposição em vários percentis da curva de distribuição pode ser acessada, bem como a incerteza associada a esta estimativa (Boer et al., 2005). Métodos probabilísticos, porém, só podem ser utilizados quando dados brutos de consumo e de concentração estão disponíveis.

Caldas e colaboradores realizaram estudos de avaliação de risco da população brasileira a pesticidas utilizando a metodologia probabilística para o cálculo da exposição (Caldas et al., 2006a,b). Dados de consumo estimados da POF 2002/2003 e dados de monitoramento de resíduos, incluindo aqueles obtidos no PARA no período 2001-2004 foram utilizados para o cálculo da ingestão. Na avaliação do risco crônico a ditiocarbamatos pelo consumo de nove frutas e legumes (maçã, morango, laranja, mamão, banana, tomate, batata, alface e cenoura), arroz e feijão, os resultados confirmaram a avaliação determinística realizada anteriormente, de que não representavam um risco para a saúde do brasileiro (Caldas et al., 2006b). No segundo estudo (Caldas et al., 2006a), foram estimados os riscos da exposição aguda cumulativa a inseticidas inibidores da AChE (organofosforados e carbamatos) pelo consumo das 9 frutas e legumes analisados no PARA. Neste estudo, a ingestão ultrapassou a dose de referência aguda (ARfD) no 99,99 percentil da curva de distribuição

A Tabela 1 ilustra os resultados obtidos nos estudos de avaliação de risco cumulativo utilizando o modelo probabilístico conduzidos no Brasil e em demais países.

Tabela 1. Avaliação de risco probabilístico aos pesticidas no Brasil e outros países (adaptado de Caldas e Jardim, 2012).

| País | Compostos | Caracterização do risco em P99.9 de exposição | | |
|------------------------------|-----------|-----------------------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| | | Crianças | População geral | Referências |
| Brasil^a | OPs e CBs | 169% ARfD ^b | 70,2%ARfD ^b | Caldas et al. (2006a) |
| | | 80,2% ARfD ^c | 33,6%ARfD ^c | |
| Dinamarca^b | OFs e CBs | 31,3% ARfD ^c | 13,8%ARfD ^c | Jensen et al. (2009) |
| | | 1,8% ARfD ^e | 0,83%ARfD ^e | |
| Holanda^d | OFs e CBs | 114% ARfD ^b | 46%ARfD ^b | Boon et al. (2008) |
| | | 16,3% ARfD ^f | 7,1%ARfD ^f | |
| EUA^d | OPs | 23% ARfD ^c | 11%ARfD ^c adultos | USEPA (2006) |
| Brasil^a | DTC | 17,2% ADI ^{g,h} | 8,8%ADI ^{g,h} | Caldas et al. (2006b) |
| Dinamarca | DTC | 1,5% ADI ^g | 0,7%ADI ^g | Jensen et al. (2008) |

a: POF (Pesquisa de Orçamentos Familiar) usada como fonte de consumo; b: acefato como composto indicador (CI); c: metamidofós como CI; d: Dados de consumo individuais; e: clorpirifós como CI; g: ADI para mancozebe; h: 30% dos resíduos de CS₂ foram considerados como propinebe.

Os estudos probabilísticos conduzidos no Brasil, porém, apresentam duas limitações importantes. Primeiramente, a exposição foi calculada baseada no consumo de um número limitado de alimentos para os quais havia dados de resíduos de pesticidas disponíveis. Adicionalmente, os dados de consumo utilizados para o cálculo da ingestão foram obtidos da POF 2002/2003, e não refletem a quantidade de alimentos consumida pelo indivíduo, mas sim a quantidade de alimento disponível no domicílio para o consumo de seus moradores (IBGE, 2011). Desta maneira torna-se necessário conduzir estudos que incluam outros alimentos importantes na dieta da população brasileira e que sejam utilizados dados de consumo individual de alimentos.

Referências

Anastassiades M, Lehotay S, Štajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for determination of pesticide residue in produce. J. AOAC Int. 2003; 86(2): 412-431.

- ANVISA, Monografia de Agrotóxicos (2012). Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>. Acessado em 04/12/2012
- Aysal P, Ambrus A, Lehotay SJ, CannaVan A. Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. *J Environ Sci Heal B*. 2007; 42: 481–490.
- Baert K, De Meulenaer B, Verdonck F, Huybrechts I, De Henauw S, Vanrolleghem PA, Debevere J, Devlieghere F. Variability and uncertainty assessment of patulin exposure for preschool children in Flanders. *Food Chem. Toxicol*. 2007; 45:1745-1751.
- Banerjee K, Oulkar DP, Dasgupta S, Patil SB, Patil SH, SaVant R, Adsule PG. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2007; 1173: 98–109.
- Bardarov V, Zaikov C. Application of high-performance liquid chromatography with spectrophotometric and electrochemical detection to the analysis of alkylenebis (dithiocarbamates) and their metabolites. *J. Chromatogr*. 1989; 479: 97-105.
- Belpoggi F, Soffritti M, Guarino M, Lambertini L, Cevolani D, Maltoni C. Results of Long-Term Experimental Studies on the Carcinogenicity of Ethylene-bis-Dithiocarbamate (Mancozeb) in Rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2002; 982: 123–136.
- Berrada H, Fernández M, Ruiz MJ, Moltó JC, Mañes J, Font G. Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months (2004/05). *Food Control*. 2010; 21: 36–44.
- Boon PE, van der Voet H, van Klaveren JD. Validation of a probabilistic model of dietary exposure to selected pesticides in Dutch infants. *Food Addit. Contam*. 2003; 20(1):S36-49.
- Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT, Vale JA. Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol Rev*. 2005; 24(2): 93-106.
- Brasil, 2002. Decreto N° 4074, de 04/01/2002. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm htm
- Caldas ED, Boon PE, Tressou J. Probabilistic assessment of the cumulative acute exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Brazilian diet. *Toxicology*. 2006a; 222: 132-142.

- Caldas ED, Conceição MH, Miranda MCC, Souza LCKR, Lima JF. Determination of Dithiocarbamate Fungicide Residues in Food by a Spectrophotometric Method Using a Vertical Disulfide Reaction System. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49; 4521-4525.
- Caldas ED, de Souza MV, Jardim, ANO. Dietary risk assessment of organophosphorus and dithiocarbamate pesticides in a total diet study at a Brazilian university restaurant. *Food Addit. Contam.* 2011; 28(1): 71–79.
- Caldas ED, Jardim AN. Exposure to toxic chemicals in the diet: is the Brazilian population at risk? *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 2012; 22(1):1-15.
- Caldas ED, Miranda MCC, Conceição MH, de Souza LCKR. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. *Food Chem. Toxicol.* 2004; 42: 1877–1883.
- Caldas ED, Miranda MCC, Conceição MH, Souza LCKR. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. *Food Chem. Toxicol.* 2004; 42: 1877-1883.
- Caldas ED, Souza LCKR. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Rev. Saúde Pública.* 2000; 34: 529-537.
- Caldas ED, Souza LCKR. Chronic dietary risk for pesticide residues in food in Brazil – an update. *Food Addit. Contam.* 2004; 21: 1057-1064.
- Caldas ED, Tressou J, Boon PE. Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticides – a probabilistic approach. *Food Chem. Toxicol.* 2006b; 44: 1562-1571.
- Codex Alimentarius Commission. Report of the Forty-First Session of the Codex Committee on Pesticide Residues. ALINORM 09/32/24. Beijing, 2009
- Codex Alimentarius Procedural Manual, 20 ed, Roma, 2011. Disponível em <http://www.codexalimentarius.org/procedures-strategies/procedural-manual/en/>. Acessado em 03/12/2012
- Crnogorac G, Schwack W. Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. *Trends Anal. Chem.* 2009; 28: 40-50.
- Crump KS. A new method for determining allowable daily intakes. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1984; 4:854.
- CVUA-Stuttgart. QuEChERS – A mini-multiresidue method for the analysis of pesticide residues in low-fat Products. 14p. Disponível em <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/reality.pdf>. Acessado em 03/12/2012

- Doerge DR, Takazawa RS. Mechanism of thyroid peroxidase inhibition by ethylenethiourea. *Chem. Res. Toxicol.* 1990; 3:98–101.
- Dybing E, O'Brien J, Renwick AG, Sanner T. Risk assessment of dietary exposures to compounds that are genotoxic and carcinogenic—an overview. *Toxicol. Lett.* 2008; 180: 110–117.
- EC (European Commission). Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Documento N° SANCO/12495/2011
- ECB (European Chemicals Bureau). Technical Guidance Document on Risk Assessment. Part III. Cap 4: Use of (Quantitative) Structure Activity Relationships ((Q)SARs). 2003 European Commission Joint Research Centre, Italy.
- Ecobichon, DJ. Toxic effects of pesticides. In: Amdur, M. O. & Klaassen C.D., editors. *Casarett and Doll's toxicology: the basis of poisons*. 6° Edição. New York: Mc Graw Hill; 2001.
- Edler L, Poirier K, Dourson M, Kleiner J, Mileson B, Nordmann H, Renwick A, Slob W, Walton K, Würtzen G. Mathematical modelling and quantitative methods. *Food Chem Toxicol.* 2002, 40:283-326.
- Eisenbrand B, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, BBlauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot J.-C, Pieters R, Kleiner J. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology.* 2002; 40: 193–236.
- EPA (Environmental Protection Agency). Choosing a percentile of acute dietary exposure as a threshold of regulatory concern. Washington, DC, 2000. Disponível em <http://www.epa.gov/oppfead1/trac/science/trac2b054.pdf>. Acessado em 03/12/2012
- EPA (Environmental Protection Agency). Ethylene Thiourea. 1992. Disponível em <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/ethyl-th.html>. Acessado em 03/12/2012
- EPA (Environmental Protection Agency). Guidelines for carcinogen risk assessment. EPA/630/P-03/001F March 2005. Disponível em http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/CANCER_GUIDELINES_FINAL_3-25-05.PDF. Acessado em 03/12/2012.
- EPA (Environmental Protection Agency). Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. EPA/630/R-98/002. Washington, DC. September 1986.

Disponível em <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=22567>.
Acessado em 03/12/2010.

EPA (Environmental Protection Agency). Organophosphate pesticides: preliminary OP cumulative risk assessment table of contents. 2001b. Disponível em <http://www.epa.gov/pesticides/cumulative/pr-a-op/index.htm>. Acessado em 03/12/2012

EPA (Environmental Protection Agency). Organophosphorus cumulative risk assessment – 2006 Update. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs July 31, 2006. Disponível em http://www.epa.gov/oppsrrd1/cumulative/2006-op/op_cra_main.pdf. Acessado em 03/12/2012.

EPA (Environmental Protection Agency). Pyrethrins/pyrethroid cumulative risk assessment. U.s. Environmental protection agency office of pesticide programs. October 4, 2011. Disponível em <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2011-0746-0003>. Acessado em 03/12/2012.

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 1995. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. 1995. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 1996. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. 1996. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012.

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2003. Dietary risk assessment for pesticide residues in food. Pesticide residues in food. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environmental and the WHO Cores Assessment

- Group on Pesticide Residues. 2003. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>.
- FAO/WHO, 2012. JMPR Reports and evaluations. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012.
- Feron VJ, Groten JP. Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food. Chem. Toxicol.* 2002; 40(6): 825-839.
- Finley B, Paustenbach D. The benefits of probabilistic exposure assessment: three case studies involving contaminated air, water, and soil. *Risk Anal.* 1994; 14: 53-73.
- Fleury FN, Nascimento CA, Faria EO, Cruvinel AR, Oliveira JM. Within-laboratory validation of a multiresidue method for the analysis of 98 pesticides in mango by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam, Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2012; 29(4): 641-56.
- Furlani RPZ, Marcilio KM, Leme FM, Tfouni SAV. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. *Food Chem.* 2011; 126(3): 1283–1287.
- Gebara AB, Ciscato CHP, Ferreira MS. Design and implementation of an effective regional monitoring program for pesticide residues in food. *International workshop on crop protection chemistry in Latin America. Costa Rica. Proceedings.* 2005. 31-35.
- Gebara AB, Ciscato CHP, Monteiro SH, Souza GS. Pesticide residues in some commodities: dietary risk for children. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2011; 86:506–510.
- Hamilton DJ, Ambrus A, Dieterle R, Felsot A, Harris C, Petersen B, Racke K, Wong S, Gonzalez R, Tanaka K, Earl M, Roberts G, Bhula R. Pesticide residues in food-acute dietary exposure. *Pest. Sci.* 2004; 60(4): 311-339.
- Herrman JL, Younes M. Background to the ADI/TDI/PTWI. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1999; 30(2 Pt 2):S109-13.
- HMSO Annual report of the working party on pesticide residues: 1992, Supplement to The Pesticides Register. London, UK, 1993.

- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo Agropecuário 2006. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf. Acessado em 03/12/2012
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa de orçamentos familiares 2008/2009, Microdados. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/microdados.shtm. Acessado em 03/12/2012
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Documento de caráter orientativo – revisão 07. 2011. Disponível em http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf. Acessado em 03/12/2012.
- IPCS (International Program on Chemical Safety). Assessing human health risks of chemicals: derivation of guidance values for health-based exposure limits. Environmental Health Criteria 170. 1994. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc170.htm>. Acessado em 03/12/2012.
- IPCS (International Program on Chemical Safety). Inventory of IPCS and other WHO pesticide evaluations and summary of toxicological evaluations performed by the Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR) through 2010. Disponível em http://www.who.int/foodsafety/chem/jmpr/publications/pesticide_inventory_report_2010.pdf. Acessado em 03/12/2012.
- IPCS (International Program on Chemical Safety). Pesticide residues in food-1993 evaluations. Part II. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmprmono/v93pr17.htm>. Acessado em 03/012/2012.
- IPCS (International Program on Chemical Safety). Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Environmental Health Criteria 240, 2009 Available from <http://www.who.int/foodsafety/chem/principles/en/index1.html>. Acessado em 02/12/2012.

- IRIS (Integrated Risk Information System). Disponível em <http://www.epa.gov/IRIS/>. Acessado em 03/12/2012.
- Jardim ANO, Caldas ED. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. *Food Control*. 2012; 25: 607-616.
- Jardim ANO, Caldas ED. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Química Nova*. 2009; 32(7): 1898-1909.
- Kroes R, Müller D, Lambe J, Löwik MRH, Van Klaverene J, Kleiner R, Massey S, Mayer I, Urieta P, Verger A, Visconti A. Assessment of intake from the diet. *Food Chem. Toxicol.*, 2002, 40, 327–385.
- Lehotay SJ, De Kok A, Hiemstra M, Van Bodegraven P. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* 2005a; 88(2): 595-614.
- Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, Hoh E, Leepipatpiboon N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*. 2010; 1217: 2548–2560.
- Lehotay SJ, Tovská KI, Lightfield AR. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.* 2005b; 88: 615-629.
- Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes NS, Monteiro CA. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003) Household food availability in Brazil: distribution and trends (1974-2003). *J. Public Health*. 2005; 39: 530-540.
- Li Z, Li Y, Liu X, Li X, Zhou L, Pan C. Multiresidue analysis of 58 pesticides in bean products by disposable pipet extraction (DPX) cleanup and gas chromatography-mass spectrometry determination. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60(19): 4788-4798.
- Liu M, Hashi Y, Song Y, Lin JM. Simultaneous determination of carbamate and organophosphorus pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2005; 1097: 183–187.
- Marrs TC. The health significance of pesticides variability in individual commodity items. *Food Addit. Contam.* 2000; 17(7): 487-89.

- Mendes CA, Mendes GE, Cipullo JP, Burdmann EA. Acute intoxication due to ingestion of vegetables contaminated with aldicarb. *Clin. Toxicol. (Philadelphia)*. 2005; 43: 117–118.
- Menezes FA, dos Santos FN, Pereira PA. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. *Talanta*. 2010; 81(1-2): 346–354.
- Mileson BE, Chambers JE, Chen WL, Dettbarn W, Ehrich M, Eldefrawi AT, Gaylor DW, Hamernik K, Hodgson E, Karczmar, AG, Padilla S, Pope CN, Richardson RJ, Saunders DR, Sheets LP, Sultatos LG, Wallace KB. Common mechanism of Toxicity: A Case Study of Organophosphorus Pesticides. *Toxicol. Sci.* 1998; 41(1): 8-20.
- Mol HGJ, Rooseboom A, Dam R, Roding M, Arondeus K, Sunarto S. Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 389(6): 1715–1754.
- Okihashi M, Kitagawa Y, Akutsu K, Obana H, Tanaka Y. Rapid method for the determination of 180 pesticide residues in foods by gas chromatography/mass spectrometry and flame photometric detection. *J. Pestic. Sci.* 2005; 30(4): 368–377.
- Petersen B J, Barraj LM. Assessing the Intake of Contaminants and Nutrients: An Overview of Methods. *Food Comp. Anal.* 1996; 9: 243-254.
- Petersen BJ. Pesticide Residues in Food: Problems and Data Needs. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2000; 31(3): 297-299.
- Pihlström T, Blomkvist G, Friman P, Pagard U, Österdahl BG. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 389: 1773–1789.
- Pizzutti IR, de Kok A, Cardoso CD, Reichert B, de Kroon M, Wind W, Righi LW, da Silva RC. A multi-residue method for pesticides analysis in green coffee beans using gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry in selective ion monitoring mode. *J. Chromatogr A.* 2012; 1251: 16-26.
- Prestes OD, Friggi AC, 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. *Quím. Nova*. 2009; 32(6): 1620-1634
- Queiroz SCN, Ferracini VL, Rosa MA. Multiresidue method validation for determination of pesticides in food using QuEChERS and UPLC-MS/MS. *Quím. Nova*. 2012; 35(1): 185-192.
- Ray DE, Fry JR. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacol Ther*. 2006; 111 (1): 174-193.
- Rebelo RM, Vasconcelos RA, Buys B, Mac CD, Rezende JÁ, Moraes, KOC, Oliveira RP. Pesticides and related commercialized in Brazil in 2009. An environmental approach. Brasilia: IBAMA; 2010. Disponível em http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/pesticidas_commercialized_in_brazil_2009.pdf. Acessado em 03/12/2012
- Reiss R, Johnston J, Tucker K, Desesso JM, Keen CL. Estimation of cancer risks and benefits associated with a potential increased consumption of fruits and vegetables. *Food Chem. Toxicol*. 2012; 50(12): 4421-4427.
- Royer A, Ménand M, Grimault A, Communal PY. Development of automated headspace gas chromatography determination of dithiocarbamates in plant matrixes. *J. Agric. Food Chem*. 2001; 49: 2152–2158.
- Safe SH. Hazard and risk assessment of chemical mixtures using the toxic equivalency factor approach. *Environ. Health Perspect*. 1998; 106(4), 1051-1058.
- Safe SH. Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs), Dibenzofurans (PCDFs), and Related Compounds: Environmental and Mechanistic Considerations Which Support the Development of Toxic Equivalency Factors (TEFs). *CRC Crit. Rev. Toxicol*. 1990; 21(1): 51-88
- Serra-Majem L, MacLean D, Ribas L, Brule D, Sekula W, Prattala R, Garcia-Closas R, Yngve A, Lalonde M, Petrasovits A. Comparative analysis of nutrition data from national, household, and individual levels: results from a WHO-CINDI collaborative project in Canada, Finland, Poland, and Spain. *J. Epidem. Comm. Health* 2003; 57: 74-80.
- Setzer Jr, R. W, Kimmel CA. Use of NOAEL, benchmark dose, and other models for human risk assessment of hormonally active substances. *Pure Appl. Chem*. 2003; 75: 2151-2158.

- Shafer TJ, Meyer DA, Crofton, KM. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113(2): 123-136.
- Silva RC, Vareli, CS, de Kok A, Pizzutti IR, Adaime MB, Zanella R. Determination of dithiocarbamate in polished rice: evaluation of different gas chromatography detection systems (gc-fpd and gc-ms) and application to samples. In: 1st Latin American Pesticide Residues Workshop (LAPRW). Santa Maria. Book of Abstracts - 1 st LAPRW. 2007
- Soderlund DM, Clark JM, Sheets PP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology.* 2002; 171: 03–59.
- Solecki R, Davies L, Dellarco V, Dewhurst I, Raaij M, Tritscher A; Guidance on setting of acute reference dose (ARfD) for pesticides. *Food Chem. Toxicol.* 2005; 43:1569-1593.
- Takatori S, Okihashi M, Okamoto Y, Kitagawa Y, Kakimoto S, Murata H, Sumimoto T, Tanaka Y. A rapid and easy multiresidue method for the determination of pesticide residues in vegetables, fruits, and cereals using liquid Chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 2008; 91: 871-883.
- Thomas KW, Sheldon LS, Pellizzari ED, Handy RW, Roberds JM, Berry MR. Testing duplicate diet sample collection methods for measuring personal dietary exposures to chemical contaminants. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 1997; 7(1):17-36.
- Tsai MJ, Wu SN, Cheng HA, Wang SH, Chiang HT. An outbreak of food-borne illness due to methomyl contamination. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2003; 41: 969–973.
- Van den Brandt P, Voorrips L, Hertz-Picciotto I, Shuker D, Boeing H, Speijers G, Guittard C, Kleiner J et al. The contribution of epidemiology. *Food Chem. Toxicol.* 2002; 40:387–424.
- Van Lishaut H, Schwack W. Selective trace determination of dithiocarbamate fungicides in fruits and Vegetables by Reversed-Phase Ion-Pair Liquid Chromatography with Ultraviolet and Electrochemical Detection. *J. AOAC Int.* 2000; 83: 720-727.
- Vareli CS, Silva RC, De Kok A, Pizzutti IR, Zanella R, Adaime MB. Analytical Method Validation for Dithiocarbamate Residues Determination in soybeans, Comparing Flame Photometric and Mass Spectrometry Detections and the Influence of

Cleanup. In: 1st Latin American Pesticide Residue Workshop (LAPRW). Santa Maria. Book of Abstracts 1st LAPRW. 2007.

Velasco-Reynold C, Navarro-Alarcon M, De La Serrana HL, Perez-Valero V, Lopez-Martinez MC. Determination of daily dietary intake of chromium by duplicate diet sampling: in vitro availability study. Food Addit. Contam. Part A. 2008; 25(5):604-10.

WHO (World Health Organization) (WHO). Framework for the provision of scientific advice on food safety and nutrition. Geneva, 2007. Disponível em <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1296e/a1296e00.pdf>. Acessado em 03/12/2012.

WHO (World Health Organization). Application of risk analysis to food standards issues. Report of a fao/who expert consultation. WHO/FNU/FOS/95.3. Geneva, 1995. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/008/ae922e/ae922e00.htm>. Acessado em 03/12/2012.

WHO (World Health Organization). Food consumption and exposure assessment of chemicals. Report of a FAO/WHO Consultation. Geneva, 1997c. Disponível em http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/exposure_feb1997/en/index.html. Acessado em 03/12/2012

WHO (World Health Organization). Guidelines for Predicting Dietary Intake of Pesticides Residues. Global Environment Monitoring System Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEM/Foods). Geneva, 1997b. Disponível em http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/pesticide_en.pdf. Acessado em 03/12/2012

WHO (World Health Organization). Regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities. Global Environment Monitoring System Food Contamination Monitoring and Assessment programme (GEMS/Food regional diets). Geneva, 2003. Disponível em http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/regional_diets/en/. Acessado em 03/12/2012

WHO (World Health Organization). Risk Management and Food Safety. FAO Food and Nutrition Paper, nº 65. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Rome, 1997a. Disponível em <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/w4982e/w4982e00.pdf>. Acessado em 03/12/2012.

WHO (World Health Organization). Total diet studies: a recipe for safer food. Global Environment Monitoring System Food Contamination Monitoring and Assessment programme (GEM/Foods). Geneva, 2005. Disponível em <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/recipe/en/index.html>.

[Acessado em 03/12/2012.](#)

Zarn JA, Brüschweiler BJ, Schlatter JR. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. Environ. Health Perspect. 2003; 111: 255-261.

Zhang J, Jiang Y, Zhou J, Fang D, Jiang J, Liu G, Zhang H, Xie J, Huang W, Zhang J, Li H, Wang Z, Pan L. Concentrations of PCDD/PCDFs and PCBs in retail foods and an assessment of dietary intake for local population of Shenzhen in China. Environ. Int. 2008; 34:799-803

II. BRAZILIAN MONITORING PROGRAMS FOR PESTICIDE RESIDUES IN FOOD – RESULTS FROM 2001 TO 2010

Andreia N.O Jardim, Eloisa D. Caldas

Laboratory of Toxicology, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

Food Control, 25: 607-616, 2012

Abstract

A total of 13,556 samples of 22 fruit and vegetable crops, rice and beans were analyzed within two Brazilian pesticide residue monitoring programs between 2001 and 2010. Pesticide residues were found in 48.3% of the samples, and 13.2% presented some irregularity, mostly non-authorized active ingredient use. Less than 3% of the samples had residue levels above the MRL. Apple, papaya, sweet pepper and strawberry were the crops with the higher percentages of positive samples (about 80%). Dithiocarbamates and organophosphorus compounds were found in 41.6% and 30.7% of the samples, respectively. Carbendazin and chlorpyrifos were the pesticides most found (26.7 and 16.1% of positive samples, respectively). Almost half of the samples analyzed had multiple residues (up to 10 residues), with multiple residues most common in samples of apple, sweet pepper and grape. About 8% of positive samples contained up to four residues of the same chemical class, mainly organophosphorus compounds (18.4 %, mostly in apple) and triazoles (16.1%, mostly in papaya and grape). In general, the scenario of pesticide residues in foods investigated within Brazilian governmental monitoring programs in the last decade is similar to what have being finding in other countries. However, the use of non-authorized active ingredient is a common practice among the farmers in the country, a problem that the government authorities have been trying to solve. A preliminary cumulative acute exposure assessment for organophosphates and carbamates in apple has shown that the intake by individuals ≥ 12 years old accounts for 96% of the acephate ARfD, indicating a need for further investigate the exposure through the consumption of other crops and group of pesticides, mainly for children.

Keywords: pesticide residues; food; Brazil;

1. Introduction

Pesticide use is the most widely adopted pest management strategy to guarantee food supplies worldwide. In Brazil, one of the world's major food producers, over 90% of farmers rely on pesticide use (IBGE, 2006), and the country has ranked first in pesticide use worldwide in recent years, with over 673 million tons applied in 2008 (ANDEF, 2009).

The basis for pesticide regulation in Brazil was set by Federal Law No. 7802, enacted in 1989, and later by Acts 4074/2002 and 5981/2006 (ANVISA, 2011a). These legal standards regulate all aspects related to pesticides, including registration, use, production, storage, transport and disposal. The pesticide registration process involves the Ministry of Health, through the National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA), which is responsible for evaluating the impact of pesticide use on human health, and for the establishment of maximum residue levels (MRL); the Ministry of the Environment, which evaluates the impact on non-human species; and the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supplies (MAPA), responsible for evaluating pesticide pest control efficacy and approving the product label. Brazilian MRLs are established based on supervised pesticide residue trials conducted throughout the country, and reflect the good agricultural practices used nationally, specified in the approved product labels. As of June 2011, 343 active ingredients had MRLs established for a variety of food commodities in the country (ANVISA, 2011b).

Two monitoring programs for pesticide residues in food of vegetal origin are currently in place in Brazil, aimed at evaluating compliance with national MRLs: the Program on Pesticide Residue Analysis in Food (PARA), coordinated by ANVISA, and the National Residue and Contaminant Control Program (PNCRC), coordinated by the MAPA. The first results of the PARA program were published by Oliva et al. (2003), and reported the residue findings from 350 samples of tomato and strawberry collected in four Brazilian states from July to December, 2001. Caldas et al. (2006a,b) summarized the PARA results for the 2001-2004 period for organophosphorus, carbamates and dithiocarbamate pesticides in nine food commodities evaluated. Additionally, Mauricio and Alvarenga (2009) described the strategies implemented by the MAPA in 2006 to increase the analytical standards of the official laboratories under the PNCRC, including the updating of instrumentation

facilities and the increase in capacity-building. The summary of the results obtained by the PARA program are periodically posted at the Agency website (ANVISA, 2001c), and those from the PNCRC were published in the official government gazette (Brazil, 2009a and 2010). These summaries are only available in Portuguese.

The objective of this paper is to present and discuss the results obtained by the PARA and the PNCRC pesticide residue monitoring programs for the period between 2001 and 2010.

2. Material and methods

2.1. The monitoring programs.

From 2001 to 2007, the scope of the PARA program was to analyze 92 active ingredients (a.i.) in 9 food crops - apple, banana, carrot, lettuce, orange, papaya, potato, strawberry and tomato (ANVISA, 2011c). This scope was expanded in 2008 (to 167 a.i., with the inclusion of pineapple, rice, onion, bean, mango, sweet pepper, cabbage and grape), and in 2009 (to 234 a.i., with the inclusion of sugar beet, collard green and cucumber). The samples analyzed under the PARA were collected at local supermarkets and food distributors by the state sanitary surveillance agencies, and covered 24 of the 26 Brazilian states, and the Federal District. The samples were sent fresh for analysis and arrived at the laboratory within 24h after collection.

The PNCRC program of vegetal origin products initiated its activities in 2006, analyzing samples of apple and papaya for export, and samples of these crops from local markets in subsequent years. Its legal basis was established in 2009 (Brazil, 2009b), when pineapple, banana, grapes, lemon, melon, mango, strawberry, tomato, lettuce, and potato were included in the program. Potato data are not included in this paper due to problems in data reporting. Under the PNCRC, samples are collected by federal agriculture inspectors at packing houses in seven Brazilian states (Espírito Santo, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Santa Catarina, Rio Grande do Sul and Paraíba) and/or at the largest national distributor of fresh food, located in the city of São Paulo (CEAGESP - *Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo*). Apple, mango, papaya and grape samples were collected from both the packing houses and CEAGESP, and the other crops only from the latter.

2.2. Analytical methods.

Five laboratories analyzed the samples collected within the PARA program, of which four are state laboratories. They were inspected and authorized by ANVISA to ensure compliance with ISO/IEC 17025 requirements; two laboratories are accredited by the competent Brazilian agency (INMETRO). Dithiocarbamates were determined as CS₂ either by spectrophotometry (LOQ of 0.08 to 0.4 mg/kg) or by gas chromatography (GC-FPD) (LOQ of 0.05 to 0.3 mg/kg). The multiresidue Mini Luke extraction method (The Netherlands, 1996) was used for the other pesticide classes, using GC-FPD, GC-ECD, GC-NPD, GC-MS/MS or LC-MS/MS. LOQs vary among laboratories, matrix and compound, being 0.01 mg/kg in most cases. The highest (0.4 mg/kg) was reported for carbendazim in apple and sweet pepper and cypermethrin in sweet pepper, and the lowest (0.005 mg/kg) for carbendazim in pineapple, sugar beet, collard green, papaya, mango, cucumber, cabbage and grape and tetraconazole in pineapple, sugar beet, mango, grape and cucumber.

Two ISO/IEC 17025 accredited laboratories analyzed the samples collected within the PNCRC program. Dithiocarbamates were determined as CS₂ by GC-FPD (LOQ of 0.01 to 0.07 mg/kg). Other pesticides were analyzed by multiresidue Mini Luke method using GC-ECD, GC-MS or LC-MS/MS. LOQ was 0.01 mg/kg in most cases, and the highest LOQ was 0.41 mg/kg for bifenthrin, captan, esfenvalerate and fenprothrin in melon, strawberry and grape.

3. Results

A total of 13,556 samples were analyzed for pesticide residues between 2001 to 2010 (Table 1), of which 12,072 were from the PARA program (July 2001 to December 2009), and 1484 from the PNCRC (January 2006 to Jul 2010). Some samples collected between 2001-2002 and 2009-2010 did not contain the sampling data, so they were grouped. Laboratories that analyzed the samples in both programs used similar analytical methods, with LOQs in the same range.

Prior to 2006, less than 50% of the samples analyzed contained pesticide residues (all samples from the PARA program), but from 2006 to 2010, the majority of the samples were positive for at least one pesticide (\geq LOQ) (Table 1). A total of 1790 samples (13%) were irregular (presence of a non-authorized a.i., or residue

levels higher than the Brazilian MRL); irregular samples represented 27.3 % of the positive samples. The periods of 2001/2002 and 2009/2010 had the higher percentages of irregular samples, representing 16.2 and 17.5 % of the samples analyzed for each period, respectively, and 2005 the lowest (5.1%). When compared with the positive samples, higher percentages of irregularities were found in 2001/2002 (32%) and 2003 (43%).

Table 1. Samples analyzed by the Brazilian monitoring programs from 2001-2010, as percent of positive and irregular samples.

| Year | Samples analyzed | Positive samples, % ^a | Irregular samples | | | | |
|--------------|------------------|----------------------------------|-------------------|----------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| | | | Total | % ^b | NA, % ^{c,d} | >MRL, % ^c | Both, % ^{c,e} |
| 2001/2002 | 1278 | 41.5 | 207 | 16.2 | 51.2 | 38.2 | 10.6 |
| 2003 | 1369 | 28.6 | 168 | 12.3 | 83.9 | 7.1 | 8.9 |
| 2004 | 1208 | 47.1 | 130 | 10.8 | 64.6 | 31.5 | 3.8 |
| 2005 | 1195 | 37.4 | 62 | 5.2 | 67.2 | 32.8 | - |
| 2006 | 1049 | 57.3 | 118 | 11.2 | 74.6 | 16.9 | 8.5 |
| 2007 | 1373 | 57.0 | 175 | 12.7 | 76.6 | 16.6 | 6.9 |
| 2008 | 2194 | 51.4 | 250 | 11.4 | 83.1 | 12.4 | 4.4 |
| 2009/2010 | 3890 | 53.9 | 680 | 17.5 | 71.8 | 19.8 | 8.4 |
| TOTAL | 13556 | 48.3 | 1790 | 13.2 | 72.1 | 20.6 | 7.4 |

^a presence of at least one pesticide residue at levels > LOQ; ^b related to the total of samples analyzed each year; ^c related to the total of irregular samples each year; ^d Non-authorized active ingredient; ^e presence of both non-authorized active ingredient and residues above the MRL.

The majority of the irregularities found for the period under study were related to the use of non-authorized a.i. (72%), mainly methamidophos (256 samples), chlorpyrifos (207 samples) and dithiocarbamates (138 samples). For 2001/2002, 2004 and 2005, over one-third of the samples had at least one residue above the MRL. The pesticides most frequently found above the MRL for the whole period were dithiocarbamates (121 samples), carbendazim (99 samples) and iprodione (39 samples). Approximately 7% of the samples presented non-authorized a.i., and also residues above the MRL.

Table 2 shows the number and the percentage of positive and irregular samples for each crop analyzed under the programs. Apple and papaya were the crops with the highest number of samples analyzed, having also the higher percentages of positive samples (about 80%), with similar percentages found also for strawberry, grape and sweet pepper. Lemon and melon were analyzed only under the PNCR program (2009/2010) (31 and 21 samples, respectively). Sweet pepper was the crop with the highest percentage of irregularity (70.7% of the samples analyzed), mainly due to non-authorized organophosphorus compound use (163 samples; Table 2), mostly methamidophos (103 samples). Strawberry represented 28.5 % of the samples with non-authorized a.i., mostly captan, prochloraz and endosulfan. Over 60% of non-authorized use in lettuce was due to dithiocarbamates (withdrawn from the label in 2005). Only 4% of potato samples analyzed were irregular, mostly due to residues above the MRL (87.8%); a profile of irregularities clearly different from the other crops. Strawberry, grape and sweet pepper presented the highest percentages of irregular samples presenting both non-authorized use and residues above the MRL (> 10%). Irregularities found in cabbage, beet, onion, lemon and melon samples were due only to non-authorized use (Table 2). In cabbage, this was mostly due to the presence of procymidone (20 samples).

Table 2. Food commodities analyzed by the Brazilian monitoring programs from 2001-2010, as percent of positive and irregular samples.

| Crop | Samples analyzed | Positive samples, % ^a | Irregular samples | | | | |
|----------------------------|------------------|----------------------------------|-------------------|----------------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| | | | Total | % ^b | NA, % ^{c,d} | > MRL, % ^c | Both, % ^{c,e} |
| Apple | 1750 | 79.9 | 107 | 6.1 | 82.2 | 16.8 | 0.9 |
| Papaya | 1545 | 82.3 | 173 | 11.2 | 46.2 | 47.4 | 6.4 |
| Potato ^f | 1222 | 25.9 | 49 | 4.0 | 12.2 | 87.8 | - |
| Orange ^f | 1219 | 28.5 | 38 | 3.1 | 86.8 | 13.2 | - |
| Tomato | 1154 | 59.8 | 158 | 13.7 | 63.9 | 27.2 | 8.9 |
| Carrot ^f | 1021 | 15.5 | 83 | 8.1 | 48.2 | 51.8 | - |
| Lettuce | 1007 | 33.9 | 210 | 20.9 | 97.1 | 1.0 | 1.9 |
| Strawberr | 992 | 76.3 | 393 | 39.6 | 73.3 | 13.5 | 13.2 |
| Banana | 911 | 11.3 | 25 | 2.7 | 52.0 | 44.0 | 4.0 |
| Beans ^f | 301 | 55.1 | 6 | 2.0 | 50.0 | 50.0 | - |
| Rice ^f | 298 | 18.5 | 15 | 5.0 | 93.3 | - | 6.7 |
| Grape | 286 | 82.2 | 98 | 34.3 | 62.2 | 21.4 | 16.3 |
| Mango | 284 | 30.6 | 9 | 3.2 | 66.7 | 33.3 | - |
| Pineapple | 270 | 41.9 | 55 | 20.4 | 49.1 | 41.8 | 9.1 |
| Cabbage ^f | 268 | 18.3 | 43 | 16.0 | 100 | - | - |
| S. pepper ^f | 266 | 82.0 | 188 | 70.7 | 86.7 | 2.7 | 10.6 |
| Onion ^f | 263 | 1.1 | 3 | 1.1 | 100 | - | - |
| Sugar | 172 | 32.0 | 37 | 21.5 | 100 | - | - |
| Cucumbe ^f | 146 | 53.4 | 43 | 29.5 | 88.4 | 7.0 | 4.7 |
| Collard ^f green | 129 | 58.1 | 52 | 40.3 | 71.2 | 19.2 | 9.6 |
| Lemon ^g | 31 | 74.2 | 3 | 9.7 | 100 | - | - |
| Melon ^g | 21 | 28.6 | 2 | 9.5 | 100 | - | - |
| TOTAL | 13556 | 48.3 | 1790 | 13.2 | 72.1 | 20.6 | 7.4 |

^a presence of at least one pesticide residue at levels > LOQ; ^b related to the total of samples analyzed each year; ^c related to the total of irregular samples each year; ^d Non-authorized active ingredient; ^e presence of both non-authorized active ingredient and residues above the MRL; ^f only PARA program; ^g only PNCRC program

Data from the PNCRC program shown in Tables 1 and 2 only concerns the period of 2006 to 2010. Table 3 shows the results of the PARA and the PNCRC for the crops analyzed during this period. In general, the PARA program had a lower frequency of positive samples and a frequency of irregular samples over two times higher than the PNCRC program (17.9 and 8.0%, respectively). The number of samples analyzed in both programs was comparable only for apple and papaya, which showed similar frequencies of positive samples during the period. However, the frequency of irregular papaya samples collected by the PARA program was over 3 times higher than that from the PNCRC program (14.4 and 3.8% of the samples analyzed, respectively). In both programs, the majority of the irregular apple samples contained non-authorized a.i. (66.7 and 71.8%), while most of the papaya irregular samples contained residues above the MRL (55.8 and 59.2%) (data not shown). The number of samples analyzed by the PNCRC program for the other crops shown in Table 3 was much smaller than those from the PARA program (less than 10%, in general), and comparisons between the two data may be misleading.

Of the samples analyzed by the PNCRC, 934 samples (62.9%) were collected at packing houses (mostly commodities for export), and 550 samples at CEAGESP (for domestic consumption, including 8 samples of imported apples). The percentage of positive samples collected at CEAGESP (75.3%) was lower than that collected at packing houses (89%). However, only 2.9% of the packing house samples were irregular (2% non-authorized use), while 10.6% of the CEAGESP samples were in this situation (6.3% non-authorized) (data not shown).

Table 3. Results obtained by the PARA and PNCRC monitoring programs from 2006-2010.

| Crop | PARA 2006-2009 | | | PNCRC 2006-Jul 2010 | | |
|--------------|------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | Samples analyzed | Positive samples, % ^a | Irregular samples, % ^b | Samples analyzed | Positive samples, % ^a | Irregular samples, % ^b |
| Apple | 560 | 84.1 | 2.7 | 690 | 87.8 | 5.7 |
| Tomato | 520 | 67.5 | 14.4 | 26 | 76.9 | 3.8 |
| Strawberry | 515 | 84.9 | 35.1 | 42 | 64.3 | 19.0 |
| Lettuce | 501 | 31.1 | 29.3 | 32 | 53.1 | 25.0 |
| Banana | 406 | 10.1 | 2.2 | 29 | 51.7 | 0.0 |
| Papaya | 396 | 89.4 | 19.4 | 540 | 92.0 | 9.1 |
| Grape | 266 | 84.2 | 36.8 | 20 | 55.0 | 0.0 |
| Pineapple | 240 | 43.3 | 20.4 | 30 | 30.0 | 20.0 |
| Mango | 261 | 27.6 | 2.3 | 23 | 65.2 | 13.0 |
| TOTAL | 3665 | 60.3 | 17.9 | 1432 | 85.0 | 8.0 |

^a presence of at least one pesticide residue at levels > LOQ; Non-authorized active ingredient; ^b presence of non-authorized active ingredient and/or residues above the MRL

Fig. 1 shows the percentage of residues that exceeded the national MRLs, considering all the positive samples. In about 25 % of the cases, residues were up to 50% higher than the MRL, and in the majority of cases (65%), reached up to 2.5 times the MRL. The three highest residues above the MRL were triazophos in tomato (2075% MRL of 0.04 mg/kg), propiconazole in rice (3340% of MRL of 0.1 mg/kg), and chlorpyrifos in potato (3400% MRL of 0.01 mg/kg).

Most of the residues (51.3%) found in the positive samples analyzed were in the range of 0.01 to < 0.1 mg/kg, and 5.8% had levels between 1 and 10 mg/kg. Fig. 2 shows the residue levels found in the samples of the 11 crops with the highest percentage of positive residues (higher than 50% of the samples analyzed). The majority of the positive samples of cucumber and beans had residue levels < 0.05 mg/kg. Over 40% of the sweet pepper and strawberry samples had residues in the range of 0.1 to <0.5 mg/kg, and about ¼ of the strawberry samples had residues above 0.5 mg/kg. Lettuce (33.9% of positive samples) presented the highest percentage of positive residues within the highest concentration range (1 - < 10

mg/kg) (27.5 %; 122 residues) (not shown), of which over 70% were dithiocarbamates. One lettuce, one pineapple and 5 strawberries samples presented residues above 10 mg/kg, with the highest levels found in strawberry (14.7, 15.3 and 25.1 mg/kg of iprodione).

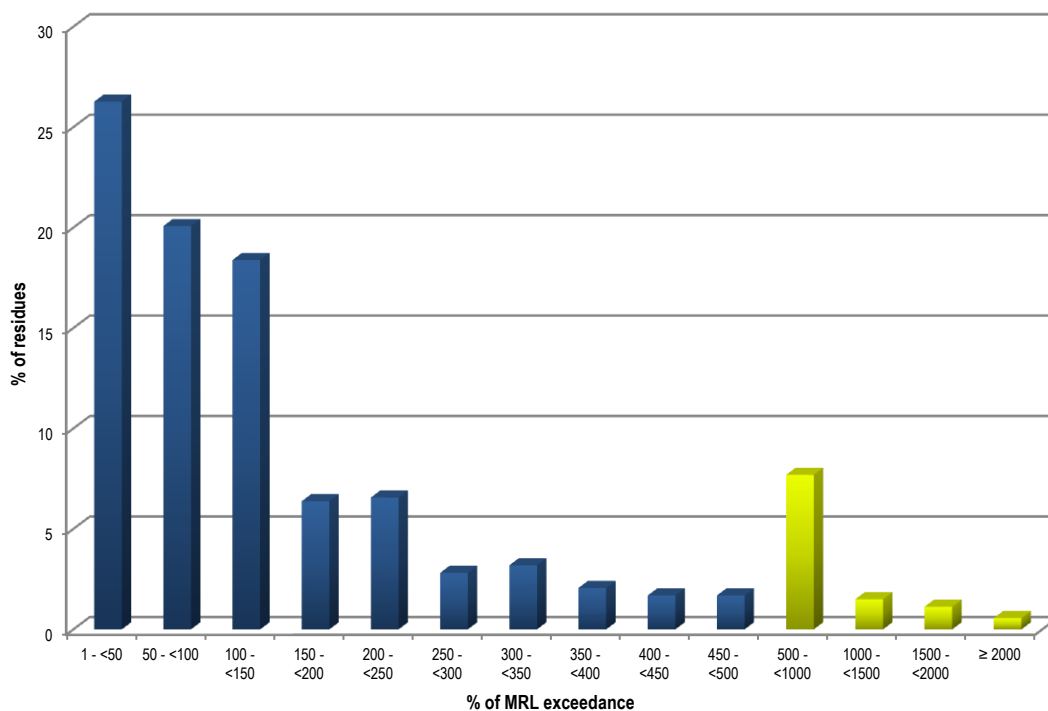


Fig 1. Percentage by which the MRLs is exceeded in the samples analyzed of the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010. Dithiocarbamates had its MRL established as CS₂ only as of 2003.

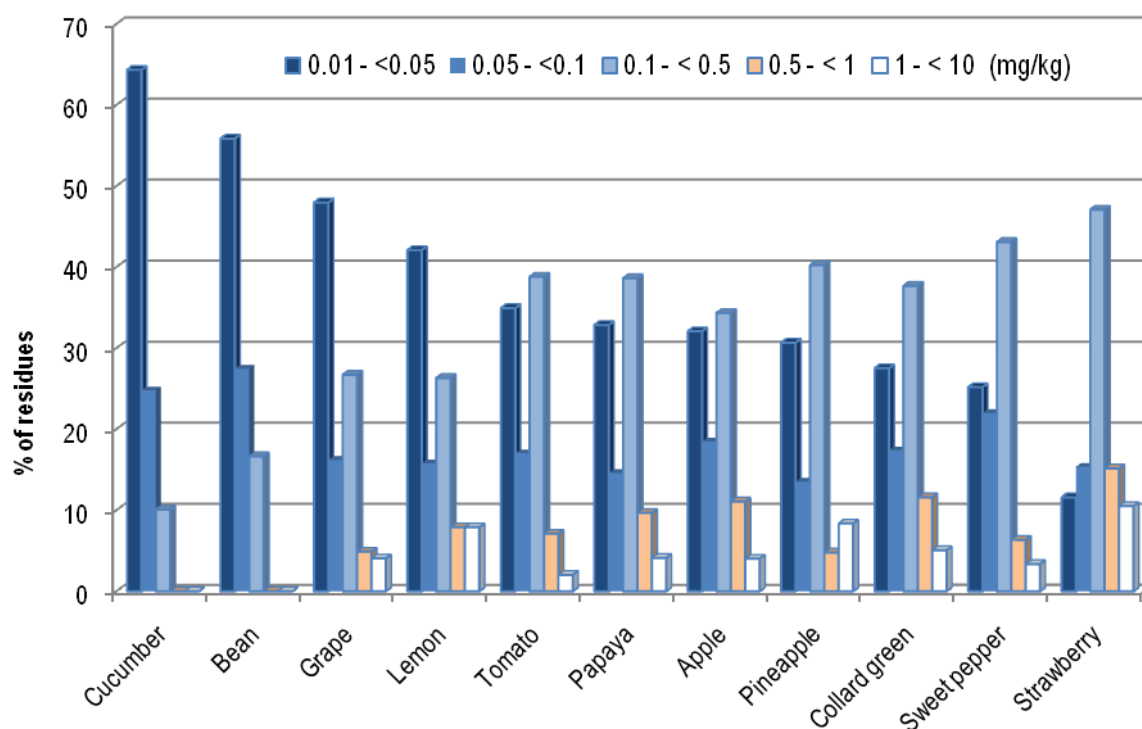


Fig. 2. Levels of pesticides found in the 11 highest positive crops samples analyzed by the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010

Fig. 3 shows the crops presenting multiple residues (up to 7 different a.i.), which represent 47.8% of the positive samples. Sweet pepper was the crop with highest number of samples with multiple residues (73.9% of positive sweet pepper samples), followed by strawberry (71.6%) and grape (70.2%). With exception of grape, all the crop samples shown in Fig. 3 had mainly two residues. Eight grape samples had 8 residues, one had 9 residues and 2 had 10 different residues; one strawberry sample also had 8 different residues (data not shown).

Table 4 shows the five main pesticides classes found in each commodity, and Fig. 4 the main compounds found in all samples analyzed. Dithiocarbamates were the pesticides most frequently detected (41.6%, 2723 samples), mainly in lettuce, apple and tomato samples (Table 4). Carbendazim, a benzimidazole fungicide, was the single compound most frequently detected (26.7% of the samples) (Fig. 4).

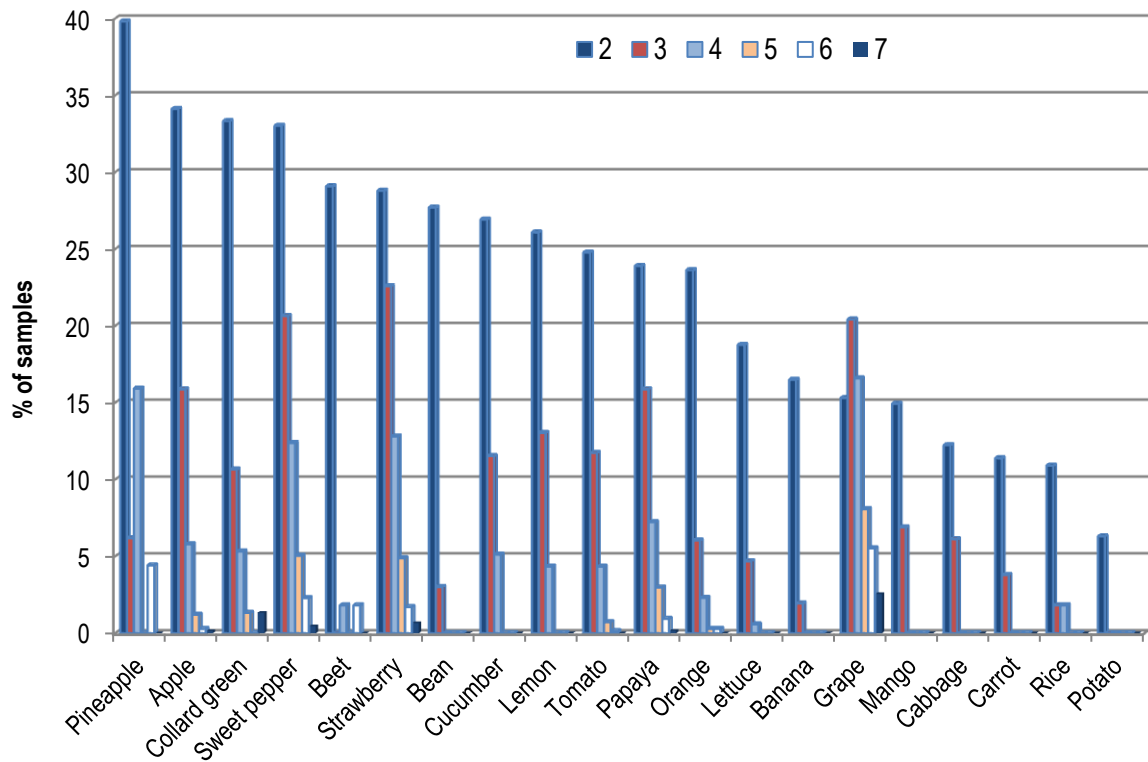


Fig. 3. Crops with multiple pesticide residues in the samples analyzed by the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010, s % of positive samples

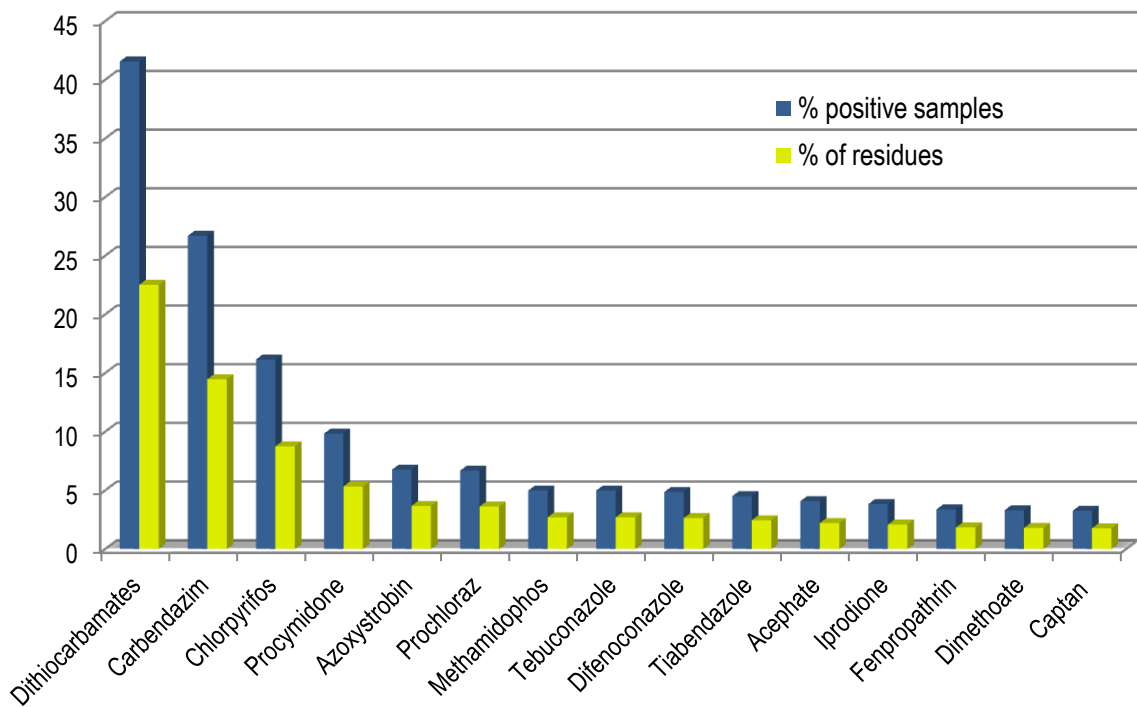


Fig. 4. The 15 pesticides most frequently detected in the samples analyzed by the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010

All crops had at least one sample with one organophosphorus insecticide, a class of compounds found in 2017 samples, about one third of all positive samples (Table 4). Over 90% of the positive potato samples contained at least one organophosphorus compound, and the three positive onion samples analyzed contained only organophosphorus compounds (non-authorized use in all cases). The four organophosphorus compounds most frequently found in the samples analyzed were chlorpyrifos, methamidophos, acephate and dimethoate (Fig. 4), representing 15.4% of the residues.

Triazoles were present mostly in beet, grape and rice (over 40% of the positive samples; Table 4), with tebuconazole and difenoconazole the most frequent compounds found within this class (Fig. 4). Pyrethroids, mainly fenpropathrin (Fig. 4), were found in about 40 % of positive collard green and sweet pepper samples (Table 4). Compounds from the carbamate class were found in 2.4 % of the samples analyzed, being present in 10.7% of the banana samples (Table 4). Carbaryl was the carbamate most found (115 samples; 1.8% of positive samples), mainly in apples (89 samples).

Table 5 shows the crops with samples containing up to four residues of the same chemical classes. Multiple residues of organophosphorus compounds were found in 18.6% of the samples positive for these compounds, followed by triazoles (16.1%). Apple was the crop with the highest number of samples in this situation (154; 11% of the positive apple samples), followed by tomato and sweet pepper, with 87 and 78 samples, respectively. Papaya and grape were the main crops with samples with multiple residues from the triazole class (37 and 35 samples, respectively). Sixty four samples had residues of organophosphorus compounds *plus* carbamates, compounds known to be inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), mostly apple. No samples of potato, banana, mango, onion, cucumber, lemon and melon contained multiple residues of the same class.

Table 4. Classes of pesticides most found in the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010, as % of positive samples.

| Crop | DT | OP | TRI | PY | CB |
|---------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Lettuce | 71.3 | 18.5 | 3.5 | 7.6 | 2.3 |
| Apple | 67.7 | 51.7 | 4.0 | 0.7 | 6.7 |
| Tomato | 56.4 | 39.9 | 8.7 | 13.2 | 1.0 |
| Collard green | 46.7 | 21.3 | 5.3 | 40.0 | 0 |
| Banana | 45.6 | 6.8 | 3.9 | 3.9 | 10.7 |
| Papaya | 45.5 | 3.7 | 19.3 | 2.4 | 0 |
| Carrot | 36.1 | 23.4 | 24.1 | 0 | 0 |
| Grape | 29.8 | 11.1 | 44.7 | 23.4 | 0.4 |
| Cucumber | 29.5 | 16.7 | 6.4 | 17.9 | 2.6 |
| Sweet pepper | 26.1 | 67.4 | 5.0 | 40.4 | 5.0 |
| Strawberry | 25.2 | 15.1 | 5.9 | 18.4 | 1.1 |
| Orange | 14.4 | 56.5 | 0 | 5.2 | 0.9 |
| Pineapple | 11.5 | 3.5 | 6.2 | 19.5 | 0 |
| Beet | 10.9 | 14.5 | 41.8 | 12.7 | 0 |
| Rice | 3.6 | 43.6 | 47.3 | 3.6 | 3.6 |
| Potato | 2.8 | 92.4 | 0 | 0 | 1.6 |
| Beans | 2.4 | 2.4 | 6.6 | 0.6 | 0 |
| Mango | 2.3 | 2.3 | 4.6 | 3.4 | 0 |
| Cabbage | 0 | 20.4 | 14.3 | 2.0 | 6.1 |
| Lemon | 0 | 17.4 | 8.7 | 8.7 | 4.3 |
| Melon | 0 | 16.7 | 0 | 16.7 | 0 |
| Onion | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 41.6 | 30.8 | 10.2 | 8.3 | 2.4 |

DT= dithiocarbamate; OP= organophosphorus; TRI=triazoles; PY=pyrethroids; CB= carbamates

Table 5. Samples with multiple residues from the same class found in the Brazilian monitoring programs from 2001 – 2010.

| Pesticide class | Number of samples ^a | Number of multiple residues, crop (number of samples) | | |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| | | 2 | 3 | 4 |
| OP | 375 (18.6%) | apple (131); tomato (59); sweet pepper (58); orange (28); strawberry (16); potato (10); papaya (6); lettuce (4); cabbage (4); carrot (4); pineapple (2); collard green (2); grape (1); bean (1) | apple (17); sweet pepper (15); tomato (7); orange (3); carrot (1) | sweet pepper (5); tomato (1) |
| TRI | 107 (16.1%) | papaya (36); grape (34); pineapple (6); strawberry (6); tomato (6); apple (4); rice (3); beet (2); carrot (2); | beet (1); grape (5); papaya (1) | grape (1) |
| PY | 48 (8.8%) | pineapple (14); tomato (14); sweet pepper (13); strawberry (3); collard green; (2); apple (1) | collard green (1) | 0 |
| CB | 4 (2.6%) | tomato (2) ; lettuce (1); apple (1) | 0 | 0 |
| OP + CB ^{b,c} | 64 | apple (29); strawberry (2); sweet pepper (2); tomato (2); lettuce (1); rice (1); cucumber (1); cabbage (1) | apple (9); sweet pepper (4); strawberry (1) | sweet pepper (1) |

OP= organophosphorus compounds; TRI= triazoles; PY= pyrethroids; CB= Carbamates; ^a % related to the number of positive samples within the class; ^bThe positive samples for OP and CB contained only one CB residue; ^c One sweet pepper sample presented 4 OP residues and 1 CB;

4. Discussion

The Brazilian monitoring program data evaluated in this study show that 48.3% of the 13,556 samples analyzed from 2001 to 2010 were positive for at least one pesticide residue. Apple, papaya, grape and sweet pepper were the crops with the highest percentage of positive samples (around 80%). Irregularities found in 13% of the samples were mostly due to the presence of non-authorized a.i., and 2.7% of the samples analyzed had residue levels above the Brazilian MRL. Samples collected at farm packing houses within the PNCRC program were more likely to contain residues than those from food distributors, as expected, due to the degradation of residues that occurs between harvesting and sales. Packing house samples also had fewer irregularities, probably because most of the crops in these facilities are destined for export, and are likely to be subject to restricted pesticide use.

The high prevalence of non-authorized pesticide use in Brazil found in this study is in part due to the profile of the country's agricultural population and to the minimal phytosanitary support given to certain crops. Most Brazilian food growers have low levels of education (over 40% are illiterate) and receive limited technical support (IBGE, 2006), do not read the pesticide labels or do not understand their content, and are economically vulnerable (Recena et al., 2006 Waishman et al., 2007; Recena and Caldas, 2008). In many cases, their decisions regarding which pesticides to use rely strongly on their previous experience, on costs, and on product availability on the farm (Recena and Caldas, 2008). For instance, over 100 a.i. are registered for use on tomato (8.7% of samples with non-authorized a.i.), including ten organophosphorus compounds and four dithiocarbamates (MAPA, 2011), which are the pesticides most found in the samples with irregularities. On the other hand, between 20 and 30 pesticides are registered for sweet pepper, collard green and lettuce (61, 28.7 and 20% of the samples analyzed with non-authorized a.i., respectively). It is likely that a farmer will use a pesticide registered for tomato in other crops also grown on the property, regardless of its registration status. In order to minimize non-authorized pesticide use on minor crops, the Brazilian Government has accepted, as of January 2010, the extension of the MRL to all crops within a group based on supervised residues analyses conducted only on representative

crops for that group (INC ANVISA/IBAMA/MAPA 01/2010). For example, a MRL set for tomato could be extended to sweet pepper.

The results found in this study are within the range of those found for pesticide monitoring programs conducted elsewhere. The 2008 European Union (EU) program (78 active ingredients in 11,610 samples of nine crops from 29 countries) showed 35.9% of positive samples, and 2.2% of the samples exceeding the MRL (EFSA, 2010). In the Netherlands, 5.9% of the 4344 samples analyzed, mostly fruit and vegetables, had residues above the MRL (VWA, 2008). In Belgium, 65.7% of the 1413 fruit and vegetable samples were positive, and 6.1% had residues above the MRL. In Poland, 2.2% of the 5340 samples analyzed in 2004-2007 had residues exceeding the MRL (Góralczyk et al., 2009). Results from the 2000-2008 Italian program showed 3.2% of the 6947 samples with residues above the MRL (Zicari et al., 2011). Pesticide analysis of 724 fruit and vegetables samples imported from South America to Denmark, Estonia, Finland, Norway and Sweden showed over 70% of positive samples, and 8.4% with residues above the MRL (Hjorth et al., 2011). About one third of these samples were from crops imported from Brazil, 9.2% of them having residues above the MRL. In the 2008 USFDA Program, 42.2% of the 3656 fruit and vegetable samples were positive and 3.5% were irregular, mostly for the presence of non-authorized a.i. in imported commodities (USFDA, 2008). In Australia, 98.9% of the 974 samples of five horticulture crops analyzed in 2009/2010 were in compliance with the relevant standards (DAFF, 2011).

Dithiocarbamates (MRLs from 0.1 to 3 mg/kg CS₂) was the pesticide class most found in the Brazilian monitoring programs (41.6% of positive samples). This incidence is much higher than that found in Canada (32.3%; Ripley et al., 2000) and the EU (7.6%; EFSA, 2011). Currently, five dithiocarbamate compounds are registered in the country. Mancozeb is the most used (about 3000 tons a.i. in 2009; Rebelo et al., 2009), registered for 33 food crops (ANVISA, 2001), being probably the main source of CS₂ detected in the samples. Metiram, the second most used (about 1000 tons in 2009, Rebelo et al., 2009), and propineb are registered for 12 and 8 food crops, respectively. Metam sodium and tiram are used only in soil and/or seed treatment, modes of application that, in most cases, do not lead to residues in food.

About 30% of the positive samples contained organophosphorus compounds, a higher percentage in comparison with the 2003-2005 Dutch program on 11,873 fruit and vegetable samples (15%, Boon et al., 2008). Chlorpyrifos was the second single

compound most frequently detected in the Brazilian programs (7.8% of the samples), and the main organophosphorus compound detected. Chlorpyrifos was also the main organophosphorus compound detected in the 2004–2007 Danish monitoring (7.4% the samples; Jensen et al., 2009), and was found in 8.6 % of the samples in Europe (EFSA, 2011), 16.9% of samples of food imported to Europe (Hjorth et al., 2011), and in 42.7% of the 1150 peach samples analyzed in 2002-2007 in Greece (Danis et al., 2011). Organophosphorous compounds are among the most acute toxic pesticides on the market worldwide, and their registration is being phased out or has been canceled in many countries, including Brazil. The use of methamidophos, the second most found organophosphorus compound in this study and the most used in the country in 2009 (5000 tons a.i.; Rebelo et al., 2009), was prohibited in the country in July 2012 (RDC 1/2011; ANVISA, 2011a).

Among the triazole pesticides, tebuconazole and difeconazole were the main compounds found in the Brazilian monitoring programs. In Belgium, difenoconazole was the fifth pesticide most frequently found (Belgium, 2008), and tebuconazole and/or myclobutanil were the main triazoles detected in the European program (EFSA, 2011), in Canada (Ripley et al., 2000) and in Greek peaches (Danis et al., 2011). Fenpropatrin was the main pyrethroid compound found in the Brazilian monitoring program (3.4% of positive samples). In Egypt (Dogheim et al., 2002), Denmark (Poulsen & Andersen, 2003), and Canada (Ripley et al., 2000), cypermethrin was the main pyrethroid found in the food samples analyzed. Although detected in less than 3% of the positive samples in Brazil, cypermethrin was the second a.i. most used in the country in 2009 (over 50.000 tons), following glyphosate (Rebelo et al., 2009).

Almost half of the positive samples (47.8%) had multiple residues, with grape being the crop with the highest number of residues in a single sample (of up to 10). Grape samples were also found to have over seven different pesticide residues in Egypt (Dogheim et al 2002), Europe (Hjorth et al 2011), and Canada (Ripley et al., 2000). In the EU Program, a single table grape sample had 26 pesticides (EFSA, 2011). Over 8% of the positive samples had at least two residues from the same chemical class, mainly from the organophosphorus and triazole classes. About 19% of the samples containing organophosphorus compounds had at least two residues of this class, a lower percentage than what was found in the Netherlands (22.2%) (Boon et al., 2008). Multiple residues are expected in some crops since the

application must alternate among pesticide classes to prevent pest resistance. However, the presence of multiple residues may also suggest that principles of good agriculture practice are not being respected (EFSA, 2011).

The use of pesticides is necessary for pest management and the presence of their residues in food is unavoidable. However, these compounds are toxic to humans at certain levels and their presence in the diet may be a health concern to humans (USEPA, 2001, Mendes et al. 2005, Menegola et al., 2006, Bjørling-Poulsen et al 2008, CODEX, 2009, Breckenridge et al 2009). In addition to providing data to assess whether the product is being applied to the crop according to the instructions on the approved labels (compliance with MRL), pesticide residue monitoring program data can also be used to assess the human health risk from exposure to pesticide through the diet (Caldas and Souza, 2004; Jensen et al., 2009; Katz and Winter, 2009; Claeys et al., 2011). Furthermore, the cumulative exposure to multiple residues with the same mechanism of action (organophosphate and carbamates, AChE inhibitors, and triazoles, sterol 14-demethylase inhibitors) can lead to unsafe intake of these compounds in the diet (USEPA, 2001; Caldas et al., 2006ab; EFSA, 2009).

We conducted a preliminary cumulative acute exposure assessment for the AChE inhibitors in apple, the commodity with the highest number of samples analyzed by the monitoring programs, one of the crops with the highest frequencies of positive samples and the one with the highest number of samples with multiple organophosphate and organophosphate plus carbamates residues. In this estimation, we calculated the equivalent residue levels in a sample, expressed as the index compound (acephate), by multiplying the level of the AChE inhibitor compound detected by its relative potency factor (RPF) calculated by Caldas et al. (2005b) and Boon et al. (2008, for fention only). The cumulative acute exposure was estimated using the FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Residues methodology for estimating the short-term intake of pesticides at international level (FAO, 2004). The highest equivalent residue found in apple in the monitoring programs during the period of 2005-2010 was used as the HR (0.387 mg/kg, as acephate). The large portion (600 g; 97.5 P of apple consumers, mean body weight of 70 kg) was estimated from a dietary survey for individuals 12 years or older conducted by IBGE in 2008/2009 (46482 responders on two non-consecutive days, 3235 apple consumers; data not published). The calculated cumulative acute intake of AChE inhibitors by individuals \geq 12 years was 50 μ g/kg bw, representing 100% of the acephate ARfD (50 μ g/kg bw;

FAO, 2002). This result indicates the need for expanding the assessment to other crops and pesticide classes, and to assess the exposure by children. Dietary risk assessments have been conducted previously in our laboratory on cumulative acute exposure to AChE inhibitors, and on chronic exposure to dithiocarbamates (Caldas and Souza, 2004, Caldas et al., 2006ab). The latest data (2005-2010) from the Brazilian monitoring programs will be used to update the previous assessments, and also to estimate the cumulative exposure to the triazole fungicides, which were found as multiple residues in 16.1% of the samples containing these compounds.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Toxicology Division of the Brazilian Health Inspectorate (ANVISA) and the Coordination for Control of Residues and Contaminants of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supplies (MAPA) for providing the raw residue data on the PARA and PNCRC programs, respectively. We also thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for supporting A. N. O. Jardim with a PhD scholarship

References

- AFSCA. (2008). Pesticide residue monitoring program in food of plant origin. Results of the official controls in accordance to regulation (CE) No 396/2005 and commission recommendation 2008/103/EC. Belgium: Federal Agency for the Safety of the Food Chain. Available from http://www.favv.be/publications-en/_documents/2008_Belgium-summary.pdf.
- ANDEF. (May 2009). (Associação Nacional de Defesa Vegetal). Tecnologia em primeiro lugar. Defesa Vegetal.
- ANVISA (Brazilian Sanitary Surveillance Agency). (2011a). Agrotóxicos e Toxicologia. Legislação. Available from <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia/>.
- ANVISA (Brazilian Sanitary Surveillance Agency). (2011b). Agrotóxicos e Toxicologia. Monografia de Agrotóxicos. Available from <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia/>.

- ANVISA (Brazilian Sanitary Surveillance Agency). (2011c). Agrotóxicos e Toxicologia. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Available from <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia/>.
- Bjørning-Poulsen, M., Andersen, H. R., & Grandjean, P. (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environmental Health*, 7, 1-22.
- Boon, P. E., Van der Voet, H., Van Raaij, M. T., & Van Klaveren, J. D. (2008). Cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Dutch diet. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3090-3098.
- Brasil. (11 de novembro de 2009a). Diário Oficial da União. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa No 35, de 10 de outubro de 2009. No. 215. Seção 1.
- Brasil. (05 de janeiro de 2009b). Diário Oficial da União. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa, N0 42, de 31 de dezembro de 2008. N_ 2. Seção 1, p 2.
- Brasil. (10 de setembro de 2010). Diário Oficial da União. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa No 22, de 8 de setembro de 2010. N_ 174. Seção 1.
- Breckenridge, C. B., Holden, L., Sturgess, N., Weiner, M., Sheets, L., Sargent, D., et al. (2009). Evidence for a separate mechanism of toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology*, 30, S17-S31.
- Caldas, E. D., & Souza, L. C. K. R. (2004). Chronic dietary risk for pesticide residues in food in Brazilian update. *Food Additives & Contaminants*, 21, 1057-1064.
- Caldas, E. D., Tressou, J., & Boon, P. (2006). Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticides e a probabilistic approach. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1562-1571.
- Caldas, E. D., Boon, P. E., & Tressou, J. (2006). Probabilistic assessment of the cumulative acute exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Brazilian diet. *Toxicology*, 222, 132-142.
- Claeys, W. L., Schmit, J. F., Bragard, C., Maghuin-Rogister, G., Pussemier, L., & Schiffers, B. (2011). Exposure of several Belgian consumer groups to pesticide residues through fresh fruit and vegetable consumption. *Food Control*, 22, 508-516.

- CODEX (Codex Alimentarius). (20 e 25 April 2009). Report of the forty-first session of the codex committee on pesticide residues. Beijing, China. Available at <http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?year¼09>.
- DAFF (The Australian Department of Agriculture, Fisheries and Forest). (2011). Australia national residue survey. Annual report 2009e2010. Available from http://www.daff.gov.au/__data/assets/pdf_file/0008/1865015/nrs-annualreport-09-10.pdf.
- Danis, T. G., Karagiozoglou, D. T., Tsakiris, I. N., Alegakis, A. K., & Tsatsakis, A. M. (2011). Evaluation of pesticides residues in Greek peaches during 2002e2007 after the implementation of integrated crop management. *Food Chemistry*, 126, 97-103.
- Dogheim, S. M., El-Marsafy, A. M., Salama, E. Y., Gadalla, S. A., & Nabil, Y. M. (2002). Monitoring of pesticide residues in Egyptian fruits and vegetables during 1997. *Food Additives & Contaminants*, 19, 1015-1027.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2010). Annual report on pesticide residues. *EFSA Journal*, 8(6), 1646.
- FAO (Food and Agricultural Organization). (2002). Acephate. Pesticide residues in food e 2002. Report of the joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO expert group on pesticide residues. 16 e 25 September 2002 Available at. Rome, Italy: FAO Plant Production and Protection Paper Food and Agriculture Organization. Available at <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>.
- FAO (Food and Agricultural Organization). (2003). Dietary risk assessment for pesticide residues in food. Pesticide residues in food 2003. Report of the Joint Meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environmental and the WHO expert group on pesticide residues. 15-24 September 2003. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations. Available at <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>.
- Góralczyk, K., Struci_nski, P., Korcz, W., Czaja, K., Hernik, A., Snopczy_nski, T., et al.(2009). The survey of pesticide residues in food of plant origin in Poland, 2004-2007. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 60, 113-119.

- Hjorth, K., Johansen, K., Holen, B., Andersson, A., Christensen, H. B., Siivinen, K., et al. (2011). Pesticide residues in fruits and vegetables from South America -a Nordic project. *Food Control*, 22, 1701-1706.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2006). Censo Agropecuário 2006. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro.
- Jensen, B. H., Petersen, A., & Christensen, T. (2009). Probabilistic assessment of the cumulative dietary acute exposure of the population of Denmark to organophosphorus and carbamate pesticides. *Food Additives & Contaminants Part A*, 26, 1038-1048.
- Katz, M., & Winter, C. K. (2009). Comparison of pesticide exposure from consumption of domestic and imported fruits and vegetables. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 335-338.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). (2011). Agrofit. Sistema de Agrotóxicos Fitosanitários. Available at http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
- Mauricio, A. Q., Lins, E. S., & Alvarenga, M. B. (2009). A national residue control plan from the analytical perspective the Brazilian case. *Analytica Chimica Acta*, 637, 333-336.
- Mendes, C. A., Mendes, G. E., Cipullo, J. P., & Burdmann, E. A. (2005). Acute intoxication due to ingestion of vegetables contaminated with aldicarb. *Clinical Toxicology (Phila)*, 43, 117-118.
- Menegola, E., Broccia, M. L., Di Renzo, F., & Giavini, E. (2006). Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects. *Reproductive Toxicology*, 22, 186-195.
- Oliva, R., Gemal, A. L., Nóbrega, A. W., & Araújo, A. C. (2003). Pesticide monitoring programme of the Ministry of health of Brazil. *Food Additives & Contaminants*, 20, 758-763.
- Poulsen, M. E., & Andersen, J. H. (2003). Results from the monitoring of pesticide residues in fruit and vegetables on the Danish market, 2000e01. *Food Additives & Contaminants*, 20, 742-757.
- Rebelo, R. M., Vasconcelos, R. A., Buys, B., MacC, D., Rezende, J. A., Moraes, K. O. C., et al. (2010). Pesticides and related commercialized in Brazil in 2009. An environmental approach. Brasília: IBAMA.

- Recena, M. C. P., & Caldas, E. D. (2008). Risk perception, attitudes and practices on pesticide use among farmers of a city in Midwestern Brazil. *Journal of Public Health*, 42, 294-301.
- Recena, M. C. P., Caldas, E. D., Pires, D. X., & Pontes, E. R. J. C. (2006). Pesticides exposure in Culturama, Brazileknowledge, attitudes, and practices. *Environmental Research*, 102, 230-236.
- Ripley, B. D., Lissemore, L. I., Leishman, P. D., Denommé, M. A., & Ritter, L. (2000). Pesticide residue on fruits and vegetables from Ontario, Canadá, 1991-1995. *J AOAC Int*, 83, 196-213.
- The Netherlands. (1996). Analytical methods for pesticides in foodstuffs. General Inspectorate for health Protection, Duty Ministry of public health, welfare and sports (6th ed).
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2001). The grouping of a series of dithiocarbamate pesticides based on a common mechanism of toxicity. Washington, DC: Health Effects Division, Office of Pesticide Programs. August 17, 2001.
- USFDA (U. S. Food and Drug Administration). (2008). Monitoring program report Fiscal year 2008. Available from http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/Pesticides/ResidueMonitoringReports/ucm228867.htm#Results_Regulatory_Monitoring.
- VWA (Voedsel en Waren Autoriteit). (2008). Food and consumer product Safety Authority. Report of pesticide residue monitoring results of the Netherlands for 2008. Available from www.vwa.nl/txmpub/files/?p_file_id%446405.
- Waichman, A. V., Ebeb, E., & Nina, N. C. S. (2007). Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. *Crop Protection*, 26, 576-583.
- Zicari, G., Soardo, V., Cerrato, E., & Rivetti, D. (2011). Results from the monitoring of pesticide residues in fruits and vegetables marketed in Piedmont (Italy), 2000 e 2008. *Ig Sanita Pubbl*, 67, 149-168.

III. MÉTODO ANALÍTICO MULTIRRESÍDUOS E ANÁLISE DE INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS, CARBAMATOS, PIRETRÓIDES E OUTROS EM ALIMENTOS

1. Estudos preliminares

Os compostos analisados neste projeto pertencem as classes dos organofosforados, carbamatos, piretróides e ditiocarbamatos, foram escolhidos por estarem entre os mais detectados nas amostras de alimentos analisadas pelo PARA (Jardim e Caldas, 2012) e por serem os mais tóxicos permitidos para uso na agricultura. Neste estudo preliminar foram avaliados 27 compostos da classe dos organofosforados (OF), 12 da classe dos piretróides (PY) e outros

O método analítico desenvolvido neste estudo baseou-se no método multiresíduo QuEChERS, mas com a substituição do solvente acetonitrila por acetato de etila (AcOEt) como solvente extrator. Foi também substituído o detector espectrômetro de massa acoplado a cromatografia gasosa (GC-MS) utilizado no QuEChERS por detectores FPD e μ ECD. Esses detectores são bastante sensíveis a compostos organofosforados (FPD), piretróides dinitroanilinas e isoftalonitras (μ ECD), respectivamente, além de possuírem menor preço e custo de manutenção quando comparados aos espectrômetros de massas. Este estudo preliminar foi realizado com a matriz tomate.

O objetivo deste teste preliminar foi avaliar métodos de extração e purificação para determinação de 27 organofosforados, dez piretróides, duas dinitroanilinas e o clorotalonil utilizando os equipamentos GC-FPD e GC- μ ECD.

1.1 Materiais

Padrões: acefato, azinfós-metílico, clorpirifós, clorpirifós metílico, diazinona, diclorvós, dimetoato, dissulfotona, etiona, fenamifós, fentoato, fenitrotiona, fentiona, forato, malationa, metamidofós, metidationa, mevinfós, monocrotofós, ometoato, parationa metílica, pirimifós metílico, profenofós, protiofós, terbufós, triazofós, triclorfom, acrinatrina, bifentrina, ciflutrininas (4 isômeros), cipermetrininas (4 isômeros), deltametrina, esfenvarelato/fenvarelato, lambda-cialotrina, fenpropatrina, permetrininas (2 isômeros), pendimentalina, trifluralina e clorotalonil – todos os padrões analíticos

foram obtidos da companhia Dr Ehrenstorfer GmbH (Alemanha). A pureza dos padrões variou de 78% a 99,5%.

Soluções padrão: foram preparadas soluções estoque na concentração de 1 mg/mL para cada pesticida, a maioria em tolueno. Os compostos acefato, metamidofós, e triclorfom foram preparados em acetato de etila e o ometoato em acetona por serem moléculas mais polares. A partir das soluções estoque foram preparadas soluções estoque intermediárias, em acetato de etila, na concentração de 30 ng/ μ L contendo os compostos de OF grupo 1 (acefato, dissulfotona, etiona, fenamifós, fenitrotona, fentiona, forato, malationa, metamidofós, ometoato, parationa metílica, protiofós, terbufós, e triclorfom), OF grupo 2 (azinfós-metílico, clorpirifós, clorpirifós metílico, diazinona, diclorvós, dimetoato, fentoato, metidationa, mevinfós, monocrotofós, pirimifós metílico, profenofós e triazofós) e piretróides (acrinatrina, bifentrina, ciflutrinas (4 isômeros), cipermetrinas (4 isômeros), deltametrina, esfenvelato/fenvelato, lambda-cialotrina, fenpropatrina, permetrinas (2 isômeros)), pendimetalina, trifluralina e clorotalonil. As soluções estoque intermediárias foram preparadas transferindo-se 300 μ L da solução estoque (utilizando microseringa de 500 μ L) para um balão calibrado de 10 mL. As soluções de trabalho utilizadas na fortificação das amostras e preparo das curvas de calibração foram preparadas a partir da diluição das soluções estoque intermediárias. As soluções de 3,0 ng/ μ L, 0,3 ng/ μ L e 0,03 ng/ μ L foram preparadas conforme a tabela 1.

Tabela 1. Preparo das soluções padrão de trabalho dos pesticidas.

| Solução de trabalho, ng/μL | Solução de origem, ng/μL | Volume pipetado, μL | Volume final, mL |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|
| 3,0 | 30 | 1000 | 10 |
| 0,3 | 30 | 100 | 10 |
| 0,03 | 3,0 | 100 | 10 |

Reagentes: os reagentes utilizados foram: acetato de etila PA (Vetec), ácido acético (JTBaker), tolueno (Mallincrodt), sulfato de magnésio ($MgSO_4$) (Merck), cloreto de sódio (NaCl) (Dinâmica), Citrato trissódico dihidratado ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) (Ecibra), hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$ (Fluka), amina primária secundária (PSA) (Supelco), acetato de sódio (J. T. Baker)

Equipamentos e condições cromatográficas: GC Agilent (7890A) equipado com injetor automático (7683 B), detectores FPD (organofosforados) e μ ECD (piretróides). Para análise dos organofosforados e os piretróides foi utilizada uma coluna OV-5 (5% fenil-95% dimetil-siloxano), com 30 m x 0,25 D.I., 0,1 μ m de espessura de filme. A rampa de temperatura utilizada foi: 50 °C (1 min), 30 °C/min até 150 °C (0 min), 5 °C/min até 280 °C (5 min). Tempo total 35.33 min. A temperatura do injetor: 250°C; Temperatura detector FPD: 250 °C; Temperatura do detector μ ECD: 300 °C; vazão constante de N₂: 1 mL/min; Volume de injeção 1 μ L, modo *splitless*.

1.2 Procedimento

A Tabela 2 ilustra as combinações de solvente e sais utilizados na extração de 15g de amostra de tomate livre de pesticida, obtida de um produtor orgânico local. A extração dos compostos foi realizada na proporção de 1 mL de AcOEt para cada 1 g de amostra. Na primeira etapa foram avaliadas três misturas de sais: MgSO₄/NaCl, MgSO₄/NaCl/Citratos e MgSO₄/Acetato de sódio. Nesta última, foi utilizado acetato de etila acidificado 1% (ácido acético).

Tabela 2. Solventes e sais utilizados nos estudos preliminares.

| Solvente | Sais para extração | Proporção (g) |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Acetato de etila | MgSO ₄ + NaCl | 7,5:1,5 |
| Acetato de etila | MgSO ₄ + NaCl + Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O + Na ₂ HC ₆ H ₅ O ₇ .1,5H ₂ O | 7,5:1,5:1,5:0,75 |
| Acetato de etila 1% de ácido acético | MgSO ₄ + CH ₃ COONa | 7,5:1,5 |

Nesse teste foi realizada a fortificação, em quintuplicata, dos compostos das classes dos organofosforados, piretróides, pendimetalina, trifluralina e clorotalonil, no nível de 20 μ g/kg (na matriz tomate) para cada uma das misturas de sais ilustradas na tabela 2. Os compostos organofosforados foram divididos em dois grupos pois alguns compostos, conforme Figura 1, possuem tempos de retenção muito próximos como, acefato/mevinfós (6.541/6.556 min), dissulfotona/diazinona (8.348/8.304 min) malationa/pirimifós metílico (9.269/9.276 min).

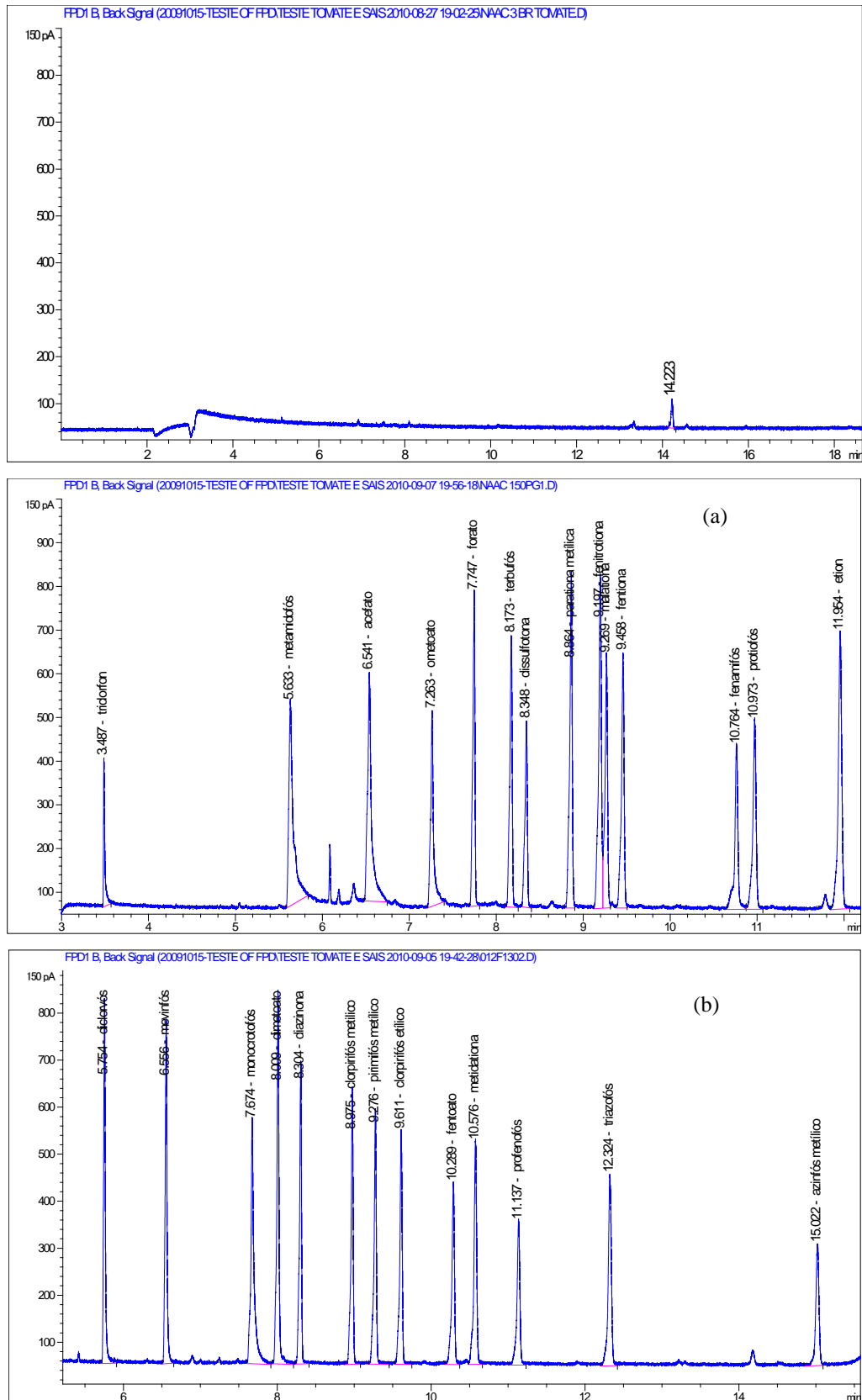


Figura 1. Cromatogramas da amostra de tomate extraída com acetato de sódio e acetato de etila acidificado injetadas no GC-FPD. (a) branco do tomate; (b) ponto de 150 pg/ μ L para compostos organofosforados do grupo 1 (b) e 2 (c) em extrato de matriz tomate branco. Injetado na coluna OV-5.

A purificação por extração dispersiva em fase sólida foi realizada com uma mistura de MgSO_4 :PSA, proporção de 150 mg:50 mg para cada mililitro de extrato. A matriz escolhida para o teste foi o tomate por ser bastante utilizada em ensaios de proficiência e pela facilidade na obtenção de amostras controle. Os procedimentos de extração, purificação e consistiram nos seguintes passos:

Extração

- 1- Pesagem das porções de 15 g da amostra de tomate nos tubos do tipo Falcon® de 50 mL;
- 2- Fortificação das replicatas no nível de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Incorporação por 5 minutos;
- 3- Adição de 15 mL de acetato de etila (1% ácido acético) e agitação por 1 minuto;
- 4- Adição da mistura de sais para extração e agitação por 1 minuto;
- 5- Centrifugação das amostras por 5 minutos (24 °C e 3500 rpm – 2383 g);
- 6- Transferência da fase orgânica (fase superior) das amostras centrifugadas para frascos âmbar previamente identificados;

Purificação

- 1- Pesagem das porções de 900 mg de sulfato de magnésio (MgSO_4) e 300 mg de PSA em um tubo falcon de 15 mL;
- 2- Transferência de 6 mL do extrato da amostra para o tubo tipo Falcon® de 15 mL;
- 3- Homogeneização do extrato com PSA+ MgSO_4 com vortex por 20 segundos;
- 4- Centrifugação por 5 minutos (24 °C e 3500 rpm – 2383 g);
- 5- Transferência de 1,5 mL do extrato para o *via*/ destinado as análises no FPD e 900 μL no *via*/ para μECD ;
- 6- Evaporação das amostras com nitrogênio;
- 7- Ressuspensão com 300 μL de acetato de etila no momento da análise.

As curvas analíticas foram preparadas em matriz e construídas com 7 pontos com as seguintes concentrações: 8 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 20 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 50 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 150 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 400 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 750 $\text{pg}/\mu\text{L}$ e 1100 $\text{pg}/\mu\text{L}$. Não foi utilizado padrão interno.

1.3 Resultados

A amostra de tomate utilizada como branco foi previamente injetada no GC-FPD- μ ECD. Os cromatogramas obtidos não apresentaram picos com mesmos tempos de retenção dos padrões de organofosforados (Figura 1) nem piretróides. As Figuras 2 a 4 ilustram os resultados dos testes de recuperação dos pesticidas na matriz tomate utilizando as misturas de sais mostradas na Tabela 1. As recuperações obtidas permaneceram entre 70 e 120% para todas as misturas testadas, com coeficiente de variação (CV) menor que 20% para a maioria dos compostos. De todos os compostos avaliados, a mistura com sulfato de magnésio e acetato de sódio apresentou melhor porcentagem de recuperação para acefato, metamidofós, ometoato, triclorfom e clorotanolil. O coeficiente de variação também foi menor quando comparado às outras misturas de sais, com exceção do acefato e clorotalonil, que apresentaram CVs menores na mistura que continha cloreto de sódio. Os compostos acefato, metamidofós e ometoato são compostos mais polares que os demais e conhecidos pela dificuldade de partição entre a fase aquosa e orgânica (Lehotay et al., 2010). Os resultados obtidos para o diclorvós foram retirados do gráfico de compostos organofosforados (grupo II) por apresentarem resultados insatisfatórios: 271% (CV=17,2%), 2423% (CV=51,7%) e 3096% (CV=150,3%) para as misturas de sais acetado de sódio, cloreto de sódio e citratos, respectivamente. Com base neste teste preliminar, a mistura de acetato de sódio e acetato de etila acidificado foi escolhida para ser usada no método para determinação dos pesticidas. Neste sistema, as recuperações foram de 70 a 120% e CV <20% para a maioria dos compostos avaliados.

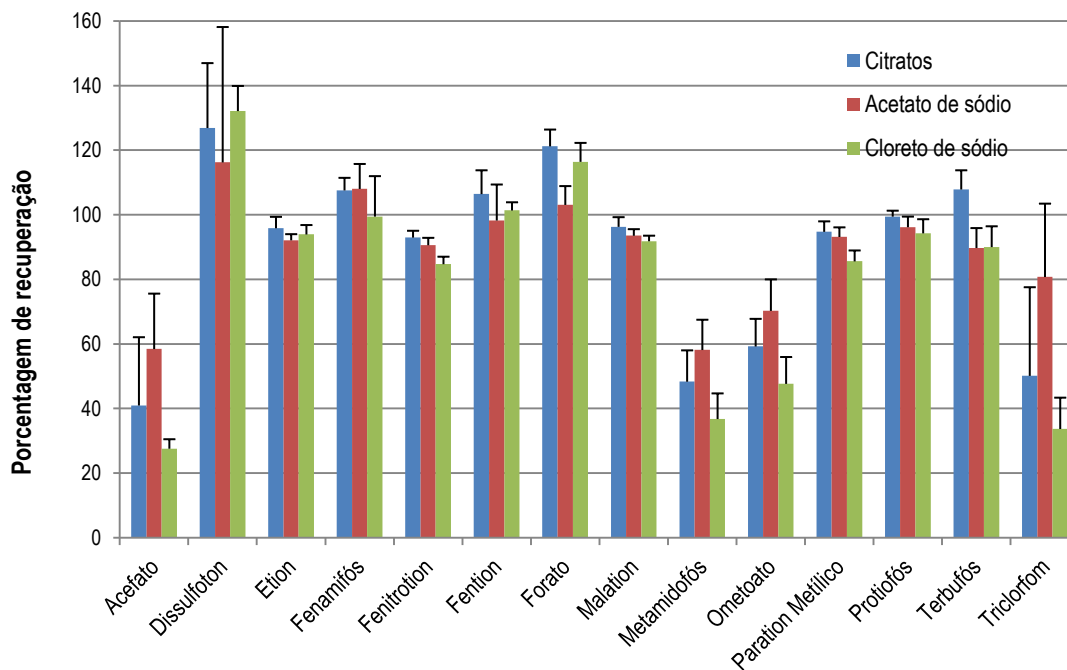


Figura 2. Média de recuperação no nível de 20 µg/kg dos compostos organofosforados do grupo 1 na matriz tomate – as barras de erros representam os desvios padrão. GC-FPD, coluna OV-5.

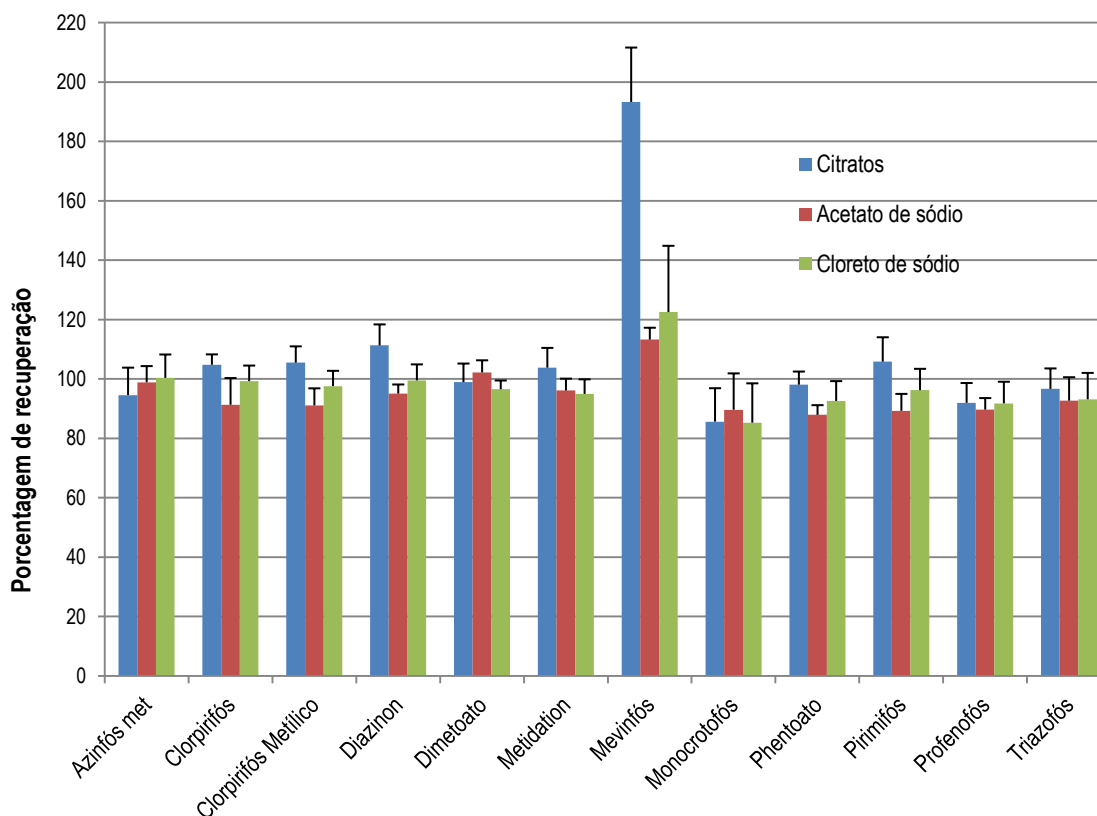


Figura 3. Teste de recuperação no nível de 20 µg/kg dos compostos organofosforados do grupo 2, na matriz tomate – as barras de erros representam os desvios padrão. GC-FPD, coluna OV-5.

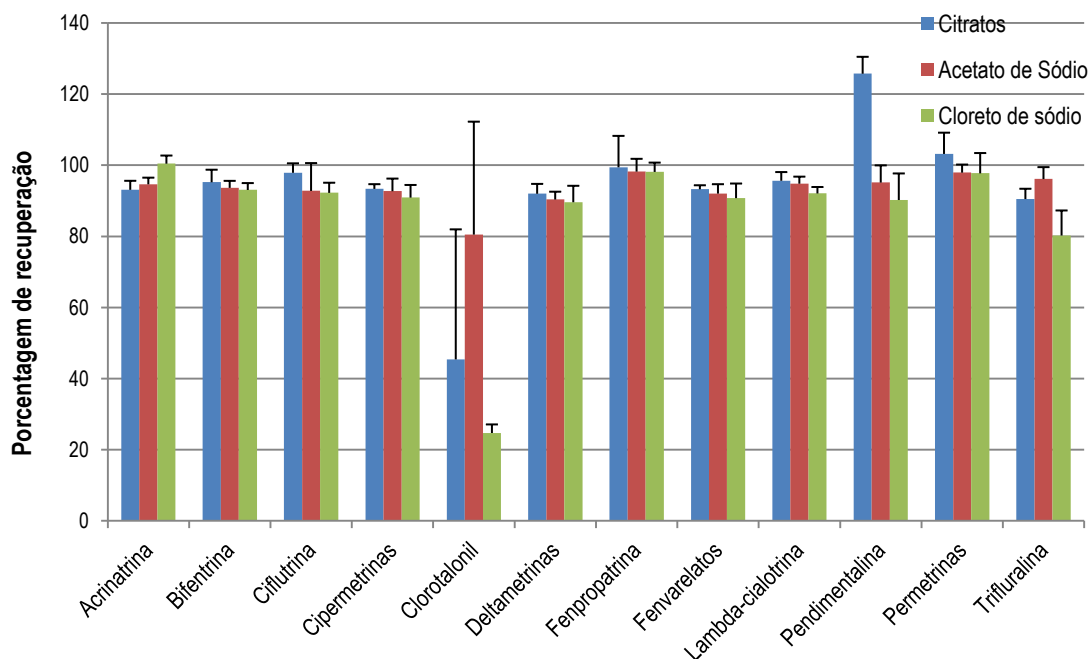


Figura 4. Teste de recuperação no nível de 20 µg/kg dos compostos das classes dos piretróides, dinitroanilinas e isoftalonitrilas – as barras de erros representam os desvios padrão. GC-µECD, coluna OV-5.

1.4 Conclusões

As condições de extração de pesticidas de várias classes com acetato de etila e purificação por extração dispersiva em fase sólida com PSA foram otimizadas neste estudo utilizando o tomate como matriz teste. Este método foi aplicado e validado para quatro frutas de estação bastante consumidas no Brasil e para as quais dados de resíduos ainda não estão disponíveis no país: caju, pêssigo, caqui e goiaba. Amostras destes alimentos serão analisadas utilizando o método validado e os dados obtidos, juntamente com os dados de monitoramento dos programas PARA e PNCRC (Cap. II), serão utilizados para avaliar a exposição da população brasileira aos pesticidas por meio na dieta.

2. Multiresidue analysis of pesticides in seasonal fruits using ethyl acetate extraction and GC-ECD-FPD, GC-MS/MS and LC-MS/MS

Andreia Nunes Oliveira Jardim, Denise Carvalho Mello, Fernanda Caroline Silva Goes, Eloisa Dutra Caldas

Abstract

The aim of this work is to present a method to validate the analysis of 46 organophosphorus (OP), pyrethroid (PY) and carbamate (CB) pesticides and metabolites, and chlorothalonil (CHL), pendimethalin (PEN) and trifluralin (TRI) residues in khaki, cashew, guava and peach. Samples were extracted with ethyl acetate (1% acetic acid), magnesium sulphate ($MgSO_4$) and sodium acetate (CH_3COONa) and the extracts cleaned up by dispersive SPE with primary secondary amine (PSA). The compounds were analyzed by GC-FPD (OP), GC- μ ECD (PY, CHL, PEN and TRI) and LC-MS/MS (CB). GC-MS/MS was used to confirm the identity of the compounds. For most compounds, recoveries ranged between 50%-120% and RSD<20%. LOQ ranged from 1 to 5 μ g/kg. The validated method was used to analyse 238 fruit and fruit pulp samples collected in the Federal District between 2010-2012. The samples were also analyzed for dithiocarbamates (DTC, as CS_2) using the spectrophotometric method. The results showed that 72% of analyzed samples were positive for at least one pesticide. Guava presented the highest percentage of positive samples (81%), followed by peach (78%), khaki (76%) and cashew (44%). DTC was present in 46.7%, lambda-cyhalothrin in 37.1%, and omethoate in 21.8% of the positive samples. None of the pesticides found in khaki, cashew and guava are authorized for these crops in Brazil. Only 4 of the 24 pesticides found in the peach samples were authorized for this crop in the country. This is the first time that pesticide residue data on these seasonal fruits are reported for the country; they are not included in the national monitoring programs. The data generated in this study may allow more sound dietary exposure assessments to be conducted in the country.

Keywords: pesticide residues; food; multiresidue method, gas chromatography, LC-MS/MS

Introduction

The worldwide use of pesticides in agriculture is essential to maintain the quality and quantity of food. However, the presence of residues in treated food and the risk to populations consuming these foods are a global concern. Results from Brazilian pesticide monitoring programs have shown that almost half of the 13556 samples of 22 different crops analyzed were positive for at least one pesticide (Jardim and Caldas, 2012). Dithiocarbamates, organonophosphorous, pyrethroid and carbamates were among the most detected pesticides (41.6%, 30.8%, 8.3% and 2.4% of positive samples, respectively). The insecticides organophosphorus and carbamates, the most toxic pesticides used currently worldwide, are neurotoxic and can inhibit the enzyme acetylcholinesterase (Ecobichon, 2001). Pyrethroids are also neurotoxic, by blocking the voltage dependent sodium, chlorine and calcium channels (Soderlund et al., 2002). The metabolites produced by certain dithiocarbamate fungicides may also be carcinogenic (Belpoggi et al., 2002).

Over the last 40 years, various methods have been developed to analyse multiresidues of pesticides in food given the variety of pesticides applied to crops. Anastassiades et al. (2003) described a multiresidue method named QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), aiming to determine a wide range of pesticides in different matrices with fewer steps and less amount of solvent. Sample extraction was performed with acetonitrile, magnesium sulfate ($MgSO_4$) and sodium chloride (NaCl) and clean up was done through dispersive solid phase extraction with primary and secondary amine (PSA). GC-MS and LC-MS were the techniques used to determine and quantify the residues.

Although mass spectrometric detectors are the choice in currently used multiresidue pesticide methods (Lehotay et al. 2005a; Mol et al., 2007), FPD (Flame Photometric Detector) and ECD (Electron Capture Detector) detectors coupled to gas chromatography systems are still widely used, mainly for the detection of organophosphorous compounds (Li et al., 2007; Wong et al., 2007; Schenck et al., 2009; Zhao et al., 2011, Liu et al., 2012) and pyrethroids compounds (Aysal et al. 2007; Berrada et al. 2010; Hunter et al. 2010, Chen et al., 2011; Vonderheide et al., 2009; Gowda and Somashekar, 2012). These detectors are cheaper and more readily available in developing countries than mass spectrometers. In addition to acetonitrile, other solvents can be used for pesticide extraction, including ethyl

acetate (Aysal et al. 2007; Berrada et al. 2010; Mol et al., 2007; Banerjee, et al., 2007; Pihlström et al., 2007). Ethyl acetate is more suitable for GC analysis than acetonitrile as it is less polar and provides a smaller liquid-to-gas expansion volume (Mastovska et al., 2004).

The objectives of the present study were to develop and validate a multiresidue method to analyze 47 pesticides and metabolites in khaki, cashew, guava and peach, fruits largely consumed by the Brazilian population for which no residue data are available in the country. Samples of these crops were also analyzed using a validated method for the content of dithiocarbamate fungicides.

Materials and Methods

Chemicals and reagents

Ethyl acetate and anhydrous magnesium sulphate ($\geq 99.5\%$) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), methanol and acetonitrile from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), acetic acid and anhydrous sodium acetate (99.5%) from J. T. Baker (Phillipsburg, USA), toluene from Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, USA), PSA (primary-secondary amine) from Sulpelco (USA), and ammonium formate from Fluka (Switzerland). Copper acetate II, sodium hydroxide, stannous chloride, hydrochloric acid, diethanolamine, acetone and ethanol from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). All organic solvents used in the multiresidue method were HPLC grade. Ultra-pure water was produced by a Milli-Q system (Millipore Corporation, USA).

Analytical standards (purity from 78 to 99.5%) of acephate, acrinathrin, aldicarb, aldicarb sulfone, aldicarb sulfoxide, azinphos methyl, bifenthrin, carbaril, carbofuran, carbofuran 3OH, carbosulfan, chlorothalonil, chlorpyrifos, chlorpyrifos methyl, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, diazinon, dichlorvos, dimethoate, disulfoton, esfenvalerate, ethion, fenamiphos, fenitrothion, fenpropathrin, fenthion, lambda-cyhalothrin, malathion, methamidophos, methidathion, metomyl, mevinphos, monocrotophos, omethoate, parathion methyl, pendimethalin, permethrin, phentoate, phorate, pirimiphos methyl, profenofos, prothiophos, terbufos, triazophos, trichlorfon and trifluralin were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany). Thiram was purchased from Sigma-Aldrich (99.9% purity) and CS_2 (PA) from Vetec.

Preparation of standard solutions

The stock solutions of the 1 mg/mL of individual pesticide standards were prepared by dissolving approximately 10 mg (± 0.01 mg) in 10 mL (certified "A" class volumetric flasks) of toluene, methanol or acetone according to their solubility and stability. Intermediate stock standards mixtures were prepared by mixing appropriate volumes of the individual stock solutions. For organophosphorus and pyrethroid compounds, chlorothalonil, pendimethalin and trifluralin, 30 ng/ μ L solutions were prepared in ethyl acetate, and for the carbamates a 10 ng/ μ L solution was prepared in methanol. The working standard mixtures used in the fortification studies and for the calibration curves were prepared by dilutions of the intermediate stock standard solutions. All the standards and solutions were stored in dark vials in a freezer at -15 °C. The thiram stock solution (2.37 mg/mL or 1.497 mg/kg of CS₂) was prepared in acetone and the working standards prepared in ethanol. The stock and working solutions of CS₂ were prepared in ethanol.

Instrumentation

GC-FPD- μ ECD: Agilent Model 7890A gas chromatograph equipped with a 7683B Series Injector autosampler, ChemStation B.03.02, FPD (organophosphorus - OP) and μ ECD (pyrethroids, dinitroanilines and aromatic fungicides – μ ECD compounds) detectors. The injector temperature was set at 250 °C. N₂ (99.999% purity) was used as carrier gas at a constant flow rate 1.0 mL/min. The temperature of the FPD detector was 250 °C, and the N₂ make up, H₂, and synthetic air flows were 60 mL/min, 85 mL/min and 100 mL/min, respectively. For the μ ECD detector, the temperature was 300 °C, and the N₂ makeup flow 60 mL/min. The column coupled to the FPD was an OV-17 (50% Diphenyl - 50% dimethyl-polysiloxane), and to the μ ECD was OV-5 (5% Diphenyl - 95% dimethyl-polysiloxane) both with 30 m X 0.25 mm ID X and 0.25 μ m film thickness. The oven temperature for either column was programmed as follows: initial temperature of 50 °C was held for 1 min, ramped to 150 °C at 30 °C/min, followed by 5 °C/min until 280 °C and held for 5 min. Total run 35.33 min. The injection volume was 1 μ L, splitless mode.

GC-MS/MS: Trace GC Ultra equipped with a PTV (programmed temperature vaporizer) injector, a TSQ Quantum XLS Triple Quadrupole from Thermo Scientific and a 30 m X 0.25 mm ID X 0.25 μ m TR-Pesticide II column (Thermo Scientific). Helium (99.999% purity) was used as carrier gas at 1.2 mL/min constant flow and the

MS transfer line was 250 °C. The temperature program was 90 °C for 1 min ramped to 180 °C at 25 °C/min, followed by 5° C/min ramp to 280 °C and 10 °C/min to 300 °C and held for 6 minutes. The total run was 32.60 min. The PTV Injector temperature began at 75 °C, heated at 2.5 °C/s to 300 °C, held for 3 min, followed by 14.5 °C/min to 330 °C for 20.20 min. The splitless with split flow was 60 mL/min. The mass spectrometer was operated in positive ionization mode, and SRM (Selected Reaction Monitoring), the collision gas was argon (1.5 mTorr) pressure and the source temperature was 280 °C.

LC/MS/MS: LC Shimadzu equipped with binary bomb (LC-20AD), degasser (DGU-20A5), autosampler injector (SIL-20AC) and column oven (CTO-20AC). The liquid chromatography system was coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (4000QTRAP, Applied Biosystem/MDS Sciex, Foster City, EUA). The software used was Analyst V1.4.2 LC/MS. Chromatographic separation was carried out at 40 °C using the column Synergi 4u Fusion RP 80 A 50 x 2.00 mm 4 micron (Phenomenex), Fusion-RP 4x2.0 mm security guard cartridges and the mobile phases of methanol + 5 mmol/L ammonium formate (solution B) and water:acetonitrile (80:20) + 5 mmol/L ammonium formate (solution A). The LC gradient elution at 0.25 mL/min flow: 0-7 min solution B from 0% to 90%; 7-12 min held in solution B 90%; 12-13 min the return to 0% solution B. Equilibration time was 5 minutes. The injection volume was 5 µL. Data were acquired in MRM mode (Multiple-Reaction-Monitoring) and the ESI (Electrospray Ionization) was performed in positive mode. The iMethod™ Test of Cliquant® Software for pesticides were used (entrance potential of 10 V, curtain gas of 30 psi; nitrogen collision gas as medium; ion spray voltage of 5000 V; temperature of 500 °C; ion source gas of 40 psi (GS1) and 60 psi (GS2)). The precursor and product ions are listed in Table 1.

Table 1. LC-MS/MS conditions for carbamates determination.

| Pesticide | RT (min) | Precursor ion | m/z | Product | DP | CE | CXP | IR |
|--------------------|-------------|-----------------------------------|-----|-----------------|----|-------|-----|------------------|
| | | | | ions (m/z) | | | | (RSD, %) n=72 |
| Aldicarb | 4.60 | [M+NH ₄] ⁺ | 208 | <u>116</u> ;89 | 31 | 11;20 | 3;3 | 1.4(2.0) |
| Aldicarb sulfone | 1.49 | [M+H] ⁺ | 223 | <u>86</u> ;148 | 50 | 20;12 | 3;3 | 1.3(10.3) |
| Aldicarb sulfoxide | 1.16 | [M+H] ⁺ | 207 | <u>132</u> ;89 | 41 | 9;19 | 3;3 | 1.2(2.6) |
| Carbaril | 6.06 | [M+H] ⁺ | 202 | <u>145</u> ;127 | 51 | 16;39 | 3;3 | 3.4(4.1) |
| Carbofuran | 5.75 | [M+NH ₄] ⁺ | 222 | <u>165</u> ;123 | 50 | 17;29 | 2;2 | 1.2(2.6) |
| Carbofuran 3-OH | 2.91 | [M+NH ₄] ⁺ | 238 | <u>163</u> ;181 | 62 | 21;15 | 4;2 | 1.4(2.8) |
| Carbosulfan | 9.88 | [M+H] ⁺ | 381 | <u>118</u> ;160 | 52 | 27;20 | 3;3 | 1.1(1.6) |
| Metomyl | 1.71 | [M+H] ⁺ | 163 | <u>88</u> ;106 | 35 | 13;13 | 3;3 | 1.9(1.7) |

RT, retention time; Quantifier ion underlined; DP, declustering potential (V); CE, collision energy (V); CXP, collision cell exit potential (V); IR, average of ratio between the quantifier and qualifier ions; RSD, relative standard deviation.

Dithiocarbamate, as CS₂, was analyzed on a Shimadzu UV 1650 PC spectrophotometer equipped with an automated Sipper 160 system and the software UV Probe 2.21.

Sample processing and extraction

A total of 238 samples (at least 1 kg) of whole fruit (67 khaki, 32 cashew, 44 guava and 67 peach), and frozen fruit pulp (11 cashew, 14 guava and 3 peach), were purchased at local supermarkets between 2010 and 2012, brought to the laboratory and kept frozen (-15 °C) until analyzed. Frozen samples were left at room temperature (22 °C) for about one hour, manually cut into small pieces, and homogenized. A 100 g portion of the homogenized sample was blended, and 15 g (±0.01 g) weighted in a 50 mL screw-cap centrifuge tube for the multiresidue method. The extraction procedure is illustrated in Figure 1.

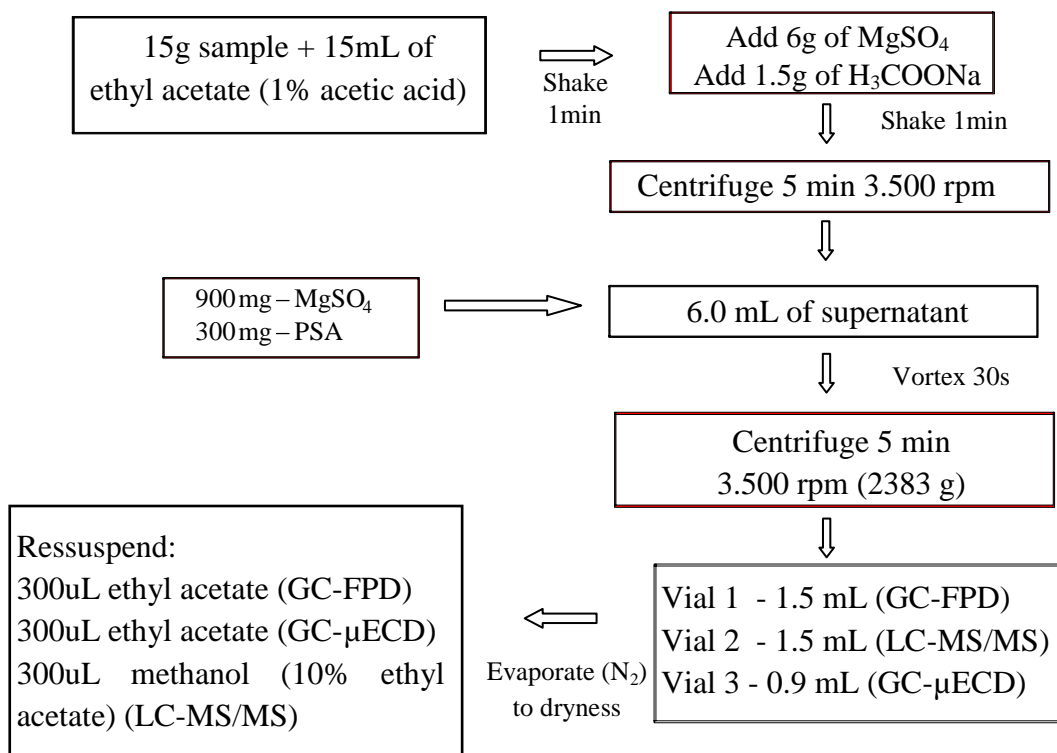


Figure 1. Flowchart for the multiresidue method.

The dithiocarbamate levels were determined according to Caldas et al. (2001). Briefly, 150g of sample was transferred to a two-neck round-bottom flask, and stannous chloride acid solution was added. The bottom flask was placed in a heating mantle, connected to a N₂ inlet and to the CS₂ vertical reaction system containing sodium hydroxide (trap 1) and the complexant solution of copper (II) acetate monohydrate/diethanolamine (trap 2). After 45 min heating under reflux, the complexant solution was transferred to a 25 mL flask, the volume completed with ethanol and the absorbance measured at 435 nm against a CS₂ standard curve.

Validation studies

Control samples were provided by a local organic farmer or purchased on the market. The samples used were previously analyzed to confirm the absence of the pesticides investigated in this study.

Multiresidue method – The selectivity was checked by analyzing the GC-FPD, GC-μECD and LC-MS/MS chromatogram profiles of a blank and a fortified sample, verifying for interferences at the same retention time of the analyzed pesticides. The trueness (recovery) and precision (expressed as the relative standard deviation -

RSD,%) were determined by adding an appropriate volume of the working standard mixtures to 15 g processed samples in the centrifuge screw cap tubes. Five replicates samples at four fortification levels were extracted and analyzed. The 27 organophosphorus were divided into two analytical standard mixtures to avoid co-elution in the chromatographic system. For each commodity, the fortifications were performed in two groups: (i) the organophosphorus group 1 plus pyrethroids and (ii) organophosphorus group 2 plus the carbamates. Intermediate precision was evaluated for all commodities through the analysis of 5 fortified samples at the intermediate level (20 µg/kg for GC compounds and 10 µg/kg for carbamates) performed by the same analyst on two different days. Linearity was accessed by injecting 3 different external matrix-matched calibration standards curves, each with 6 points, prepared by adding appropriate standards solution volumes to the vials containing extracts of a blank extract. The calibration standard curves ranged from 8 to 1100 pg/µL for OPs, 10 to 650 pg/µL for µECD compounds, and 4 to 550 pg/µL for CBs. The linear regression was evaluated by checking the residues' variance (Cochran's test), the correlation coefficient (r), and the significance of the regression (ANOVA) (INMETRO, 2011; Neto et al 2010). The instruments limits of detection (LD) and quantification (LQ) were set as a signal-to-noise ratio (S/N) of 3:1 and 10:1, respectively. The method limit of quantification (LOQ) was defined as the lowest concentration that could be quantified with acceptable recovery ($\geq 70\%$) and precision ($RSD \leq 20\%$) (Sanco, 2011). The method limit of detection (LOD) was set as half of the LOQ.

Two procedures were included as quality controls during sample analysis: a) addition of 100 µL of the surrogate standard solution (chlorpyrifos methyl; 3 ng/µL in ethyl acetate) to the samples before extraction; samples with surrogate recoveries < 70% were re-analyzed. b) extraction of 5 samples fortified with all pesticides at intermediate level recovery (20 µg/kg); these results were also used to evaluate the intermediate precision. The samples with a positive result in the GC-FPD-µECD analysis were reanalyzed by GC-MS/MS to confirm the compound identity.

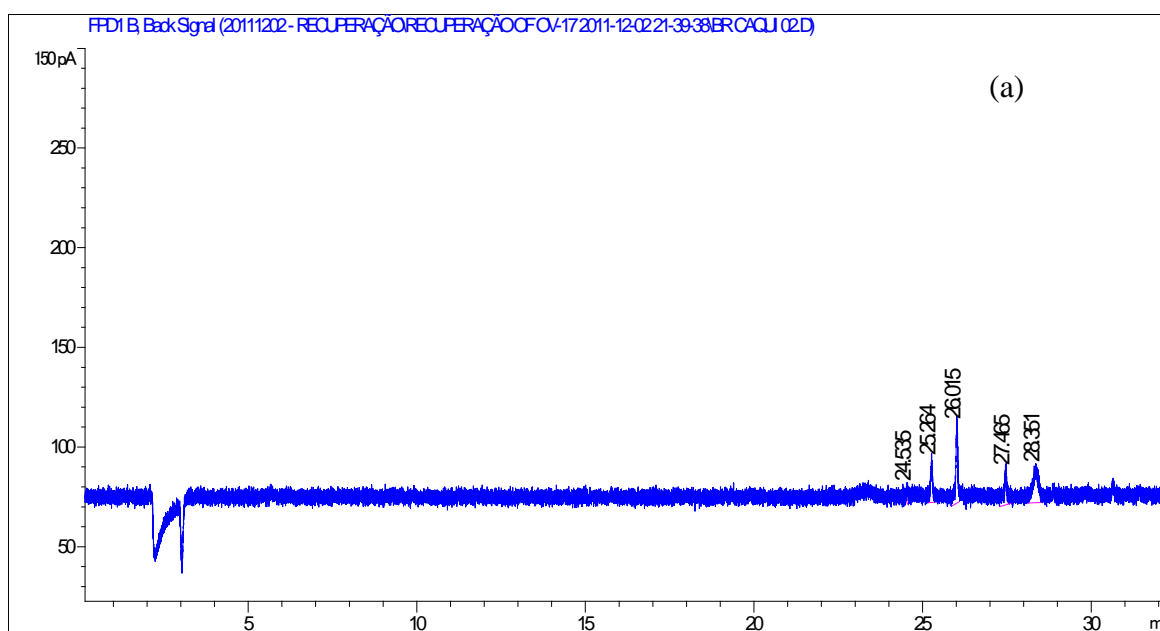
Dithiocarbamates method – Fortification studies were performed by adding different volumes of the thiram standard solution to the 150 g samples. Calibration curve was prepared with a CS₂ as described in Caldas et al (2001). Known volumes of the CS₂ working solution were transferred to 25 mL volumetric flasks containing 15 mL of the complexant reagent. The volume was completed with ethanol and the

absorbance was measured using a spectrophotometer at 435 nm. The eight calibration points varied from 0.21 to 8.4 μg of CS_2/mL , corresponding to 0.04 to 1.4 mg of CS_2/kg in the food samples. LOQ was the lowest concentration that could be quantified with acceptable recovery ($\geq 70\%$) and precision ($\text{RSD} < 30\%$) levels. The Toxicology Laboratory of the University of Brasilia is ISO 17025 certified by INMETRO, the Brazilian accreditation body, to perform this method.

Results and Discussion

Validation studies

Figures 2, 3 and 4 illustrate the selectivity of the pesticides analyzed by GC-FPD, GC- μECD and LC-MS/MS, respectively. No interfering peaks were present in the blank samples at the same retention time for all pesticides, indicating that the extraction, clean up and instrument conditions were satisfactory and the method was selective.



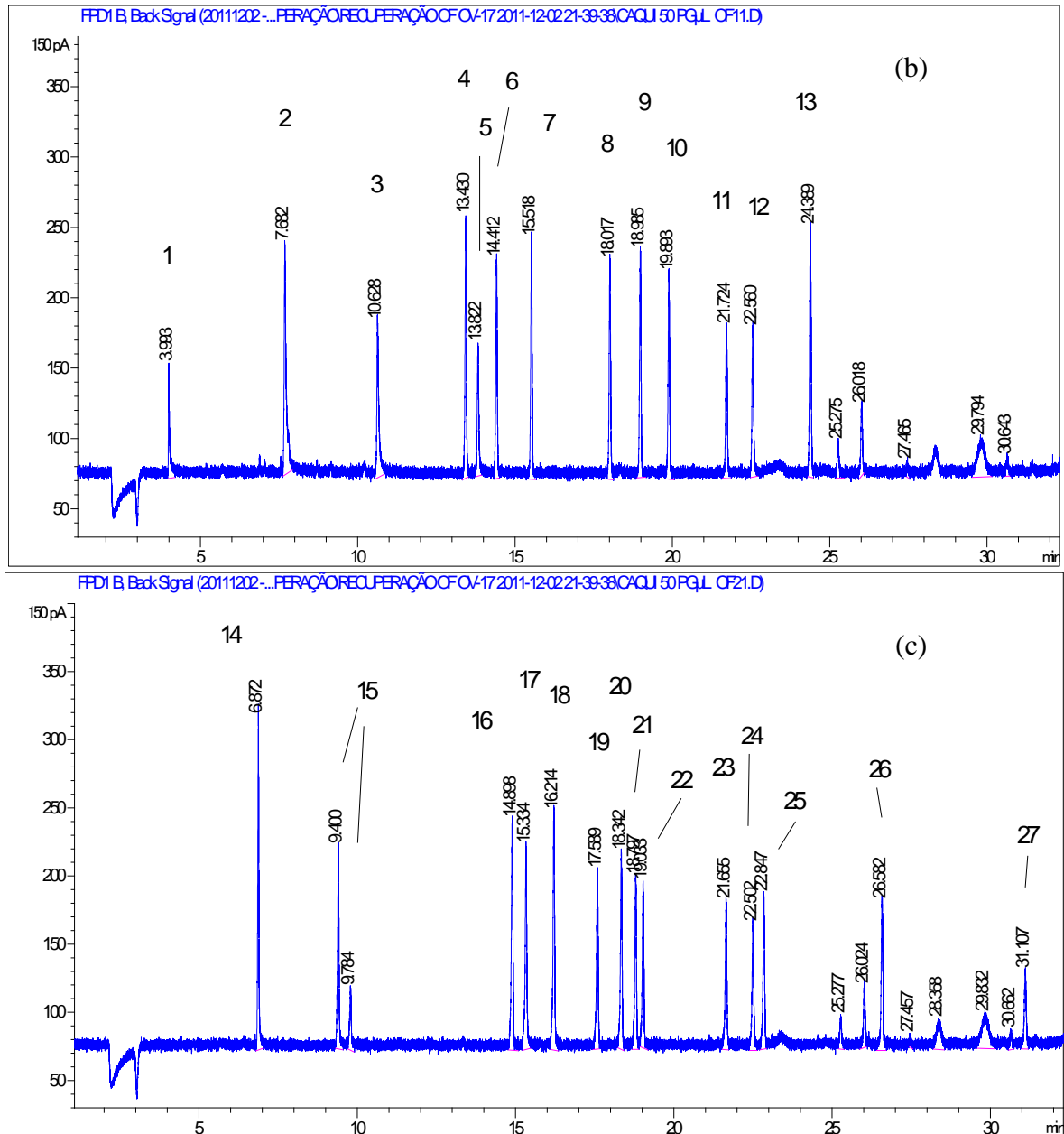
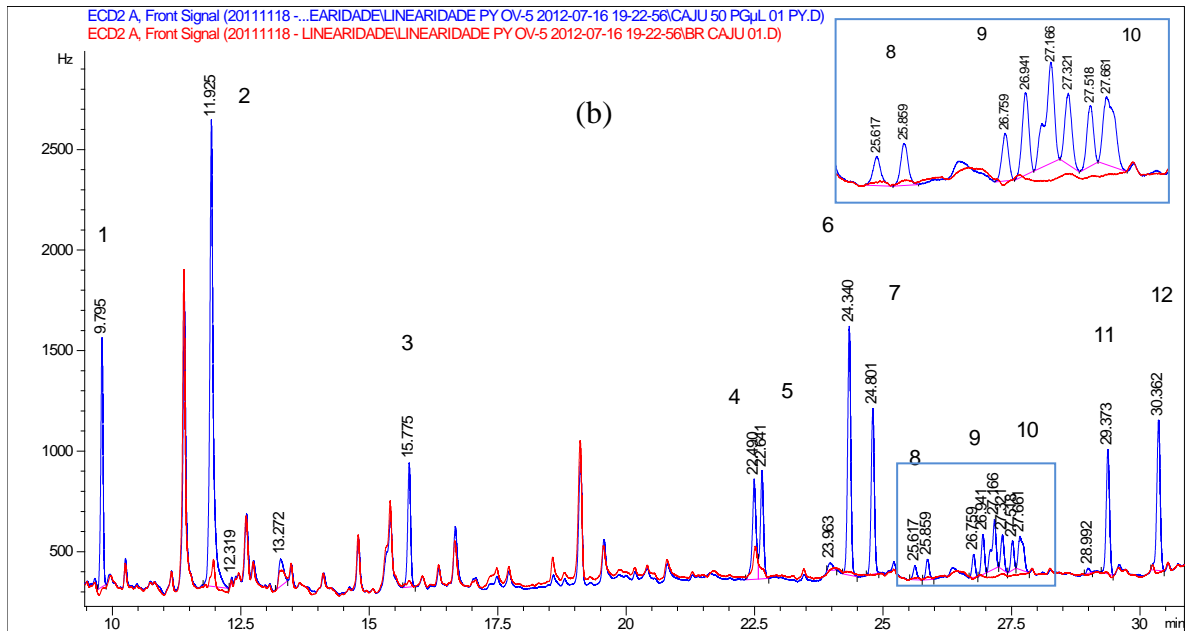
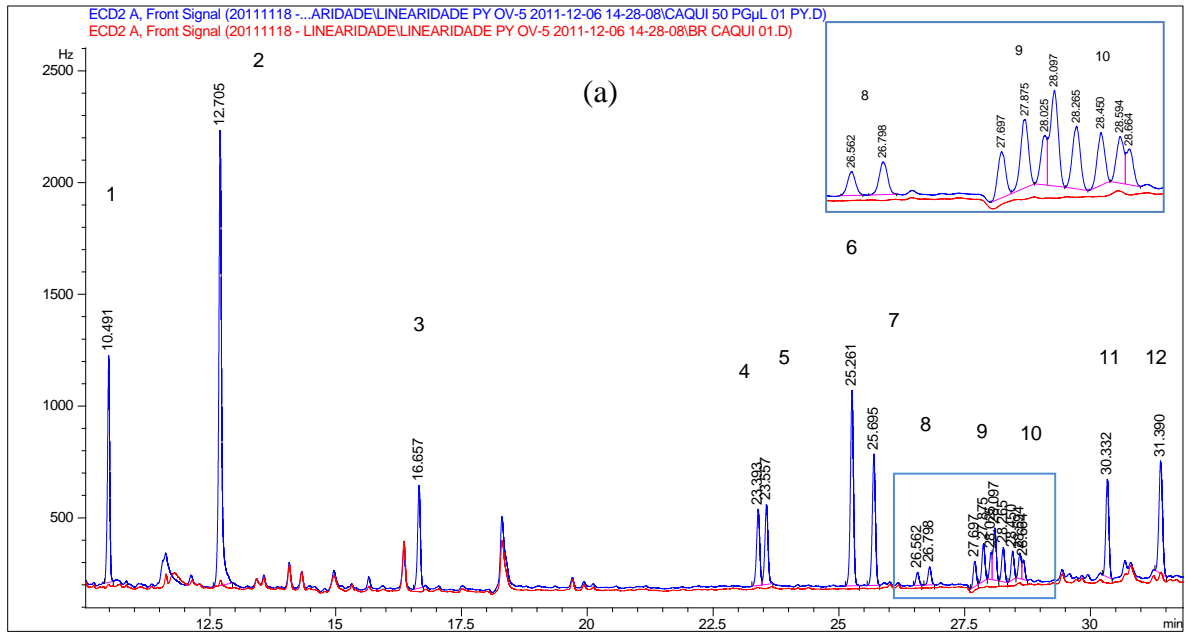


Figure 2. GC-FPD chromatograms (OV-17 column) of a khaki matrix mach calibration curve (50pg/μL). (a) khaki blank; (b) OP group1: 1.trichlorfon; 2.methamidophos; 3.acephate; 4.phorate; 5.omethoate; 6. Terbufos; 7.disulfoton; 8.parathion methyl; 9.fenitrothion; 10.fenthion; 11.prothiophos; 12.fenamiphos; 13.ethion. (c) OP group 2: 14. dichlorvos; 15.mevinphos (E and Z); 16.diazinon; 17.monocrotophos; 18.dimethoate; 19.chlorpyrifos methyl; 20.pirimiphos; 21.chlorpyrifos; 22.malathion; 23.phentoate; 24.profenofos; 25.methidathion; 26.triazophos; 27.azinphos methyl.



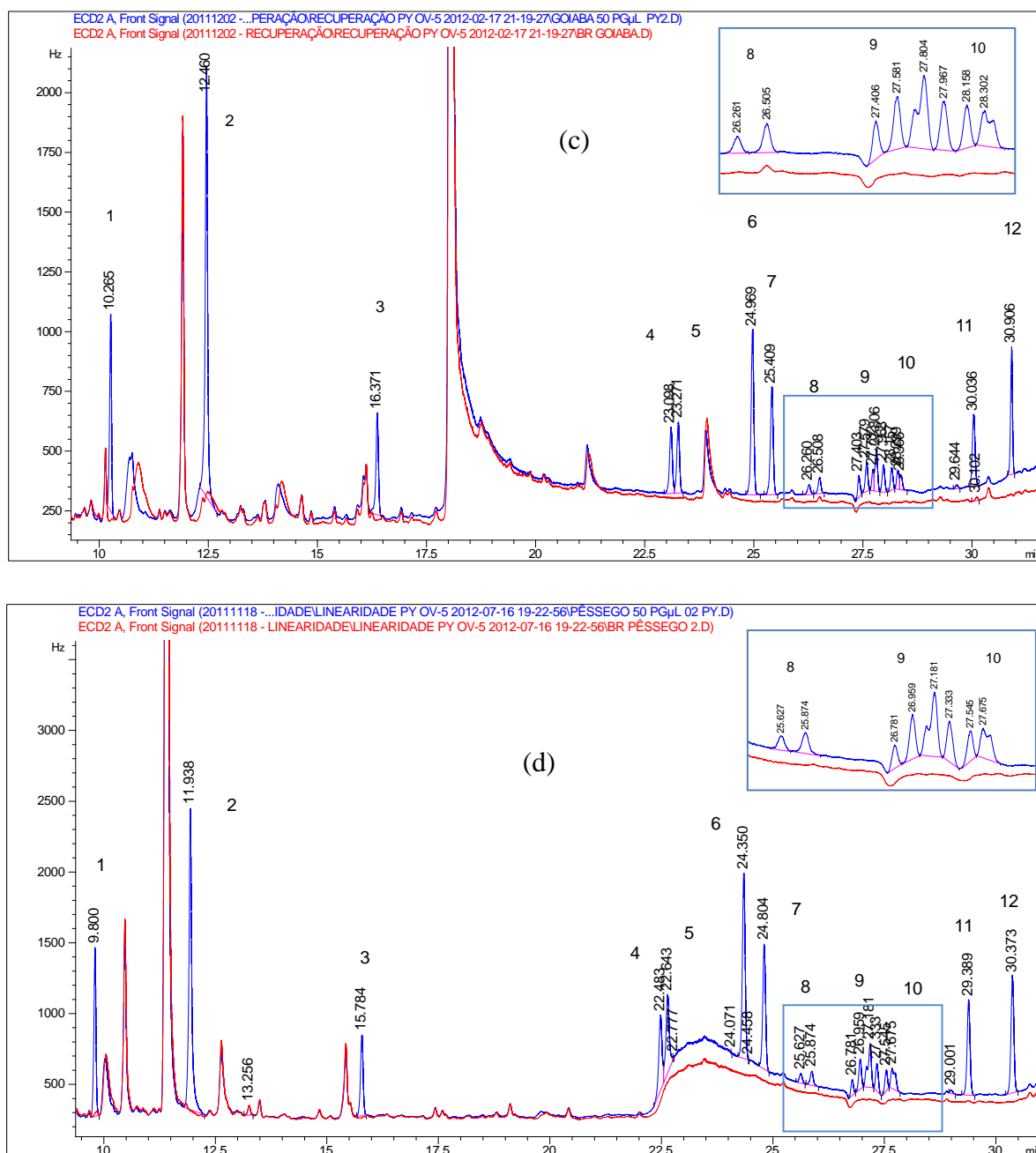


Figure 3. GC-ECD chromatograms (OV-5 column) of blank (red) and matrix mach calibration curve (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (blue) of pyrethroids, dinitroanilines and chlorotalonil – (a) khaki; (b) cashew; (c) guava; (d) peach; 1.trifluralin; 2.chlorothalonil; 3.pendimethalin; 4.bifenthrin; 5.fenpropathrin; 6.acrinathrin; 7.lambda-cyhalothrin; 8.permethrins; 9.cyfluthrins (4 isomers); 10.cypermethrins (4 isomers); 11.esfenvalerate; 12.deltamethrins.

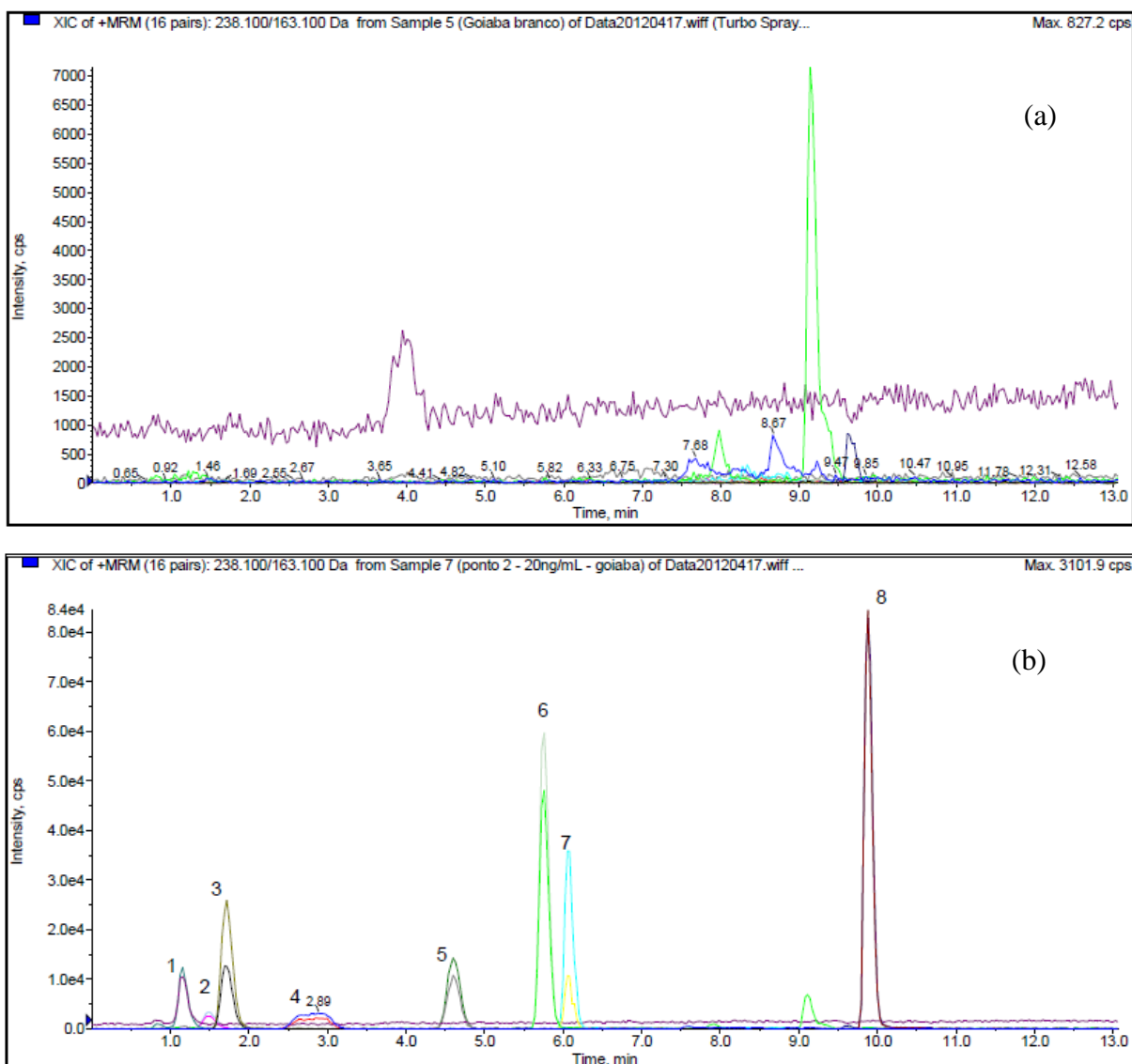


Figure 4. LC-MS/MS chromatograms for carbamate determination (Synergi 4u Fusion RP column) of a guava blank extract (a) and a guava matrix match calibration at 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (b). For each pesticide peak there are two product ions (Table 1). Pesticides: 1. aldicarb sulfone; 2. aldicarb sulfoxide; 3. methomyl; 4. carbosulfan 3-OH; 5. aldicarb; 6. carbofuran; 7. carbaril; 8. carbosulfan.

Table 2 shows the results of the mean recoveries and precisions found during the validation for the organophosphorous compounds. Recoveries below 70% were found for acephate and methamidophos in most cases, and for omethoate in some cases. These compounds have higher polarity, which probably prevented a total partitioning into the ethyl acetate phase. Similar results were found by Lehotay et al (2010), Berrada et al. (2010) and Mol (2007) when extracting these compounds from fruits and vegetables with ethyl acetate. For some compound/crop combinations,

nothing was recovered above the instrument limit of quantification (e.g. acephate in khaki, guava and peach) but recovery of dichlorvos from peach was over 250% at all levels. Precision was within the acceptable range ($\leq 20\%$) in most cases, with the exception of dichlorvos fortification levels in certain crops (up to 46% in peach). Dichlorvos is highly volatile and some losses may have occurred during the evaporation step prior to the GC analysis (Aysal et al., 2007).

Table 2. Mean % recoveries and RSD (%) for organophosphorus pesticides in khaki, cashew, guava and peach analyzed by GC- FPD (n=5 at each level)

| Pesticide | Khaki | | | | Cashew | | | | Guava | | | | Peach | | | |
|----------------------------|------------|------------|-------------|--------------|------------|------------|-------------|--------------|------------|------------|-------------|--------------|------------|------------|-------------|--------------|
| | 2 µg/kg | 5 µg/kg | 20 µg/kg | 200 µg/kg | 2 µg/kg | 5 µg/kg | 20 µg/kg | 200 µg/kg | 2 µg/kg | 5 µg/kg | 20 µg/kg | 200 µg/kg | 2 µg/kg | 5 µg/kg | 20 µg/kg | 200 µg/kg |
| Acephate | nq | 77(5) | 45(13) | 45(3) | 63(5) | 68(2) | 63(7) | 64(7) | nq | 73(8) | 54(5) | 53(3) | nq | 69(7) | 68(5) | 66(14) |
| Azinphos methyl | nq | 88(9) | 97(3) | 95(7) | nq | 117(14) | 111(11) | 102(5) | nq | 95(17) | 109(8) | 98(10) | nq | 108(11) | 102(18) | 119(22) |
| Chlorpyrifos | 96(19) | 82(3) | 84(8) | 99(4) | 89(13) | 106(3) | 108(4) | 106(2) | 95(7) | 102(4) | 96(2) | 97(6) | 82(14) | 88(3) | 97(12) | 105(8) |
| Chlorpyrifos methyl | 83(11) | 64(7) | 95(10) | 111(4) | 111(10) | 103(6) | 106(3) | 10(2) | 97(4) | 99(6) | 97(1) | 95(6) | 93(6) | 94(7) | 94(13) | 106(9) |
| Diazinon | 89(18) | 73(6) | 93(10) | 105(3) | 93(4) | 93(4) | 104(4) | 102(1) | 82(9) | 99(6) | 95(1) | 94(6) | 89(10) | 92(7) | 96(11) | 102(6) |
| Dichlorvos | nq | nq | 72(36) | 64(30) | 128(8) | 105(12) | 87(7) | 99(23) | 69(20) | 76(28) | 91(8) | 68(26) | 278(38) | 263(29) | 310(32) | 271(46) |
| Dimethoate | 90(13) | 68(1) | 93(2) | 93(4) | 117(5) | 98(3) | 99(5) | 95(2) | 109(6) | 98(7) | 91(1) | 88(6) | 91(7) | 90(5) | 90(3) | 84(2) |
| Disulfoton | nq | 81(16) | 55(8) | 75(6) | 93(16) | 107(8) | 113(6) | 114(5) | 67(16) | 87(8) | 62(6) | 76(5) | nq | 63(8) | 68(6) | 89(11) |
| Ethion | 82(20) | 102(5) | 80(7) | 96(4) | 98(4) | 102(4) | 103(5) | 107(5) | 73(22) | 104(4) | 86(14) | 98(3) | 81(7) | 95(8) | 80(10) | 103(4) |
| Fenamiphos | 76(19) | 115(4) | 86(11) | 84(6) | 100(8) | 105(4) | 112(5) | 112(4) | 78(18) | 120(15) | 84(10) | 88(3) | 103(3) | 89(10) | 96(7) | 102(3) |
| Fenitrothion | 87(19) | 108(7) | 87(7) | 10(3) | 108(7) | 102(8) | 111(4) | 113(5) | 95(12) | 111(3) | 89(13) | 100(3) | 89(8) | 100(8) | 87(7) | 102(4) |
| Fenthion | 74(18) | 98(4) | 77(8) | 89(2) | 119(11) | 100(4) | 103(4) | 107(5) | 72(10) | 103(5) | 79(15) | 92(3) | 91(9) | 83(11) | 75(10) | 98(4) |
| Malathion | 76(13) | 84(3) | 93(9) | 106(4) | 94(11) | 93(4) | 104(6) | 101(2) | 87(6) | 105(3) | 95(2) | 95(6) | 99(13) | 87(7) | 104(14) | 111(9) |
| Methamidophos | nq | 46(7) | 45(8) | 43(7) | 77(6) | 69(4) | 62(4) | 64(5) | 62(6) | 59(4) | 50(5) | 46(3) | 75(12) | 52(7) | 57(3) | 57(13) |
| Methidathion | 83(9) | 73(3) | 97(5) | 102(5) | 87(6) | 99(5) | 101(4) | 103(3) | 90(8) | 103(10) | 97(2) | 94(6) | 92(10) | 98(6) | 106(14) | 111(12) |
| Mevinphos | 101(18) | - | 88(6) | 89(4) | 97(13) | 98(7) | 97(4) | 95(4) | 74(15) | 97(5) | 87(4) | 86(6) | 94(18) | 97(11) | 101(11) | 104(7) |
| Monocrotophos | 77(4) | 54(10) | 60(8) | 57(7) | 80(9) | 100(13) | 92(7) | 88(1) | 78(5) | 69(6) | 70(4) | 72(5) | 72(8) | 82(12) | 92(17) | 102(13) |
| Omethoate | nq | 83(6) | 44(8) | 43(5) | 78(21) | 66(9) | 69(4) | 70(8) | 77(16) | 74(7) | 61(8) | 60(3) | 74(19) | 77(11) | 75(9) | 74(11) |
| Parathion methyl | 77(11) | 94(5) | 88(5) | 92(3) | 104(4) | 110(3) | 103(4) | 102(5) | 88(15) | 110(5) | 85(11) | 93(3) | 89(17) | 94(5) | 86(7) | 97(3) |
| Phentoate | 83(15) | 74(5) | 91(8) | 104(4) | 115(4) | 111(5) | 102(4) | 101(3) | 107(8) | 99(6) | 96(2) | 95(6) | 98(14) | 89(6) | 94(12) | 109(11) |
| Phorate | 83(15) | 83(18) | 84(6) | 85(4) | 83(9) | 84(2) | 85(3) | 86(4) | 83(9) | 84(7) | 85(10) | 86(4) | nq | 66(11) | 52(21) | 63(17) |
| Pirimiphos | 81(6) | 76(3) | 94(8) | 107(3) | 94(8) | 101(4) | 105(3) | 104(2) | 97(9) | 106(7) | 98(2) | 96(6) | 96(5) | 99(5) | 10(13) | 105(7) |
| Profenofos | 79(17) | 77(5) | 94(6) | 104(6) | 120(10) | 114(9) | 104(5) | 98(2) | 96(16) | 92(5) | 97(2) | 96(7) | 90(11) | 88(5) | 96(13) | 109(11) |
| Prothiophos | 94(16) | 115(6) | 82(8) | 96(3) | 100(12) | 104(4) | 108(4) | 109(4) | 75(19) | 115(3) | 93(12) | 98(3) | 80(12) | 101(11) | 86(7) | 104(4) |
| Terbufos | 70(12) | 70(10) | 74(8) | 90(3) | 80(7) | 111(6) | 104(4) | 107(4) | 73(14) | 97(4) | 76(13) | 89(4) | 70(19) | 81(9) | 59(16) | 75(11) |
| Triazophos | 72(17) | 87(5) | 91(6) | 100(5) | 86(10) | 88(9) | 94(5) | 97(3) | 83(13) | 95(8) | 96(4) | 97(8) | 85(3) | 91(9) | 100(14) | 106(12) |
| Trichlorfon | nq | 77(12) | 82(8) | 74(3) | nq | 78(8) | 91(10) | 98(3) | nq | 77(11) | 76(3) | 79(4) | nq | 75(10) | 82(8) | 88(9) |

nq: < limit of instrument quantification. -: not analyzed

With a few exceptions, the compounds analyzed by GC- μ ECD had satisfactory recoveries and RSDs (Table 3). In some cases, nothing was detected at the lowest fortification level, and in others recoveries were within the range of >120 - 130%, probably due to an enhancement of the μ ECD response (Hunter et al., 2010). Permethrins, cyfluthrins and cypermethrins were detected and quantified as the sum of their isomers. The compounds lambda-cyhalothrin, esfenvalerate and deltamethrin have a second peak for their diastereoisomers which are higher than the instrument LQ only at higher concentrations. According to Mastovska and Lehotay (2004), these type II pyrethroids (which contain a cyano group at the α carbon of the 3-phenoxybenzyl alcohol moiety) can suffer isomerization in the GC liner, which increases with the number of injections. Reduction of this phenomenon can be achieved by the maintenance of the injection system and the use of an acid injection solution. In our study, we substituted the silanized liner and cut 15 cm of the column after each batch of 100-120 injections and used an acidified ethyl acetate matrix extract.

Low recoveries were found for aldicarb sulfoxide for khaki (15-61%; Table 4). Some recoveries obtained for carbosulfan in cashew were extremely high (125-210%), as were RSD at the highest levels. Table 5 summarizes the LOQs for all the crop/compound combinations evaluated in this study. For most crop/compound combinations, LOQ was 1 or 2 μ g/kg. LOQs for the pyrethroids were 4 or 8 μ g/kg.

Some published studies set the value 10 μ g/kg as the limit of quantification for fruits and vegetables in compliance with European Union (EU) legislation for baby foods (EC 2006/141). This LOQ was achieved by some laboratories using mass spectrometers detectors (Mol et al., 2007, Pihlström et al., 2007; Lehotay et al., 2005a). Payá et al. (2007) reported a LOQ of 5 μ g/kg for 38 pesticides in cucumber by GC-MS, and Banerjee et al. (2007) LOQ between 1 and 6 μ g/kg for 82 compounds using LC-MS/MS and between 2.5 to 10 μ g/kg for 21 pyrethroids by GC-MS (Banerjee et al., 2010).

Data shown in Table 6 indicate that the intermediate precision was below 30% in most cases. Exceptions were aldicarb sulfoxide in khaki, aldicarb in peach, carbosulfan in khaki and cashew, and diclorvos in all matrices. The on-going performance verification showed a recovery between 60 and 140%, within the acceptable range (Sanco, 2011), and RSD < 20%.

Table 3. Mean % recoveries and RSD (%) for pyrethroids, chlorothalonil, pendimethalin and trifluralin analyzed by GC- μ ECD) in khaki, cashew, guava and peach (n=5 at each level)

| Pesticide | Khaki | | | | Cashew | | | | Guava | | | | Peach | | | |
|-----------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|
| | 4 μ g/kg | 8 μ g/kg | 20 μ g/kg | 200 μ g/kg | 4 μ g/kg | 8 μ g/kg | 20 μ g/kg | 200 μ g/kg | 4 μ g/kg | 8 μ g/kg | 20 μ g/kg | 200 μ g/kg | 4 μ g/kg | 8 μ g/kg | 20 μ g/kg | 200 μ g/kg |
| Acrinathrin | 86(4) | 92(1) | 98(10) | 97(9) | 107(11) | 107(11) | 117(8) | 120(16) | 114(6) | 120(6) | 111(3) | 106(5) | 98(6) | 100(6) | 111(4) | 105(4) |
| Bifenthrin | 84(5) | 97(1) | 102(7) | 92(7) | 109(15) | 95(23) | 107(7) | 124(13) | 117(6) | 120(3) | 111(3) | 10(4) | nq | 90(12) | 111(7) | 107(3) |
| Chlorothalonil | 84(11) | 75(4) | 72(25) | 89(11) | 97(2) | 101(10) | 103(5) | 113(9) | 101(7) | 94(6) | 88(4) | 103(4) | 92(5) | 93(8) | 10(3) | 101(2) |
| Cyfluthrins | 85(3) | 86(3) | 96(8) | 97(9) | 103(9) | 110(13) | 118(6) | 126(21) | 106(7) | 130(17) | 114(7) | 113(6) | 98(12) | 106(4) | 111(10) | 112(2) |
| Cypermethrins | 82(3) | 84(3) | 100(8) | 97(9) | nq | 78(24) | 114(6) | 131(22) | 105(11) | 124(8) | 120(8) | 113(6) | nq | 120(19) | 123(17) | 110(13) |
| Deltamethrins | 88(3) | 90(4) | 94(12) | 104(8) | 113(4) | 113(11) | 118(5) | 129(24) | 102(13) | 121(8) | 119(9) | 119(8) | 118(10) | 106(7) | 111(9) | 117(4) |
| Esfenvalerate | 91(3) | 89(3) | 97(12) | 104(9) | 116(4) | 113(12) | 120(6) | 129(25) | 102(11) | 121(8) | 120(9) | 116(8) | 117(10) | 108(7) | 114(8) | 112(3) |
| Fenpropathrin | 87(6) | 95(1) | 99(7) | 94(9) | 100(7) | 108(11) | 118(10) | 113(16) | 116(3) | 120(3) | 111(3) | 106(5) | 101(10) | 99(7) | 110(6) | 108(4) |
| λ-cyhalothrin | 87(4) | 88(1) | 97(6) | 10(8) | 111(5) | 112(11) | 114(10) | 121(17) | 115(5) | 117(4) | 110(4) | 111(6) | 106(9) | 108(3) | 114(5) | 105(4) |
| Pendimethalin | 80(10) | 91(2) | 89(6) | 94(4) | 105(8) | 117(8) | 115(4) | 110(9) | 106(5) | 10(2) | 98(1) | 103(3) | 94(6) | 93(5) | 102(1) | 103(4) |
| Permethrins | 74(5) | 100(4) | 105(4) | 88(9) | nq | 112(17) | 122(8) | 109(15) | nq | 99(12) | 111(6) | 107(6) | nq | 105(11) | 117(16) | 99(2) |
| Trifluralin | 81(6) | 62(3) | 81(5) | 89(4) | 115(1) | 114(4) | 116(3) | 122(6) | 96(4) | 101(2) | 99(4) | 102(1) | 92(4) | 92(7) | 98(1) | 96(3) |

nq – value < limit of instrument quantification; λ -cyhalothrin – Lambda-cyhalothrin

Table 4. Mean % recoveries and RSD (%) for carbamate pesticides in khaki, cashew, guava and peach analyzed by LC-MS/MS (n=5 at each level).

| Pesticide | Khaki | | | | Cashew | | | | Guava | | | | Peach | | | |
|---------------------------|------------|------------|--------------------|--------------|------------|------------|-------------|--------------|--------------------|------------|-------------|--------------------|------------|------------|-------------|--------------|
| | 1 µg/kg | 4 µg/kg | 10 µg/kg | 100 µg/kg | 1 µg/kg | 4 µg/kg | 10 µg/kg | 100 µg/kg | 1 µg/kg | 4 µg/kg | 10 µg/kg | 100 µg/kg | 1 µg/kg | 4 µg/kg | 10 µg/kg | 100 µg/kg |
| Aldicarb | 99(4) | 83(4) | 100(7) | 79(5) | 89(5) | 96(3) | 98(4) | 91(3) | 99(6) | 95(1) | 97(5) | 88(2) | 120(4) | 122(1) | 120(3) | 105(4) |
| Aldicarb sulfone | 64(16) | 80(5) | 91(8) | 68(6) | 80(7) | 88(4) | 101(6) | 88(4) | 98(5) | 92(2) | 94(4) | 92(2) | 92(4) | 88(4) | 92(4) | 88(4) |
| Aldicarb sulfoxide | 15(17) | 61(5) | 35(7) | 30(14) | 57(2) | 72(7) | 81(3) | 71(4) | 90(7) | 85(7) | 81(7) | 64(4) | 81(11) | 78(5) | 78(12) | 59(2) |
| Carbaril | 99(6) | 96(2) | 114(8) | 82(5) | 90(3) | 103(4) | 108(4) | 96(4) | 109(3) | 106(4) | 103(6) | 85(4) | 108(2) | 111(1) | 108(2) | 92(2) |
| Carbofuran | 101(7) | 96(1) | 111(5) | 81(2) | 72(3) | 86(3) | 95(8) | 77(8) | 112(9) | 109(4) | 112(5) | 88(11) | 113(5) | 129(10) | 123(3) | 93(3) |
| Carbofuran 3OH | 89(6) | 85(1) | 102(8) | 78(4) | 82(4) | 92(1) | 101(4) | 92(4) | 104(4) | 94(3) | 97(5) | 85(3) | 101(3) | 101(2) | 102(3) | 85(3) |
| Carbosulfan | 83(3) | 137(8) | 53(3) ^a | 77(3) | 125(10) | 210(12) | 190(57) | 153(45) | 73(6) ^a | 95(10) | 82(8) | 76(4) ^a | 81(10) | 68(58) | 77(7) | 59(11) |
| Methomyl | 64(16) | 83(3) | 91(8) | 69(4) | 79(5) | 87(8) | 94(13) | 84(4) | 79(3) | 87(1) | 94(3) | 84(2) | 79(6) | 87(1) | 94(3) | 84(4) |

a: n=4 – outlier removed (box plot)

Tabela 5. The LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) for each crop/compound.

| Compound | Khaki | Cashew | Guava | Peach |
|---------------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| Acephate | 5 | 2 | 5 | 5 |
| Acrinathrin | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Aldicarb | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Aldicarb sulfone | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Aldicarb sulfoxide | - | 4 | 1 | 1 |
| Azinphos-methyl | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Bifenthrin | 4 | 4 | 4 | 8 |
| Carbaryl | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Carbofuran | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Carbofuran, 3OH | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Carbosulfan | - | - | 4 | 1 |
| Chlorothalonil | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Chlorpyrifos | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Chlorpyrifos-methyl | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Cyfluthrin | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Cypermethrin | 4 | 4 | 4 | 8 |
| Deltamethrin | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Diazinon | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Dichlorvos | - | - | - | - |
| Dimethoate | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Disulfoton | 5 | 2 | 2 | 5 |
| Ethion | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Fenamiphos | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Fenitrothion | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Fenpropathrin | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Fenthion | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Esfenvalerate | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Lambda-cyhalothrin | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Malathion | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Methamidophos | 5 | 2 | 2 | 2 |
| Methidathion | 2 | 2 | 2 | 2 |

| Compound | Khaki | Cashew | Guava | Peach |
|-------------------|-------|--------|-------|-------|
| Methomyl | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Mevinphos | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Monocrotophos | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Omethoate | 5 | 2 | 2 | 2 |
| Parathion-methyl | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Pendimetalin | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Permethrin | 4 | 8 | 8 | 8 |
| Phenthoate | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Phorate | 2 | 2 | 2 | 5 |
| Pirimiphos-methyl | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Profenofos | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Prothiophos | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Terbufos | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Triazophos | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Trichlorfon | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Trifluralin | 4 | 4 | 4 | 4 |

Table 6. Results of quality control recovery and RSD (%) at 20 µg/kg (GC compounds) and 10 µg/kg (CB) performed during sample extractions and intermediate precision.

| Pesticide | Intermediate precision (RSD,%) | | | | Recovery and RSD, % of QC | | | |
|----------------|--------------------------------|-----------|-------|-----------|---------------------------|---------------------|---------|---------|
| | Khaki | Cashew | Guava | Peach | Kakhi | Cashew ^a | Guava | Peach |
| Acephate | 15 | 6.6 | 8.4 | 8.5 | 57(5) | 66(7) | 63(1) | 60(6) |
| Acrinathrin | 9.9 | 7.8 | 9.0 | 4.1 | 96(11) | 109(4) | 106(13) | 110(4) |
| Ald. sulfoxide | <u>48</u> | 11 | 12 | 16 | 94(4) | 89(17) | 90(14) | 102(5) |
| Aldicarb | 8.3 | 6.7 | 10 | <u>34</u> | 108(9) | 99(11) | 116(3) | 65(25) |
| Ald. sulfone | 15 | 12 | 8.5 | 20 | 118(2) | 83(11) | 109(3) | 132(5) |
| Azinph. methyl | 8.5 | 9.2 | 13 | 14.6 | 108(9) | 106(7) | 101(17) | 100(12) |
| Bifenthrin | 7.3 | 7.6 | 4.1 | 7.4 | 102(9) | 116(6) | 109(5) | 120(5) |
| Carbaril | 8.5 | 15 | 8.3 | 2.0 | 128(3) | 82(12) | 118(2) | 108(2) |
| Carbofuran | 9.0 | 11 | 5.9 | 8.9 | 130(2) | 102(15) | 123(1) | 106(7) |
| Carbofuran 3OH | 8.5 | 9.5 | 8.6 | 7.2 | 116(2) | 89(13) | 113(1) | 116(2) |
| Carbosulfan | <u>37</u> | <u>83</u> | 9.4 | <u>22</u> | 112(3) | 43(36) | 95(3) | 53(17) |
| Chl. methyl | 7.6 | 6.2 | 4.0 | 9.6 | 94(6) | 110(10) | 96(6) | 97(6) |

| Pesticide | Intermediate precision (RSD,%) | | | | Recovery and RSD, % of QC | | | |
|----------------|--------------------------------|-----------|-----------|------------|---------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | Khaki | Cashew | Guava | Peach | Kakhi | Cashew ^a | Guava | Peach |
| Chlorothalonil | 18 | 5.4 | 5.1 | 3.9 | 81(7) | 98(5) | 91(6) | 97(4) |
| Chlorpyrifos | 8.9 | 5.8 | 3.8 | 9.4 | 95(5) | 111(8) | 96(5) | 100(7) |
| Cyfluthrins | 10 | 5.2 | 11 | 9.1 | 96(13) | 119(5) | 99(10) ^b | 117(9) |
| Cypermethrins | 12 | 6.1 | 11 | 16 | 107(14) | 121(3) | 105(10) ^b | 145(11) ^b |
| Deltamethrins | 13 | 6.3 | 11 | 9.2 | 99(15) | 110(7) | 103(7) | 111(10) |
| Diazinon | 7.5 | 5.7 | 4.9 | 7.9 | 94(6) | 107(8) | 101(5) | 98(4) |
| Dichlorvos | <u>45</u> | <u>25</u> | <u>80</u> | <u>104</u> | 99(47) | 136(6) | 435(30) | 15(31) |
| Dimethoate | 4.6 | 4.7 | 4.4 | 16 | 95(6) | 101(4) | 88(6) | 114(13) |
| Disulfoton | <u>26</u> | 10 | 19 | <u>26</u> | 91(8) | 95(8) | 80(8) | 43(8) |
| Esfenvalerate | 12 | 7.3 | 11 | 8.4 | 100(13) | 110(7) | 104(9) | 116(10) |
| Ethion | 8.5 | 7.2 | 16 | 18.1 | 91(3) | 102(11) | 68(3) | 59(9) |
| Fenamiphos | 11 | 7.4 | 9.6 | 11.7 | 86(11) | 10(4) | 75(4) | 80(6) |
| Fenitrothion | 9.0 | 5.1 | 12 | 7.9 | 101(2) | 105(5) | 77(3) | 78(5) |
| Fenpropathrin | 8.8 | 10 | 6.3 | 4.9 | 100(11) | 106(6) | 104(8) | 106(2) |
| Fenthion | 11 | 6.1 | 13 | 15 | 92(2) | 96(8) | 69(2) | 61(4) ^b |
| L. cyhalothrin | 9.1 | 8.9 | 7.5 | 4.8 | 101(11) | 106(5) | 101(8) | 112(5) |
| Malathion | 7.1 | 6.2 | 3.7 | 9.7 | 84(5) | 84(8) | 84(5) | 84(5) |
| Methamidophos | 6.7 | 6.9 | 8.0 | 6.3 | 45(6) | 59(11) | 53(10) | 52(6) |
| Methidathion | 5.5 | 7.4 | 5.9 | 11 | 98(7) | 108(10) | 89(6) | 110(9) |
| Metomyl | 13 | 12 | 9.4 | 13 | 113(4) | 99(11) | 110(1) | 79(8) |
| Mevinphos | 7.7 | 5.3 | 12 | 15 | 90(10) | 104(5) | 107(5) | 80(4) |
| Monocrotophos | 18 | 5.3 | 6.8 | 12 | 82(7) | 93(3) | 73(9) | 96(7) |
| Omethoate | <u>22</u> | 5.5 | 7.9 | 12 | 67(7) | 73(6) | 66(6) | 63(8) |
| Pendimethalin | 9.2 | 4.5 | 7.1 | 3.7 | 99(9) | 112(5) | 110(5) | 104(5) |
| Permethrins | 15 | 9.9 | 11 | 11 | 99(23) | 106(2) | 110(15) | 117(5) |
| Phentoate | 7.5 | 6.1 | 5.7 | 11 | 96(7) | 110(7) | 91(7) | 105(8) |
| Phorate | 12 | 6.4 | 7.4 | 18 | 84(6) | 84(8) | 84(3) | 84(5) |
| Pirim. methyl | 4.8 | 5.3 | 10.5 | 6.8 | 92(3) | 98(7) | 75(3) | 81(5) |
| Pirimiphos | 6.6 | 6.1 | 3.8 | 9.3 | 96(5) | 109(9) | 95(5) | 101(5) |
| Profenofos | 6.3 | 5.7 | 5.2 | 12 | 96(7) | 110(7) | 92(6) | 106(11) |
| Prothiophos | 7.3 | 7.9 | 14.5 | 12 | 91(2) | 103(13) | 75(3) | 72(9) |
| Terbufos | 10 | 6.8 | 12 | 12 | 87(5) | 95(8) | 90(3) | 60(7) |
| Triazophos | 7.2 | 9.1 | 8.7 | 12 | 108(9) | 107(10) | 85(8) | 106(11) |
| Trichlorfon | 13 | 16 | 4.6 | 7.4 | 67(9) | 79(24) | 77(6) | 76(4) |
| Trifluralin | 7.6 | 4.5 | 5.5 | 11 | 91(5) | 109(3) | 94(6) | 119(5) |

^a n =3; ^b n=4 (outlier removed – box plot); RSD, % ≥ 20 are underlined

The linearity study of the matrix-match calibration curve showed that for most compounds, in all matrices, the calibration data were heteroscedastic ($C_{\text{calculated}} < C_{\text{critical};6;3}$), indicating that the standard deviations of the calibration curve residues increased with pesticide concentrations (Figure 5), and the weighted linear regression was chosen to calculate recoveries and to quantify the sample results (Miller and Ambrus 2000). Homoscedasticity was obtained for 11 compounds in khaki (chlorpyrifos methyl, monocrotophos, phentoate, pirimiphos, pendimethalin, lambda-cylothrins, permethrins, cyfluthrins, cypermethrins, esfenvalerate and deltamethrins), 3 compounds in guava (carbaryl, carbofuran 3OH and carbosulfan) and peach (pendimethalin, fenpropathrin and methomyl), and 2 compounds in cashew (dichlorvos and mevinphos). Here, the weighted regression was used to homogenize the procedure in all cases. The correlation coefficients were 0.99 or higher for almost all compounds. Even with certain pesticides presenting a r of approximately 0.96, the ANOVA showed that the weighted regressions for all curves were significant ($p < 0.05$).

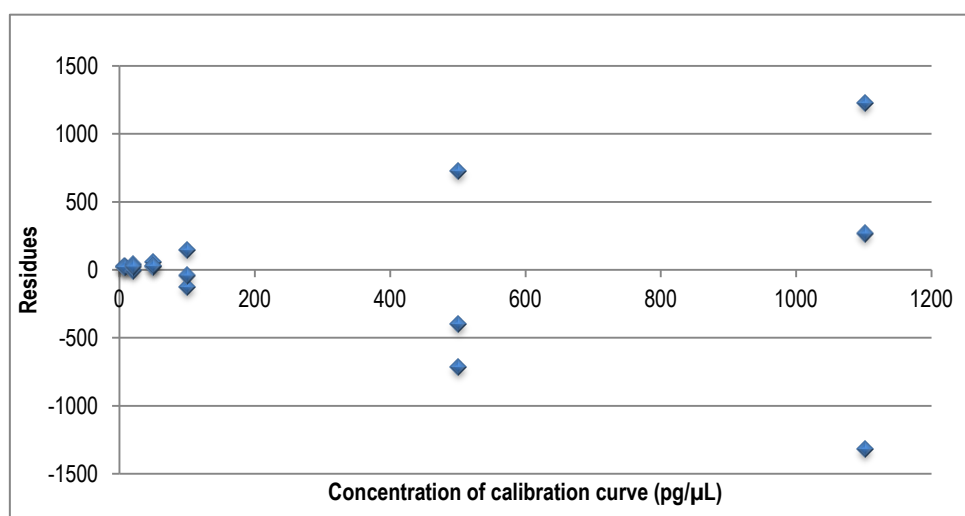


Figure 5. Distribution of the linear regression residues calculated for matrix match calibration curve for terbufos ($y = 10.966x + 32.576$) prepared in guava blank extracts.

In most methods, anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) is the salt used to force the partition between the aqueous and the ethyl acetate organic phase (Banerjee et al., 2007; Banerjee et al., 2010; Berrada et al., 2010; Chen et al., 2011; Goto et al., 2006) and sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) (Pihlström et al., 2007; Aysal et al., 2007) or phosphate buffer solution to adjust the extract pH (Mol et al., 2007). In this study we used MgSO_4 and CH_3COONa , the same salts used in the modified

QuEChERS method (Lehotay et al., 2005b). The $MgSO_4$ was chosen due to its higher ability to remove more water than Na_2SO_4 , in addition to the fact that the dissolution of $MgSO_4$ is an exothermic process, and can facilitate the extraction of non polar compounds.

The dithiocarbamates results for trueness and precision in the tested matrices are shown in the Table 7. The recoveries ranged from 70% to 120% and the $RSD < 20\%$ at all tested levels, and LOQ was 0.05 mg/kg CS_2 for all matrices. The CS_2 calibration curve showed to be homoscedastic and the least square method was used to generate the calibration graphics. The spectrophotometric method was successfully validated and applied to the collected samples.

Table 7. Mean recoveries and RSD for dithiocarbamate pesticides in khaki, cashew, guava and peach analyzed as CS_2 by spectrophotometry.

| Food | Level (mg/kg CS_2) | N | Recovery (%) | RSD, % |
|--------|--------------------------|---|--------------|--------|
| Cashew | 0.05 | 4 | 77.1 | 0.98 |
| | 0.1 | 4 | 73.6 | 8.97 |
| | 0.2 | 4 | 75.0 | 14.4 |
| | 0.8 | 3 | 81.4 | 11.1 |
| Khaki | 0.05 | 4 | 108 | 4.0 |
| | 0.1 | 8 | 85.8 | 2.39 |
| Guava | 0.05 | 4 | 98.6 | 7.26 |
| | 0.1 | 4 | 85.0 | 2.68 |
| | 0.5 | 4 | 90.3 | 3.76 |
| | 1.0 | 4 | 107 | 2.21 |
| Peach | 0.05 | 4 | 90.0 | 2.45 |
| | 0.1 | 4 | 83.2 | 3.9 |

Sample analysis

The recoveries performed during sample extractions for QC ranged between 60-140% in most cases (Table 5), within acceptable analytical performance parameters for routine analyses (Sanco, 2011). The surrogate chlorpyrifos methyl presented recoveries below $< 70\%$ in only 6 samples (3 khakis, 2 peaches and 1

guava). These samples were reanalyzed. The identity of the pesticides found in the samples analyzed by GC-FPD or GC- μ ECD was confirmed by the GC-MS/MS in all cases (figure 6).

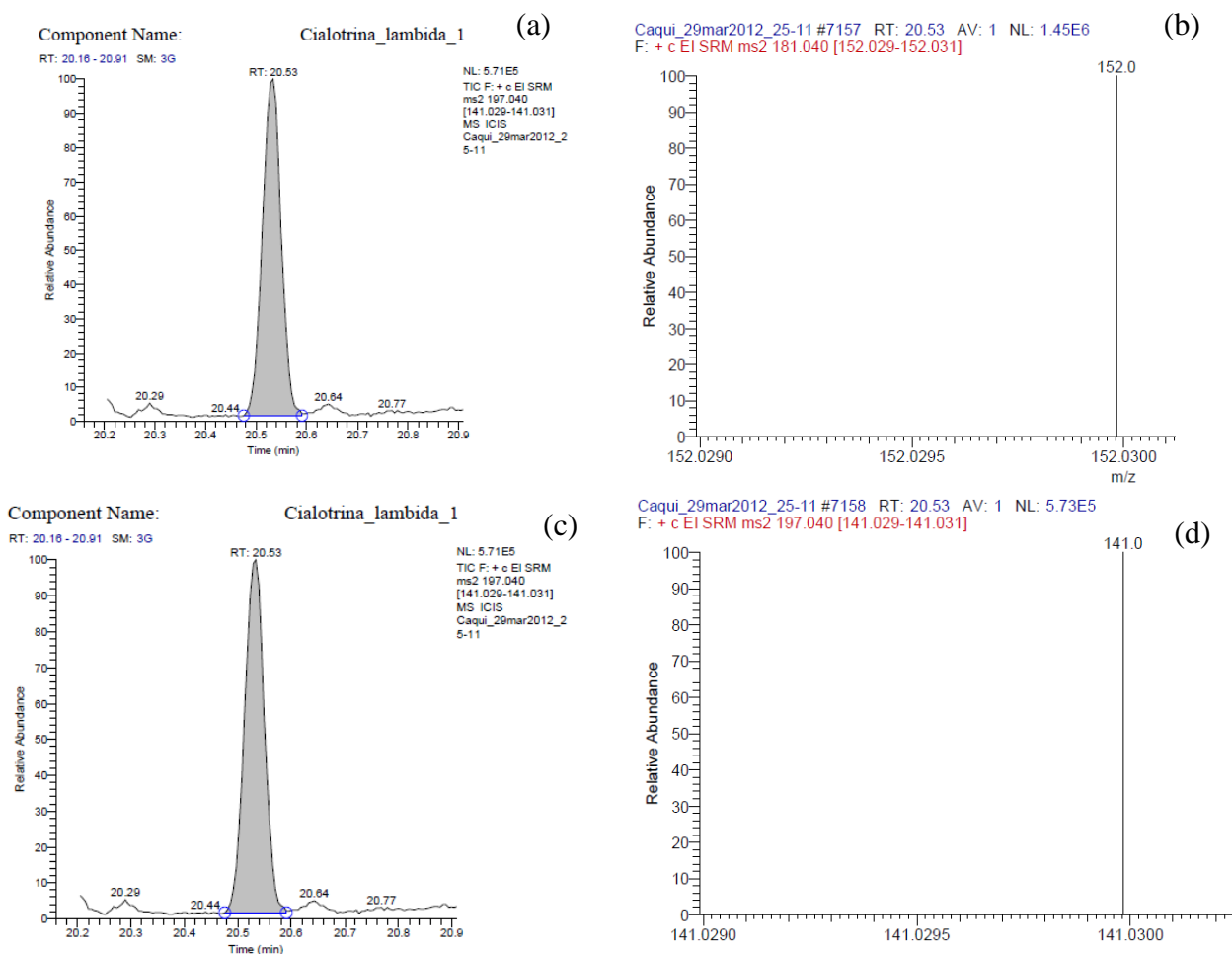


Figure 6. GC-MS/MS chromatograms (TR-Pesticide II column) and spectrums of a khaki sample containing lambda-cyhalothrin. The chromatograms and mass spectrum of the first transition are illustrated in the figures (a) and (b) and for the second transition in the figures (c) and (d).

Of the 47 pesticides analyzed, 24 were detected in the samples at least once (Figure 7). Dithiocarbamates were present in almost 50% of the samples, higher than the percentage found in the Brazilian pesticide residue monitoring programs for other crops (42%, Jardim and Caldas, 2012). Triazofos, malathion, diazinon and esfenvalerate were found just once and were not included in Figure 7.

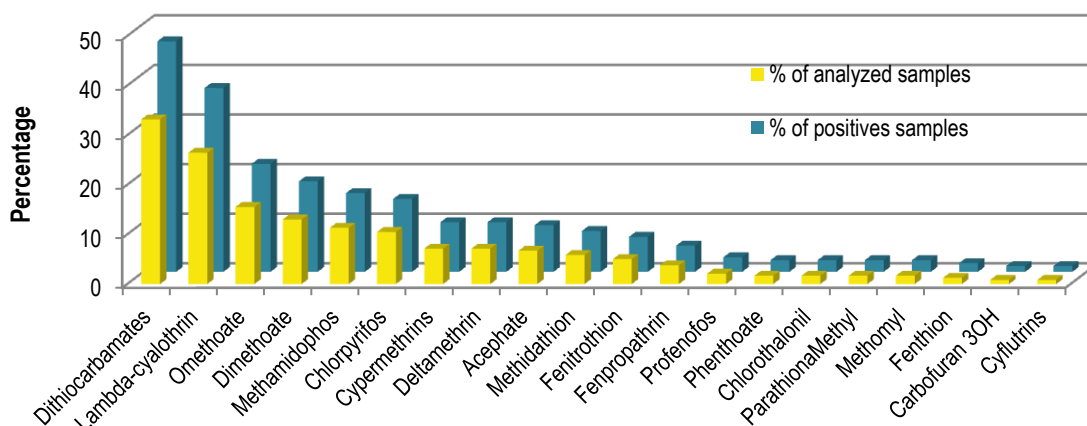


Figure 7. The pesticides most found in the analyzed samples. The percentage of the pesticides found in the total analysed sample (yellow) and total positive samples (blue).

Of the total of 238 samples analyzed, 68.1% (162 samples) presented at least one pesticide residue. Guava was the crop with the highest percent of positive samples (77.6%), and cashew with the lowest (44%). Figures 8 to 11 show the pesticide residues and the respective concentration ranges found for each crop. Dithiocarbamates were the compounds most found in cashew, khaki and peaches, and lambda-cyhalothrin was the most found in guava. Residues of at least one organophosphorus or pyrethroids were detected in all analyzed crops. The carbamate methomyl were found in one peach sample, and 3 guava samples. Carbofuran 3OH was found in only 2 frozen guava pulp samples.

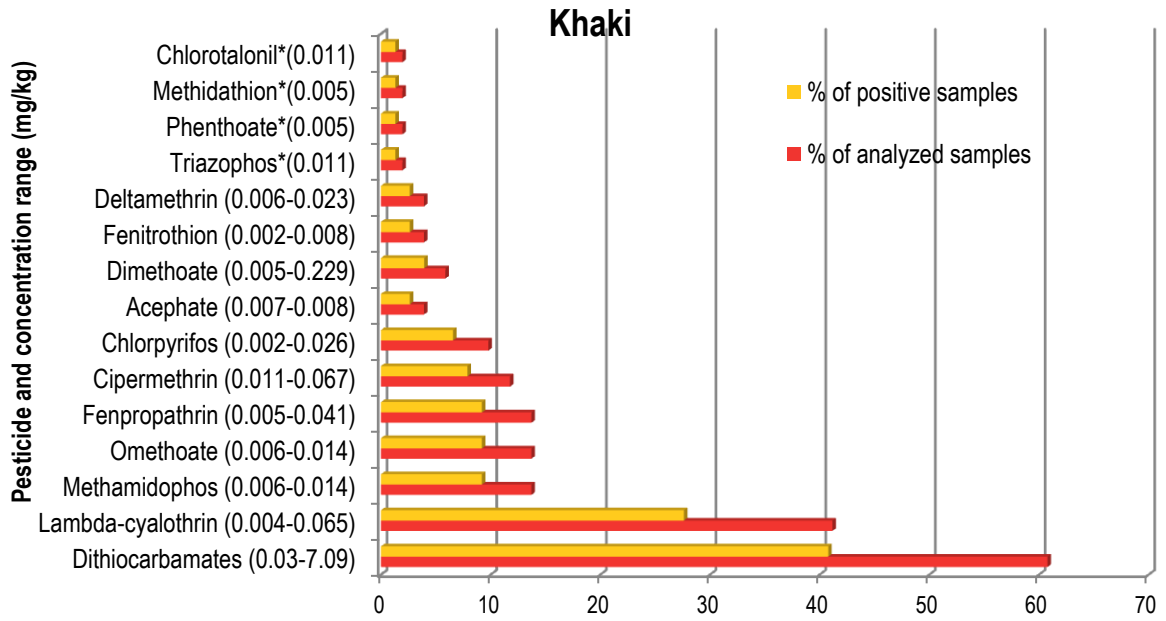


Figure 8. Pesticides residues found in khaki samples. *Only one positive sample.

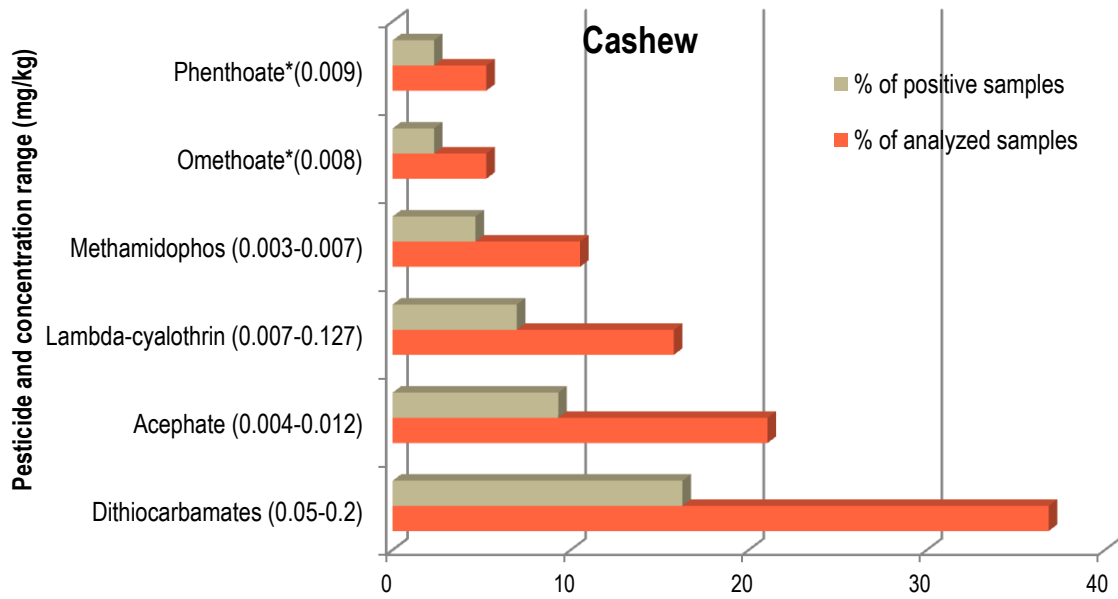


Figure 9. Pesticides residues found in cashew samples. *Only one positive sample.

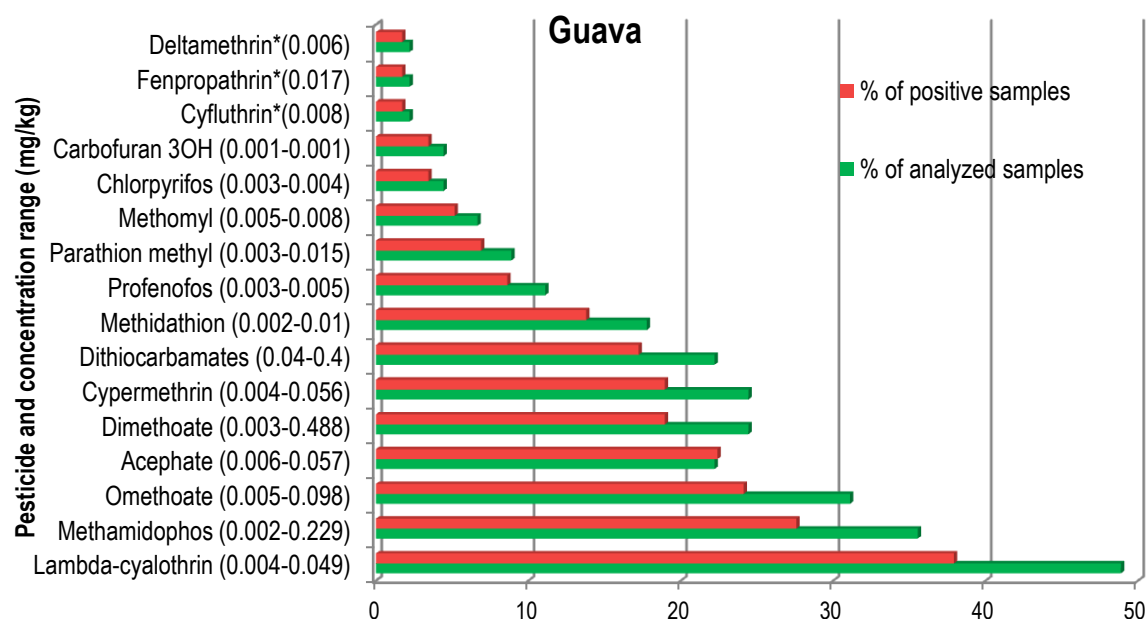


Figure 10. Pesticides residues found in guava samples. *Only one positive sample.

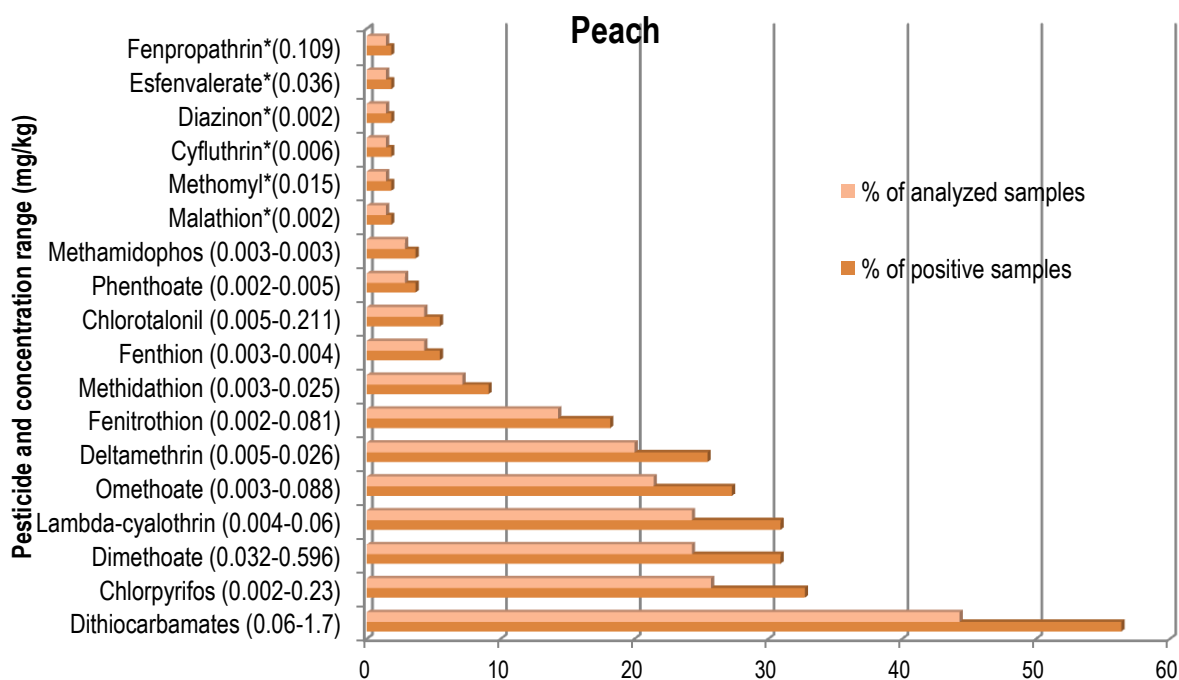


Figure 11. Pesticides residues found in peach samples. *Only one positive sample.

Pesticides residues were found in 9 of the 14 frozen guava pulp samples analyzed, and dithiocarbamates in 2 of the 11 cashew frozen pulp samples analyzed. Three positive frozen pulp samples analyzed contained dimethoate e one sample

also contained methamidophos. The mean dimethoate concentration for frozen peach pulp (n=3) was 40.1 µg/kg, lower than what was found in the whole fruit (n=14; 287.1 µg/kg). Dithiocarbamates, acephate, parathion methyl and profenofos were found in both guava fruit and pulp.

Of the pesticides analyzed by the multiresidue method, dimethoate was found at the highest levels (0.596, 0.488 and 0.229 mg/kg in peach, guava and khaki, respectively). The highest dithiocarbamate concentration was found in a khaki sample (7.09 mg/kg CS₂). In Spain, dithiocarbamates were detected in 33.3% of the 24 analyzed khaki samples and 7.5% of peach samples (Berrada et al 2010).

None of the pesticides found in khaki, cashew and guava are authorized for use on these crops in Brazil. Only 4 pesticides found in peach were within the established maximum residue levels (MRL): deltamethrin (0.04 mg/kg), fenthion (0.05 mg/kg), malathion (6.0 mg/kg) and dithiocarbamate (2.0 mg/kg CS₂) (ANVISA, 2012). The levels of these pesticides found in peach were below the MRLs (Figure 10). The use of non-authorized pesticides on Brazilian crops is a major issue in the country, accounting for 72% of all irregularities found in Brazilian monitoring programs (Jardim and Caldas, 2012). In order to increase the phytosanitary support given to certain crops, the Brazilian Government recently issued new regulation in which, when requested by the manufacturer, the MRL established for one representative crop of the group could be extended to the entire crop group (Brazil, 2010). The crops analyzed in this study are classified as “fruits with edible peel”, of which apple and grape are the representative crops. The pesticides dithiocarbamates, dimethoate, chlorpyrifos, deltamethrin, methidathion, fenitrothion, fenpropathrin, chlorothalonil and fenthion are authorized for apple, and lambda-cyhalothrin for grapes (AGROFIT, 2012). According to the new regulation, after consideration by government authorities, these MRLs may be extended to the crops analyzed in this study.

Of the total of 67 peach fruit samples collected, over half (34 samples) were imported from USA or Chile, and no residues were detected in 47%. However, all the national peach fruit and the 3 frozen pulps were positive for at least one pesticide, of which only 5 samples had authorized pesticide residues. These results were expected as exporters are more aware of trade barriers and thus commodities are more likely to contain fewer irregularities.

A total of 64.8% of the positive samples contained multiple residues (Figure 12). Guava was the crop with highest percent of multiple residues (73.3%) and cashew with the lowest (25%). Four peach samples had 7 or 8 different residues. Sixty-one samples (37.7% of positive samples) had 2 to 6 different OP residues and 3 guava samples also contained carbamates pesticide (methomyl) residues. The presence of multiresidues with the same pesticide mechanism of action may indicate that good agriculture practices are not being followed (EFSA, 2010). Other reasons may include contamination from spray drifts from neighboring plots or during crop storage.

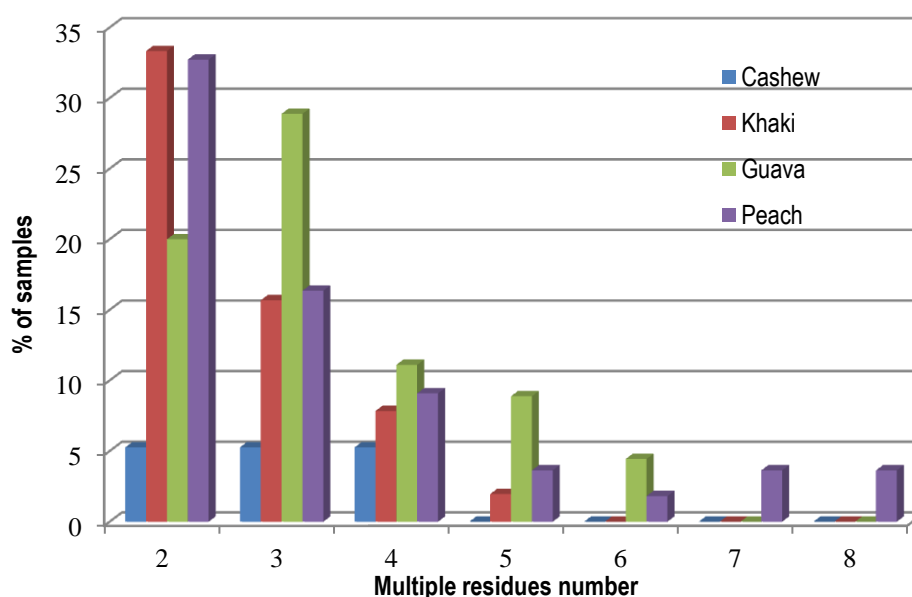


Figure 12. Multiple residues found in positive samples.

Conclusion

A multiresidue method for the analysis of 46 pesticides and metabolites using GC-FPD, GC- μ ECD and LC-MS/MS in khaki, cashew, guava and peach was successfully validated. Only carbosulfan (khaki and cashew) aldicarb sulfoxide (khaki), and dichlorvos (all matrices) gave unsatisfactory validation results. The use of ethyl acetate for extraction is preferred to acetonitrile due to its lower cost. Additionally, this solvent is more suitable for GC analysis. Furthermore, the use of selective detectors, such as FPD and μ ECD, although more time consuming, is still

the only option in some laboratories in developing countries, due to the high instrument and maintenance costs of a GC-MS/MS.

The results obtained in this study indicate that good agricultural practices are not being followed by farmers in Brazil since most of the pesticides found in the samples are not authorized for use on the crops. The fruits analyzed in this study are highly consumed in Brazil during certain months of the year and the residue data generated may complement Brazilian monitoring data for other crops and thus allow more sound exposure assessments to be conducted, mainly regarding cumulative acute exposure to organophosphorous pesticides.

References

- Agrofit. Sistema de Agrotóxicos Fitosanitários (2012). MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Available at http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
- Anastassiades M, Lehotay S, Štajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for determination of pesticide residue in produce. *J AOAC Int.* 2003; 86(2): 412 – 431.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2012). Pesticides monographs. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>.
- Aysal P, Ambrus A, Lehotay SJ, Cannavan A. Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. *J Environ Sci Heal B.* 2007; 42: 481–490.
- Banerjee K, Oulkar DP, Dasgupta S, Patil SB, Patil SH, Savant R, Adsule PG. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007; 1173: 98–109.
- Banerjee K, SaVant RH, Dasgupta S, Patil SH, Oulkar DP, Adsule PG. Multiresidue Analysis of Synthetic Pyrethroid Pesticides in Grapes by Gas Chromatography with Programmed Temperature Vaporizing–Large Volume Injection Coupled with Ion Trap Mass Spectrometry. *J AOAC Int.* 2010; 93(2): 368-379.

- Belpoggi F, Soffritti M, Guarino M, Lambertini L, Cevolani D, Maltoni C. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Ann NY Acad Sci.* 2002; 982: 123 – 136.
- Berrada H, Fernández M, Ruiz MJ, Moltó JC, Mañes J, Font G. Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months (2004/05). *Food Control.* 2010; 21: 36–44.
- Brasil. (23 de fevereiro de 2010). *Diário Oficial da União*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Conjunta, No 1, de 23 de fevereiro de 2010. 36. Seção1.
- Caldas ED, Conceição MH, Miranda MCC, Souza LCKR, Lima JF. Determination of Dithiocarbamate Fungicide Residues in Food by a Spectrophotometric Method Using a Vertical Disulfide Reaction System. *J Agr Food Chem.* 2001; 49: 4521 – 4525.
- Chen C, Qian Y, Chen Q, Tao C, Li C, Li Y. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China. *Food Control.* 2011; 22: 1114-1120.
- Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides. In: Amdur MO and Klaassen CD, editors. *Casarett and Doll's toxicology: the basis of poisons*. 6° Edição. New York: Mc Graw Hill; 2001
- EFSA (European Food Safety Authority). (2010). Annual report on pesticide residues. *EFSA Journal*, 8(6), 1646.
- European Commission (EC). Commission Directive 2006/141/EC of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC Official Journal of the European Union L 401/, 4
- Goto T, Ito Y, Yamadaa S, Matsumoto H, Okab H, Nagase H. The high throughput analysis of N-methyl carbamate pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry using a short column. *Anal Chim Acta.* 2006; 555: 225–232.
- Gowda SRA, Somashekar RK. Evaluation of Pesticide Residues in Farmgate Samples of Vegetables in Karnataka, India. *B Environ Contam Tox.* 2012; 89: 626–632.
- Hunter RE Jr, Riederer AM, Ryan PB. Method for the Determination of Organophosphorus and Pyrethroid Pesticides in Food via Gas Chromatography with Electron-Capture Detection. *J Agr Food Chem.* 2010; 58: 1396 – 1402.

- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Documento de caráter orientativo – revisão 07. 2011. 19p.
- Jardim ANO, Caldas ED. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. *Food Control*. 2012; 25: 607-616.
- Lehotay SJ, De Kok A, Hiemstra M, Van Bodegraven P. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. *J AOAC Int.* 2005a; 88(2):595-614
- Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, Hoh E, Leepipatpiboon N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J Chromatogr A*. 2010; 1217: 2548–2560.
- Lehotay SJ, Tovská KI, Lightfield AR. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. *J AOAC Int.* 2005b; 88(2): 615-629
- Li L, Liu F, Qian C, Jiang S, Zhou Z, Pan A. Determination of Organophosphorus Pesticides in *Lycium barbarum* by Gas Chromatography with Flame Photometric Detection. *J AOAC Int.* 2007; 90(1): 271-276
- Liu X, Mitrevski B, Li D, Li J, Marriott PJ. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with flame photometric detection applied to organophosphorus pesticides in food matrices. *Microchem J*. In Press, Corrected Proof, Available online 27 July 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.07.013>
- Mastovska K, Lehotay SJ. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *J Chromatogr A*. 2004; 1040(2): 259–272.
- Miller JN, Ambrus A. Chapter 9 – Statistics in calibration analysis. *Manual on Basic Statistics*, FAO/IAEA Training and Reference Centre for Food and Pesticide Control: Vienna, Australia 2000; 1–18p.
- Mol HGJ, Rooseboom A, Dam R, Roding M, Arondeus K, Sunarto S. Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 389(6): 1715–1754.
- Neto BB, Scarminio IS, Bruns RE. *Como fazer experimentos*. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman; 2010.

- Payá P, Anastassiades M, Mack D, Sigalova I, Tasdelen B, José Oliva J, Barba A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 389:1697–1714.
- Pihlström T, Blomkvist G, Friman P, Pagard U, Österdahl B. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 389: 1773–1789.
- Sanco, 12495/2011. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Available at http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf
- Schenck F, Lu JWC, Holcomb JJR, Mitchell LM. Multiresidue Analysis of 102 Organophosphorus Pesticides in Produce at Parts-per-Billion Levels Using a Modified QuEChERS Method and Gas Chromatography with Pulsed Flame Photometric Detection. *J AOAC Int.* 2009; 92(2): 561-573.
- Soderlund DM, Clark JM, Sheets PP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology.* 2002; 171: 03–59.
- Vonderheide AP, Kauffman PE, Hieber TE, Brisbin JA, Melnyk LJ, Morgan JN. Development of an Analytical Scheme for the Determination of Pyrethroid Pesticides in Composite Diet Samples. *J Agr Food Chem.* 2009; 57: 2096–2104.
- Wong JW, Hennessy MK, Hayward DG, Krynitsky AJ, Cassias I, Schenck FJ. Analysis of Organophosphorus Pesticides in Dried Ground Ginseng Root by Capillary Gas Chromatography–Mass Spectrometry and –Flame Photometric Detection. *J Agr Food Chem.* 2007; 55: 1117–1128.
- Zhao W, Sun X, Deng X, Huang L, Yang M, Zhoud Z. Cloud point extraction coupled with ultrasonic-assisted back-extraction for the determination of organophosphorus pesticides in concentrated fruit juice by gas chromatography with flame photometric detection. *Food Chem.* 2011; 127(2): 683–688.

IV. AVALIAÇÃO PROBABILÍSTICA DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO BRASILEIRA AOS RESÍDUOS DE PESTICIDAS NA DIETA E OS RISCOS PARA A SAÚDE

1. Introdução

O cálculo da ingestão de pesticidas por meio do consumo de alimentos é dependente de duas bases de dados: concentração de resíduos de pesticida no alimento e consumo do alimento/peso corpóreo (Jardim e Caldas, 2009) .

A avaliação de risco cumulativo é calculada para grupo de compostos que possuem mesmo mecanismo de ação tóxica GMC (grupo de compostos com mecanismo comum) (EPA, 2002). O GAC (grupo de compostos com avaliação comum) é um subgrupo das substâncias selecionadas no GMC para refinamento dos estudos de avaliação de risco. Uma vez que as substâncias possuem mesmo mecanismo de ação, estas também possuem efeito aditivo, diferenciando apenas na potência tóxica (Bobbis et al., 2007). Para que o efeito tóxico de cada composto possa ser considerado, é necessário normalizá-los com relação ao efeito de um composto indicador (CI). O fator de potência tóxica relativa (FPT) é aplicado à concentração de cada composto do GAC, possibilitando considerar as diferentes potências tóxicas de cada composto e estimar a exposição à todos os compostos do grupo. O FPT é a razão entre a potência tóxica do composto indicador e do composto do GAC (Equação 1). Entre as exigências para escolha do CI é a existência de dados de estudos toxicológicos comprovando que o composto possui uma curva dose-resposta bem definida para o mecanismo de ação tóxica (EPA 2002).

$$FPT_n = \frac{\text{Potência tóxica Composto indicador}}{\text{Potência tóxica}_n} \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde FPT_n é o fator de potência tóxica para o composto n em relação ao composto indicador.

Para quantificar a potência tóxica dos GAC são utilizados resultados de estudos toxicológicos conduzidos em animais de laboratório. Segundo o EPA (2002), a BMD (estimada utilizando os modelos de dose-resposta) é preferível aos valores

de NOAEL/LOAEL, pois estes últimos dependem da dose selecionada no estudo. Um bom exemplo é a BMD10, utilizada nos cálculos de exposição cumulativa aos organofosforados e carbamatos, que representa a dose em que houve 10% de inibição da enzima acetilcolinesterase com relação ao grupo controle. Entretanto, quando apenas os valores de NOAEL estão disponíveis na literatura, estes podem ser utilizados no cálculo dos fatores de potência tóxica.

Nesta etapa do projeto foi calculada a exposição cumulativa da população brasileira para as classes com mesmo mecanismo de ação tóxica organofosforados e carbamatos (aguda), piretróides (crônica), triazóis (crônica e aguda) e ditiocarbamatos (crônica).

2. Metodologia

2.1 Fatores de potência tóxica

Organofosforados e N-metilcarbamatos

Os compostos organofosforados e N-metilcarbamatos exercem seu mecanismo de ação tóxica após exposição aguda pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) no sistema nervoso central e periférico (Ecobichon, 2001). A atividade da AChE no cérebro é o efeito tóxico utilizado para calcular a potência tóxica, entretanto, dados de inibição no plasma e eritrócitos podem servir como substitutos (EPA, 2006). A Tabela 1 mostra os FPT para os compostos organofosforados e carbamatos detectados nas amostras do PARA, PNCRC e LabTox consideradas neste estudo. Alguns compostos organofosforados encontrados nas amostras analisadas (n) não foram incluídos no cálculo de exposição por não terem BMD10 ou NOAEL reportados na literatura: clortiofós (n=1) heptenofós (n=1), piridafentiona (n=1), pirimifós etílico (n=4) e protiofós (n=1).

Tabela 1. Fatores de potência tóxica (FPT) após exposição aguda calculados para os compostos organofosforados e carbamatos utilizando NOAEL ou BMD10, considerando o acefato (ACE) e o metamidofós (MET) como compostos indicadores (adaptado de Caldas et al., 2006a).

| Pesticida | NOAEL (mg/kg pc) | BMD10 (mg/kg pc) | Espécie/AChE | FPT ACE | FPT MET | Fonte |
|-------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|--------------|-------------|------------------|
| Acefato | | 0,99 | Rato/Cérebro | 1,00 | 0,08 | EPA(2006) |
| | 2,5 | | Rato/Cérebro | | | FAO(2002) |
| | 0,58* | | Rato/Cérebro | | | FAO(2002) |
| Azinfós metílico | | 0,86 | Rato/Cérebro | 1,15 | 0,09 | EPA(2006) |
| Clorfenvinfós | 0,5* | | Rato/Cérebro | 1,16 | 0,13 | FAO(1994) |
| Clorpirifós | | 1,48 | Rato/Cérebro | 0,67 | 0,05 | EPA(2006) |
| Clorpirifós metílico | | 16,2 | Rato/Cérebro | 0,06 | 0,00 | EPA(2006) |
| Diazinona | | 6,24 | Rato/Cérebro | 0,16 | 0,01 | EPA(2006) |
| Diclorvós | | 2,35 | Rato/Cérebro | 0,42 | 0,03 | EPA(2002) |
| Dimetoato | | 0,25 | Rato/Cérebro | 3,96 | 0,32 | EPA(2006) |
| Dissulfotom | | 0,07 | Rato/Cérebro | 14,14 | 1,14 | EPA(2006) |
| Etiona | 0,06* | | Cachorro/Cérebro | 9,67 | 1,12 | FAO(1990) |
| Fenitrotiona | 2,5* | | Rato/Cérebro | 0,23 | 0,03 | FAO(2000) |
| Fentiona | | 0,24 | Rato/Cérebro | 4,13 | 0,33 | EPA(2006) |
| Fentoato | 1* | | Rato/Cérebro | 0,58 | 0,07 | FAO(1984) |
| Fosmete | | 3,56 | Rato/Cérebro | 0,28 | 0,02 | EPA(2006) |
| Malationa | | 313,91 | Rato/Cérebro | 0,00 | 0,00 | EPA(2006) |
| Metamidofós | | 0,08 | Rato/Cérebro | 12,38 | 1,00 | EPA(2006) |
| | 0,3 | | Rato/Cérebro | | | FAO(2002) |
| | 0,067* | | Rato/Cérebro | | | FAO(2002) |
| Metidationa | | 0,25 | Rato/Cérebro | 3,96 | 0,32 | EPA(2006) |
| Mevinfós | | 0,11 | Rato/Cérebro | 9,00 | 0,73 | EPA(2006) |
| Monocrotofós | | 0,1 | Rato/Cérebro | 9,90 | 0,80 | NL(2003) |
| Ometoato | | 0,09 | Rato/Cérebro | 11,0 | 0,89 | EPA(2006) |
| Parationa etílica | 0,5 | | Rato/Cérebro | 5,00 | 0,60 | EPA(1999) |
| Parationa metílica | | 0,67 | Rato/Cérebro | 1,48 | 0,12 | EPA(2006) |

| Pesticida | NOAEL (mg/kg pc) | BMD10 (mg/kg pc) | Espécie/AChE | FPT ACE | FPT MET | Fonte |
|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------|------------|-----------|
| Pirazofós | 0,21* | | Rato/Cérebro | 2,76 | 0,32 | FAO(1992) |
| Pirimifós metílico | | 2,25 | Rato/Cérebro | 0,44 | 0,04 | EPA(2006) |
| Profenofós | | 20,58 | Rato/Cérebro | 0,05 | 0,004 | EPA(2006) |
| Triazofós | 0,012* | | Cachorro/Eritrocitária | 48,3 | 5,58 | FAO(2002) |
| Triclorfom | | 31,74 | Rato/Cérebro | 0,03 | 0,003 | EPA(2006) |
| Carbamatos | | | | | | |
| Aldicarbe | | 0,06 | Rato/Cérebro | 16,50 | 1,33 | EPA(2005) |
| Carbaril | | 1,58 | Rato/Cérebro | 0,63 | 0,05 | EPA(2005) |
| Carbofuran 3-OH | | 0,15 | Rato/Cérebro | 6,60 | 0,53 | EPA(2005) |
| Carbofurano | | 0,15 | Rato/Cérebro | 6,60 | 0,53 | EPA(2005) |
| Carbosulfano | 0,5 | | Rato/Cérebro | 5,00 | 0,60 | FAO(2003) |
| Metomil | | 0,49 | Rato/Cérebro | 2,02 | 0,16 | EPA(2005) |
| Pirimicarbe | | 11,96 | Rato/Cérebro | 0,08 | 0,01 | EPA(2005) |

*Baseados em estudos crônicos ou subcrônicos;

Piretróides

A ausência/presença do grupo α -ciano nas moléculas dos compostos piretróides tipos I ou II está relacionada com o aumento do tempo de inativação dos canais de sódio voltagem dependentes após exposição aguda causando retardo na repolarização do neurônio (EPA, 2011). As moléculas do tipo I permanecem um tempo menor (20 milissegundos) gerando efeitos da Síndrome T e as moléculas do tipo II podem inativar por um intervalo de tempo maior (\gg 200 milissegundos) gerando os efeitos tóxicos da Síndrome CS. Para os compostos esfenvalerato e fenproprina estes atrasos possuem intervalo intermediário aos dos tipos I e II (EPA, 2011).

A avaliação de risco cumulativa aos piretróides foi realizada utilizando os fatores de potência tóxica calculados pelo EPA (2011), utilizando dados neurocomportamentais de estudos de doses orais agudas (FOB - *functional observational battery*) para estabelecer uma medida uniforme de potência. Entre os 46 parâmetros neurocomportamentais avaliados, uma análise de componentes principais identificou 5 *endpoints*: temperatura corporal, tremores, convulsão crônica, salivagem excessiva e redução de mobilidade. As doses que geraram uma mudança

comportamental em 20% com relação ao controle foram selecionadas como o limiar para BMD (BMD20). O EPA estimou FPT para 15 piretróides considerando a deltametrina como composto indicador.

A Tabela 2 mostra os FPT para exposição aguda aos piretróides detectados nas amostras consideradas neste estudo. Dois compostos encontrados nas amostras de monitoramento (n), o etofenproxi (n=25) e a fenotrina (n=1), ambos permitidos para uso no Brasil, não foram incluídos no cálculo de avaliação cumulativa por não possuírem FPT estimados.

Tabela 2. Fatores de potência tóxica (FPT) calculados para os compostos piretróides utilizando BMD20 e deltametrina como composto indicador (EPA, 2011).

| Pesticida | BMD20 (mg/kg pc) | FPT |
|---------------------|-----------------------------|------------|
| Aletrina | 135 | 0,11 |
| Beta-ciflutrina | 12,6 | 1,15 |
| Beta-cipermetrina | 76,3 | 0,19 |
| Bifentrina | 14,3 | 1,01 |
| Ciflutrina | 12,6 | 1,15 |
| Cipermetrina | 76,3 | 0,19 |
| Deltametrina | 14,5 | 1 |
| Esfenvalerato | 40,5 | 0,36 |
| Fempropatrina | 29 | 0,5 |
| Lambda-cialotrina | 8,9 | 1,63 |
| Permetrina | 156 | 0,09 |

Triazóis

A *European Food Safety Authority* (EFSA, 2009) avaliou estudos de 26 compostos da classe dos triazóis, com uso permitido na Europa, com objetivo de avaliar a possibilidade de formar grupos de compostos com avaliação comum. A toxicidade durante o desenvolvimento gestacional foi o efeito tóxico agudo comum produzido por um número apreciável de compostos e por isso escolhido como *endpoint* para avaliações das exposições agudas. O efeito agudo específico de malformação craniofacial foi utilizado selecionar os compostos do grupo e a BMD5 escolhida para quantificar o efeito.

Nos estudos crônicos o fígado foi o alvo comum entre os triazóis. Os efeitos comuns foram a hipertrofia hepática resultando em aumento do peso do fígado. A hepatotoxicidade foi escolhida como *endpoint* para das exposições crônicas e por isso os valores de NOAEL foram escolhidos para cálculo dos FPT. A Tabela 3 mostra os valores de FPT estimados pelo EFSA (2009) e que serão utilizados neste estudo. Os compostos flutriafol (n=89), tetraconazol (n=79), metconazol (n=6) e funquinconazol (n=1) foram encontrados nas amostras de monitoramento (n), mas não apresentaram os efeitos específicos selecionados pela Agência, e o FPT não foi estimado

O composto fluzilazol foi incluído na tabela 3 por ser o composto indicador para cálculo das FPT agudo. Entretanto, não foram encontrados resíduos para este composto nas amostras analisadas.

Tabela 3. Valores de NOAEL, BMD e FPT para exposição aguda e crônica a triazóis (EFSA, 2009).

| Composto | Agudo | | Crônico | |
|---------------------------------|--------------------|------------|---------------------|----------|
| | BMD5, mg/kg pc dia | FPT | NOAEL, mg/kg pc dia | FPT |
| Ciproconazol^a | 104 | 2,2 | 2 | 1 |
| Difenoconazol | - | - | 1 | 2 |
| Epoxiconazol | 154 | 1.5 | 0,8 | 2,5 |
| Flusilazol^b | 232 | 1,0 | - | - |
| Miclobutanil | - | - | 39 | 0,05 |
| Propiconazol | 2648 | 0.1 | 3,6 | 0,6 |
| Tebuconazol | - | - | 16 | 0,1 |

a: composto indicador utilizado para cálculo dos FPT crônicos; b: composto indicador utilizado para cálculo dos FPT agudos.

Ditiocarbamatos

Os etilenobisditiocarbamatos (EBDC), subclasse dos ditiocarbamatos, podem induzir câncer em animais de laboratório por meio do metabólito etilenotiouréia (ETU) (EPA, 2001a). O valor da ingestão diária aceitável (IDA) foi estabelecida em 30 µg/kg pc (equivalente a 16,9 CS₂/kg pc/dia) pelo JMPR (FAO, 1993) para o grupo dos EBDCs (que inclui mancozebe e metiram), baseado no NOAEL com *endpoint* para efeitos na tireóide de estudos crônicos com ratos de 4,8 mg/kg pc. O composto

propinebe possui mesmo mecanismo de ação, mas por meio do metabólito propilenotiouréia (PTU), com NOAEL de 2,5 mg/kg pc (FAO, 1993).

Atualmente, a análise da presença dos fungicidas ditiocarbamatos em alimentos é realizada utilizando métodos que medem um grupo comum a todos compostos da classe, o CS₂. Esta análise não permite especificar qual o fungicida do grupo está presente na amostra. No presente estudo, seguindo metodologia de Caldas et al. (2006b), foi considerado que a fonte de CS₂ encontrado nas amostras advinha do uso de EBDCs (mancozebe ou metiram) e propinebe. Utilizando o mancozebe como composto indicador (CI), estimou-se o fator de potência tóxica para o propinebe calculado igual a 1,92 (NOAEL_{EBDC} / NOAEL_{propinebe}).

2.2 Dados de resíduos de pesticidas

Os dados de resíduos para 26 alimentos considerados neste estudo foram obtidos a partir os dados dos programas de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos da ANVISA (PARA) e do MAPA (PNCRC) a partir de 2005 (Cap. IV), atualizados com dados de 2010 do PARA e de 2010/2011 do PNCRC; e os dados obtidos nas análises realizadas no LabTox (Cap. V.2).

A Tabela 4 mostra um resumo dos resultados das amostras analisadas no PNCRC (2006-2011), PARA (2005-2010) e Labtox (2010-2012) para goiaba, pêssago, caqui e caju utilizados neste estudo. Os resultados dos dados de resíduos de pesticidas para goiaba, caju e pêssago na fruta toda e na polpa foram agrupados. No total foram analisadas 13809 amostras.

Tabela 4. Dados de resíduos de pesticidas em alimentos analisados pelo PARA, PNCRC e LabTox entre 2005 e 2012.

| Alimento | Total analisado | % amostras positivas | % de amostras positivas | | | | |
|-------------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|------|------|------|------|
| | | | DT | OP | CB | PY | TRI |
| Abacaxi | 459 | 52,5 | 6,64 | 8,30 | 3,32 | 34,4 | 6,64 |
| Alface | 877 | 35,0 | 54,4 | 24,8 | 4,23 | 17,3 | 8,79 |
| Arroz | 496 | 34,1 | 1,18 | 52,1 | 9,47 | 17 | 46,2 |
| Banana | 634 | 17,0 | 39,8 | 3,70 | 13,9 | 4,63 | 5,56 |
| Batata | 914 | 34,8 | 0,63 | 95,0 | nq | 1,26 | 0,00 |
| Beterraba | 325 | 48,3 | 22,9 | 25,5 | 0,64 | 15,9 | 52,9 |
| Caju^a | 43 | 27,9 | 58,3 | 33,3 | 8,33 | 25,0 | na |

| Alimento | Total analisado | % amostras positivas | % de amostras positivas | | | | |
|----------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| | | | DT | OP | CB | PY | TRI |
| Caqui ^a | 67 | 76,1 | 60,8 | 35,3 | nq | 72,6 | na |
| Cebola | 417 | 13,9 | nq | 81,0 | 6,90 | nq | 0,00 |
| Cenoura | 737 | 37,9 | 5,38 | 43,4 | 0,72 | 0,36 | 59,1 |
| Couve | 301 | 46,2 | 25,9 | 30,2 | nq | 51,1 | 8,63 |
| Feijão | 489 | 70,6 | 2,03 | 17,7 | 3,48 | 2,61 | 41,2 |
| Goiaba ^a | 58 | 77,6 | 22,2 | 71,1 | 11,1 | 80,0 | na |
| Laranja | 902 | 46,3 | 9,57 | 59,1 | 11,7 | 22,7 | 4,07 |
| Limão ^b | 67 | 64,2 | nq | 18,6 | 2,33 | 4,65 | 9,30 |
| Maçã | 1763 | 86,2 | 65,6 | 57,8 | 5,59 | 2,57 | 5,00 |
| Mamão | 1460 | 89,7 | 39,7 | 3,06 | 0,15 | 9,01 | 31,9 |
| Manga | 490 | 33,9 | 6,63 | 4,22 | nq | 5,42 | 3,01 |
| Melão ^b | 54 | 27,8 | 0,00 | 20,0 | nq | 20,0 | 6,67 |
| Morango | 776 | 80,7 | 15,0 | 16,3 | 0,80 | 29,1 | 24,9 |
| Pepino | 302 | 63,9 | 18,7 | 44,6 | 2,59 | 16,1 | 5,18 |
| Pêssego ^a | 70 | 77,1 | 57,4 | 61,1 | 1,85 | 63 | na |
| Pimentão | 469 | 89,6 | 25,5 | 68,8 | 22,1 | 71,90 | 18,3 |
| Repolho | 417 | 15,6 | nq | 27,7 | 4,62 | 7,69 | 10,8 |
| Tomate | 884 | 71,3 | 58,1 | 44,4 | 2,54 | 30,5 | 24,9 |
| Uva | 338 | 81,1 | 27,0 | 11,7 | 0,73 | 32,9 | 76,6 |
| TOTAL | 13809 | 57,7 | 19,2 | 20,8 | 2,5 | 10,6 | 12,1 |

nq: resultados abaixo do limite de quantificação; na: classe não analisada; DT: ditiocarbamatos; OP: organofosforados; CB: Carbamatos; PY: piretróides; TRI: triazóis. a. somente LabTox; b. somente PNCRC.

Resíduo equivalente

Na avaliação cumulativa, o resíduo de um pesticida pertencente a um determinado GAC encontrado numa amostra é calculado como o composto indicador do GAC utilizando a Eq. 2

$$R_e = C_a \times FPT_a + C_b \times FPT_b + C_c \times FPT_c + \dots + C_n \times FPT_n \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde,

R_e = resíduo equivalente do composto presente na amostra, expresso como composto indicador, em mg/kg;

C_a = concentração do composto *a* encontrado na amostra, em mg/kg;
 FPT_a = fator de potência do composto *a* em relação ao composto indicador;
 n = número de compostos do mesmo GAC encontrados numa amostra.

Fatores de processamento

Alguns alimentos analisados neste estudo devem passar por algum tipo de processamento antes de serem consumidos, que podem alterar os níveis de resíduos de pesticidas nos alimentos. Entre as formas de processamento estão preparar sucos, retirar a casca não comestível, cozinhar, assar e fritar. O fator de processamento (FP) é definido como a razão entre a concentração do pesticida no alimento depois de processado e a concentração no alimento como analisado. Este fator é então aplicado ao resíduo encontrado nas amostras analisadas para se estimar o resíduo nesta amostra após o processamento (FAO, 2009).

Neste trabalho os fatores de processamento foram utilizados apenas para os compostos organofosforados e carbamatos, por serem os mais críticos. Como o efeito do processamento na concentração do resíduo no alimento pode variar, os FPs foram definidos em uma distribuição normal utilizando as funções logarítmica ou logística dependendo do tipo de processamento (de Boer e Van der Voet, 2011a). Em uma distribuição do tipo logarítmica os fatores de processamento amostrados são sempre entre zero e um, enquanto que na distribuição logística os fatores amostrados podem ser maiores que um. Esta última é aplicada para processamentos que concentram o resíduo, como desidratar. As distribuições foram especificadas utilizando os parâmetros de processamento médio e 95 percentil disponíveis para organofosforados (Van Klaveren et al 2006 apud Boon et al 2008).

A Tabela 5 mostra os valores médios e o 95 percentil desta distribuição para cada processamento relevante para este estudo para todos os organofosforados e carbamatos. A lavagem dos alimentos antes do consumo não foi considerada por ser possível que um indivíduo consuma o alimento sem lavar.

Tabela 5. Fatores de processamento (FP) utilizados nos cálculos de exposição aos organofosforados e carbamatos em alimentos.

| Processamento | FP | |
|------------------------|-------|------|
| | médio | 95P |
| Descascar frutas | 0,44 | 0,99 |
| Descascar vegetais | 0,76 | 0,94 |
| Cozinhar/conserva | 0,74 | 0,99 |
| Assar (pão/bolo) | 0,74 | 0,99 |
| Desidratar | 0,49 | 3,18 |
| Fritar/cozinha no óleo | 0,74 | 0,99 |
| Suco | 0,67 | 0,92 |
| Marmelada/Geléia | 0,74 | 0,99 |
| Molho | 0,67 | 0,92 |

2.3 Dados de consumo de alimentos

Os dados de consumo dos alimentos analisados foram obtidos da POF 7 de 2008/2009 (Pesquisa de Orçamento Familiar) do IBGE (IBGE, 2012). Nesta pesquisa participaram 55970 domicílios dos 27 estados brasileiros e o Distrito Federal. Nesta edição, 13569 domicílios foram selecionados aleatoriamente e 34003 indivíduos com 10 anos ou mais preencheram o formulário Bloco de Consumo Alimentar Pessoal em dois dias não consecutivos para informar seu o consumo individual.

De todos os indivíduos participantes, 33618 (98,9%) consumiram pelo menos um dos 26 alimentos pertinentes ao estudo em pelo menos um dos dois dias não consecutivos. Esta população tinha em média $36,1 \pm 18,3$ anos (10-102 anos) e pesava em média $64,2 \pm 15$ kg (19-150 kg). Destes, 53,8% eram mulheres, sendo que 2,1% delas estavam grávidas no momento da pesquisa, 35,8% possuíam idade entre 12 e 45 anos, e 15,9% eram adolescentes (entre 12 e 18 anos). A Tabela 6 resume o consumo dos alimentos e suas preparações (total de 90 alimentos e preparações).

Tabela 6. Alimentos, número de dias reportados, média e desvio padrão de consumo, segundo a POF 2008/2009 (IBGE, 2012). Em destaque, os 26 alimentos para os quais dados de resíduos estão disponíveis.

| Alimentos | Nº de dias reportados^a | Média^b, g/dia | Desvio, g/dia |
|----------------------------|------------------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Abacaxi | 630 | 160,4 | 171,7 |
| Abara | 9 | 96,1 | 13,5 |
| Acarajé | 47 | 114,9 | 55,1 |
| Alface | 4783 | 37,4 | 77,4 |
| Arroz | 58503 | 189,7 | 127,6 |
| Arroz com carne seca | 87 | 215,0 | 136,5 |
| Arroz com feijão | 4 | 69,5 | 0,0 |
| Arroz com mandioca | 6 | 194,7 | 102,6 |
| Arroz com ovo | 8 | 71,2 | 57,8 |
| Arroz de cuxa | 37 | 125,3 | 64,8 |
| Arroz de leite | 123 | 285,4 | 136,6 |
| Arroz doce | 233 | 258,3 | 163,6 |
| Arroz e ave | 285 | 161,8 | 85,1 |
| Ave com batata | 20 | 150,4 | 110,8 |
| Baião de dois | 1670 | 231,0 | 146,8 |
| Banana | 9550 | 115,9 | 70,4 |
| Bananada | 36 | 43,8 | 23,0 |
| Batata | 4063 | 129,2 | 104,6 |
| Batata frita | 184 | 104,4 | 80,2 |
| Batata palha | 245 | 37,5 | 30,6 |
| Beterraba | 662 | 48,7 | 34,4 |
| Bolo de arroz | 121 | 121,6 | 78,7 |
| Bolo de banana | 138 | 118,7 | 63,1 |
| Bolo de cenoura | 639 | 102,7 | 64,8 |
| Bolo de cenoura diet/light | 2 | 60,0 | 0,0 |
| Bolo de laranja | 417 | 93,6 | 55,1 |
| Bolo de laranja diet/light | 5 | 113,9 | 32,0 |
| Caju | 179 | 270,3 | 310,8 |
| Cajuína | 39 | 319,5 | 148,1 |
| Caldo de feijão | 784 | 213,8 | 144,3 |
| Caldo de tomate | 15 | 369,4 | 159,7 |
| Caldo verde | 32 | 467,2 | 246,9 |

| Alimentos | Nº de dias reportados^a | Média^b, g/dia | Desvio, g/dia |
|--------------------|------------------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Caqui | 161 | 130,9 | 61,9 |
| Carne com batata | 209 | 147,1 | 110,9 |
| Catchup | 73 | 20,4 | 13,6 |
| Catchup diet/light | 17 | 17,4 | 10,9 |
| Cebola | 440 | 26,2 | 27,2 |
| Cenoura | 899 | 49,9 | 39,5 |
| Charuto de repolho | 13 | 68,5 | 50,8 |
| Couve | 1057 | 48,6 | 31,7 |
| Doces de caju | 4 | 37,6 | 26,2 |
| Doces de goiaba | 561 | 97,4 | 100,8 |
| Doces de pêssego | 6 | 66,7 | 16,0 |
| Farofa de banana | 58 | 48,7 | 35,9 |
| Feijão | 48440 | 247,9 | 172,4 |
| Feijão tropeiro | 310 | 110,7 | 85,7 |
| Feijoada | 530 | 434,1 | 264,0 |
| Goiaba | 398 | 255,8 | 175,0 |
| Laranja | 4354 | 286,8 | 192,0 |
| Leite com banana | 952 | 315,1 | 266,9 |
| Leite com maçã | 17 | 243,2 | 56,8 |
| Leite com mamão | 110 | 300,7 | 124,7 |
| Leite com morango | 29 | 315,8 | 107,8 |
| Limão | 165 | 79,2 | 51,2 |
| Maçã | 3953 | 166,4 | 63,2 |
| Mamão | 1914 | 205,2 | 114,2 |
| Manga | 1699 | 226,2 | 187,5 |
| Melão | 304 | 118,7 | 80,1 |
| Molho de tomate | 245 | 73,1 | 49,8 |
| Morango | 98 | 74,7 | 52,1 |
| Pepino | 522 | 29,8 | 33,3 |
| Pepino em conserva | 70 | 201,1 | 108,7 |
| Pêssego | 180 | 106,4 | 69,9 |
| Pimentão | 91 | 38,8 | 22,7 |
| Purê de batata | 738 | 121,6 | 61,7 |
| Refresco de caju | 761 | 316,8 | 178,4 |

| Alimentos | Nº de dias reportados^a | Média^b, g/dia | Desvio, g/dia |
|--------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Refresco de laranja | 170 | 371,6 | 185,6 |
| Repolho | 1019 | 55,9 | 38,3 |
| Repolho em conserva | 9 | 85,2 | 33,3 |
| Salada de maionese | 1399 | 103,6 | 56,0 |
| Salpicão | 91 | 66,8 | 37,8 |
| Suco de abacaxi | 1576 | 308,8 | 150,8 |
| Suco de beterraba | 45 | 263,2 | 76,0 |
| Suco de goiaba | 1210 | 302,0 | 138,4 |
| Suco de laranja | 5152 | 311,9 | 158,9 |
| Suco de laranja e banana | 4 | 729,2 | 206,3 |
| Suco de laranja e beterraba | 34 | 406,5 | 249,6 |
| Suco de laranja e cenoura | 28 | 264,3 | 83,8 |
| Suco de laranja, cenoura e beterraba | 96 | 246,1 | 94,4 |
| Suco de mamão | 51 | 233,6 | 89,2 |
| Suco de manga | 864 | 315,7 | 153,3 |
| Suco de melão | 48 | 292,1 | 137,5 |
| Suco de morango | 279 | 319,6 | 171,2 |
| Suco de pêssego | 113 | 336,0 | 151,6 |
| Suco de pêssego em calda | 10 | 482,0 | 189,2 |
| Tomate | 5583 | 67,8 | 45,7 |
| Tomate seco | 7 | 32,2 | 6,6 |
| Tutu | 84 | 265,7 | 257,8 |
| Uva | 448 | 159,4 | 94,5 |
| Vinagrete | 417 | 72,1 | 54,2 |

^a. dias reportados pelos 34003 indivíduos que responderam ao questionário de consumo (POF 7); ^b. média expandida para toda população brasileira, utilizando fatores de expansão fornecidos pelo IBGE.

As 73 preparações reportadas na POF e utilizadas neste estudo foram convertidas em proporção do alimento cru. Por exemplo, a quantidade final de cenoura em uma porção de bolo de cenoura consumida pelo indivíduo. Foram utilizadas três referências principais com preparações de receitas para os alimentos avaliados neste estudo. A referência Alimentos Per Capita (2007) foi utilizada para

estimar as preparações bolos e biscoitos, cereais, farofas, frutas, legumes, leguminosas, massas, molhos, sobremesas e sopas. Para cada preparação há os ingredientes, as quantidades equivalentes em grama ou mililitro, o modo de preparo, o peso da porção pronta. Nos alimentos em que a preparação do alimento consumido não estava bem discriminada, como por exemplo, o consumo de arroz com feijão, foi utilizado o Manual de Receitas e Medidas Caseiras para Cálculo de Inquéritos Alimentares: Manual elaborado para auxiliar o processamento de dados de inquéritos alimentares (2002). Outra fonte de informação utilizada nesta estimativa foi a Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras (2004). A Tabela 7 mostra as proporções dos alimentos crus presentes nas preparações reportadas na POF.

Tabela 7. Proporções dos alimentos nas preparações selecionadas neste estudo.

| Alimento preparado | Alimento cru | Proporção do alimento cru% |
|--------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Abara | Feijão | 30 |
| Acarajé | Feijão | 30 |
| Arroz com carne seca | Arroz | 60 |
| Arroz com feijão | Arroz/feijão | 66,6/33,3 |
| Arroz com mandioca | Arroz | 50 |
| Arroz com ovo | Arroz | 70, |
| Arroz de cuxa | Arroz | 90 |
| Arroz de leite | Arroz | 33 |
| Arroz doce | Arroz | 62,5 |
| Arroz e ave | Arroz | 50 |
| Ave com batata, inhame, batata baroa | Batata | 19 |
| Baião de dois | Arroz/feijão | 22,5/22,5 |
| Bananada | Banana | 48,2 |
| Batata frita | Batata | 91,4 |
| Batata palha | Batata | 91,4 |
| Bolo de arroz | Arroz | 66 |
| Bolo de banana | Banana | 29 |
| Bolo de cenoura | Cenoura | 15 |
| Bolo de laranja | Laranja | 11,5 |

| Alimento preparado | Alimento cru | Proporção do alimento cru% |
|----------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Cajuína | Caju | 129,2 |
| Caldo de feijão | Feijão | 100,0 |
| Caldo de tomate | Tomate | 63,5 |
| Caldo verde | Batata/couve | 53,3/24,4 |
| Carne com batata, inhame, batata baroa | Batata | 19 |
| Catchup | Tomate | 97 |
| Charuto de repolho | Repolho | 10 |
| Doces de caju | Caju | 50,1 |
| Doces de goiaba | Goiaba | 50,1 |
| Doces de pêsego | Pêssego | 57,3 |
| Farofa de banana | Banana | 50 |
| Feijão tropeiro | Feijão | 60 |
| Feijoada | Feijão | 29,2 |
| Leite com banana | Banana | 25,0 |
| Leite com maçã | Maçã | 30,0 |
| Leite com mamão | Mamão | 30,0 |
| Leite com morango | Morango | 30,0 |
| Salada de maionese | Batata/cenoura | 27/30 |
| Molho de tomate | Tomate | 150 |
| Pepino em conserva | Pepino | 100 |
| Purê de batata | Batata | 61,0 |
| Refresco de caju | Caju | 19,5 |
| Refresco de laranja | Laranja | 13 |
| Salpicão | Batata | 14 |
| Suco de abacaxi | Abacaxi | 40 |
| Suco de beterraba | Beterraba | 30 |
| Suco de goiaba | Goiaba | 30 |
| Suco de laranja | Laranja | 37,1 |
| Suco de laranja e banana | Laranja/banana | 50/20 |
| Suco de laranja e beterraba | Laranja/beterraba | 70/30 |
| Suco de laranja e cenoura | Laranja/cenoura | 75/30 |
| Suco de laranja, cenoura e beterraba | Laranja/cenoura/beterraba | 75/15/15 |
| Suco de mamão | Mamão | 50 |
| Suco de manga | Manga | 30 |

| Alimento preparado | Alimento cru | Proporção do alimento cru% |
|-------------------------|------------------------|----------------------------|
| Suco de melão | Melão | 52 |
| Suco de morango | Morango | 50 |
| Suco de pêsego | Pêsego | 50 |
| Suco de pêsego em calda | Pêsego | 26,8 |
| Tomate seco | Tomate | 300 |
| Vinagrete | Cebola/pimentão/tomate | 12,0/5/18 |
| Tutu | Feijão | 26,7 |

2.4 Cálculo da exposição probabilística a pesticidas na dieta

Esta etapa do estudo foi realizada em colaboração com o *National Institute for Public Health and the Environment* da Holanda (RIVM), com sede em Bilthoven. O cálculo exposição pelo método probabilístico foi realizado utilizando o software MCRA 7.1 (*Monte Carlo Risk Assessment*) desenvolvido pelo RIVM e Biometrics (*Wageningen University and Research Center*), uma ferramenta computacional elaborada para avaliar o risco de uma população exposta à substâncias químicas, por meio da dieta, baseado em dados de monitoramento (de Boer e Van der Voet, 2011) (Figura 1). O programa tem funcionamento remoto por pessoas autorizadas.

MCRA: Monte Carlo Risk Assessment
Probabilistic modelling of chemical intake from food

MCRA quantifies dietary exposure to chemicals as a distribution by combining data on food consumption with data on concentrations of chemicals in foods. Analyze your own or shared data on consumption and chemical concentrations.

Main features of MCRA are:

- Data selection from e-platform of MS Access databases, or from a simple MS Excel table
- Conversion of food-as-eaten to food-as-measured, model for brand loyalty
- Quantification of short-term exposure (personday intake) for acute risk assessment
- Quantification of long-term exposure (usual intake) for chronic risk assessment
- Relative contributions of foods to the total exposure/intake
- Modelling of exposure/intake as a function of covariates, e.g. age and gender
- Modelling of concentrations, including models for nondetects and unit variability
- Modelling of food processing effects
- Uncertainty analysis
- For acute risks comparison with external point estimates

Current version is MCRA 7.1

If you are interested in using MCRA please fill in the [registration form](#) or contact [Jacob van Klaveren](#), RIVM

MCRA is a program for Monte Carlo Risk Assessment, developed for RIVM by WUR/Biometrics to facilitate RIVM's tasks for the national food safety authority (VWA) and for cooperation in international projects (EFSA, EC-Research). MCRA started in the context of the Dutch Programme for the Quality of Agricultural Products (KAP).

[Publications and reports using MCRA](#)

Figura 1. Página inicial do MCRA (<https://mcra.rivm.nl/>).

O MCRA utiliza o modelo estocástico de Monte Carlo para calcular a exposição onde cada simulação é uma combinação de tiragens aleatórias entre valores de consumo do banco de dados de consumo diário individual e valores do banco de dados de concentração de resíduos para os alimentos consumidos. No presente estudo as estimativas foram realizadas a partir de 1.000.000 de simulações. A exposição é ajustada para o peso corpóreo do indivíduo e expressa em mg/kg pc/dia. Na distribuição dos valores de exposição individuais é possível selecionar os percentis usados para acessar o risco, comparando a IDA ou ARfD do composto indicador.

O MCRA disponibiliza várias possibilidades estatísticas de tratamento dos dados, algumas das quais são realçadas neste texto. As opções escolhidas foram sugeridas pelos colaboradores do RIVM, e uma discussão detalhada destas ferramentas está fora do escopo deste trabalho.

A figura 2 ilustra as 4 etapas principais utilizadas no MCRA:

- 1- *Data selection* – seleção dos bancos de dados de consumo e resíduos, e o composto indicador a ser avaliado. Também é possível selecionar subgrupos para exposição como sexo, idade e peso.
- 2- *Specify Model* - na escolha do modelo é especificada qual exposição será avaliado (aguda ou crônica), o número de simulações entre dados de consumo e resíduos, uso ou não de fatores de processamento e a escolha, para as amostras com resultados abaixo do LOQ, a substituição por zero ou uma fração do LOQ;
- 3- *Set and Run* - escolha dos percentis da curva de distribuição a serem reportados pelo modelo.
- 4- *View output* - nesta etapa é possível verificar os resultados.

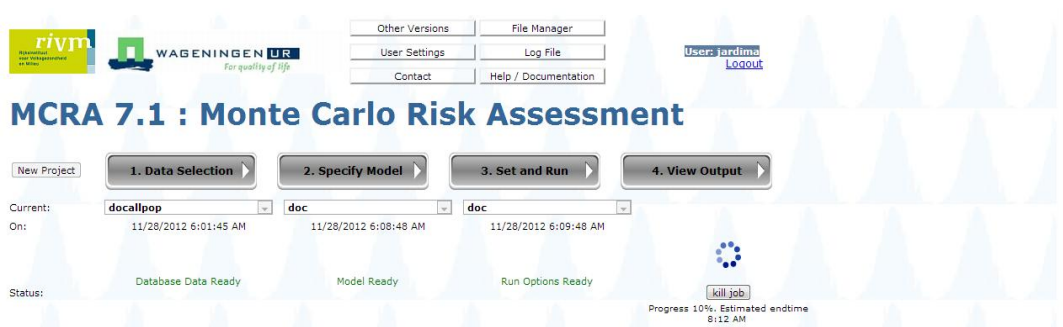


Figura 2. Menu central do MCRA.

Neste estudo, todos os alimentos analisados são incluídos para um determinado grupo de compostos e foram considerados no cálculo da ingestão, mesmo alimentos com nenhum resultado positivo. Neste caso, o resíduo foi considerado como 0, com exceção dos ditiocarbamatos (1/2 LOQ).

Exposição aguda

A exposição aguda foi estimada para os organofosforados e carbamatos, piretróides e triazóis. O modelo básico para calcular a exposição aguda é dado pela equação 3 (de Boer e Van der Voet, 2011)

$$Exp_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^p x_{ijk} c_{ijk}}{pc_i} \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde,

Exp_{ij} é a exposição do indivíduo i no dia j ($\mu\text{g}/\text{kg pc}$);

x_{ijk} é o consumo do indivíduo i no dia j do alimentos k (g);

c_{ijk} é a concentração da substância no alimento k , consumido pelo indivíduo i no dia j (mg/kg);

pc_i é o peso corpóreo do indivíduo i (kg);

p é o número de alimentos considerados no cálculo.

Exposição crônica

A exposição crônica foi estimada para os triazóis e ditiocarbamatos. Na exposição crônica o valor de c_{ijk} na equação 3 é substituído por c_k , que representa a média da concentração do pesticida encontrada em todos alimentos analisados. O MCRA disponibiliza quatro modelos para avaliar a exposição crônica: o modelo

betabinomial-normal, o modelo logístico normal-normal; o modelo discreto/semi-paramétrico e o modelo de médias individuais observadas, que normalmente superestima a estimativa (de Boer e Van der Voet, 2011). Neste estudo utilizou-se o modelo betabinomial-normal, com transformação log dos dados para ajustar melhor os dados à normalidade. Os dados de consumo individual obtido da POF 2009/2010 se referem ao que foi reportado por dois dias não consecutivos. O MCRA assume o mesmo número de dias para cada indivíduo, logo dias sem consumo de determinado alimento é considerado como zero.

Incerteza

As simulações foram realizadas para a população geral e grupos específicos da população, e os percentis P50 a P99,99 das distribuições geradas foram reportadas. A distribuição de *bootstrap* caracteriza a incerteza em cada percentil devido à incerteza da amostragem dos dados originais. O objetivo é criar uma base de dados *bootstrap* do mesmo tamanho dos dados originais de consumo e concentração com reposição dos dados originais. Repetindo este processo várias vezes é produzida uma distribuição de *bootstrap* para cada percentil e construído seu intervalo de confiança (de Boer e Van der Voet 2011). O número de iterações para cada *bootstrap* é definido na reamostragem dos *bootstrap*, que deve ser menor que o de simulações para diminuir o tempo do processo computacional. O programa MCRA apresenta o resultado final como os percentis de 2,5, 25, 75 e 97,5 da curva de distribuição da incerteza para cada percentil de ingestão. Os valores correspondentes ao 2,5 e 97,5 foram utilizados como o intervalo superior e inferior da incerteza da exposição. A Tabela 8 mostra os parâmetros das simulações realizadas pelo programa para todos os grupos de compostos.

Tabela 8. Parâmetros do MCRA utilizados para estimativa da exposição.

| Parâmetros | Exposição aguda | Exposição crônica |
|-----------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Simulações | 1.000.000 | 1.000.000 |
| <i>Bootstraps</i> | 500 | 100 |
| Reamostragem dos <i>boostrops</i> | 200.000 | 100.000 |

2.5 Caracterização do risco da exposição

A caracterização do risco da exposição cumulativa aguda para os compostos organofosforados e carbamatos, piretróides e triazóis, e crônica para os triazóis foi realizada comparando diferentes percentis de exposição aguda ou crônica estimada pelo MCRA com as ARfDs ou IDA dos compostos indicadores para cada GAC.

A caracterização do risco para os compostos ditiocarbamatos foi realizada segundo Caldas et al. (2006b), com base na expectativa de uso dos compostos ditiocarbamatos no Brasil. O uso de mancozebe ou metiram é autorizado em 34 culturas e o de probinebe em 8 culturas (ANVISA, 2012). Tiram e metam sódio são autorizados somente para uso no solo e/ou sementes e resíduos de CS₂ advindo do uso destes compostos não são esperados nos alimentos. Levando em conta este panorama, dois cenários de exposição foram avaliados. No primeiro cenário, 100% do CS₂ encontrado nas amostras analisadas vieram do uso de EBDCs (mancozebe ou metiram), e a exposição estimada pelo MCRA em cada percentil foi comparada à IDA de EBDC 16,9 CS₂/kg pc/dia (FAO, 1993). No segundo cenário, foi considerado que 70% dos resíduos de CS₂ encontrados na amostra provêm do uso dos EBDCs e 30% do uso de propinebe (Eq. 4).

$$\% IDA_{70\%EBDC + 30\%PB} = (ingestão \times 0,7 + ingestão \times 0,3 \times 1,92) / IDA_{EBDC} \quad \text{Eq. (4)}$$

Para todos os grupos, risco pode existir se a ingestão estimada exceder o parâmetro toxicológico (ARfD ou IDA), ou % IDA ou ARfD > 100 (IPCS, 2009).

3. Resultados e discussão

3.1 Organofosforados e carbamatos

A Tabela 9 mostra os resultados da avaliação de exposição cumulativa aguda a organofosforados e carbamatos quando utilizados os fatores de potência tóxica calculados com o acefato e metamidofós como composto indicador (CI) para a população geral e adolescentes. Em todos cenários considerados, a ingestão ultrapassou a ARfD no intervalo superior de P99,9. Nos cálculos utilizando o acefato como CI, a estimativa da ingestão representou 120% da ARfD e 148% da ARfD para

adultos e adolescentes, respectivamente, enquanto que para o metamidofós este percentual chegou a 118%. Independente do CI utilizado, a estimativa para adolescente foi maior que para adultos. No percentil de 99,99, todas as estimativas de ingestão média ultrapassaram a ARfD. Estes resultados indicam que o alto consumo de alimentos altamente contaminados pode representar um risco à saúde. Este é um evento agudo, que pode ocorrer eventualmente na vida de um indivíduo.

Tabela 9. Percentis da distribuição de ingestão aguda cumulativa de organofosforados e carbamatos utilizando o acefato e metamidofós como compostos indicadores

| Percentil | Acefato (ARfD=100 µg/kg pc ^a) | | Metamidofós (ARfD=10 µg/kg pc ^b) | |
|----------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------|-----------------|
| | Ingestão, µg/kg pc (IC) | %ARfD, média | Ingestão, µg/kg pc (IC) | %ARfD, média |
| População geral (10 a 104 anos) | | | | |
| 50 | 0 (0-0) | 0 | 0 (0-0) | 0 |
| 90 | 0,1116 (0,09-0,14) | 0,11 | 0,009148 (0,01-0,01) | 0,09 |
| 95 | 0,4341 (0,34-0,57) | 0,43 | 0,03617 (0,03-0,05) | 0,36 |
| 99 | 3,831 (2,59-6,17) | 3,83 | 0,3238 (0,22-0,58) | 3,2 |
| 99,9 | 55,32 (12,72-120,4) | 55,32 | 4,256 (1,16-10,1) | 42,5 |
| 99,99 | 207,7 (35,1-288,4) | 207,7 | 15,92 (3,31-24,31) | 159 |
| Adolescentes (12-18 anos) | | | | |
| 50 | 0 (0-0) | 0 | 0 (0-0) | 0 |
| 90 | 0,1047 (0,08-0,14) | 0,1 | 0,008567 (0,01-0,01) | 0,08 |
| 95 | 0,419 (0,32-0,56) | 0,42 | 0,03473 (0,03-0,05) | 0,34 |
| 99 | 4,036 (2,71-7,66) | 4,04 | 0,3544 (0,23-0,63) | 3,5 |
| 99,9 | 65,33 (14,18-148) | 65,3 | 5,129 (1,29-11,79) | 51,3 |
| 99,99 | 230,2 (40,82-349,4) | 230 | 20,18 (3,69-27,75) | 202 |

IC= intervalo inferior (2,5%) e superior (97,5%) do intervalo de confiança (95%) fornecido pelo *bootstrap*; ^a FAO, 2005; ^b FAO, 2002

Num outro estudo conduzido no Brasil com apenas nove alimentos e dados de disponibilidade de alimentos no domicílio, Caldas et al. (2006b) estimaram que a ingestão para crianças ultrapassou a ARfD no limite superior do P99,9 em 83% e 242% quando utilizados metamidofós e acefato como CI, respectivamente. A ARfD utilizada para o acefato foi 50 µg/kg pc, valor que foi atualizado pelo JMPR em 2005 para 100 µg/kg PC.

No estudo conduzido por Boon et al. (2008) na Holanda, o acefato foi o CI para organofosforados (ARfD de 50 µg/kg pc) e o oxamil para os carbamatos (ARfD=9 µg/kg pc), avaliados separadamente. A estimativa de ingestão para organofosforados ultrapassou a ARfD na média de ingestão do P99,9 para crianças em 14%. Para os carbamatos, a estimativa ficou abaixo da ARfD do oxamil em todos os percentis avaliados. Caldas et al.(2006b) e Boon et al. (2008) também utilizaram o software MCRA para estimar a ingestão.

No estudo conduzido pelo EPA (2006), o cálculo probabilístico da ingestão dos organofosforados utilizou o metamidofós como composto indicador e o software DEEMFCID (*Dietary Exposure Evaluation Model-Food Commodity Index Database*) para estimar a ingestão. O EPA utiliza a Margem de Exposição (MOE) para caracterizar o risco, que é definida como a razão entre a referência toxicológica e a estimativa da exposição. Para pesticidas, valores de MOE abaixo de 100 podem indicar risco. A MOE ficou abaixo de 100 nas estimativas de ingestão para crianças entre 1-2 anos e 3-5 anos e para adultos (acima de 20 anos) no P99,5.

O arroz foi o alimento que mais contribuiu com a ingestão cumulativa de organofosforados e carbamatos (Figura 3), tanto para a população geral quando para os adolescentes (mais que 50%), seguido da laranja (até 21% para a população geral para o metamidofós como composto indicador). No estudo de Caldas et al. (2006a), o alimento que mais contribuiu para ingestão foi o tomate, entretanto nesta avaliação dados de resíduos de pesticidas não estavam disponíveis para o arroz, alimento essencial na dieta do brasileiro. No presente estudo, o consumo de arroz inclui também 10 diferentes preparações e o consumo de laranja inclui suco de laranja, suco de laranja com outras frutas (banana/beterraba/cenoura), refresco de laranja e bolo de laranja.

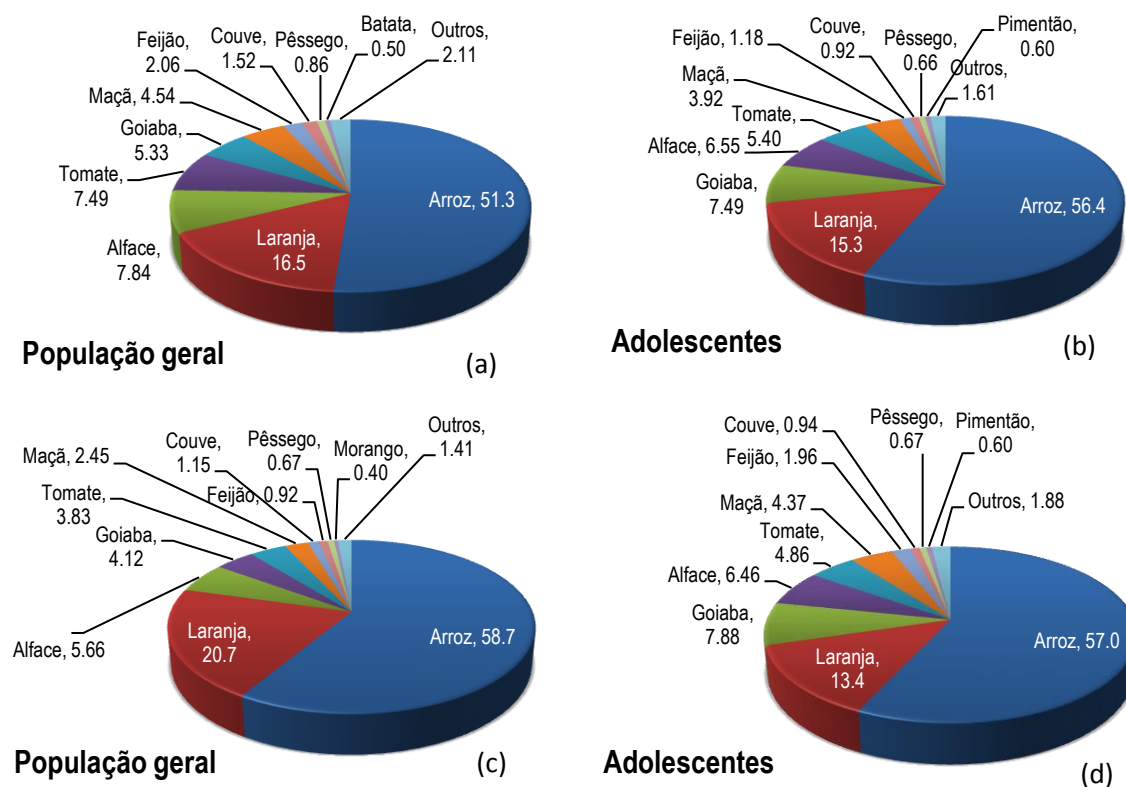


Figura 3. Os dez alimentos que mais contribuíram para ingestão de organofosforados e carbamatos (em porcentagem) pela população geral e adolescentes; metamidofós (a - b) e acefato (c - d)

3.2. Piretróides

A Tabela 10 mostra a estimativa da exposição cumulativa aguda aos piretróides. No P 99,99 a ingestão representou 15% da ARfD para a população geral e 18,6% da ARfD para adolescentes, indicando que os piretróides presentes nos alimentos não representam risco mesmo para aqueles que consomem grandes quantidades dos alimentos avaliados. Nesta estimativa não foram aplicados fatores de processamento de alimentos tornando o resultado mais conservador.

O EPA (2011) publicou o primeiro relatório sobre avaliação da exposição cumulativa para piretróides por meio do consumo de alimentos utilizando a metodologia probabilística (software DEEMFCID). Não foram aplicados fatores de processamento de alimentos. Os resultados mostraram que o menor valor de MOE obtido foi 2300, no P99,9 da distribuição de estimativa de ingestão para crianças menores que um ano. Segundo o relatório o risco associado a ingestão de piretróides estimado para crianças e adultos não é preocupante.

Tabela 10. Percentis da distribuição de ingestão cumulativa aguda de piretróides tendo deltametrina como composto indicador (ARfD=10 µg/kg pc; EPA, 2011)

| Percentis | População geral (10-104 anos) | | Adolescentes (12-18 anos) | |
|--------------|----------------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| | Ingestão, µg/kg pc (IC) | %ARfD, média | Ingestão, µg/kg pc (IC) | %ARfD, média |
| 50 | 0 (0-0) | 0 | 0 (0-0) | 0 |
| 90 | 0,001125 (0-0) | 0,01 | 0 (0-0) | 0 |
| 95 | 0,01142 (0,01-0,02) | 0,11 | 0,01065 (0,01-0,02) | 0,11 |
| 99 | 0,08253 (0,06-0,11) | 0,83 | 0,08142 (0,06-0,11) | 0,81 |
| 99,9 | 0,4596 (0,35-0,59) | 4,6 | 0,4791 (0,35-0,6) | 4,79 |
| 99,99 | 1,512 (1,15-2,22) | 15,1 | 1,859 (1,19-2,31) | 18,6 |

IC= intervalo inferior (2.5%) e superior (97.5%) do intervalo de confiança (95%) fornecido pelo *bootstrap*

As contribuições dos alimentos para estimativa da ingestão de inseticidas piretróides mostraram-se mais distribuídas quando comparada aos organofosforados e carbamatos. Ainda assim, arroz, feijão e laranja continuam entre os alimentos que mais contribuíram (Figura 4). No estudo conduzido pelo EPA (2011) os alimentos que mais contribuíram foram alface, maçã e espinafre.

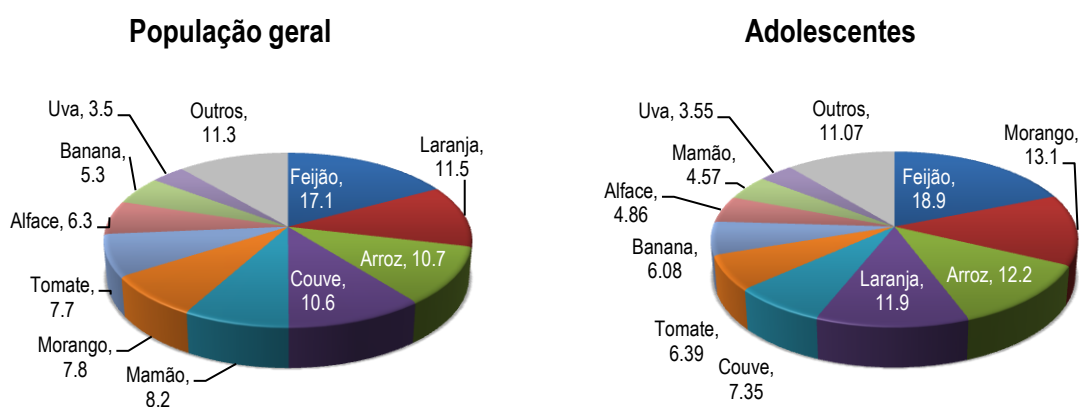


Figura 4. Os dez alimentos que mais contribuíram para ingestão total (em porcentagem) de piretróides pela população geral e adolescentes usando como a deltametrina como composto indicador

3.3 Triazóis

A Tabela 11 apresenta as estimativas da ingestão cumulativa aguda a triazóis por mulheres em idade reprodutiva (12-45 anos) e mulheres grávidas. A escolha destas subpopulações está relacionada ao efeito agudo considerado, mal formação craniofacial do feto que pode ocorrer durante a gestação. A ingestão máxima em todos cenários avaliados representou um máximo de 45% da ARfD do composto indicador (5 µg/kg pc).

Tabela 11. Percentis da distribuição de ingestão aguda cumulativa dos triazóis por mulheres em idade reprodutiva e grávidas tendo como composto indicador o fluzilazol (ARfD=5 µg/kg pc; EFSA, 2009).

| Percentil | Mulheres (12-45 anos) | | Mulheres grávidas | |
|--------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| | Ingestão, µg/kg PC (IC) | %ARfD, média | Ingestão, µg/kg PC (IC) | %ARfD, média |
| 50 | 0 (0-0) | 0 | 0 (0-0) | 0 |
| 90 | 0 (0-0) | 0 | 0 (0-0) | 0 |
| 95 | 0 (0-0) | 0 | 0 (0-0) | 0 |
| 99 | 0,02877 (0-0,06) | 0,58 | 0,03079 (0,01-0,06) | 0,62 |
| 99,9 | 0,7107 (0,08-1,54) | 14,21 | 0,7348 (0,08-1,44) | 14,7 |
| 99,99 | 2,272 (0,23-3,48) | 45,43 | 2,073 (0,29-2,73) | 41,5 |

IC= intervalo inferior (2,5%) e superior (97,5%) do intervalo de confiança (95%) fornecido pelo *bootstrap*

O consumo de arroz contribuiu com cerca de 70 % da ingestão cumulativa aguda de triazóis e o feijão com cerca de 15% (Figura 5).

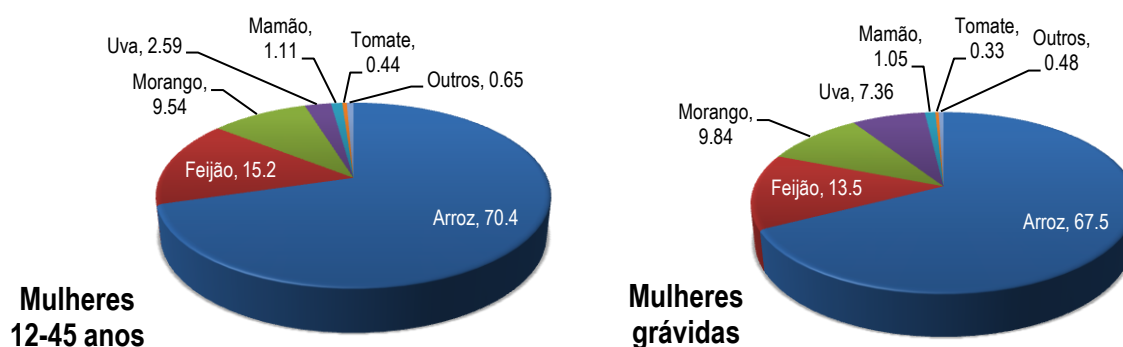


Figura 5. Os seis alimentos que mais contribuíram para ingestão total (em porcentagem) de triazóis (exposição aguda) por mulheres entre 12-45 anos e grávidas usando o fluzilazol como composto indicador.

As estimativas da ingestão cumulativa crônica aos triazóis são apresentados na Tabela 12. O maior valor de %IDA média foi obtido para adolescentes no P 99,99 (1,128%). Este resultado mostra que a possibilidade de risco pela ingestão crônica de triazóis é muito baixa.

Tabela 12. Percentis da distribuição de ingestão cumulativa crônica dos triazóis pela população geral e adolescentes usando o ciproconazol como composto indicador (IDA =20 µg/kg pc/dia; EFSA, 2009).

| Percentil | População geral | | Adolescentes | |
|--------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|
| | Ingestão, µg/kg pc/dia (IC) | %IDA, média | Ingestão, µg/kg pc/dia (IC) | %IDA, média |
| 50 | 0,012 (0,002-0,027) | 0,07 | 0,016 (0,002-0,038) | 0,08 |
| 90 | 0,035 (0,005-0,071) | 0,17 | 0,040 (0,005-0,099) | 0,20 |
| 95 | 0,045 (0,007-0,094) | 0,22 | 0,051 (0,006-0,131) | 0,26 |
| 99 | 0,028 (0,012-0,161) | 0,36 | 0,083 (0,009-0,219) | 0,41 |
| 99,9 | 0,122 (0,020-0,289) | 0,61 | 0,143 (0,016-0,389) | 0,72 |
| 99,99 | 0,192 (0,031-0,498) | 0,96 | 0,226 (0,022-0,60) | 1,13 |

IC= intervalo inferior (2,5%) e superior (97,5%) do intervalo de confiança (95%) fornecido pelo *bootstrap*

O consumo de arroz contribuiu com cerca de 80% da ingestão total de adultos e adolescentes. O feijão contribuiu com cerca de 5% e o mamão com 7% na população geral.

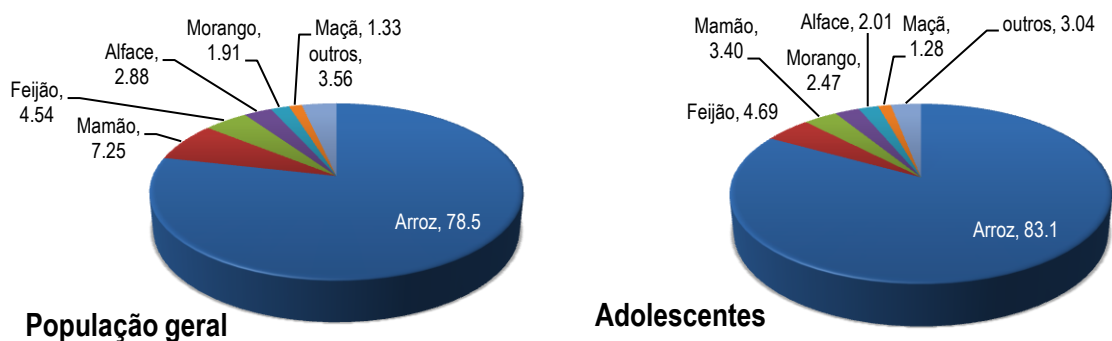


Figura 6. Os seis alimentos que mais contribuirão para ingestão cumulativa crônica (em porcentagem) de triazóis (exposição aguda) pela população geral e adolescentes usando o ciproconazol como composto indicador.

Van Klaveren et al. (2010) estimaram a exposição cumulativa aguda e crônica aos triazóis utilizando dados de resíduos e de consumo de alimentos de países da União Européia e o software MCRA. A estimativa para mulheres em idade reprodutiva (12-45 anos) foi calculada utilizando dados de monitoramento e de LMR para uma combinação alimento/pesticida e fatores de variabilidade de resíduos de 3,6, parâmetros bem mais conservadores que os utilizados neste estudo. O resultado mostrou que a partir do P90 a estimativa da ingestão já ultrapassa a dose de referência aguda (ARfD) quando o LMR foi usado. O maior valor encontrado de exposição foi para a população de mulheres da Holanda onde a estimativa de ingestão no P99,99 ultrapassou a ARfD em mais de 5000%. A ingestão crônica atingiu um máximo de 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{dia}$, principalmente pelo consumo de banana, tomate e abacaxi.

3.4 Ditiocarbamatos

A Tabela 13 apresenta os percentis da estimativa de ingestão crônica de CS_2 e a caracterização do risco nos dois cenários propostos. No primeiro, onde todo o CS_2 encontrado nas amostras de alimentos teve a origem apenas do uso dos EBDCs, a %IDA calculada no P99,99 foi 56,5% e 68,4% para a população geral e adolescentes, respectivamente. No segundo cenário, em que foi considerado 30% do CS_2 como proveniente do propinebe, %IDA calculada (P99,99) foi 72,1% e 87,3% para a população geral e adolescentes, respectivamente.

Tabela 13. Percentis de distribuição da ingestão crônica de CS₂ pela população geral e adolescentes

| Percentis | Ingestão CS ₂ , µg/kg pc | %IDA, 100 % EBDC | %IDA 30% propinebe |
|--------------------------------------|----------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| População geral (10-104 anos) | | | |
| 50 | 1,246 (1,232-1,257) | 7,4 | 9,41 |
| 90 | 2,533 (2,506-2,57) | 15,0 | 19,1 |
| 95 | 3,097 (3,058-3,149) | 18,3 | 23,4 |
| 99 | 4,512 (4,451-4,619) | 26,7 | 34,1 |
| 99,9 | 6,927 (6,65-7,138) | 41,0 | 52,3 |
| 99,99 | 9,543 (8,816-10,86) | 56,5 | 72,1 (66,6 – 82,0) |
| Adolescentes (12-18 anos) | | | |
| 50 | 1,391 (1,365-1,415) | 8,2 | 10,5 |
| 90 | 2,878 (2,81-2,964) | 17,0 | 21,7 |
| 95 | 3,535 (3,434-3,662) | 20,9 | 26,7 |
| 99 | 5,216 (5,007-5,456) | 30,9 | 39,4 |
| 99,9 | 8,02 (6,622-8,504) | 47,5 | 60,6 |
| 99,99 | 11,56 (10,3-12,64) | 68,4 | 87,3 (77,8-95,4) |

IC= intervalo inferior (2,5%) e superior (97,5%) do intervalo de confiança (95%) fornecido pelo *bootstrap*

No cálculo da estimativa de ingestão crônica de CS₂ as amostras com resultados abaixo do limite de quantificação (LOQ) foram considerados com LOQ/2 e não foram aplicados fatores de processamento. Estas condições tornam as estimativas mais conservadoras. Os ditiocarbamatos são substâncias bastante instáveis e podem degradar-se rapidamente na forma de CS₂ e ETU e PTU (etilenotiouréia e propilenotiouréia) durante o processamento do alimento. Adicionalmente, os ditiocarbamatos são pesticidas não-sistêmicos e por isso, processamento como lavar e descascar reduz significativamente a sua concentração.

No estudo conduzido no Brasil por Caldas et al. (2006b), a ingestão foi estimada utilizando dados de resíduos de CS₂ e dados de disponibilidade de consumo para 11 alimentos. No 99,99 percentil, as %IDA foram 31,1%, (100% EBDCs) e 39,7% (30% propinebe).

Arroz e feijão juntos foram os alimentos que contribuíram para mais de 70% da estimativa de ingestão tanto para a população geral como para adolescentes (Figura 7). A laranja também aparece, mas com percentual em torno de 6%. Em Caldas et al. (2006b), que também inclui dados de arroz e feijão, os alimentos que mais impactaram a ingestão foram o tomate (24%), arroz e maçã (20% cada).

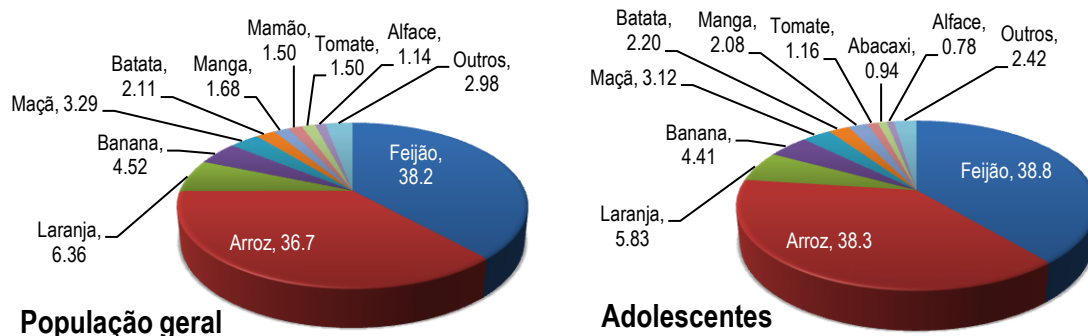


Figura 7. Os dez alimentos que mais contribuíram para ingestão cumulativa crônica (em porcentagem) dos ditiocarbamatos (expresso como CS₂) pela população geral e adolescentes.

Conclusão

Para as classes de compostos piretróides, triazóis e ditiocarbamatos, a ingestão ficou abaixo do parâmetro toxicologicamente seguro para a população geral e subpopulações (adolescentes, mulheres em idade reprodutiva ou gestantes) avaliadas. Para os compostos organofosforados e carbamatos, o limite superior do P99,9 da distribuição da ingestão ultrapassou a ARfD, indicando um potencial risco para os consumidores de grandes quantidades de alimentos contaminados. De maneira geral, os alimentos que mais contribuíram para as estimativas da ingestão foram o arroz, feijão e a laranja.

Referências

- ANVISA, Monografia de Agrotóxicos (2012). Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>. Acessado em 04/12/2012
- Araújo MOD De, Guerra TMM. Alimentos Per Capita. 3ªed. Natal: Editora da UFRN; 2007.
- Boobis AR, Ossendorp BC, Banasiak U, Hamey PY, Sebestyen I, Moretto A. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. *Toxicol. Lett.* 2007; 180:137-150.
- Boon PE, Van der Voet H, Van Raaij MTM, Van Klaveren JD. Cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Dutch diet. *Food Cheml Toxicol.* 2008; 46: 3090–3098.
- Caldas ED, Boon PE, Tressou J. Probabilistic assessment of the cumulative acute exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Brazilian diet. *Toxicology.* 2006a; 222: 132-142.
- Caldas ED, Tressou J, Boon PE. Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticides – a probabilistic approach. *Food Chem. Toxicol.* 2006b; 44: 1562-1571.
- de Boer WJ, Van der Voet H. MCRA 7.1 Reference Manual. Report Dec 2011. Biometris and RIVM. 2011. Disponível em <https://mcra.rivm.nl>.
- Ecobichon, DJ. Toxic effects of pesticides. In: Amdur, M. O. & Klaassen C.D., editors. Casarett and Doll's toxicology: the basis of poisons. 6ª Edição. New York: Mc Graw Hill; 2001.
- EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on risk assessment for a selected group of pesticides from the triazole group to test possible methodologies to assess cumulative effects from exposure through food from these pesticides on human health. Efsa panel on plant protection products and their residues (PPR Panel). Parma, Italy. *EFSA Journal* 2009; 7 (9); 1167
- EPA (Environmental Protection Agency). Guidance on cumulative risk assessment of pesticide chemicals that have a common mechanism of toxicity. Office of Pesticide Programs U.S. Environmental Protection Agency Washington, D.C. 20460. January 14, 2002. Disponível em

http://www.epa.gov/oppfead1/trac/science/cumulative_guidance.pdf. Acessado em 03/12/2012.

EPA (Environmental Protection Agency). Organophosphate Pesticides: Revised Cumulative Risk Assessment. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs June 10, 2002. Disponível em <http://epa.gov/pesticides/cumulative/rra-op/>. Acessado em 03/12/2012.

EPA (Environmental Protection Agency). Organophosphorus cumulative risk assessment – 2006 Update. U.S. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs July 31, 2006. Disponível em http://www.epa.gov/oppsrrd1/cumulative/2006-op/op_cra_main.pdf. Acessado em 03/12/2012.

EPA (Environmental Protection Agency). Pyrethrins/pyrethroid cumulative risk assessment. U.S. Environmental protection agency office of pesticide programs. October 4, 2011. Disponível em <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2011-0746-0003>. Acessado em 03/12/2012.

EPA (Environmental Protection Agency). The determination of whether dithiocarbamate pesticides share a common mechanism of toxicity. Health Effects Division Office of Pesticide Programs U.S. Environmental Protection Agency. Washington D.C. 20460 December 1, 2001a. Disponível em <http://epa.gov/oppsrrd1/cumulative/dithiocarb.pdf>. Acessado em 03/12/2012

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 1984. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. 1984. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012.

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 1993. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. 1993. Disponível em

<http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012.

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 1990. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. 1990. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012.

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 1992. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. 1992. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012.

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 1994. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. 1994. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012.

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2000. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. 2000. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012.

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2002. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on

Pesticide Residues. 2002. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012.

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2002. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. 2002. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012.

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2005. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. 2005. Disponível em <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/jmpr/jmpr-rep/en/>. Acessado em 03/12/2012.

FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization. 2009. Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed, FAO, Roma, 2009. Disponível em http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/FAO_manual2nded_Oct07.pdf. Acessado em 03/12/2012

Fisberg RM, Villar BS. Manual de Receitas e Medidas Caseiras para Cálculo de Inquéritos Alimentares: Manual elaborado para auxiliar o processamento de dados de inquéritos alimentares. 1ª ed. São Paulo: Editora Signus; 2002.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2012. Pesquisa de orçamentos familiares 2008/2009, Microdados. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/microdados.shtm. Acessado em 03/12/2012

IPCS (International Program on Chemical Safety). Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Environmental Health Criteria 240, 2009 Available from <http://www.who.int/foodsafety/chem/principles/en/index1.html>. Acessado em 02/12/2012

- Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras. 5ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2004.
- Van Klaveren JD, Noordam M, Boon PE, Van Donkersgoed G, Ossendorp BC, Van Raaij MTM, Van der Roest J. Trends in normoverschrijdingen, overschrijdingen Van de acute referentiewaarde en gesommeerde blootstelling (Trends in Exceedances of the Limit and the Acute Reference Dose, and Cumulative Exposure). 2006. RIKILT-Institute of Food Safety, Wageningen. Disponível em www.rikilt.wur.nl. Acessado em 04/12/2012
- Van Klaveren JD, Van Donkersgoed G, H. Van der Voet H, Stephenson C, Boon PE. Scientific/Technical Report submitted to EFSA Cumulative Exposure Assessment of Triazole Pesticides. RIKILT – Institute of Food Safety, Wageningen University and Research Centre. 2010. Disponível em <http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/pub/40e.htm>. Acessada em 04/12/2012

CONCLUSÕES FINAIS

Dados de monitoramento de resíduos de pesticidas de programas governamentais no Brasil mostraram que as classes de pesticidas mais presentes nas 13.809 amostras de 22 alimentos analisadas foram os ditiocarbamatos (41,6%) e os organofosforados (30,7%). Cerca de 8% das amostras positivas tinham até quatro pesticidas da mesma classe química, principalmente organofosforados (18,4%) e triazóis (16,1%), indicando a necessidade de se avaliar a exposição cumulativa dos compostos destas classes.

Os programas governamentais, porém, não incluíram algumas frutas consumidas em grandes quantidades em alguns períodos do ano, como caqui, pêsego, caju e goiaba. O alto consumo de um alimento num único dia pode representar um risco agudo da exposição aos pesticidas presentes. Para preencher esta lacuna, um método multirresíduos para análise de 46 compostos pertencentes às classes dos organofosforados, carbamatos e piretróides por GC-FFD- μ ECD e LC-MS/MS foi satisfatoriamente validado e utilizado na análise de amostras destas frutas. Das 238 amostras analisadas para estes compostos e também para os ditiocarbamatos, 61,1% apresentaram pelo menos um pesticida analisado, principalmente da classe dos ditiocarbamatos. A grande maioria das amostras positivas apresentou resíduos de pesticidas não autorizados para a cultura, indicando que as boas práticas agrícolas não estão sendo obedecidas no país.

A metodologia probabilística foi aplicada no cálculo das estimativas de exposição cumulativa aguda e crônica aos resíduos de pesticidas por meio da dieta utilizando dados de monitoramento e de consumo de alimentos para indivíduos a partir de 10 anos de idade. Para as classes de compostos piretróides, triazóis e ditiocarbamatos, a ingestão ficou abaixo do parâmetro toxicologicamente seguro para a população geral e subpopulações avaliadas. Para os compostos organofosforados e carbamatos, o limite superior do P99,9 da distribuição da ingestão ultrapassou a ARfD, indicando um potencial risco para os consumidores de grandes quantidades de alimentos contaminados. De maneira geral, os alimentos que mais contribuíram para a ingestão foram o arroz e o feijão, que compõem a base da alimentação do brasileiro, e a laranja, a segunda fruta mais frequentemente consumida no país.

A avaliação de risco da exposição de pesticida na dieta deste estudo representou um grande avanço com relação aos estudos anteriores conduzidos no Brasil, que utilizaram um número limitado de alimentos e dados de disponibilidade de alimentos no domicílio para estimar o consumo. Primeiramente, a exposição incluiu 26 alimentos para os quais dados de resíduos estavam disponíveis, e 73 preparações que continham estes alimentos, refletindo os principais alimentos consumidos pela população. Adicionalmente, o estudo utilizou dados de consumo individual, que reflete o que é realmente consumido pela população, não o que está disponível. Finalmente, este é o primeiro estudo no Brasil a avaliar a exposição cumulativa às classes de compostos triazóis e piretróides. Estudos semelhantes só foram conduzidos pela autoridade de segurança alimentar da Comunidade Europeia (EFSA) e pela agência ambiental dos Estados Unidos (EPA).

Uma limitação importante deste estudo, também identificada nos anteriores, é a ausência de dados de consumo individual para crianças, principalmente na faixa de 0-6 anos de idade. Esta população é mais sensível à exposição aos pesticidas por estarem em fase de desenvolvimento, principalmente do sistema neurológico, que é sensível aos organofosforados, carbamatos e piretróides. Adicionalmente, as crianças possuem um consumo de alimentos por peso corpóreo superior a de adultos. É essencial que as autoridades governamentais e pesquisadores da área sensibilizem o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) para a inclusão desta população na próxima pesquisa de consumo alimentar a ser realizada no país, que ocorrerá provavelmente em 2014-2015.

Os resultados deste trabalho podem ser usados pelas autoridades governamentais, principalmente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para auxiliar nas decisões de autorização de registro de um novo ingrediente ativo ou da inclusão de novas culturas no rótulo de produtos já existentes. É importante que somente substâncias com baixa toxicidade sejam autorizadas para uso em arroz e feijão, já que qualquer resíduo presente pode ter impacto importante na ingestão. Ademais, um maior número de amostras destes alimentos deve ser coletado para análise no âmbito dos programas de monitoramento de resíduos de pesticidas para auxiliar na fiscalização das boas práticas agrícolas no campo e gerar novos dados de resíduos para atualização das estimativas de ingestão.

Os alimentos de produção orgânica são uma alternativa aos produzidos de acordo com a agricultura convencional, que utiliza pesticida. Entretanto, os alimentos orgânicos possuem custo elevado e por isso não são acessíveis a todos, principalmente, às populações economicamente menos favorecidas. Além do que a oferta destes alimentos ainda é limitada.

É importante ressaltar que os benefícios associados ao consumo de alimentos contendo resíduos de pesticidas, principalmente frutas e legumes, são superiores aos eventuais riscos. Por fim, uma dieta balanceada e diversificada continua sendo a melhor estratégia para evitar a exposição excessiva a algumas substâncias químicas presentes em determinados alimentos.