

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

**Marlos Eduardo Zorzella Fontana**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUAL E MONITORAMENTO  
DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS POR GC- $\mu$ ECD EM MÉIS DO  
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

**Santa Maria, RS  
2019**

**Marlos Eduardo Zorzella Fontana**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUAL E MONITORAMENTO DE  
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS POR GC- $\mu$ ECD EM MÉIS DO ESTADO DO RIO  
GRANDE DO SUL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ionara Regina Pizzutti

Santa Maria, RS  
2019

Fontana, Marlos Eduardo Zorzella  
VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUAL E MONITORAMENTO DE  
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS POR GC-?ECD EM MÉIS DO ESTADO DO  
RIO GRANDE DO SUL / Marlos Eduardo Zorzella Fontana.-  
2019.

77 p.; 30 cm

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ionara Regina Pizzutti  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2019

1. Desenvolvimento de método analítico 2.  
Cromatografia gasosa 3. Análise de resíduos de agrotóxicos  
4. Agrotóxicos em Méis I. Pizzutti, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ionara  
Regina II. Título.

**Marlos Eduardo Zorzella Fontana**

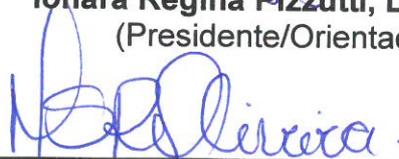
**VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESIDUAL E MONITORAMENTO DE  
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS POR GC- $\mu$ ECD EM MÉIS DO ESTADO DO RIO  
GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Curso de pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

**Aprovado em 12 de março de 2019**



**Ionara Regina Pizzutti, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



**Mari Sílvia Rodrigues de Oliveira, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**



**Maria Silvina Niell Menegazzi, Dr<sup>a</sup> (Udelar) - Videoconferência**

Santa Maria, RS

*Dedico este trabalho a ti mamadi  
que sempre foi uma incentivadora para  
que isso tudo acontecesse. Hoje aqui  
estou, concluindo este sonho que é  
nosso. Esta vitória não é minha, ela é  
muito nossa.*

*All that I am, or hope to be, I owe to my  
angel mother.  
(Abraham Lincoln)*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não foi realizado sozinho e por isso devo agradecer imensamente a algumas pessoas especiais que contribuíram de alguma forma:

- Primeiramente meus pais Maria Bernadete e Renizio, por todo suporte dado, carinho, pelo apoio e mais ainda por aguentar quando os níveis de stress estavam no último e eu só queria ficar incomunicável. Amo vocês.
- Aos meus irmãos Alexandre (*in memoriam*), Marcelo e Shaiane e aos meu sobrinhos João Otávio, Vicente e Antônio por tudo. Ao mano pelos momentos de desespero quando meu computador deu problema e eu não tinha backup de nada. A mana por todo auxilio dado. Amo vocês.
- A minha mãe científica, minha orientadora e amiga Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ionara Regina Pizzutti por todo o carinho, pela ajuda, pela dedicação, por fazer do impossível possível para que o laboratório estivesse sempre em pleno vapor para que tudo fosse possível. E obrigado também pelos puxões de orelha, com toda certeza foram necessários.
- A professora Dr<sup>a</sup> Carmem Dickow por toda ajuda com o sistema de gestão da qualidade, com os conselhos de mãe, pelos morangos orgânicos e mais ainda pelos salmos cap 126 vers 05 que veio naqueles momentos de maior desespero nesse mestrado.
- Ao professor Dr. Marcelo Barcellos pela ajuda na qualificação e todo suporte com materiais PMS (para momentos de solidão).
- A Dr<sup>a</sup>. Silvina pela prontidão em auxiliar na qualificação e na defesa. A Professora Dr<sup>a</sup> Mari Silvia por ter aceitado o convite prontamente. Muito obrigado a vocês.
- Aos meus colegas do CEPARC Barbara Reichert, Barbara J., Matheus, Maria, Dênia e Vanessa que de alguma forma ou outra contribuíram e me auxiliaram sejam pesando sulfato e PSA ou apenas aguentando os meus gostos musicais apurados. Em especial a Bárbara e a Dênia que me auxiliaram com as extrações. E a Barbara Reichert pelos momentos de crise em que faltava um pedaço de conhecimento sobre alguma coisa.
- Aos ex CEPARCIANOS, mas que de alguma forma ajudaram em meu conhecimento Ingrid, Jonatan e Cátia. Obrigado riquinhos.
- A Luizina que veio da Argentina dar início aos trabalhos e compartilhar teu conhecimento. Apesar dos pesares, obrigado por tudo.
- Agradeço a minha eterna amiga por estarmos juntinhos desde a graduação Franciele que acompanhou toda a luta e todos os momentos de desespero e que sempre esteve lá comigo. Te amo amiga, *you will Always be my person*.
- Agradeço a todos os meus amigos por em momentos de stress ou cansaço estarem lá para de alguma forma alegrar meus dias, seja ligando pra falar besteira ou me arrastando pra alguma pistinha aleatória. E mais ainda por entenderem os momentos de “eu não posso tenho que estudar/tenho que ir ao lab/tenho que escrever”.
- Agradeço IMENSAMENTE aos secretários do PPGQ-UFSM Ademir e Valéria por todo auxilio. Vocês são sensacionais.
- Agradeço aos Vigilantes por todas as vezes que vieram prontamente abrir o prédio nos finais de semana, durante a noite e sempre fizeram isso com imensa felicidade.
- A dona Tereza que sempre entrou em nossos laboratórios para limpar com um sorriso no rosto agradecendo por mais um dia de trabalho.

## RESUMO

### VALIDAÇÃO DE MÉTODO MULTIRRESÍDUAL E MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS POR GC- $\mu$ ECD EM MÉIS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

AUTOR: Marlos Eduardo Zorzella Fontana  
ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. Ionara Regina Pizzutti

Devido à complexidade de matrizes como o mel e das baixas concentrações dos pesticidas presentes, existe uma grande necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos eficientes e confiáveis para a identificação e quantificação desses resíduos. A maior vantagem de um método multirresidual é a possibilidade de determinação de uma diversidade de agrotóxicos em uma mesma análise cromatográfica. Desta forma, este trabalho realizou a validação do método multirresidual para a determinação de agrotóxicos em mel por GC- $\mu$ ECD. Foram avaliados os parâmetros de efeito matriz e linearidade da curva analítica em termos de coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e resíduos. A determinação dos limites de quantificação e detecção, exatidão e precisão foi realizada através dos estudos de fortificação/recuperação, nas seguintes concentrações: 5, 10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  em sete replicatas cada ( $n=7$ ). Para a determinação dos agrotóxicos adicionou-se 10 mL de água ultrapura em 10 g de mel seguido de agitação. Em seguida 10 mL de acetonitrila 1% ácido acético (v/v) foram adicionados e agitou-se, para a partição adicionou-se 4 g de  $\text{MgSO}_4$  e 1 g de acetato de sódio seguidos de agitação e centrifugação. Transferiu-se 2 mL para tubo contendo 300 mg de  $\text{MgSO}_4$  e 50 mg de PSA para realizar a etapa de purificação seguidos de agitação e centrifugação. Finalmente evaporou-se 1,2 mL de extrato e ressuspendeu-se em 1,2 mL de isoctano/tolueno (9:1, v/v). Adicionou-se 990  $\mu\text{L}$  do extrato em vial e 10  $\mu\text{L}$  de P.I.I. A maioria dos agrotóxicos apresentaram linearidade de 2,5 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Em relação aos limites de detecção e quantificação, 78,9% dos agrotóxicos estudados apresentaram LOD de 2,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 57,9% dos agrotóxicos apresentarem LOQ de 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 36,8% LOQ de 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 5,3% LOQ de 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os resultados obtidos para a validação foram considerados satisfatórios de acordo com o SANTE 2017. As recuperações entre 70 e 120% e RSD <20% foram obtidos para todos os agrotóxicos. O efeito matriz não teve grande influencia nos resultados na determinação dos agrotóxicos por GC- $\mu$ ECD. Amostras de méis de diferentes mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul foram analisadas e em nenhuma delas foi encontrado concentração superior ao LOQ.

**Palavras-chaves:** Agrotóxicos. Cromatografia Gasosa. Captura de elétrons. Validação analítica. QuEChERS.

## ABSTRACT

### MULTI-RESIDUAL METHOD VALIDATION AND MONITORING OF PESTICIDE RESIDUES BY GC- $\mu$ ECD IN HONEY FROM RIO GRANDE DO SUL STATE

AUTHOR: Marlos Eduardo Zorzella Fontana

ADVISOR: Dr<sup>a</sup>. Ionara Regina Pizzutti

Due to the complexity of matrices such as honey and the low concentrations of pesticides, there is a great need for the development of efficient and reliable analytical methods for the identification and quantification of these residues. The greatest advantage of a multi-residual method is the possibility of determining a variety of pesticides in the same chromatographic analysis. Thus, this work carried out the validation of the multi-residual method for the determination of pesticides in honey by GC- $\mu$ ECD. The parameters of matrix effect and linearity of the analytical curve were evaluated in terms of coefficient of determination ( $r^2$ ) and residues. The determination of the limits of quantification and detection, accuracy and precision was performed through the fortification/recovery studies, in the following concentrations: 5, 10, 20 and 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in seven replicates each ( $n=7$ ). For the determination of pesticides 10 mL of ultrapure water was added to 10 g of honey followed by stirring. Then 10 ml of acetonitrile 1% acetic acid (v/v) were added and stirred. To the partition step was added 4 g of  $\text{MgSO}_4$  and 1 g of sodium acetate followed by stirring and centrifugation. 2 mL was transferred into the tube containing 300 mg of  $\text{MgSO}_4$  and 50 mg of PSA to perform the purification step followed by stirring and centrifugation. Finally 1.2 mL of extract was evaporated and resuspended in 1.2 mL of isooctane/toluene (9:1, v/v). 990  $\mu\text{L}$  of the extract in vial and 10  $\mu\text{L}$  of I.I.S. Most pesticides presented linearity of 2.5 to 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Regarding to limits of detection and quantification, 78.9% of the pesticides studied presented LOD of 2.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 57.9% of pesticides presented LOQ of 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 36.8% LOQ of 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 5.3% LOQ of 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The results obtained for the validation were considered satisfactory according to the SANTE 2017. The recoveries between 70 and 120% and RSD <20% were obtained for all pesticides. The matrix effect had no great influence on the results in the determination of pesticides by GC- $\mu$ ECD. Honey samples from different regions of Rio Grande Sul were analyzed and none of them presented concentration values higher than LOQ.

**Key-words:** Pesticides. Gas chromatography. Electrons Capture detector. Analytical validation. QuEChERS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quantidade de mel produzida em toneladas pelos 11 maiores países produtores de mel no mundo.....	21
Figura 2- Participação das 5 maiores Unidades de Federação produtoras de mel (%). .....	21
Figura 3 - Esquema da sequência do método de Quechers .....	32
Figura 4 - Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás típico.....	34
Figura 5 - Modos de interação entre a fase móvel e a fase estacionária em cromatografia gasosa.....	37
Figura 6 - Representação gráfica de linearidade, faixa de trabalho, faixa linear de trabalho e sensibilidade. ....	40
Figura 7 - Mapa com as 7 mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul .....	47
Figura 8 - Esquema do procedimento de extração pelo método QuEChERS empregado neste trabalho. ....	49
Figura 9 - Cromatograma total dos agrotóxicos obtidos através da injeção de uma solução mistura a $200\mu\text{g L}^{-1}$ demonstrando os tempos de retenção. ....	53
Figura 10 - Cromatograma total obtido pro GC- $\mu$ ECD através da análise do extrato "branco" de matriz.....	54
Figura 11 - Cromatograma total obtido pro GC- $\mu$ ECD dos solventes e reagentes empregados na determinação dos agrotóxicos.....	55
Figura 12 - Resíduos da curva analítica do agrotóxico Heptacloro obtida a partir de soluções analíticas preparadas em extrato "branco" de matriz. ....	57
Figura 13 - Comparação entre as curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas de gama-HCH, preparadas em isoctano/tolueno (9:1, v/v) e em extrato "branco" de matriz. ....	58
Figura 14 - Comparação entre as curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas de Ciflutrina, preparadas em isoctano/tolueno (9:1, v/v) e em extrato "branco" de matriz. ....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição geral do mel.....	20
---	----

Tabela 2 - Limites máximos de resíduos em $\mu\text{g kg}^{-1}$ de acordo com os órgãos Brasileiros e Europeu.....	24
Tabela 3 - Tipos de agrotóxicos mais comuns e respectivos organismos-alvo. ....	26
Tabela 4 - Nome, fornecedor, pureza, classe química e cas number dos materiais de referências utilizados no preparo das soluções estoque. ....	44
Tabela 5 - Tempo de retenção para cada um dos agrotóxicos analisados. ....	52
Tabela 6 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos para os agrotóxicos analisados por GC- $\mu$ ECD a partir das soluções 2,5; 5; 10; 20; 50; 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ ..	56
Tabela 7 - Efeito matriz percentual dos agrotóxicos analisados por GC- $\mu$ ECD a partir das soluções preparadas em isoctano/tolueno (9:1, v/v) e em extrato "branco" de matriz.....	58
Tabela 8 - Valores médios (n=7) de recuperação, RSD%, LOD e LOQ obtidos nos estudos de fortificação/recuperação através das análises de extrato "branco" de mel fortificado nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ .	60
Tabela 9 - Comparação entre os valores médios de recuperação obtidos através da análise de extrato "branco" de mel fortificado nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g k}^{-1}$ (n=7), realizada por dois analistas, no intervalo de 7 dias.	62
Tabela 10 - Resultados estatísticos do teste t para análise de precisão intermediária dos ensaios de recuperação/fortificação com valor de confiança de 95% (n=7).....	63
Tabela 11 – Concentrações dos agrotóxicos obtidos após análise por GC- $\mu$ ECD das amostras do grupo 1 (n=3).....	66
Tabela 12- Concentrações dos agrotóxicos obtidos após análise por GC- $\mu$ ECD das amostras do grupo 2 (n=3).....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
a	Coeficiente angular
a.C.	Antes de Cristo
b	Coeficiente linear
CCD	Cromatografia em camada delgada
CP	Cromatografia em papel
DDD	diclorodifenildicloroetano
DDE	diclorodifenildicloroetileno
DDT	diclorodifeniltricloroetano
ECD	Detector por captura de elétrons (do inglês, <i>electron capture detector</i> )
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
GC	Cromatografia Gasosa
HCB	Hexaclorobenzeno
HCH	Hexaclorociclohexano
IC	Cromatografia iônica
LC	Cromatografia Líquida
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento
Mercosul	Mercado Comum do Sul
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio
min	Minutos
NaCl	Cloreto de Sódio

P.I.I.	Padrão interno do instrumento
P.I.P.	Padrão interno do procedimento
PNCRC	O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PSA	Amina primária secundária
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
RSD	Desvio padrão relativo
s	Segundos
S	Desvio padrão

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos Gerais</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>ABELHAS</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Apicultura brasileira</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>O MEL</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Características nutricionais</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Importância econômica</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Contaminação de agrotóxicos em mel</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2.3.1</b>	<i>Limites Máximos de Resíduos</i> .....	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>AGROTÓXICOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Organoclorados</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Organofosforados</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Pirazol</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Piretroides</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4</b>	<b>ANÁLISE DE RESÍDUO DE PESTICIDA</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Método de extração <i>QuEChERS</i></b> .....	<b>31</b>
<b>3.5</b>	<b>CROMATOGRAFIA</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Cromatografia Gasosa</b> .....	<b>34</b>
<b>3.5.1.1</b>	<i>Gás de arraste</i> .....	<b>35</b>
<b>3.5.1.2</b>	<i>Sistema de injeção de amostra</i> .....	<b>35</b>
<b>3.5.1.3</b>	<i>Colunas</i> .....	<b>36</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Detector por captura de elétrons</b> .....	<b>38</b>
<b>3.6</b>	<b>VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS</b> .....	<b>38</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Seletividade</b> .....	<b>39</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Linearidade/Faixa de Trabalho/ Faixa Linear de Trabalho/ Sensibilidade</b> .....	<b>40</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Limite de detecção e Limite de Quantificação</b> .....	<b>41</b>
<b>3.6.4</b>	<b>Tendência/Recuperação</b> .....	<b>42</b>
<b>3.6.5</b>	<b>Precisão</b> .....	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>INSTRUMENTAÇÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>MATERIAIS</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3</b>	<b>SOLVENTES E REAGENTES</b> .....	<b>43</b>
<b>4.4</b>	<b>GASES</b> .....	<b>44</b>
<b>4.5</b>	<b>MATERIAS DE REFERÊNCIA</b> .....	<b>44</b>
<b>4.6</b>	<b>PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS</b> .....	<b>45</b>
<b>4.6.1</b>	<b>Preparo da solução estoque</b> .....	<b>45</b>

4.6.2	Preparo da solução analíticas de trabalho .....	45
4.6.3	Preparo de solução mistura.....	46
4.6.4	Preparo do solvente de extração .....	46
4.7	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	46
4.8	AMOSTRAS DE MEL .....	47
4.9	PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO .....	47
4.9.1	Procedimento de fortificação e extração do “branco” .....	47
4.10	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	49
4.10.1	Curva analítica, linearidade e efeito matriz .....	49
4.10.2	Controles de qualidade .....	50
4.10.3	Precisão e Precisão Intermediária .....	50
4.10.4	Exatidão.....	51
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>51</b>
5.1	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	51
5.2	ANÁLISE DOS SOLVENTES, REAGENTES E DA AMOSTRA “BRANCO”...54	
5.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	55
5.3.1	Curva analítica e linearidade .....	55
5.3.2	Avaliação do efeito matriz.....	57
5.3.3	Limites de detecção e quantificação.....	59
5.3.4	Precisão Intermediária .....	61
5.3.5	Exatidão.....	64
5.4	MONITORAMENTO EM AMOSTRAS DE MEL.....	65
5.5	CONTROLES DE QUALIDADE .....	68
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
	<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>75</b>
	<b>APÊNDICE 2.....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A população mundial vem crescendo continuamente nas últimas décadas e estima-se que em 2050 a população mundial chegue a 9,8 bilhões de pessoas, aproximadamente 31% a mais do que a estimativa do ano de 2017 (WORLDPOPDATA, 2017). Dessa forma, o setor da agricultura vem realizando grandes esforços para aumentar a produção de alimentos e suprir a demanda interna e externa.

O avanço da tecnologia tem levado ao incremento da produção de alimentos e com isso a segurança alimentar tem sido um tópico cada vez mais importante em assuntos governamentais, não apenas no sentido de produção, mas também para que os parâmetros de qualidade e segurança sejam respeitados. Com isso, além da qualidade nutricional, os Limites Máximos de Resíduos (LMR) tanto químicos como microbiológicos estão sendo cada vez mais rigorosos.

Os agrotóxicos são vastamente aplicados em todo o mundo em uma diversidade de locais, que variam desde aplicação domissanitária até grandes lavouras e plantações. O uso de agrotóxicos possui benefícios inquestionáveis, como por exemplo, matar insetos/plantas daninhas que podem dizimar plantações e reduzir a capacidade produtiva (AKTAR, SENGUPTA e CHOWDHURY, 2009).

Entretanto o uso incorreto dos agrotóxicos, o descarte impróprio de resíduos de aplicação e os resíduos de agrotóxicos provenientes de lavagens de maquinários podem se difundir no meio ambiente chegando a solos e rios (GEBLER, 2011). Com isso pode então ocorrer à contaminação indireta de plantas e flores onde abelhas fazem a polinização.

O setor de apicultura brasileiro vem crescendo cada vez mais o valor da produção de mel em 2016 foi de R\$ 470,51 milhões, um acréscimo de 31,5%, impulsionado pelo aumento da demanda e pela valorização do mel como produto saudável. A Região sul apresentou a maior cooperação para esse crescimento, sendo responsável por 43,1% da produção brasileira, com o estado do Rio Grande do Sul como o maior contribuinte (IBGE, 2019).

Devido a crescente exportação do mel brasileiro para o mercado externo, os LMR devem estar de acordo com os estabelecidos pelo país de destino, os quais podem ou não ser iguais aos estabelecidos no Brasil. Em vários casos, os LMR do país de destino é menor que o Brasileiro e isso então institui uma pressão para que

métodos analíticos sejam desenvolvidos para atingir limites de quantificação (LOQ) cada vez menores e nas mais diversas matrizes, incluindo as de matrizes de origem animal.

Vários métodos analíticos multirresiduais vêm sendo desenvolvidos e validados para diversas matrizes. Um método que tem notório destaque foi o desenvolvido por Anastassiades et al. em 2003, o método baseia-se na extração com solvente orgânico acetonitrila e alega ser simples, rápido, fácil, barato e seguro, conhecido mundialmente como o método de QuEChERS.

Juntamente aos métodos de extração a cromatografia vem apresentando vasta aplicabilidade na separação desses compostos orgânicos e quando acopladas a um detector, significativa capacidade de quantificação.

O mel foi escolhido para este estudo em virtude do seu crescimento econômico e de exportação, juntamente ao fato do estado do Rio Grande do Sul ser o maior produtor brasileiro. Juntamente a isso diversas colmeias de abelhas foram dizimadas em diversas regiões do estado do Rio Grande do Sul com fortes indícios de contaminação por agrotóxicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar de um método cromatográfico para determinação multirresidual de agrotóxicos em mel.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os parâmetros de validação para os 19 agrotóxicos validados a fim de que os limites de quantificação atendam os LMR.
- Aplicar o método validado em amostras de mel disponíveis aos consumidores em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ABELHAS

As abelhas surgiram do processo evolutivo das vespas que trocaram o hábito alimentar de pequenos insetos pelo pólen das flores há cerca de 135 milhões de anos. Atualmente mais de 20 mil espécies de abelhas são conhecidas e estima-se que existam mais 40 mil espécies não descobertas. Contudo, apesar deste grande número de espécies somente 2% das espécies produzem mel. As abelhas do gênero *Apis* são as mais conhecidas como produtoras de mel (CAMARGO; PEREIRA; LOPEZ, 2002).

Em torno de 2400 anos a.C., as abelhas eram cultivadas em potes de barro pelos egípcios para facilitar o transporte dos enxames e serem colocadas nas proximidades da residência do produtor. Os egípcios são considerados os primeiros cultivadores de abelhas, contudo a palavra colmeia tem origem grega, pois os povos gregos colocavam os enxames em invólucros com formato de sino (CAMARGO; PEREIRA; LOPEZ, 2002).

No Brasil as abelhas da espécie *Apis mellifera* foram introduzidas somente em meados de 1840, provenientes da Espanha e Portugal. Em 1845, a abelha *Apis mellifera mellifera* foi introduzida no sul do país pelos imigrantes alemães e mais tarde, entre 1870 a 1880, a espécie *Apis mellifera ligustica* foram introduzidas pelos italianos (CAMARGO; PEREIRA; LOPEZ, 2002).

O néctar é transportado para a colônia, primeiramente sofre algumas alterações como, por exemplo, a perda de água, outras alterações como composição química também ocorrem. Após essas mudanças ele é então armazenado nos alvéolos. O néctar pode ter variação de açúcares entre 3% e 87%, contudo na grande maioria dos casos essa variação fica restrita entre 30% e 40%. Durante o transporte, o néctar sofre transformações devido a secreções de várias glândulas, principalmente das glândulas hipofaringeanas, que introduzem enzimas ao material original (CAMARGO et al., 2006).

De acordo com ITIS (2013) as abelhas possuem a seguinte classificação taxonômica: reino Metazoa, filo artrópode, classe inseto, ordem hymenoptera e família apidae.

### 3.1.1 Apicultura brasileira

Oficialmente a apicultura brasileira teve início em 1839 quando o padre Antônio Carneiro fez a importação de mais de 100 colônias de abelhas provenientes da região do Porto/Portugal. Contudo, apenas 7 colônias chegaram com vida ao Brasil e foram instaladas na praia de Formosa/RJ. (A.B.E.L.H.A, 2015)

Entre 1845 e 1880 imigrantes alemães e italianos introduziram mais espécies de abelhas *Apis mellifera* nas regiões sul e sudeste do Brasil. Inicialmente a apicultura iniciou como *hobby* para a produção de cera. A apicultura brasileira teve um início bastante rudimentar em quintais de apicultores com poucas técnicas de manejo, uma vez que as abelhas não apresentavam comportamentos agressivos (A.B.E.L.H.A, 2015).

Até meados de 1950 o Brasil apresentava baixas produções de mel não ultrapassando a casa de 8 mil toneladas/ano pois as abelhas não estavam totalmente adaptadas às condições climáticas tropicais do Brasil. Outro grande problema foi a acariose e a nosemose, doenças que dizimaram centenas de colônias. Com a finalidade de aumentar a resistência das abelhas frente a essas doenças em 1956 o professor Warwick Estevam Kerr, com apoio do Ministério da Agricultura, dirigiu-se à África para selecionar colônias de abelhas africanas *Apis mellifera scutellata*. As abelhas rainhas foram então introduzidas em um apiário experimental em Rio Claro a fim de serem comparadas com as abelhas europeias. Contudo 26 colônias foram mortas 45 dias após a chegada ao Brasil (A.B.E.L.H.A, 2015; PEREIRA e LOPES [2013]).

As abelhas africanas encontraram condições climáticas bastante propícias e excelente vegetação para se propagarem e cruzarem. O cruzamento de abelhas africanas e abelhas europeias deu origem a abelhas africanizadas com comportamento agressivo, porém muito produtivas. Com isso a apicultura brasileira foi forçada a modernização, ao aumento de investimentos para pesquisa e melhorias na profissionalização da atividade (PEREIRA e LOPES [2013]).

## 3.2 O MEL

De acordo com o *Codex Alimentarius Commission*, (2001) o mel é a substância doce natural produzida pelas abelhas a partir do néctar das plantas ou das

secreções de partes vivas de plantas ou excreções de insetos sugadores de plantas nas partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam combinando com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam no favo da colmeia para amadurecer.

De acordo com a Instrução Normativa nº11 de 2000 o mel pode ser classificado quanto sua origem: mel floral é o mel obtido dos néctares das flores, podendo ser unifloral ou multifloral. O mel de melato é o mel obtido principalmente a partir de secreções das partes vivas das plantas ou excreções de insetos sugadores de plantas. Pode ainda ser classificado segundo o procedimento de obtenção de mel do favo e por ultimo segundo sua apresentação e/ou processamento (BRASIL, 2000).

### **3.2.1 Características nutricionais**

A composição do mel varia de acordo com a flor de origem. O mel é composto por pelo menos 181 substâncias tendo como os principais açúcares produzidos a frutose e glicose. Além desses dois monossacarídeos também se encontram outros dissacarídeos como por exemplo maltose, sacarose, maltulose, turanose, kojibose, isomaltose entre outros. Também se encontra trissacarídeos como erlose, centose, maltotriose, isopanose entre outros. Juntamente a estes carboidratos o mel apresenta enzimas, aminoácidos, proteínas, flavonoides, ácidos fenólicos e grupos diversos (AHMED et al, 2018).

Existem 26 aminoácidos reportados no mel entre eles a prolina é a que apresenta maior quantidade (50-85% dos aminoácidos totais). Os elementos traços que podem estar presentes são cálcio (Ca), ferro (Fe), zinco (Zn), potássio (K), fósforo (P), magnésio (Mg), selênio (Se), cromo (Cr) e manganês (Mn). Outro grupo que constitui o mel são as vitaminas em quantidades pequenas entre elas estão riboflavina, niacina, ácido fólico, ácido pantotênico, vitamina B6 e ácido ascórbico (AHMED et al, 2018). A Tabela 1 apresenta a composição média dos principais constituintes.

Tabela 1 - Composição geral do mel

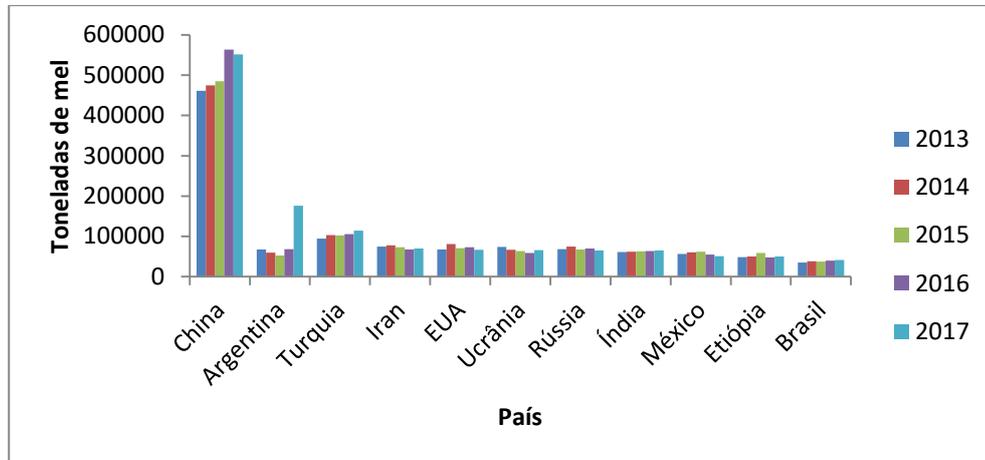
<b>Componente</b>	<b>Valor/100 g</b>
Carboidratos totais	82,4 g
Frutose	38,5 g
Glicose	31,28 g
Sacarose	1,31 g
Maltose	7,31 g
Ácido total como glucônico	0,57 g
Teor de umidade	17,1 g
Cinzas	0,169 g
Fibras	0,2 g
Aminoácidos/Proteínas	0,3 g
N	0,041 g
Fe	0,42 mg
K	52 mg
Ca	6 mg
P	4 mg
Mg	2 mg
Cu	1-100 µg/g
Zn	0,22 mg
Vitamina B2	0,038 mg
Vitamina B3	0,21 mg
Vitamina B5	0,068 mg
Vitamina B6	0,024 mg
Vitamina B9	2 µg
Vitamina C	0,5 mg
Grupos diversos	-

Fonte: (AHMED et al, 2018).

### 3.2.2 Importância econômica

O Brasil, até 1990, ocupava a 25ª posição no ranking global na produção de mel. Os últimos dados disponíveis pela FAO (2019) colocaram o Brasil como o 11º país produtor de mel no mundo em 2017, conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1 - Quantidade de mel produzida em toneladas pelos 11 maiores países produtores de mel no mundo.



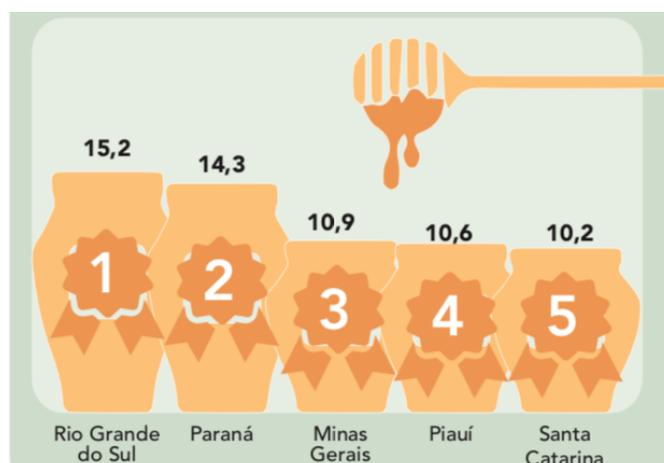
Fonte: (FAO, 2019).

A produção brasileira cresceu aproximadamente 5% de 2016 para 2017. O valor da produção brasileira atingiu a marca dos R\$ 513,9 milhões (IBGE, 2019).

Dentre as 5 regiões existentes no Brasil a região Sul foi a principal produtora de mel, responsável por 39,7% da produção total do país no ano de 2017. A região nordeste do país, após uma crescente da ocorrência de chuvas, correspondeu a 30,7% da produção de mel. Em terceiro lugar ficou a região sudeste (23,8%) seguidos das regiões centro-oeste (4,3%) e norte (1,5%) (IBGE, 2019).

Os estados que apresentaram destaque na produção em 2017 estão apresentados na Figura 2. O Rio Grande do Sul foi o maior produtor de mel de 2017 (15,2%) seguido do Paraná, Minas Gerais, Piauí e Santa Catarina.

Figura 2- Participação das 5 maiores Unidades de Federação produtoras de mel (%).



Fonte: (IBGE, 2019.)

### 3.2.3 Contaminação de mel por agrotóxicos

A perda de colônias de abelhas melíferas tem sido atribuída a uma multiplicidade de causas, incluindo práticas de manejo, estresse, patógenos, exposição a agrotóxicos e mudanças climáticas. Os efeitos negativos da exposição a agrotóxicos em abelhas são bem estudados e inclui longevidade de abelha operária encurtada, diminuição da sobrevivência e peso de rainhas e baixa vitalidade da colônia. A exposição a agrotóxicos sintéticos também aumenta em significância com pressões antrópicas como agricultura e urbanização. As mudanças no uso da terra resultam não apenas na fragmentação das áreas forrageiras, mas também no uso impróprio de herbicidas, fungicidas e inseticidas que podem ser problemáticos para as abelhas em baixas concentrações (FULTON et al., 2019; RAMOS et al., 2018).

As abelhas podem patrulhar áreas extensas durante suas buscas de néctar e pólen. Cultivos pulverizados são visitados por abelhas e agrotóxicos são transportados para dentro da colmeia, onde os agrotóxicos são protegidos pelo pólen, mel, cera de abelha e abelhas. A presença de pesticidas em matrizes de colmeias tem sido relatada em todo o mundo. Nos EUA, os miticidas fluvalinato e o inseticida clorpirifós foram os pesticidas mais frequentemente detectados, que apresentaram as maiores concentrações em abelhas, cera de abelha e pólen (MULLIN et al., 2010; VERNICH et al., 2018).

Devido aos fatores de contaminação organizações governamentais estabelecem limites máximos de resíduos de agrotóxicos em diversas matrizes e, além disso, são responsáveis por programas de monitoramento para fiscalização do cumprimento da legislação. No Brasil, estabelecer limites máximos de resíduos (LMR's) é competência do Ministério da Saúde. No caso de não estarem estabelecidos por aquele Ministério, utilizam-se os internalizados no MERCOSUL, os recomendados pelo Codex Alimentarius, os constantes nas Diretivas da União Europeia e os utilizados pelo FDA/USA (JARDIM, ANDRADE, QUEIROZ, 2009).

#### 3.2.3.1 *Limites Máximos de Resíduos*

Os vestígios de agrotóxicos deixados em produtos tratados ou aqueles deixados por medicamentos veterinários em animais são chamados de "resíduos". Um limite máximo de resíduos (LMR) é o nível mais alto de um resíduo de

agrotóxicos que é legalmente tolerado nos alimentos ou rações quando os pesticidas são aplicados corretamente de acordo com as Boas Práticas Agrícolas (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

De acordo com a instrução normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999 o secretário de defesa agropecuária, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os arts. 18 e 53, ambos do anexo i do decreto no 8.852, de 20 de setembro de 2016, tendo em vista o disposto na portaria nº 51, de 6 de fevereiro de 1986, na portaria no 527, de 15 de agosto de 1995, na instrução normativa sda nº 42, de 20 de dezembro de 1999, e o que consta do processo no 21000.010168/2018-31, resolve: art. 1º aprovar o plano de amostragem e limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal - PNCRC de 2018 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos (BRASIL, 1999).

O PNCRC/Animal tem como objetivo gerar a garantia de qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas, gerenciando a avaliação da presença de resíduos de agrotóxicos nos produtos de origem animal.

A Tabela 2 apresenta os LMR estabelecidos, tanto pela legislação brasileira como legislação europeia, para os agrotóxicos deste estudo em mel.

Tabela 2 - Limites máximos de resíduos em  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de acordo com os órgãos Brasileiros e Europeu.

Agrotóxicos	LMR's ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
	Brasil	Europa
Alfa-HCH	10	10
Beta-HCH	10	10
hexaclorobenzeno	-	10
Gama-HCH	10	10
Heptacloro	10	10
Heptacloro-epóxido		
Aldrin	10	10
Fipronil	5	5
Clorpirifós	20	50
Profenfós	20	50
Endrim	10	10
4,4 DDE	10	
4,4 DDD	10	Soma 50
4,4 DDT	10	
Fenpropatrina	10	-
cis-Permetrina		
trans-Permetrina	Soma 20	-
Ciflutrina	20	50
Deltametrina	20	50

Fonte: (MAPA 2018; EU, 2019).

### 3.3 AGROTÓXICOS

Do acordo com a UNITED NATIONS (2017), a população mundial em 2050 atingirá a marca de 9,8 bilhões de habitantes, o que por consequência levará a um aumento da demanda por alimentos e derivados. Para que essa crescente demanda seja suprida, tem-se buscado em novas tecnologias para o aumento dessa produção. Contudo, somente o avanço tecnológico não é suficiente para o controle de pragas, uma opção então é a utilização de agrotóxicos para que esse controle seja feito. E ainda, a capacidade na qual os países têm de produção e colheita em grande escala, em áreas reduzidas, com baixa rotatividade de cultivos e

mecanização do trabalho tem sido possível devido ao uso dos agrotóxicos (VEIGA, 2007).

Os agrotóxicos são utilizados para eliminar formas de vida vegetal ou animal, que de alguma forma são indesejáveis para a plantação. Os pesticidas químicos têm como propriedade comum o bloqueio de rotas metabólicas vitais para o crescimento ou desenvolvimento dos organismos para os quais são tóxicos. Isso torna o uso de agrotóxicos de suma importância para a erradicação de pragas e o combater de doenças que atingem o sistema agropecuário (VEIGA, 2007).

O termo legal definido pela Lei 7802/89, ou Lei de Agrotóxicos, considera agrotóxicos como o termo a ser empregado. Porém, ainda são utilizados os termos pesticidas, defensivos agrícolas e praguicidas. Cada uma das palavras está associada a um tipo específico de setor, os produtores de agrotóxicos, por exemplo, preferem o uso de defensivo agrícola, pois na visão da indústria é exatamente para isso que o produto serve (BRASIL, 1989).

O *códex Alimentarius* (2010, p. 19) define agrotóxico como:

Agrotóxico significa qualquer substância destinada a prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer praga, incluindo espécies indesejadas de plantas ou animais durante a produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento de alimentos, produtos agrícolas ou alimentos para animais ou que possam ser administradas em animais para o controle de ectoparasitas. O termo inclui substâncias destinadas ao uso como regulador de crescimento vegetal, desfolhante, dessecante, agente de desbaste de frutas ou inibidor de brotação e substâncias aplicadas a culturas antes ou depois da colheita para proteger a mercadoria da deterioração durante o armazenamento e transporte. O termo normalmente exclui fertilizantes, nutrientes para plantas e animais, aditivos alimentares e medicamentos para animais.

Resíduo de agrotóxico é considerado qualquer substância especificada em alimentos, produtos agrícolas ou ração animal em decorrência do uso de agrotóxicos. O termo resíduo de agrotóxico ainda abrange os derivados de agrotóxicos como os metabolitos, produtos de reação, produtos de conversão e quaisquer impurezas que possuam toxicologia significativa (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

Os agrotóxicos podem ser divididos em diversas classes de acordo com o organismo-alvo que o mesmo age. Na Tabela 3 alguns exemplos dos tipos de agrotóxicos e o organismo ao qual o mesmo inibe/extermina.

Tabela 3 Tipos de agrotóxicos mais comuns e respectivos organismos-alvo.

<b>Tipo de Agrotóxico</b>	<b>Organismos-alvo</b>
Acaricida	Ácaros
Algicida	Algas
Avicida	Pássaros
Bactericida	Bactérias
Desinfetante	Microorganismos
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas
Inseticida	Insetos
Larvicida	Larvas de Insetos
Molusquicida	Caracóis, Lesmas
Nematicida	Nematoides
Piscicida	Peixes
Raticida	Roedores

Fonte: (BAIRD E CANN, 2008).

Outro tipo de classificação que os agrotóxicos podem receber é quanto ao grupo químico. Esta classificação é uma das mais úteis para os pesquisadores que estudam o comportamento dos agrotóxicos no meio ambiente, pois através desta classificação pode-se ter um conhecimento sobre propriedades físicas e químicas dos agrotóxicos em questão. De acordo com as propriedades químicas, os agrotóxicos são geralmente classificados em organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, pirazois entre outros.

### 3.3.1 Organoclorados

Os organoclorados são hidrocarbonetos clorados que foram amplamente utilizados como agrotóxicos entre as décadas de 40 e 60 atuando basicamente como inseticida.

O início destes pesticidas é registrado em 1874 com o pesquisador Zeidler, responsável pela síntese da molécula de diclorodifeniltricloroetano, popularmente conhecido como DDT. Contudo o seu poder como inseticida foi descoberto somente em 1940 por Paul Mueller. Este poder inseticida associado a sua baixa solubilidade em água, alta estabilidade proporcionaram resultados bastante evidentes para a

época e o uso deste agrotóxico se expandiu rapidamente. Durante o período da segunda guerra mundial o DDT em pó foi amplamente utilizado para combater epidemias causadas por piolhos e também foi amplamente utilizado para matar o vetor da malária. O uso dava-se através da pulverização do pó do DDT diretamente nas pessoas (KONRADSEN et al., 2004).

Com o uso desenfreado do DDT, novas medidas foram tomadas. A primeira delas foi de aumentar as dosagens para que a eficiência fosse mantida. E na sequência, novas moléculas com eficácia superior ao DDT e com maior degradabilidade foram sintetizadas (TURK, 1989). Com o passar do tempo, devido a sua grande estabilidade, resíduos de agrotóxicos de organoclorados já haviam contaminado grande parte do ecossistema. Com isso, na metade para o final da década de 60 os países iniciaram pesquisas mais intensificadas sobre o assunto, concomitantemente, a políticas que restringissem ou até mesmo proibissem o uso destes pesticidas (QUEIROZ et al., 2004).

Os organoclorados são agrotóxicos que possuem uma meia vida bastante prolongada em solos, sedimentos, ar e biota. Devido a possuírem baixa solubilidade em água, ou seja, serem compostos lipofílicos, estas substâncias acumulam-se na cadeia alimentar pois são bastante estáveis e com baixa volatilidade. Devido a isso, desde o início dos anos 1970 estes agrotóxicos tem sido progressivamente restringidos e no Brasil sua utilização esta proibida desde 1985 (ALVES et al., 2010; CARLOS, et al., 2013).

Uma grande parte dos agrotóxicos organoclorados são considerados como poluentes orgânicos persistentes (POPs). De acordo com decreto nº 5.472 de 20 de junho de 2005 os seguintes organoclorados são caracterizados como POPs: Aldrin, Dieldrin, Endrin, Clordano, Clordecone, Heptaclo, Hexaclorobenzeno (HCB), Alfa Hexaclorociclohexano (alfa HCH), Beta hexaclorociclohexano (beta HCH), Lindano, Mirex (dodecacloro), Pentaclorobenzeno (PeCB), Endossulfam, Toxafeno, Pentaclorofenol e seus sais e ésteres.

Os POPs são conceituados como compostos sintéticos resistentes à degradação e com elevada estabilidade, com isso, permanecem no ambiente por um longo tempo. Além disso, possuem alta toxicidade e alta capacidade de bioacumulação nos organismos vivos o que pode acarretar em biomagnificação, ou seja, acúmulo progressivo ao longo da cadeia alimentar. Os seres humanos estão expostos a essas substâncias químicas de várias maneiras: principalmente através

dos alimentos que ingerem, através do ar que respiram, ao ar livre, em ambientes fechados e no local de trabalho. Muitos produtos utilizados na vida diária podem conter POPs, que foram adicionados para melhorar as características do produto, como retardadores de chama ou surfactantes. Como resultado, os POPs podem ser encontrados virtualmente em qualquer lugar do planeta em concentrações mensuráveis (UNEP, 1999).

Dentre o grupo de agrotóxicos organoclorados, os que serão abrangidos nesse estudo são: 4,4 DDT, 4,4 DDE, 4,4 DDD, alfa-HCH, beta-HCH, gama-HCH (lindano), HCB, Aldrin, Endrin, Hexaclorobenzeno, Heptacloro, Heptacloro-epóxido e alfa-Endosulfan.

### 3.3.2 Organofosforados

Os compostos organofosforados (OP) possuem pelo menos uma ligação carbono-fósforo, uma ligação considerada relativamente forte. Constituem um grupo de produtos químicos utilizados a mais de 50 anos para proteger a agricultura, a pecuária e a saúde humana.

O surgimento dos organofosforados como agrotóxicos deu-se devido à alta toxicidade dos organoclorados. Ao longo dos anos, essa classe de agrotóxicos ganhou notório espaço e grande uso. Além de possuírem menor preço, largo espectro de atividade e alto impacto sobre insetos, esses agrotóxicos degradam-se mais fácil do que os organoclorados, com isso, o grande problema de persistência no meio ambiente é evitado (BARBOZA et al., 2018).

A maioria dos organofosforados são utilizados como inseticidas ainda que uma quantia considerável atue como herbicida ou fungicida. Estes inseticidas são amplamente utilizados em uma grande variedade de culturas e são geralmente dispersos na forma de aerossol consistindo do pesticida adsorvido em uma partícula fina inerte dissolvida em um solvente. Também possuem uso generalizado em casa e no jardim para controlar os insetos (APVMA, 2013).

Os inseticidas OP variam amplamente em sua solubilidade lipídica. Alguns inseticidas OP são relativamente hidrofílicos com valores de log Kow (log P) <1,0 [ex.: dimetoato (0,76) e triclorfon (0,51)], enquanto outros são altamente lipofílicos com altos valores de log Kow [por exemplo, clorpirifós (5,05), dichlofenthion (5,14) e profenofos (4,56)]. A lipofilicidade afeta acentuadamente o volume de distribuição, a

intensidade da toxicidade, a duração e o recrudescimento da toxicidade (EDDLESTON, 2018).

### 3.3.3 Pirazol

Os pirazóis são os membros importantes de compostos heterocíclicos com dois nitrogênios adjacentes em um sistema de anéis de cinco membros. Entre os dois átomos de nitrogênio; um é básico e o outro é de natureza neutra. Estas são moléculas aromáticas devido às suas estruturas de anel conjugadas planares com seis elétrons  $\pi$  deslocalizados. A natureza aromática surge dos quatro elétrons  $\pi$  e do par não compartilhado de elétrons no nitrogênio  $-NH$ . As formas parcialmente reduzidas de pirazole são nomeadas como pirazolinias; enquanto a forma completamente reduzida é pirazolidina. Um dos representantes deste grupo químico é o Fipronil.

O fipronil, descoberto em 1987, foi desenvolvido originalmente por Rhône-Poulenc e inicialmente promovido como uma alternativa para controlar o gafanhoto do deserto. Os ensaios foram realizados na África Ocidental e mostrou-se muito eficaz contra os acridídeos (MATTHEWS, 2018).

### 3.3.4 Piretroides

Os piretróides são uma classe de inseticidas orgânicos sintéticos derivados das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas. Eles têm sido usados em todo o mundo desde a década de 1980 por causa de seu alto nível de eficácia e baixa toxicidade em comparação com outros inseticidas, como organofosforados e compostos de éster carbâmico. Eles são muito tóxicos para organismos aquáticos e podem causar efeitos adversos em longo prazo em ambientes aquáticos. Devido à lipofilicidade dos piretróides, é difícil removê-los quando entram em um organismo. Em longo prazo, baixa dose de exposição à piretróides pode causar doenças crônicas e ter efeitos tóxicos sobre os sistemas nervoso, imunológico, cardiovascular e genético dos organismos, induzindo teratogenicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade. Koureas et al. (2012) forneceu evidências de que a exposição a piretróides está associada a efeitos adversos no sistema reprodutor masculino. Contudo, são

extremamente efetivos contra um largo espectro de insetos em baixas quantidades (Ma, 2009; Zhao, 2014; YOO et al., 2016; SANTOS, AREAS e REYES, 2007).

Os piretróides também desempenham um papel vital nos produtos de cuidados pessoais, como xampu e perfume repelente de mosquitos. Cipermetrina, deltametrina, fenpropatrina, fenvalerato, bifentrina, permetrina,  $\lambda$ -cialotrina e ciflutrina têm sido amplamente utilizados nos últimos anos. Eles são altamente fotolábeis e se degradam rapidamente à luz do sol, e o custo de reaplicá-los limitou seu uso agrícola generalizado. Os piretróides foram sintetizados para serem similares às piretrinas, porém mais estáveis no ambiente. Evidências sugerem que eles têm uma margem muito grande de segurança quando usados como indicado pelo rótulo (GONG, 2013).

#### 3.4 ANÁLISE DE RESÍDUO DE PESTICIDA

Uma gama muito grande de agrotóxicos são passíveis de serem analisados por métodos multirresíduos onde diversos analitos são analisados simultaneamente em um pequeno número de análises. Esses métodos são robustos o suficiente para abranger pesticidas de diferentes polaridades sem comprometer a sensibilidade e a sensibilidade. Os métodos de extração mais empregados nessas análises são *QuEChERS*, *SweEt* e *Mini-Luke Holandês*.

O método *QuEChERS* (acrônimo para Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, que se traduz por “rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro”) consiste na extração empregando acetonitrila como solvente de extração (ANASTASIADIS et al., 2003). O *SweEt* (acrônimo para, Swedish Ethyl Acetate, que se traduz por acetato de etila sueco) este método baseia-se pela extração dos analitos utilizando acetato de etila contendo 1% ácido acético como solvente extrator (ANDERSEN E POULSEN, 2013). E por último, o método *mini-luke holandês* uma otimização e miniaturização do método *Luke*, consiste na extração dos analitos com uma mistura de três solventes: acetona, diclorometano e éter de petróleo, seguidos de evaporação e ressuspensão em metanol (HIEMSTRA E DE KOK, 2007).

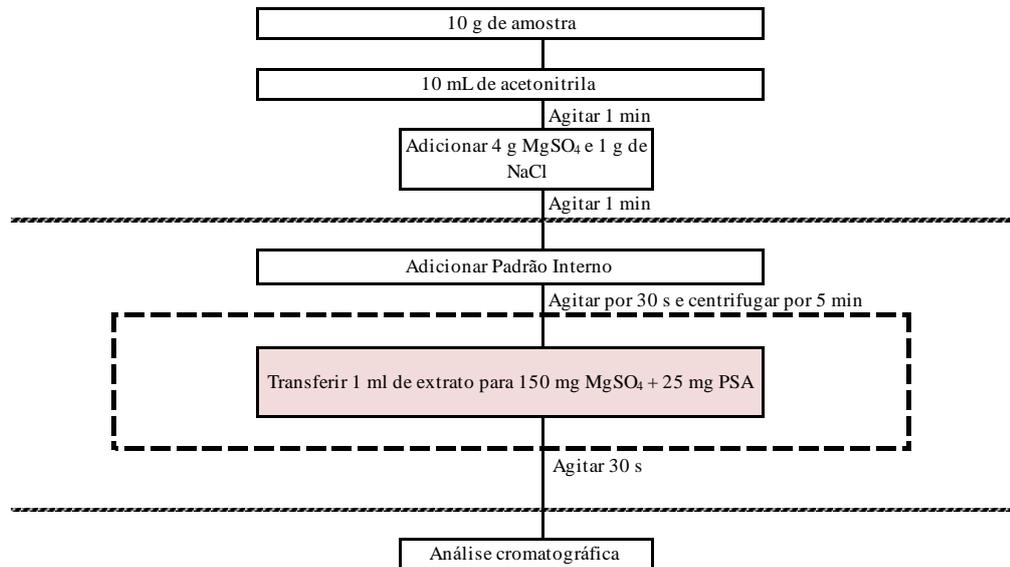
### 3.4.1 Método de extração *QuEChERS*

O método multirresíduo que foi publicado há um pouco mais de 15 anos e que ainda é amplamente utilizado nos dias atuais é o método de *QuEChERS* desenvolvido por Anastasiades et al (2003) e segue sendo amplamente utilizado na atualidade.

O método original de *QuEChERS* envolve uma extração inicial de 10 gramas de amostra com acetonitrila, seguido de uma partição após adição de 4 gramas de  $MgSO_4$  e 1 grama de  $NaCl$ . A quantidade de  $NaCl$  é bastante crítica neste caso pois quanto maior a quantidade deste sal for adicionada menor será a recuperação para diversos pesticidas. Isso se deve a saturação da fase aquosa e com isso maior é a separação da fase aquosa da fase orgânica e com isso a fase orgânica torna-se menos polar. Com isso agrotóxicos com caráter mais polar não ficavam solubilizados na fase orgânica. Com o controle da quantidade de  $NaCl$  foi possível controlar o espectro de polaridade dos analitos durante a partição. Outro fator importante do uso de  $NaCl$  era para que compostos mais polares como açúcares permanecessem na fase aquosa e não fossem extraídos para a fase orgânica (ANASTASIADES et al., 2003).

Por fim, uma etapa simples de purificação onde o extrato era misturado com  $MgSO_4$  e Amina primária secundária (PSA). O PSA mostrou-se o mais eficiente para a purificação do extrato onde os agrotóxicos não apresentaram nenhuma perda devido ao uso (ANASTASIADES et al., 2003). Um esquema deste método está descrito na Figura 3.

Figura 3 - Esquema da sequência do método de Quechers



Fonte: (AUTOR).

Após a consolidação deste método de extração diversas variações foram criadas ao longo do tempo. Uma delas foi o QuEChERS tamponado, desenvolvido por Lehotay, Mastovská e Lightfield (2005). As diferenças deste método para o primeiro são basicamente três: a primeira foi no solvente de extração que anteriormente era somente acetonitrila, passou a ser acetonitrila 1% (v/v) ácido acético, a segunda foi à substituição de NaCl por acetato de sódio, para que se tenha o meio onde ocorre a extração tamponada para melhorar as recuperações de agrotóxicos que são extremamente sensíveis à mudança de pH e a última modificação foi o aumento da quantidade de amostra que passou a ser 15 gramas.

### 3.5 CROMATOGRAFIA

Diversos métodos analíticos estão sendo utilizados para realizar análises química, entretanto a cromatografia tem ganhado grande destaque devido à facilidade com que efetua a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, seja por si só ou acoplada com outras técnicas instrumentais como espectrofotometria ou espectrometria de massas, por exemplo, (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia é baseada na partição contínua e repetida de analitos entre uma fase estacionária e uma fase móvel, levando à separação dos vários analitos. A

fase móvel pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico (resultando em cromatografia a gás, a líquido ou de fluido supercrítico respectivamente). A fase estacionária é uma película líquida, um adsorvente sólido ou outro material sólido com funcionalidade química especial (MEYER, 2013).

A técnica cromatográfica pode ser classificada de diferentes maneiras e através de vários critérios, contudo, as divisões mais comuns são em relação à técnica empregada, ao mecanismo de separação envolvido e aos diferentes tipos de fases utilizadas.

O sistema físico da cromatografia de uma forma geral a define. A fase estacionária pode estar sob a superfície planar de um suporte ou ainda dentro de um tubo cilíndrico. Tendo isso em vista, ela é classificada em cromatografia planar e cromatografia em coluna respectivamente. A primeira ainda pode ser classificada em cromatografia em papel (CP) e cromatografia em camada delgada (CCD). A segunda, por sua vez, pode ser subdividida de acordo com o diâmetro interno da coluna; coluna preparativa (6-50 mm), analíticas (2-6 mm), com micro diâmetro (1-2 mm) e capilares (<1 mm) (LANÇAS, 2017).

O estado físico da fase estacionária também serve para classifica-la. A fase estacionária pode ser um líquido ou sólido. O líquido pode estar recobrimo um suporte sólido ou imobilizado sob ele. Essa imobilização pode ser uma imobilização química direta entre o suporte e o líquido, ou ainda somente entre as cadeias do próprio líquido. O líquido pode ainda estar diretamente disperso sob a parede da coluna, como nos casos das colunas capilares (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; LANÇAS 2017).

E por fim, a maneira mais comum de dividir a cromatografia é em relação ao estado físico da fase móvel. Tem-se então a cromatografia gasosa quando a fase móvel for um gás inerte, a cromatografia líquida na qual a fase móvel é um líquido que pode ou não interagir com o(s) analito (s) e que auxilia no processo de separação, e a cromatografia supercrítica, onde a fase móvel é um vapor pressurizado, em temperatura e pressão acima do seu ponto crítico, o que confere uma viscosidade menor que um líquido, mas mantendo as propriedades de interação com os analito (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A alta sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade dos métodos cromatográficos têm sido amplamente exploradas na ciência e tecnologia de

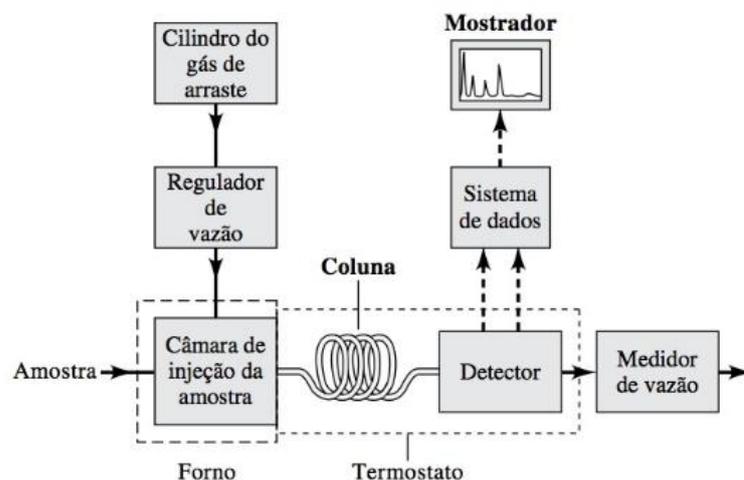
alimentos e nutrição. E a cromatografia líquida tem ganhado uma atenção especial para as análises de agrotóxicos em alimentos.

### 3.5.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) foi utilizada pioneiramente como uma técnica analítica por Martin e Synge em 1941, onde sugeriram o uso de cromatogramas de partição gás-líquido para fins analíticos. Contudo a realidade prática da GC foi evidenciada somente em 1951 quando Martin e James publicaram um artigo descrevendo o primeiro cromatógrafo a gás. Eles demonstraram a técnica separando e determinando quantitativamente os doze componentes de uma mistura de ácidos graxos C1-C5. A importância do GC foi reconhecida quase de imediato pelos laboratórios petroquímicos, que enfrentavam o desafio de analisar misturas complexas de hidrocarbonetos (SANDERS; MAYNARD, 1968; CHATWAL, 2006).

Esse método físico de separação, quando a fase móvel é um gás é denominada Cromatografia em Fase Gasosa, sendo que a fase estacionária pode ser sólida ou líquida. Esse líquido pode estar recobrimo diretamente a superfície da coluna capilar ou ainda recobrimo um suporte sólido inerte (LANÇAS, 1993). A Figura 4 apresenta os componentes básicos de um sistema de cromatografia gasosa.

Figura 4 - Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás típico.



Fonte: (SKOOG, 2014).

Um cromatógrafo a gás típico consiste de um injetor, uma coluna, equipamento de controle de vazão do gás de arraste, forno e aquecedores para manter as temperaturas do injetor e da coluna, um registrador gráfico e um detector (SKOOG, 2014; LANÇAS, 2017).

#### 3.5.1.1 Gás de arraste

A fase móvel em cromatografia gasosa é denominada gás de arraste e deve ser obrigatoriamente, quimicamente inerte. A fase móvel mais utilizada é o gás Hélio, porém outros gases como, Argônio, Nitrogênio e Hidrogênio podem ser utilizados. Os gases inertes são encontrados em cilindros pressurizados sendo controlados por manômetros e medidores de vazão. A função do gás de arraste é levar as moléculas da amostra a ser separada na coluna capilar até o detector (SCHOMBURG, 1990; LANÇAS, 1993; SKOG, 2014).

O gás de arraste deve apresentar algumas características para poder ser usado como fase móvel; não pode interagir com a fase estacionária e/ou com a amostra e ser compatível com o detector utilizado (SCHOMBURG, 1990; LANÇAS, 1993).

#### 3.5.1.2 Sistema de injeção de amostra

Existem quatro tipos básicos de técnicas de injeção: isotérmica, split e splitless, on-column e vaporização de temperatura programada (PTV, do inglês *programmed temperature vaporization*). As injeções isotérmicas Split e splitless são realizadas na mesma entrada chamada entrada split/splitless. Esta entrada split/splitless é mais comum devido à sua simplicidade e robustez. No entanto, a injeção clássica sem divisão permite apenas 1–2 µl de líquido nas colunas capilares na maioria dos casos. Dependendo do solvente, esta injeção pode ser aumentada até 5–10 µl usando um pulso de pressão durante o processo de introdução da amostra (GROB; BARRY, 2004; HOH; MASTOVSKA, 2008).

Para a injeção de amostra mais reprodutível, cromatógrafos a gás usam auto-injetores e auto-amostradores. Com tais auto-injetores, as seringas são cheias e a amostra, injetada no cromatógrafo automaticamente com maior precisão do que a injeção manual (LANÇAS, 1993; SKOG, 2014; LANÇAS, 2017).

### 3.5.1.3 Colunas

No nível mais básico, uma coluna capilar é composta de duas partes: o tubo e a fase estacionária. A sílica fundida e o aço inoxidável são os principais materiais da tubulação. Existem várias fases estacionárias. A maioria são polímeros termicamente estáveis de alto peso molecular que são líquidos ou gomas. As fases estacionárias mais comuns deste tipo são os polissiloxanos e polietilenoglicóis. O próximo tipo mais comum de fases estacionárias são pequenas partículas porosas compostas de polímeros ou zeólitos (por exemplo, alumina, peneiros moleculares) (GROB; BARRY, 2004; RAHMAN et al., 2015).

GC é a única forma de cromatografia que não utiliza uma fase móvel para interagir com o analito. Quando a fase estacionária é um adsorvente sólido, o processo é denominado cromatografia gás-sólida (GSC, do inglês *gas-solid chromatography*), e quando é um líquido sobre um suporte inerte, o processo é denominado cromatografia gás-líquido (GLC, do inglês *gas-liquid chromatography*) conforme a Figura 5. Colunas cromatográficas capilares não são preenchidas com material de recheio. Em vez disso, uma película fina de fase líquida reveste a parede interna. Devido ao tubo capilar ser aberto, sua resistência à vazão de gás é muito baixa (GROB; BARRY, 2004; CHATWAL, 2006; RAHMAN et al., 2015).



### 3.5.2 Detector por captura de elétrons

As origens do detector por captura de elétrons (ECD, do inglês *electron capture detector*) é datada em 1960 quando seu primeiro modelo foi apresentado por Lovelock e Lipsky (LOVELOCK; LIPSKY, 1960) .

O detector de captura de elétrons (ECD, do inglês *electron capture detector*) tornou-se amplamente utilizado para as amostras ambientais e alimentares em virtude de responder seletivamente aos compostos orgânicos contendo halogênios, como agrotóxicos e bifenilas policloradas.

Este detector, o eluato passa sobre a fonte radioativa emissora de radiação  $\beta$ , geralmente  $\text{Ni}^{63}$ . Utiliza-se principalmente um sistema de eletrodos de detecção cilíndrica e utiliza-se nitrogênio ou argônio como gás de transporte. Durante a ionização de tais gases, íons positivos e elétrons são produzidos. Esses elétrons podem ser capturados por moléculas da amostra. Como resultado da captura de elétrons, os íons negativos são formados com uma velocidade de desvio significativamente menor. Em condições de ECD, a recombinação de íons-íons ocorre muito mais eficientemente do que a recombinação de íons-elétrons e, portanto, a introdução de um composto eletrofílico no detector resulta numa redução da corrente iônica. A captura de elétrons é um processo cuja eficiência depende da energia dos cientistas (SKOOG, 2014; CHEN; CHEN, 2018; BUDZYŃSKA et al, 2019).

## 3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método analítico tem por finalidade assegurar a confiabilidade dos resultados, provando que o método utilizado é aceitável para o que ele se destina. De acordo com a norma ABNT NBR ISSO/IEC 17025 validação é “[...] a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos” (ABNT, 2017).

O documento orientativo do Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial (INMETRO) “Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-

CGCRE-008” de Julho de 2018, os parâmetros de desempenho que devem ser realizados são: Seletividade, Linearidade/Faixa de Trabalho/ Faixa Linear de Trabalho/Sensibilidade, Limite de detecção e Limite de Quantificação, tendência/recuperação e precisão. Ainda pode-se avaliar opcionalmente a robustez. (INMETRO, 2018).

### 3.6.1 Seletividade

A seletividade é o grau de o método discriminar o(s) analito(s) a serem analisados na presença de componentes semelhantes, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. O método capaz de produzir resposta para diversos analitos, mas que pode distinguir a resposta de cada um é considerado um método seletivo (INMETRO, 2018).

Os experimentos descritos na literatura para a avaliação da seletividade consistem em ensaios envolvendo padrões analíticos e materiais de referência, amostras na presença ou ausência dos analitos de interesse e com isso ocorre à avaliação da capacidade de identificação dos analitos de interesse na presença dos interferentes. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, tendência e a precisão serão seriamente comprometidas (INMETRO, 2018).

O efeito matriz é a influência de um ou mais compostos extraídos da amostra na medição da concentração ou massa do analito. Pode ser observado como resposta aumentada ou diminuída do detector, comparada com aquela produzida por soluções em solventes do analito. A presença ou ausência de tais efeitos pode ser demonstrada por comparação da resposta produzida a partir do analito numa solução solvente com a obtida da mesma quantidade de analito no extrato da amostra (SANTE, 2018).

A determinação do efeito matriz é calculada através da comparação da resposta do analito da solução em solvente e em extrato de matriz de acordo com a Equação 2.

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \left( \frac{A_1}{A_2} - 1 \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Sendo:  $A_1$ : inclinação da curva analítica em matriz;

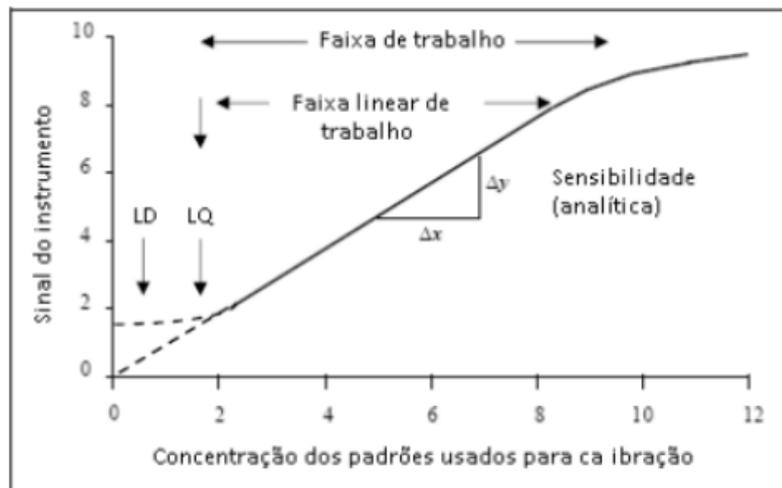
$A_2$ : inclinação da curva analítica em solvente;

### 3.6.2 Linearidade/Faixa de Trabalho/ Faixa Linear de Trabalho/ Sensibilidade

A linearidade de um método analítico é a capacidade em obter resultados diretamente proporcionais à concentração de uma analito em uma amostra. Juntamente a linearidade pode ser definida a faixa de trabalho que é o intervalo entre a maior e a menor concentração de analito em uma amostra onde o procedimento apresentou resultados satisfatórios para precisão, exatidão e linearidade (INMETRO, 2018).

Seguindo esse raciocínio a faixa linear de trabalho então nada mais é que a faixa de concentração do analito em que o resultado encontrado é proporcional a concentração. E por fim a sensibilidade do método está interligado com a inclinação da curva analítica (INMETRO, 2018). A Figura 6 representa um resumo dos quatro parâmetros aqui descritos.

Figura 6 - Representação gráfica de linearidade, faixa de trabalho, faixa linear de trabalho e sensibilidade.



Fonte: (INMETRO, 2018).

Para a maioria das técnicas cromatográficas observa-se uma relação linear de primeira ordem entre a resposta do instrumento e a concentração do analito. Essa relação produz uma equação matemática representada pela Equação 3.

$$y = ax + b$$

Equação 3

Onde:

y: sinal instrumental

a: coeficiente angular

b: coeficiente linear

x: concentração

### 3.6.3 Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) de um procedimento analítico é a menor quantidade de um analito que pode ser detectado na amostra, porém não necessariamente quantificado. O LOD pode variar para cada tipo de analito e para o tipo de matriz. Existem diversos métodos de calcular o LOD, dentre eles: percepção visual, relação sinal/ruído e através da estimativa a partir da curva analítica (INMETRO, 2018). Para o cálculo a partir da curva analítica utiliza-se a Equação 4.

$$LOD = 3,3 \frac{s}{a}$$

Equação 4

Onde:

s: desvio padrão da resposta do branco;

a: coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (INMETRO, 2018). Neste estudo o LOQ foi determinado com ensaios de fortificação/recuperação e considerando o LOQ o resultado com precisão e exatidão dentro dos padrões estipulados por Sante (2017). Para o cálculo a partir da curva analítica utiliza-se a Equação 5.

$$LOQ = 10 \frac{s}{a}$$

Equação 5

Onde:

s: desvio padrão da resposta do branco;

a: coeficiente angular da curva analítica.

### 3.6.4 Tendência/Recuperação

A tendência é a combinação dos erros sistemáticos e aleatórios aplicados a uma série de resultados. A tendência pode ser expressa em termos de recuperação analítica representados pela Equação 6 (INMETRO, 2018).

$$R(\%) = \frac{C_1}{C_2} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

C1: concentração determinada na amostra fortificada;

C2: concentração usada para fortificação.

De modo geral de acordo com Sante (2017) os intervalos de recuperação aceitos são entre 70 a 120% com precisão de até 20%.

### 3.6.5 Precisão

A precisão tem a finalidade de avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra analisadas em condições definidas. A precisão pode ser calculada em termos de desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) de acordo com a Equação 7 (INMETRO, 2018).

$$RSD(\%) = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

s: desvio padrão;

X<sub>m</sub>: concentração média determinada.

As três maneiras mais comuns de expressá-la são por meio de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2018).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento e a validação de método analítico foi desenvolvido no Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC), Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

#### 4.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Cromatógrafo a gás HP6890 (Hewlett Packard) equipado com:
  - Coluna capilar: DB-1 30 m x 500 µm x 0,25 µm (J&W scientific, EUA)
  - Injetor automático HP6890 series injector
  - GC autosampler controller G1512a (Hewlett Packard)
- Micro detector por captura de elétrons (Agilent Technologies) equipado com;
  - Fonte de 15 millicuries de Ni<sup>63</sup>
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, EUA);
- Balança analítica de precisão com quatro casas decimais, calibrada (Sartorius, Alemanha);
- Concentrador modelo Rapidvap (Labconco Corporation, EUA)
- Balança analítica de precisão com duas casas decimais, calibrada (Mettler, Suíça);
- Mesa agitadora modelo 3016 (GFL, Alemanha);
- Centrifuga Hareaus Varifugue (ThermoScientific, Alemanha);
- Pipetador automático *HandyStep*, calibrado (Brand, Alemanha);
- Homogeneizador Vórtex Genie 2 (Scientific Industries, EUA);

#### 4.2 MATERIAIS

- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueáveis de 15 e 50 mL (Nalgene, EUA);
- Frascos de vidro âmbar;
- Frascos de fundo cônico para evaporação;
- Balões volumétricos certificados de 5, 10 e 50 mL;
- Frascos de vidro para armazenamento de soluções padrões de 22 mL (NationalScientific, EUA);
- Vidrarias comum de laboratório.

#### 4.3 SOLVENTES E REAGENTES

- Água ultrapura do sistema de Milli-Q;
- Acetonitrila grau HPLC (Macron, EUA);

- Ácido acético glacial (J.T. Baker, EUA);
- Isoctano grau HPLC (Macron, EUA);
- Tolueno (Mallinckrodt, EUA);
- Sulfato de Magnésio (Êxodo científica, Brasil);
- Acetato de sódio (Vetec Química Fina, Brasil);
- PSA (Supelco, EUA);

#### 4.4 GASES

- Nitrogênio 99,999% (Peak Scientific, EUA).
- Hélio 99,999% (Linde, Brasil)

#### 4.5 MATERIAIS DE REFERÊNCIA

Neste trabalho foram estudados os agrotóxicos listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Nome, fornecedor, pureza, classe química e cas number dos materiais de referências utilizados no preparo das soluções estoque.

Nome	Fornecedor	Pureza (%)	Classe química	Cas Number
4,4 DDD	Dr. Ehrenstorfer	99	Organoclorado	72-54-8
4,4 DDE	Dr. Ehrenstorfer	98,5	Organoclorado	72-55-9
4,4 DDT	Dr. Ehrenstorfer	98,5	Organoclorado	50-29-3
Aldrin	Dr. Ehrenstorfer	96	Organoclorado	309-00-2
Alfa-HCH	Dr. Ehrenstorfer	98	Organoclorado	319-84-6
Beta-HCH	Dr. Ehrenstorfer	98,4	Organoclorado	319-85-7
Bromofós-etílico*	Dr. Ehrenstorfer	98	Organofosforado	4824-78-6
Ciflutrina	Dr. Ehrenstorfer	96	Piretróide	68359-37-5
Clorpirifos	Dr. Ehrenstorfer	98,5	Organofosforado	2921-88-2
Deltametrina	Dr. Ehrenstorfer	98	Piretróide	52918-63-5
Endrin	Dr. Ehrenstorfer	97	Organoclorado	72-20-8
Fenpropatrina	Dr. Ehrenstorfer	99	Piretróide	39515-41-8
Fipronil	Dr. Ehrenstorfer	98,8	Pirazol	120068-37-3
Gama-HCH	Dr. Ehrenstorfer	98,5	Organoclorado	58-89-9
Heptacloro	Dr. Ehrenstorfer	99,5	Organoclorado	76-44-8
Heptacloro-epoxido	Dr. Ehrenstorfer	99	Organoclorado	1024-57-3
hexaclorobenzeno	Dr. Ehrenstorfer	99,5	Organoclorado	118-74-1
PCB-153**	Dr. Ehrenstorfer	99	Bifenila Policlorada	35065-27-1
Profenfos	Dr. Ehrenstorfer	92	Organofosforado	41198-08-7
cis-Permetrina	Dr. Ehrenstorfer	95	Piretróide	61949-76-6
trans-Permetrina	Dr. Ehrenstorfer	99	Piretróide	61949-77-7

\*Utilizado como Padrão Interno do Instrumento (P.I.I.) \*\* Utilizado como Padrão Interno do Procedimento (P.I.P).

Fonte: (AUTOR)

## 4.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

### 4.6.1 Preparo da solução estoque

As soluções estoque dos materiais de referência foram preparadas na concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  levando em consideração o grau de pureza especificado pelo fabricante. O material de referência foi pesado em balança analítica de precisão com quatro casas decimais e, então, o volume de tolueno foi calculado para que se atingisse a concentração desejada.

O material de referência foi pesado diretamente em frasco de vidro com capacidade de 22 mL. Em seguida, a porção pesada foi dissolvida em solvente orgânico adequado com o auxílio de um pipetador automático calibrado com o volume exato calculado previamente. O frasco foi então fechado, agitado em vórtex por aproximadamente 2 min e levado para banho de ultrassom por cerca de 10 min, a fim de que todo o material sólido fosse solubilizado. As soluções foram armazenadas em frascos transparentes, a  $-18^{\circ}\text{C}$ , em congelador com temperatura controlado por termômetro calibrado.

### 4.6.2 Preparo da solução analíticas de trabalho

As soluções analíticas de trabalho, de concentração  $10 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparadas a partir das soluções estoque do item 4.6.1 para cada um dos agrotóxicos selecionados. Em balão volumétrico certificado de 10 mL adicionou-se aproximadamente 5mL de uma solução de isoctano/tolueno (9:1, v/v) e, com o auxílio de um pipetador automático, foram transferidos  $100 \mu\text{L}$  da solução estoque. Posteriormente, aferiu-se o menisco do balão com a mesma solução e homogeneizou-se em vórtex. As soluções de trabalho foram armazenadas em frasco de vidro a  $-18^{\circ}\text{C}$  em congelador com temperatura controlado por termômetro calibrado.

### 4.6.3 Preparo de solução mistura

A solução mistura dos agrotóxicos foi preparada utilizando solução de isoctano/tolueno (9:1, v/v) como solvente. Pipetou-se 50  $\mu\text{L}$  de cada uma das respectivas soluções estoques do item 4.6.1, com exceção da solução estoque de bromofós etílico e do PCB 153, pois estes agrotóxicos possuem a função de padrão interno do instrumento e padrão interno do procedimento respectivamente, para balão volumétrico certificado de 50 mL e completou-se com solução de isoctano/tolueno (9:1, v/v). A solução contendo a mistura dos agrotóxicos foi então agitada em vórtex por 2 min e armazenada em frasco de vidro protegido com papel alumínio a  $-18^{\circ}\text{C}$  em congelador com temperatura controlado por termômetro calibrado.

### 4.6.4 Preparo do solvente de extração

Em um balão volumétrico com capacidade de 1 litro preencheu-se aproximadamente metade do volume do balão com acetonitrila. Foi adicionado então 10 mL de ácido acético glacial a fim de ter uma concentração final de 1% (v/v). Em seguida, com o auxílio de um pipetador automático calibrado foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque do PC 153 para que o mesmo ficasse a uma concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Então se completou o balão com acetonitrila e homogeneizou-se.

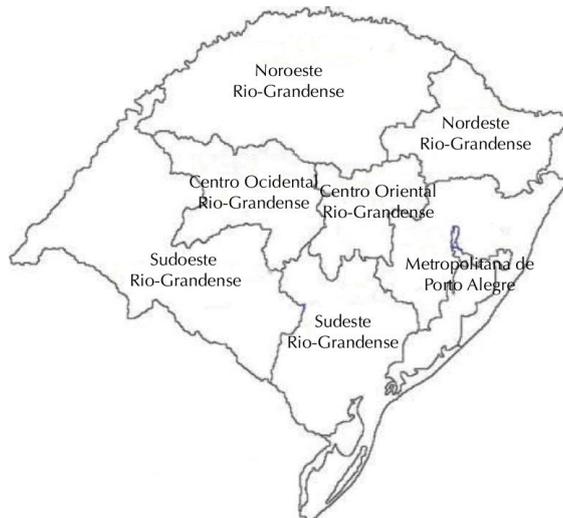
## 4.7 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A fim de verificar as melhores condições do sistema cromatográfico para obtenção de resultados mais precisos e exatos foram otimizadas condições do sistema cromatográfico como: volume de injeção, rampa de temperatura, temperatura do injetor e vazão do gás de arraste. Então soluções individuais a  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cada um dos agrotóxicos foi injetada três vezes a fim de verificar o tempo de retenção de cada analito. Os resultados da otimização das condições e os tempos de retenção individual de cada um encontram-se no item 5.1.

## 4.8 AMOSTRAS DE MEL

A amostra de mel “branco” foi proveniente do município de São João do Polêsine/RS. As amostras adquiridas para o monitoramento, 19 ao todo, são provenientes de diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul. Da mesorregião Centro ocidental rio-grandense foram coletados 6 amostras em 5 diferentes cidades. Da mesorregião Noroeste Rio-Grandense foram coletadas também 7 amostras em 6 cidades diferentes. Na mesorregião Sudoeste Rio-Grandense foram coletadas 3 amostras em 3 diferentes cidades. Na mesorregião Sudeste Rio-Grandense foi coletada 1 amostra. E finalmente, na mesorregião Metropolitana Rio-Grandense duas amostras foram coletadas em uma mesma cidade. A Figura 7 apresenta um esquema das divisões das 7 mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul. As amostras foram coletadas simulando a compra de um consumidor.

Figura 7 - Mapa com as 7 mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul



Fonte: (FERIGOLLO et al, 2017).

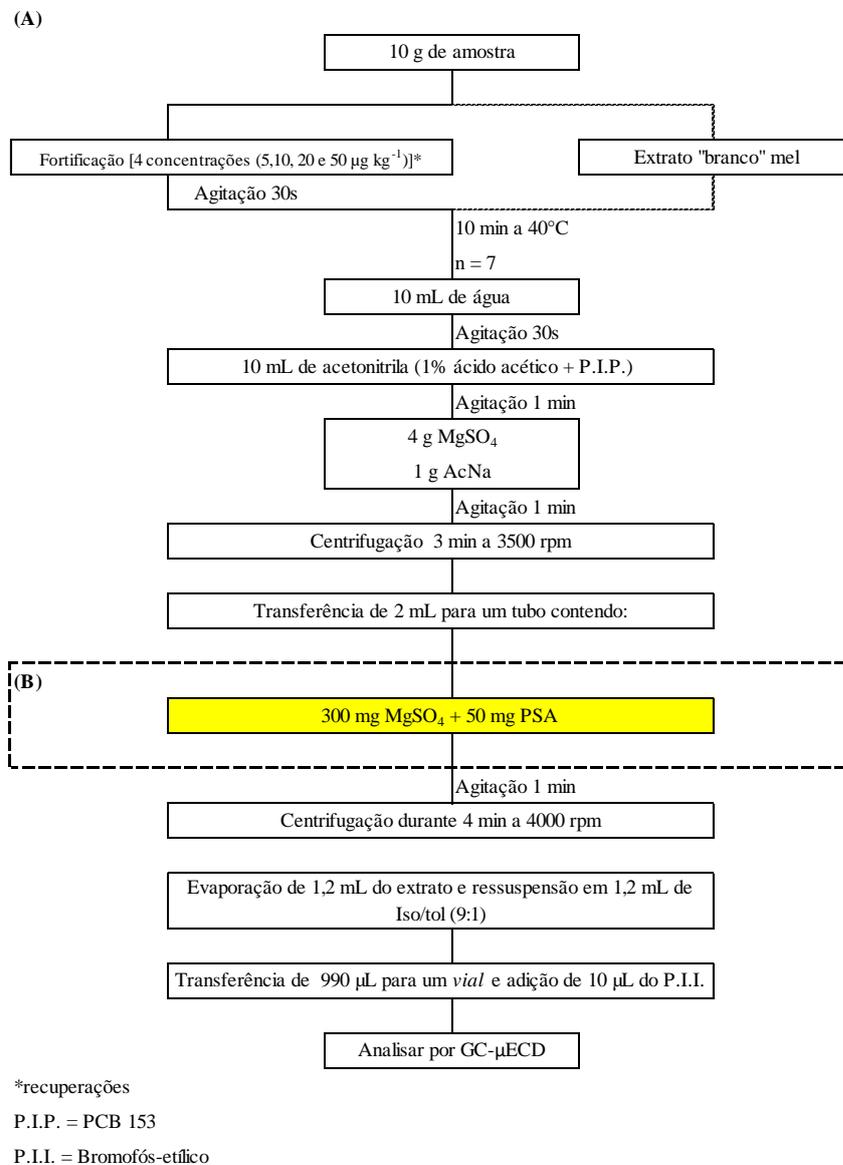
## 4.9 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

### 4.9.1 Procedimento de fortificação e extração do “branco”

Para a realização do procedimento experimental esquematizado na Figura 8, pesou-se  $10 \pm 0,05$  g de amostra em tubos falcon com capacidade de 50 mL e em

seguida fortificou-se a amostra “branco” com a solução mistura ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) contendo os agrotóxicos deste estudo em 4 níveis de fortificação: 5, 10, 20 e  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , adicionando-se 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$  respectivamente. Foram fortificadas 7 amostras em cada nível e também 7 amostras sem fortificação. Seguindo, foram colocados em banho de água por 10 minutos a  $40^{\circ}\text{C}$  e agitado em vórtex por 30 segundos. Então, 10 mL de água ultrapura foram adicionadas e agitados novamente em vórtex por 1 minuto. Após a mistura com água ultrapura adicionou-se 10 mL do solvente de extração acetonitrila 1% ácido acético (v/v) contendo o padrão interno do método e agitou-se em mesa agitadora por 1 minuto. Acrescentou-se o sulfato de magnésio e acetato de sódio para realizar a partição, seguida de 1 minuto de agitação mecânica e centrifugou-se. Transferiu-se quantitativamente 2 mL do sobrenadante para tubos falcon com capacidade de 15 mL contendo 300 mg de sulfato de magnésio e 50 mg de PSA para realizar a etapa de purificação do extrato, agitou-se por 1 minuto e centrifugou-se. Transferiu-se quantitativamente com pipeta calibrada 1,2 mL para frascos de fundo cônico e evaporou-se o solvente até securo. Por fim, ressuspendeu-se com 1,2 mL de solução de isoctano:tolueno 9:1 (v/v) e transferiu-se para vial 990  $\mu\text{L}$  desta solução com 10  $\mu\text{L}$  de solução do padrão interno do instrumento (bromofós-etílico  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Figura 8 - Esquema do procedimento de extração pelo método QuEChERS empregado neste trabalho.



Fonte: (AUTOR).

## 4.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

### 4.10.1 Curva analítica, linearidade e efeito matriz

O preparo da curva analítica é de suma importância durante o processo de análise química, pois se o sistema de calibração não está correto os parâmetros de precisão e exatidão ficam comprometidos afetando diretamente o resultado. Foram preparadas 7 curvas analíticas em isoctano:tolueno (9:1, v/v) e 7 curvas analíticas

em extrato “branco” de matriz em 7 níveis de concentração: 2,5; 5; 10; 20; 50; 100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  e injetou-se 4  $\mu\text{L}$  de cada solução analítica no sistema de GC- $\mu\text{ECD}$ .

Através das áreas obtidas verificou-se a linearidade do método cromatográfico. A linearidade foi avaliada levando em consideração o coeficiente de determinação e os valores de resíduos (Apêndice B).

O efeito matriz foi calculado levando em consideração a inclinação da curva analítica em solvente e em extrato “branco” de matriz conforme a Equação 2 do item 3.6.1.

Para verificação da linearidade foi avaliado não somente o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), mas também foram calculados os resíduos das curvas analíticas preparadas em extrato “branco” de matriz.

#### **4.10.2 Controles de qualidade**

Com o intuito de melhorar a eficiência da análise realizou-se o controle do procedimento de extração utilizando um padrão interno do procedimento (P.I.P.) PCB 153 em uma concentração de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O P.I.P. é adicionado ao solvente de extração e passa por todo procedimento de extração até a análise cromatográfica. Já o padrão interno do instrumento (P.I.I.) deste estudo foi o bromofós-etílico 10  $\text{mg L}^{-1}$ . Foram adicionados diretamente no vial, 10  $\mu\text{L}$  do P.I.I., momentos antes do início da análise.

#### **4.10.3 Precisão e Precisão Intermediária**

A precisão, considerando a repetitividade do instrumento foi avaliada através da injeção de 7 vezes cada nível da curva analítica e 7 vezes cada nível das fortificações.

A precisão intermediária do método foi determinada realizando dois ensaios de fortificação/recuperação em quatro níveis diferentes de concentração (5, 10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) em 7 replicatas cada nível de acordo com o procedimento conforme o item 4.9.1. O mesmo procedimento foi realizado mais uma vez seguindo o mesmo procedimento com um intervalo de 7 dias, porém por um segundo analista e então se avaliou o desvio padrão relativo (RSD%) das recuperações que cada analista

obteve. Além disso, foi utilizado o teste estatístico  $t$  para verificar se os resultados entre os dois analistas eram estatisticamente semelhantes.

#### 4.10.4 Exatidão

Para o estudo de exatidão foi utilizado os resultados do ensaio de fortificação/recuperação de acordo com o procedimento descrito no item 4.9.1. Os resultados obtidos foram comparados com o valor fortificado da amostra (considerado o valor real). O calculo das recuperações foram calculados de acordo com a Equação 6 do item 3.6.4.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Primeiramente foi injetada uma solução individual de cada agrotóxico a uma concentração de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  preparada em isoctano/tolueno (9:1, v/v) a fim de verificar o tempo de retenção individual de cada um. Após a constatação de que todos os compostos eluíam em tempos de retenção distintos injetou-se a solução mistura a fim de verificar as melhores condições cromatográficas para a separação dos picos. Os tempos de retenção de cada agrotóxico após a otimização das condições cromatográficas encontram-se na Tabela 5 e a Figura 9 representando o cromatograma total dos agrotóxicos.

As condições cromatográficas do GC- $\mu$ ECD foram:

- Para o GC:
  - Volume de injeção:  $4 \mu\text{L}$ ;
  - Injeção no modo *splitless*;
  - Temperatura do Injetor:  $200^{\circ}\text{C}$ ;
  - Gás de arraste: Hélio
  - Coluna cromatográfica: DB-1 30 m x 500  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$

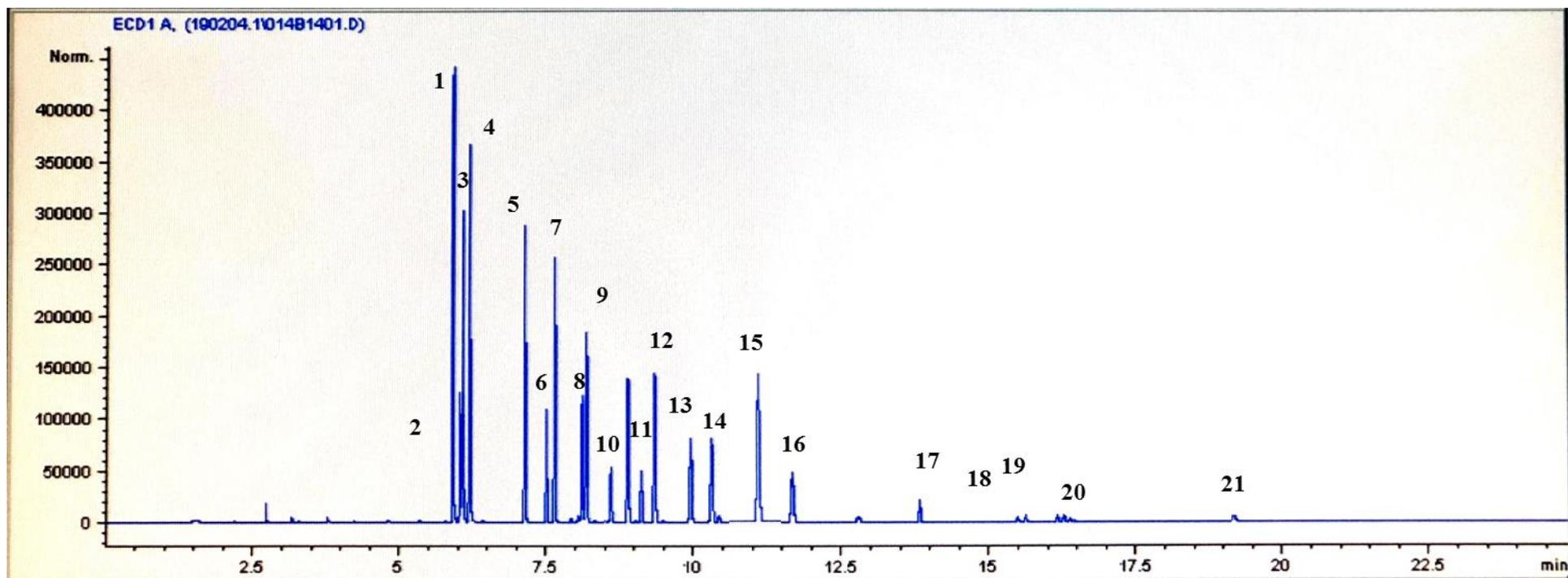
- Programa de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 100°C (1 minuto), com incrementos de temperatura de 25°C até 220°C; posteriormente de 30°C até 270°C, e de 20°C até 290°C.
  - Vazão do gás de arraste: 1,0 mL min<sup>-1</sup>;
  - Tempo total de análise: 24,8 minutos.
- Para o detector por captura de elétrons  $\mu$ ECD:
    - Temperatura do detector: 300°C;
    - Makeup gás: N<sub>2</sub>

Tabela 5 - Tempo de retenção para cada um dos agrotóxicos analisados.

Número	Agrotóxico	Tempo de Retenção (min)
1	Alfa-HCH	5.924
2	Beta-HCH	6.050
3	hexaclorobenzeno	6.097
4	Gama-HCH	6.211
5	Heptacloro	7.155
6	Clorpirifos	7.529
7	Aldrin	7.667
8	Fipronil	8.136
9	Heptacloro - epoxido	8.206
10	bromofós-etílico	8.623
11	Profenfos	9.142
12	4,4 DDE	9.340
13	Endrin	9.948
14	4,4 DDD	10.304
15	PCB- 153	11.009
16	4,4 DDT	11.667
17	Fenrpopatrina	13.818
18	cis-Permetrina	15.480
19	trans-Permetrina	15.613
20	Ciflutrina	16.266
21	Deltametrina	19.170

Fonte: (AUTOR).

Figura 9 - Cromatograma total dos agrotóxicos obtidos através da injeção de uma solução mistura a  $200\mu\text{g L}^{-1}$  demonstrando os tempos de retenção.

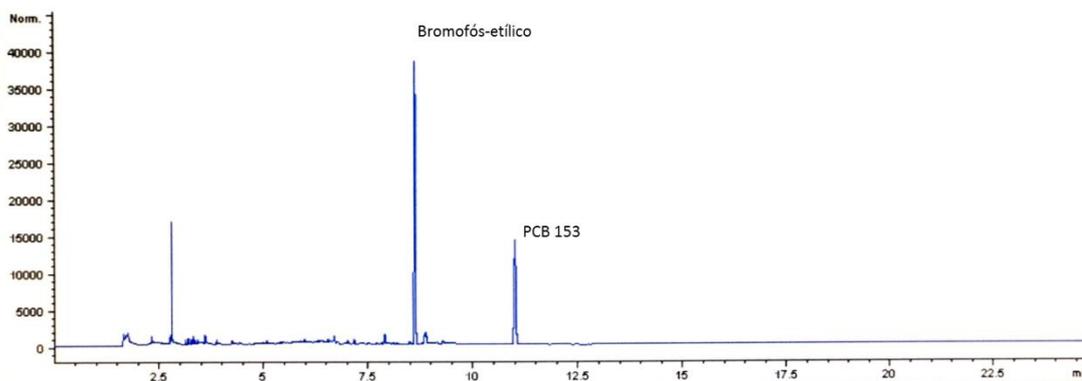


Fonte: (AUTOR).

## 5.2 ANÁLISE DOS SOLVENTES, REAGENTES E DA AMOSTRA “BRANCO”

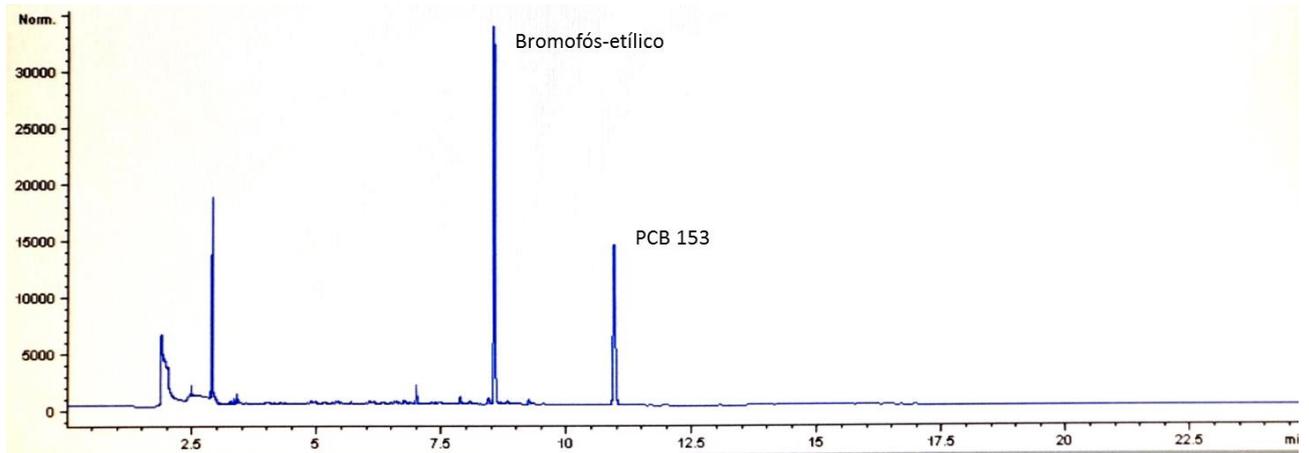
Os solventes e reagentes, assim como a amostra “branca” de mel foram submetidos ao processo de extração descrito no item 4.9.1. sob as condições cromatográficas otimizadas descritas no item 5.1. a fim de verificar a presença de interferentes. Nos cromatogramas obtidos nestas análises, representados pelas Figuras 10 e 11 pode-se observar que não há presença de interferentes. Ambos os cromatogramas apresentaram o P.I.I. e o P.I.P. O pico presente em 2,6 minutos presente tanto no solvente quando na matriz não é considerado interferente pois o tempo de retenção do primeiro agrotóxico é 5,924 minutos. Com isso, pode-se dizer que tanto os solventes e reagentes utilizados como a amostra “branco” são apropriados para que o estudo de validação seja realizado.

Figura 10 - Cromatograma total obtido pro GC- $\mu$ ECD através da análise do extrato “branco” de matriz.



Fonte: (Autor).

Figura 11 - Cromatograma total obtido pro GC- $\mu$ ECD dos solventes e reagentes empregados na determinação dos agrotóxicos.



FONTE: (AUTOR).

### 5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Após definidas as condições de extração e as melhores condições cromatográficas para separação e quantificação dos analitos em mel, foi realizado a validação do método analítico conforme os seguintes parâmetros.

#### 5.3.1 Curva analítica e linearidade

As equações das curvas analíticas em extrato “branco” de matriz e em isoctano/tolueno (9:1, v/v), o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e o intervalo linear para cada um dos pesticidas encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros das curvas analíticas obtidos para os agrotóxicos analisados por GC- $\mu$ ECD a partir das soluções 2,5; 5; 10; 20; 50; 100 e 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Agrotóxicos	Curva em extrato "branco" de matriz	$r^2$	Curva em solvente	$r^2$	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Alfa-HCH	$y=2182,5x-9529,3$	0,9933	$y=2257x-8868,2$	0,9938	2,5 a 200
Beta-HCH	$y=582,06x-1546,6$	0,9972	$y=579,17x-633,8$	0,9996	2,5 a 200
hexaclorobenzeno	$y=1391,7x-5115,1$	0,9952	$y=1380,6x-4136$	0,9949	2,5 a 200
Gama-HCH	$y=1550,4x-9777,7$	0,9918	$y=2003,8x-8666,1$	0,9954	2,5 a 200
Heptacloro	$y=1789,5x-7529,3$	0,9953	$y=1709,8x-4709,3$	0,9967	2,5 a 200
Clorpirifós	$y=696,38x-1052,2$	0,9968	$y=666,98x-691,73$	0,9973	2,5 a 200
Aldrin	$y=1766,8x-4871,9$	0,9965	$y=1756,6x-4486,6$	0,9969	2,5 a 200
Fipronil	$y=940,51x-1108,7$	0,9983	$y=896,2x-825,92$	0,9994	2,5 a 200
Heptacloro - epóxido	$y=1368,7x-1670,6$	0,9990	$y=1425,4x-2417,2$	0,9983	2,5 a 200
Profenfós	$y=462,04x-244,16$	0,9987	$y=485,97x+946,66$	0,9997	2,5 a 200
4,4 DDE	$y=1393,4x-4143,9$	0,9967	$y=1381,3x-2832$	0,9992	10 a 200
Endrin	$y=972,04x-1825,2$	0,9997	$y=881,79x-2817,6$	0,9941	2,5 a 200
4,4 DDD	$y=946,66x-1796,8$	0,9992	$y=928,33x-942,09$	0,9998	2,5 a 200
4,4 DDT	$y=745,82x-2362,8$	0,9985	$y=693,4x-1343,4$	0,9999	2,5 a 200
Fenpropatrina	$y=179,38x-124,93$	0,9992	$y=175,47x-86,882$	0,9997	2,5 a 200
cis-Permetrina	$y=41,726x+22,81$	0,9960	$y=37,849x+139,1$	0,9970	10 a 200
trans-Permetrina	$y=50,208x+2,52$	0,9972	$y=48,769x+91,935$	0,9978	10 a 200
Ciflutrina	$y=171,96x-337,14$	0,9968	$y=146,96x+539,33$	0,9954	10 a 200
Deltametrina	$y=92,008x-124,41$	0,9999	$y=83,315x+89,544$	0,9986	10 a 200

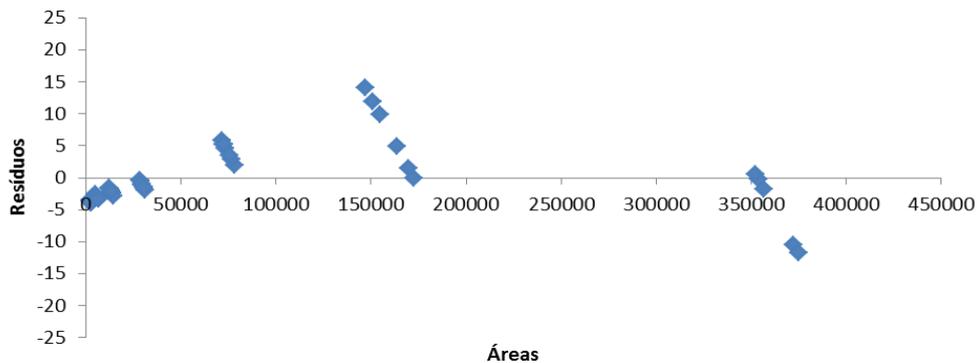
Fonte: (AUTOR).

A partir da Tabela 6 se pode observar que todos os agrotóxicos apresentaram coeficiente de determinação maior que 0,9900. Isso apresenta um grande indicativo da linearidade do método proposto. Juntamente ao coeficiente de determinação foram observados os resíduos das curvas analíticas preparadas em extrato "branco" de matriz para poder confirmar a faixa linear de cada agrotóxico. Após a análise desses dois fatores pode-se observar que 73,7% dos analitos apresentaram faixa linear de 2,5 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto os demais 26,3% apresentaram uma faixa linear de 10 a 200.

Os resíduos foram calculados de acordo com Vareli (2018) e depois de calculados os resíduos individuais de cada agrotóxico eles foram levados em consideração para o estabelecimento da faixa linear visto que o documento orientativo Sante (2017) estabelece que o desvio das concentrações retrocalculadas dos padrões de calibração das concentrações reais, utilizando a curva de calibração na região relevante, não deve ser superior a  $\pm 20\%$ . Com isso, os níveis de concentração onde os resíduos foram superiores a  $\pm 20\%$  foram considerados fora da faixa linear. A Figura 12 representa um exemplo dos resíduos calculados

para os pesticidas, para os demais agrotóxicos, os gráficos de resíduos encontram-se no Apêndice B.

Figura 12 - Resíduos da curva analítica do agrotóxico Heptacloro obtida a partir de soluções analíticas preparadas em extrato "branco" de matriz.



Fonte: (AUTOR).

Outro fator importante sobre os resíduos é a homoscedasticidade do modelo utilizado. Ou seja, independência, variância constante para diferentes níveis de X e distribuição normal.

### 5.3.2 Avaliação do efeito matriz

O efeito matriz foi calculado de acordo com a Equação 2 descrita no item 3.6.1. Os resultados encontram-se na Tabela 7.

Partindo do princípio que o efeito matriz promove aumento ou supressão do sinal analítico quando comparada a resposta do detector a um determinado analito que esta presente em extrato "branco" de matriz e em solvente orgânico.

De acordo com o documento orientativo Sante (2017), mais de 20% de supressão ou aumento de sinal os efeitos de matriz precisam ser abordados na calibração. Devido ao efeito matriz sofrer variações ao longo do tempo e com as condições do instrumento, deve-se monitorá-lo constantemente, independente de ser na etapa de desenvolvimento de método quanto na aplicação do método validado nas análises de rotina. Uma vez que um dos analitos (gama-HCH) apresentou efeito matriz fora da faixa de  $\pm 20\%$  o método de *matrix-matched calibration* foi utilizado para a quantificação de todos os analitos a fim de compensar o efeito matriz (PIZZUTTI et al., 2009).

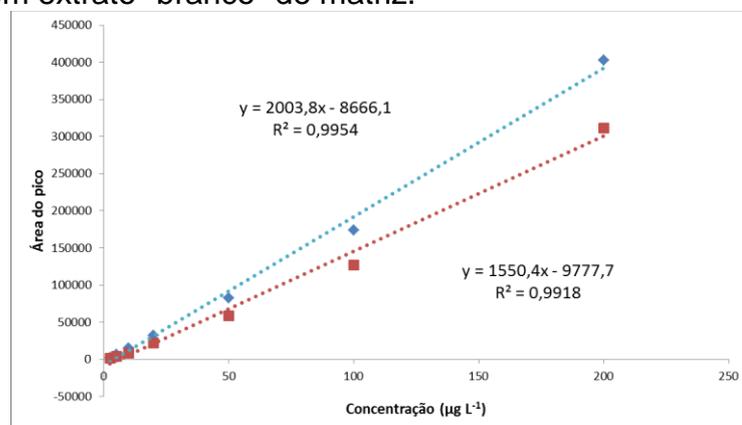
Tabela 7 - Efeito matriz percentual dos agrotóxicos analisados por GC- $\mu$ ECD a partir das soluções preparadas em isoctano/tolueno (9:1, v/v) e em extrato "branco" de matriz.

Agrotóxico	Efeito Matriz (%)
Alfa-HCH	-3,30
Beta-HCH	0,50
hexaclorobenzeno	0,80
Gama-HCH	-22,63
Heptacloro	4,69
Clorpirifós	4,41
Aldrin	0,58
Fipronil	4,94
Heptacloro - epóxido	-3,98
Profenfós	-4,92
4,4 DDE	0,88
Endrin	10,23
4,4 DDD	1,97
4,4 DDT	7,56
Fenpropatrina	2,23
cis-Permetrina	10,24
trans-Permetrina	2,95
Ciflutrina	17,01
Deltametrina	10,43

Fonte: (AUTOR).

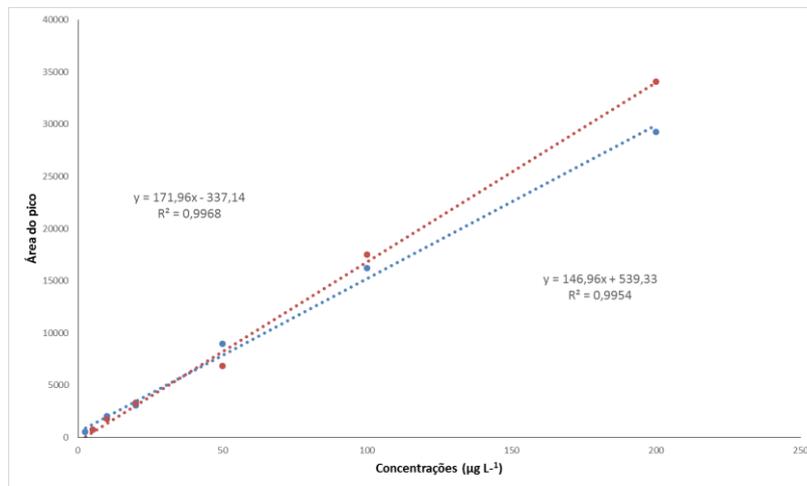
A Figura 13 representa as curvas analíticas preparadas em extrato "branco" de matriz e em solvente mostrando o efeito matriz negativo enquanto que a Figura 14 apresenta efeito matriz positivo.

Figura 13 - Comparação entre as curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas de gama-HCH, preparadas em isoctano/tolueno (9:1, v/v) e em extrato "branco" de matriz.



Fonte: (AUTOR).

Figura 14 - Comparação entre as curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas de Ciflutrina, preparadas em isooctano/tolueno (9:1, v/v) e em extrato "branco" de matriz.



Fonte: (AUTOR).

### 5.3.3 Limites de detecção e quantificação

Os resultados de LOD e LOQ do método para cada pesticida estão demonstrados na Tabela 8.

O limite de detecção foi estabelecido como a concentração mais baixa injetada de cada agrotóxico no processo de linearidade. Em 78,9% dos agrotóxicos o LOD foi o nível de concentração mais baixo da curva analítica prepara em extrato "branco" de matriz, o que corresponde a  $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Para os demais (21,1%), o LOD foi mais baixo que o primeiro nível da faixa linear. Este resultado deu-se, pois o analito foi detectado com relação sinal/ruído  $\geq 3$ , contudo os resíduos deste nível não foram satisfatórios para que o mesmo fosse considerado como parte da faixa linear. Conforme a Figura 6 do item 3.6.2 pode-se ver claramente que o LOD não necessariamente deva fazer parte da faixa linear.

Já o LOQ foi estabelecido através dos ensaios de fortificação/recuperação conforme o procedimento do item 4.9.1. Foram avaliados 4 níveis de fortificação 5, 10, 20 e  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  realizados em 7 replicatas ( $n=7$ ). O LOQ foi considerado como o menor nível que apresentou resultados conforme a recomendação do documento Sante (2017), onde a recuperação média das replicatas deve estar entre 70 a 120% e o desvio padrão relativo (RSD%)  $\leq \pm 20\%$ . A Tabela 8 apresenta os valores das recuperações médias de cada nível para cada agrotóxico.

Tabela 8 - Valores médios (n=7) de recuperação, RSD%, LOD e LOQ obtidos nos estudos de fortificação/recuperação através das análises de extrato "branco" de mel fortificado nas concentrações de 5, 10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Agrotóxicos	REC 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (%)	RSD (%)	REC 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (%)	RSD (%)	REC 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (%)	RSD (%)	REC 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (%)	RSD (%)	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Alfa-HCH	58	3,6	77	5,4	85	7,2	85	7,8	2,5	10
Beta-HCH	88	5,1	79	9,9	100	10,8	86	12,4	2,5	5
hexaclorobenzeno	114	7,3	82	5,2	88	9,8	79	8,2	2,5	10
Gama-HCH	75	4,4	76	9,0	88	16,5	86	13,9	2,5	10
Heptacloro	76	6,8	83	7,4	89	13,5	82	17,4	2,5	5
Clorpirifos	92	6,6	99	8,3	97	7,7	84	12,3	2,5	5
Aldrin	79	9,2	81	6,1	93	15,3	79	13,1	2,5	5
Fipronil	84	6,9	84	14,4	89	12,4	81	13,3	2,5	5
Heptacloro - epoxido	81	12,1	81	5,8	91	12,4	94	11,5	2,5	5
Profenfos	89	8,6	94	13,1	97	12,2	86	10,3	2,5	5
4,4 DDE	38	9,5	96	2,7	105	7,8	96	14,9	5	10
Endrin	84	4,7	82	10,7	92	6,2	92	16,6	2,5	5
4,4 DDD	78	6,8	80	5,4	95	13,4	85	11,8	2,5	5
4,4 DDT	80	6,8	85	12,8	106	6,3	84	9,3	2,5	5
Fenrpopatrina	99	6,4	89	6,5	97	7,8	84	10,7	2,5	5
cis-Permetrina	27	43,5	108	7,8	88	12,0	80	7,6	5	10
trans-Permetrina	22	35,6	100	11,9	102	15,6	88	13,9	5	10
Ciflutrina	46	12,9	84	10,5	91	6,7	83	4,1	5	10
Deltametrina	n.d*	0,00	46	15,3	93	13,3	93	12,4	10	20

\*n.d= abaixo do limite de detecção do método.

Fonte: (AUTOR).

A partir dos resultados observados na Tabela 8 pode-se observar que 57,9% dos agrotóxicos apresentarem LOQ de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , 36,8% LOQ de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  e 5,3% LOQ de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Alguns agrotóxicos como alpha-HCH, 4,4 DDE, cis-permetrina, trans-permetrina e ciflutrina apresentaram recuperações para o nível de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , contudo as recuperações foram abaixo de 70% estipulado por Sante (2017). Além disso, a permetrina tanto cis quanto trans apresentaram o valor de RSD% fora da faixa de  $\pm 20,0\%$ . Os agrotóxicos alfa-HCH, 4,4 DDE e ciflutrina apesar das baixas recuperações apresentaram resultados satisfatórios de RSD% mostrando ser bem preciso os resultados entre as 7 replicatas dos ensaios de fortificação/recuperação.

Para os agrotóxicos HCB e gama-HCH o LOQ determinado experimentalmente foi de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . A justificativa encontra-se no item 5.3.4.

Considerando então os limites máximos de resíduos destes agrotóxicos em mel, pode-se verificar que todos os LOQ ficaram ou no mesmo nível de concentração ou em concentração menor que a máxima permitida. Com isso, o método mostrou-se extremamente qualificado para atender a legislação em análises de amostras.

#### 5.3.4 Precisão Intermediária

Para este estudo o procedimento do item 4.9.1 foi realizado uma primeira vez por um analista, denominado Analista 1, e uma semana depois o mesmo procedimento foi realizado por um segundo analista, denominado Analista 2. Os resultados das recuperações médias de cada analista e o cálculo dos respectivos desvios padrão relativo encontram-se na Tabela 9.

Os critérios de precisão intermediária de acordo com Sante (2017) são de que o RSD% deve ser inferior a 20% e o documento orientativo DOQ-CGCRE-008 do Inmetro (2018) estabelece que o RSD% deve ser menor que 21% para nível de  $10 \mu\text{g kg}$ . Contudo, além de avaliar o RSD% entre os dois analista realizou-se também o teste estatístico *t* a fim de testar se a condição testada (diferentes analistas) exercem influências significativas no valor do RSD% da precisão intermediária. Com isso, testou-se as 7 recuperações em cada nível para cada analito entre os analistas a fim de verificar se os dois grupos diferentes são considerados estatisticamente semelhantes ou não, a Tabela 10 apresenta os resultados do teste *t*.

Tabela 9 - Comparação entre os valores médios de recuperação obtidos através da análise de extrato "branco" de mel fortificado nas concentrações de 5, 10, 20 e 50  $\mu\text{g k}^{-1}$  (n=7), realizada por dois analistas, no intervalo de 7 dias.

Agrotóxicos	Recuperação 5 $\mu\text{g k}^{-1}$			Recuperação 10 $\mu\text{g k}^{-1}$			Recuperação 20 $\mu\text{g k}^{-1}$			Recuperação 50 $\mu\text{g k}^{-1}$		
	Analista		RSD(%)	Analista		RSD(%)	Analista		RSD(%)	Analista		RSD(%)
	1	2		1	2		1	2		1	2	
Alfa-HCH	58	56	0,97	77	74	1,57	85	81	2,48	85	82	2,00
Beta-HCH	88	100	6,74	79	97	10,02	100	100	0,18	86	95	5,07
HCB	114	78	18,94	82	74	5,05	88	72	9,49	79	77	0,96
Gama-HCH	75	91	9,20	76	78	1,40	88	86	0,77	86	98	6,67
Heptaclo	76	77	0,59	83	79	2,05	89	77	7,07	82	79	2,07
Clorpirifos	92	80	6,71	99	97	1,08	97	99	0,82	84	95	6,09
Aldrin	79	79	0,03	81	76	3,15	93	81	6,55	79	76	1,61
Fipronil	84	80	2,51	84	88	2,53	89	76	7,84	81	88	4,06
Heptaclo - epoxido	81	79	1,73	81	100	10,43	91	88	1,83	94	88	3,54
Profenfos	89	93	2,23	94	99	2,42	97	101	1,94	86	104	9,45
4,4 DDE	38	41	3,80	96	82	7,41	105	98	3,68	96	101	2,33
Endrin	84	75	5,59	82	96	8,14	92	96	2,63	92	94	1,24
4,4 DDD	78	79	0,26	80	90	5,91	95	83	6,09	85	93	4,29
4,4 DDT	80	84	2,55	85	103	9,52	106	86	10,04	84	96	6,77
Fenpopatrina	99	100	0,71	89	98	4,78	97	88	4,77	84	99	8,43
cis-Permetrina	27	30	5,26	108	87	10,54	88	88	0,27	80	106	13,91
trans- Permetrina	22	27	10,20	100	86	7,51	102	92	5,12	88	106	9,15
Ciflutrina	46	36	12,20	84	90	3,53	91	85	3,01	83	96	7,17
Deltametrina	n.d*	0,00	0,00	46	58	11,97	93	81	6,48	93	91	1,09

Fonte: (AUTOR).

Tabela 10 - Resultados estatísticos do teste *t* para análise de precisão intermediária dos ensaios de recuperação/fortificação com valor de confiança de 95% (n=7).

Agrotóxicos	Nível 5 µg k <sup>-1</sup>		Nível 10 µg k <sup>-1</sup>		Nível 20 µg k <sup>-1</sup>		Nível 50 µg k <sup>-1</sup>	
	T <sub>calculado</sub>	P	T <sub>calculado</sub>	P	T <sub>calculado</sub>	P	T <sub>calculado</sub>	P
Alfa-HCH	0,38	0,72	0,98	0,37	0,95	0,38	0,89	0,41
Beta-HCH	1,81	0,12	2,13	0,08	0,01	0,99	1,24	0,26
HCB	3,07	0,04	1,58	0,06	2,07	0,09	0,40	0,70
Gama-HCH	6,72	0,003	0,51	0,63	0,41	0,70	1,77	0,13
Heptacloro	0,53	0,62	1,04	0,34	1,27	0,25	0,05	0,96
Clorpirifós	0,89	0,41	0,77	0,47	0,61	0,56	1,81	0,12
Aldrin	0,07	0,95	1,47	0,19	1,87	0,11	0,40	0,70
Fipronil	1,38	0,22	0,72	0,50	2,07	0,09	0,80	0,46
Heptacloro - epóxido	0,5	0,63	2,32	0,06	1,13	0,30	0,99	0,36
Profenfós	0,68	0,52	0,16	0,87	0,41	0,69	2,34	0,07
4,4 DDE	1,1	0,31	1,74	0,14	1,81	0,12	1,37	0,22
Endrin	2,22	0,08	2,30	0,07	1,41	0,21	0,25	0,80
4,4 DDD	0,08	0,93	1,91	0,10	1,80	0,12	0,88	0,41
4,4 DDT	0,64	0,54	1,54	0,17	1,95	0,10	1,64	0,15
Fenrpopatrina	0,43	0,68	2,00	0,91	1,57	0,47	2,02	0,08
cis-Permetrina	0,98	0,36	2,00	0,10	0,11	0,91	2,15	0,08
trans-Permetrina	0,01	0,99	1,50	1,18	0,15	0,88	1,76	0,13
Ciflutrina	0,88	0,41	0,91	0,40	1,10	0,31	2,07	0,08
Deltametrina	n.c.*	n.c.*	155	0,18	1,05	0,33	0,21	0,84

\*n.c.= não calculado;  $t_{\text{crítico}(0,05, 6)} = 2,45$

Fonte: (AUTOR).

Com base nos resultados de RSD% apresentados na Tabela 9 e do teste  $t$  apresentados na Tabela 10 é possível analisar se os dados são estatisticamente semelhantes e com isso, assegurar a precisão intermediária do método para cada analito em cada nível de fortificação/recuperação. Para esta avaliação, foram verificados os resultados encontrados de RSD% inferior a 20% e os valores de  $P$  e  $T_{\text{calculado}}$  com nível de confiança de 95% e 6 graus de liberdade ( $n=7$ ). Neste segundo caso pode-se afirmar que os resultados são estatisticamente semelhantes em caso do valor de  $P$  ser superior a 0,05 e o valor de  $T_{\text{calculado}}$  deve ser obrigatoriamente maior que o valor de  $T_{\text{crítico}}$ .

O valor de  $T$  crítico para nível de confiança de 95% e 6 graus de liberdade é de 2,45. Com essa base, pode-se comparar os valores de  $T_{\text{calculado}}$  presentes na Tabela 10. Com exceção dos agrotóxicos HCB e gama-HCH no nível de fortificação de  $5 \mu\text{g k}^{-1}$  todos os outros resultados apresentaram o comportamento de  $P > 0,05$  e  $T_{\text{calculado}} > T_{\text{crítico}}$ .

Devido ao comportamento apresentado pelos agrotóxicos HCB e gama-HCH é possível afirmar que para nível de fortificação  $5 \mu\text{g k}^{-1}$  os valores de recuperação encontrado entre os dois analista são estatisticamente diferentes, ou seja, para estes agrotóxicos nesse nível em particular o método não se mostrou preciso. Uma vez que não se pode garantir a precisão neste nível, apesar de ambos apresentarem boa exatidão, o LOQ para estes agrotóxicos não podem ser considerado  $5 \mu\text{g k}^{-1}$  pois o mesmo não apresenta níveis de precisão confiáveis.

### 5.3.5 Exatidão

Os resultados de exatidão foram apresentados na Tabela 8, e foram obtidos através dos ensaios de fortificação-recuperação onde foram calculados os valores recuperados frente ao valor conhecido fortificado.

Para fortificação de  $5 \mu\text{g k}^{-1}$  os agrotóxicos alfa-HCH, 4,4 DDE, cis-Permetrina, trans-Permetrina e Ciflutrina não apresentaram valores de exatidão satisfatórios (70-120% de acordo com Sante (2017)). Os demais níveis para estes agrotóxicos apresentaram resultados dentro dos parâmetros estabelecidos.

Em relação aos demais agrotóxicos a exatidão foi atingida satisfatoriamente nos quatro níveis de fortificação estudados.

#### 5.4 MONITORAMENTO EM AMOSTRAS DE MEL

As amostras de méis analisadas neste trabalho são provenientes de diferentes cidades do estado do Rio Grande do Sul conforme descritas no item 4.8. A coleta das amostras foi realizada simulando a compra de um consumidor. Após coletadas, as amostras permaneceram armazenadas em suas embalagens originais de coleta até a análise. O armazenamento foi em temperatura ambiente sem tratamento especial prévio.

A extração das amostras foi exatamente como descrita a amostra “branco” no item 4.9.1. Juntamente a extração das amostras foi realizado uma extração controle de fortificação/recuperação no nível de  $10 \mu\text{g k}^{-1}$  com a finalidade de auxiliar o controle de qualidade fornecido pelos P.I.I e P.I.P.

As extrações ocorreram em dois dias distintos sendo divididas em dois grupos. O grupo 1 era composto pelas amostras MM01 a MM10, enquanto o grupo 2 era composto pelas amostras ML01 a ML09 e os resultados encontram-se nas Tabelas 11 e 12 respectivamente.

A partir das análises realizadas pode-se verificar que os méis analisados frente aos 19 pesticidas deste trabalho apresentaram estar dentro das exigências da legislação de acordo com o MAPA (2018). Como pode ser observado nas Tabelas 11 e 12 nenhuma amostra apresentou concentração de agrotóxicos acima do LMR estabelecido.

Tabela 11 – Concentrações dos agrotóxicos obtidos após análise por GC- $\mu$ ECD das amostras do grupo 1 (n=3).

<b>Agrotóxicos</b>	<b>MM01</b>	<b>MM02</b>	<b>MM03</b>	<b>MM04</b>	<b>MM05</b>	<b>MM06</b>	<b>MM07</b>	<b>MM08</b>	<b>MM09</b>	<b>MM10</b>
<b>Alfa-HCH</b>	n.d.									
<b>Beta-HCH</b>	n.d.									
<b>HCB</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Gama-HCH</b>	n.d.									
<b>Heptacloro</b>	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	<LOQ
<b>Clorpirifós</b>	n.d.									
<b>Aldrin</b>	n.d.									
<b>Fipronil</b>	n.d.									
<b>Heptacloro-epóxido</b>	n.d.									
<b>Profenofós</b>	n.d.									
<b>DDE</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Endrim</b>	n.d.									
<b>4,4 DDD</b>	n.d.									
<b>4,4 DDT</b>	n.d.									
<b>Fenpropatrina</b>	n.d.									
<b>Cis-permetrina</b>	n.d.									
<b>Trans-permetrina</b>	n.d.									
<b>Ciflutrina</b>	n.d.									
<b>Deltametrina</b>	n.d.									

\*n.d= abaixo do limite de detecção, <LOQ= resultado esta entre o limite de detecção e o limite de quantificação.

Fonte: (AUTOR).

Tabela 12- Concentrações dos agrotóxicos obtidos após análise por GC- $\mu$ ECD das amostras do grupo 2 (n=3).

<b>Agrotóxicos</b>	<b>ML01</b>	<b>ML02</b>	<b>ML03</b>	<b>ML04</b>	<b>ML05</b>	<b>ML06</b>	<b>ML07</b>	<b>ML08</b>	<b>ML09</b>
<b>Alfa-HCH</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Beta-HCH</b>	n.d.								
<b>HCB</b>	n.d.								
<b>Gama-HCH</b>	n.d.								
<b>Heptacloro</b>	n.d.								
<b>Clorpirifós</b>	n.d.								
<b>Aldrin</b>	n.d.								
<b>Fipronil</b>	n.d.								
<b>Heptacloro- epóxido</b>	n.d.								
<b>Profenofós</b>	n.d.								
<b>DDE</b>	n.d.								
<b>Endrim</b>	n.d.								
<b>4,4 DDD</b>	n.d.								
<b>4,4 DDT</b>	n.d.								
<b>Fenpropatrina</b>	n.d.								
<b>Cis- permetrina</b>	n.d.								
<b>Trans- permetrina</b>	n.d.								
<b>Ciflutrina</b>	n.d.								
<b>Deltametrina</b>	n.d.								

\*n.d= abaixo do limite de detecção, <LOQ= resultado esta entre o limite de detecção e o limite de quantificação.

Fonte: (AUTOR).

## 5.5 CONTROLES DE QUALIDADE

Para verificar o desempenho do método analítico e do comportamento do instrumento utilizado, foram utilizados dois padrões internos, um para o procedimento e outro para o instrumento. Todo o procedimento de extração, a partir da etapa de fortificação, foi controlado através da solução do PCB-153. Os valores de recuperação para o P.I.P. foram calculadas e tiveram os mesmos critérios de aceitação que os ensaios de fortificação/recuperação dos demais pesticidas. Todavia, quando os resultados não se encontram dentro das condições adequadas, o processo de extração deve ser repetido (LOZANO et al., 2016). Contudo, nesse estudo não houve a necessidade de repetir nenhuma etapa de extração, visto que em todos os casos o P.I.P. teve-se recuperação (RSD%) entre 75,5 e 120% (16%).

Conforme Pizzutti (2006) afirmou, no sistema de cromatografia a gás há uma maior necessidade de avaliar o sistema de injeção, pois o sistema de GC apresenta menor estabilidade e menor repetitividade quando comparado ao sistema de LC. Neste estudo o P.I.I. foi o bromofós-etílico. No final de cada extração transferiu-se 990  $\mu\text{L}$  do extrato final da extração e adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de bromofós-etílico 10  $\text{mg L}^{-1}$ . Considerou-se como dentro dos padrões aceitáveis quando o RSD% apresentado pelas áreas de injeção fosse inferiores a  $\pm 30\%$  da área média das injeções. Caso ocorre-se uma injeção onde a área do pico cromatográfico do padrão divergisse mais ou menos 30% a amostra deveria ser reinjetada. Entretanto, se houvessem mais desvios observados, todo o conjunto de amostras e soluções padrões deveriam ser reanalisados (LOZANO et al., 2016). Entretanto o equipamento usado mostrou-se bem preciso, pois o RSD% apresentado de todas as injeções foram inferiores a 12,9%.

## 6 CONCLUSÕES

Atualmente métodos analíticos multirresíduos para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos utilizando um único ou uma combinação de solventes orgânicos são vastamente empregados. Em alguns casos ainda, faz-se uso de etapas de purificação do extrato necessária para matrizes mais complexas como o caso do mel.

O método de extração empregado combinado ao sistema GC- $\mu$ ECD mostrou-se altamente seletivo aos analitos estudados visto que os componentes co-extraídos da matriz não apresentaram grande aumento ou supressão de sinal para a grande maioria dos agrotóxicos.

Este estudo mostrou através de ensaios de fortificação/recuperação que o método utilizado apresenta boa exatidão e juntamente aos testes estatísticos bons resultados de precisão para a grande maioria dos agrotóxicos nos quatro níveis de fortificação. Apenas dois analitos não apresentaram confiabilidade na precisão no nível de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , e 5 analitos não apresentaram exatidão necessária nesse nível.

O método analítico mostrou-se útil quanto aos limites de quantificação e detecção uma vez que todos os LOQ foram ou em concentrações inferiores ou concentrações iguais aos limites máximos de resíduo permitido segundo a legislação do MAPA (2018).

Após avaliação das curvas analíticas preparadas em extrato “branco” de matriz e em solvente orgânico combinado aos cálculos e análises de resíduos, pode-se verificar a faixa linear do método para cada agrotóxico sendo que a grande maioria apresentou faixa linear de 2,5 a  $200 \mu\text{g K}^{-1}$ .

O método validado mostrou-se eficiente na determinação de resíduos de 19 agrotóxicos por GC- $\mu$ ECD em méis e foi aplicado em 19 amostras coletadas em 5 das 7 mesorregiões existentes no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

As amostras analisadas estavam em conformidade com a legislação em relação aos 19 agrotóxicos analisados, sendo que nenhuma apresentou concentração dos agrotóxicos com concentração superior ao seu respectivo LMR.

## REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBRISO/IEC 17025**. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro. 2017.
- AHMED, S. et al. Honey as a potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into its molecular Mechanisms of Action. **Oxid. Med. And Cellu. Logenv**. 2018.
- AKTAR, M. W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisc Toxicol**, Vol. 2(1): 1–12, 2009.
- ALVES, M. I. R.; FILHO, N. R. A.; OLIVEIRA, L. G.; FURTADO, S. T. F. Avaliação da Contaminação por Pesticidas Organoclorados em Recursos Hídricos do Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 15, n.1, p. 67-74, 2010.
- ANASTASSIADES, M. et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residue in Produce. **Journal of AOAC International** Vol. 86, N° 2, 2003.
- APVMA, The Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. **Organophosphate Pesticides**. Safe Work Australia, 2013.
- BAIRD, COLINCANN, MICHAEL. **Environmental chemistry**. New York, NY: W.H. Freeman, 2008.
- BARBOZA, H. T. G. et al. Compostos organofosforados e seu papel na agricultura. **Revista virtual de química**, v. 10, n. 1, p. 172-193, 2018.
- BRASIL, Decreto nº 5.472, de 20 de junho de 2005. Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. Diário oficial da União, casa civil subchefia para assuntos jurídicos, Brasília, DF.
- BRASIL. Lei n. 7.802, de 11 de julho de 1989. Lei de Agrotóxicos. **Diário Oficial da União**, poder executivo, Brasília, DF.
- BUDZYŃSKA, E. et al. Ion mobility spectrometers and electron capture detector – A comparison of detection capabilities. **Talanta**, 194, p. 259-265, 2019.
- CAMARGO, R. C. R et al. Mel: Características e propriedades. Teresina, PI: Embrapa meio-norte, 2006.
- CAMARGO, R. C. R.; PEREIRA, F. M.; LOPEZ, M. T. R. Sistema de produção 3: Produção de mel. Teresina, PI: Embrapa meio-norte, 2002.

CARLOS, E. A.; ALVES, R. D.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. J. B. Simultaneous determination of the organochlorine and pyrethroid pesticides in drinking water by single drop microextraction and gas chromatography. **Chemical Society**, v. 24, n. 8, p. 1217-1227, 2013.

CHATWAL, G.R., **Analytical Chromatography**. New Delhi: Himalaya Pub. House, 2006.

CHEN, E. C. M.; CHEN, E. S. Electron affinities from gas chromatography electron capture detector and negative ion mass spectrometry responses and complementary methods. **Journal of Chromatography A**, 1573, p. 1-17, 2018.

Codex Alimentarius Commission, "Revised Codex Standard for Honey Codex Stan 12-1981, Rev. 2" Codex Standard, Vol. 12. 1981, pp. 1-7, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS. **Procedural Manual**. Edição 19. 2010.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1 ed. Editora UNICAMP, São Paulo, 2006.

EDDLESTON, M. Novel clinical toxicology and pharmacology of organophosphorous insecticide self-poisoning. **Annual Review of pharmacology and toxicology**, v.59, p. 341-360, 2018.

FERIGOLLO, D. et al. Aquisição de produtos da agricultura familiar para alimentação escolar em municípios do Rio Grande do Sul. **Revista de Saúde Pública**. 51. 1-10(2017).

FAO. **Food and Agriculture Data**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. 2017. Acessado em: 05 Fev. 2019. 2017

FULTON, C. A. et al. An assessment of pesticide exposures and land use of honey bees in Virginia. **Chemosphere**, v. 222, p. 489-493, 2019.

GROB, R. L. E.; BARRY, E. F. **Modern practice of gas chromatography**. Hoboken, N.J., Wiley-Interscience, 2004.

GONG, D.C., Pyrethroids pesticides residues and their behavior in a multimediu environment of Loagtan River Barin. Dissertação de mestrado, Universidade de Chongqing, Chongqing China, 2013.

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

HOH, E. e MASTOVSKA, K. Large volume injection techniques in capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v1186, p. 2-15, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Pecuária Municipal de 2017. Diretoria de pesquisas, coordenação de agropecuária, 2019.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008. **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**: documento de caráter orientativo. Revisão 07, julho. 2018.

ITIS, Integrated Taxonomic Information System. **Hymenoptera** Taxonomic Serial No.: 152741, 2013. Disponível em < <https://www.itis.gov/>> acessado e 15/02/2019.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, nº 4. 2009.

KOUREAS, M. et al. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. **Toxicol. Lett.** 210 (2), 155-168, 2012.

KONRADSEN, F. et al. Engineering and malaria control: learning from the past 100 years. **Acta Tropica**, v.89, p.99-108, 2004.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos, SP: Acta, 1993.

LANÇAS, F. M. **Fundamentos de Cromatografia Gasosa**. 1 Ed., São Paulo, 2017.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. 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.**, 88, 615, 2005.

LOVELOCK, J. E.; LIPSKY, S. R. Electron affinity spectroscopy – A new method for the identification of functional groups in chemical compounds separated by gas chromatography. **J. Am. Chem. Soc.**, 82, p. 431-433, 1960.

LOZANO, A., et al. Miniaturisation and optimization of the Dutch mini-like extractions method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticide in fruits and vegetables. **Food Chem.**, v.192, p. 668-681, 2016.

Ma, X., Research progress on analytical technique of pyrethroid pesticide residue. **J. Anhui Agr. Sci.**, 37 (28), p. 13775-13777, 2009.

MAPA. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa No 11. **REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DO MEL**. De 20 de out. de 2000.

MAPA. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa No 20. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal – PNCRC**. De 12 de jan de 2019.

MATTHEWS, G. A. **A history of Pesticides**. Boston, MA: CABI 2018.

MEYER, V.R. **Chromatography | Principles**. Reference Module in Chemistry, Molecular sciences and Chemical Engineering, 2013.

MULLIN, C. A. et al. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implication for Honey Bee Health. **PLoS one** 5, e9754, 2010.

PIZZUTTI, I. R. **Validação de métodos multirresíduos de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS**. 2006, 297 p. Tese (Doutorado em Química) , Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

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

QUEIROZ, E. L. R. Organoclorados: Um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade** Vol. VII nº 2, 2004.

RAHMAN, M. M. et al. Basic Overview on Gas Chromatography Columns. **Analytical Separation Science**, first edition, 2015.

RAMOS, M. M. G. et al. Analysis and evaluation of (neuro)peptides in honey bees exposed to pesticides in field conditions. **Environmental Pollution**. V. 235, p. 750-760, 2018.

SANDERS, W.N.; MAYNARD, J. B. Capillary gas chromatographic methods for determining the C3-C12 hydrocarbons in full-range motor gasoline. **Anal. Chem.** 40 (3), PP 527-535, 1968.

SANTE. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed**. Documento nº SANTE/11813, 2017.

SANTOS, M. A. T., AREAS, M. A., REYES, F. G. R. Piretróides – Uma visão geral. **Alim. Nutr.**, v18, n.3, p. 339-349, 2007.

SCHOMBURG, G. **Gas chromatography**. Cambridge: VCH, 1990.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 9ª edição, São Paulo, SP 2014.

TURK, J. **Introduction to environmental studies**. 3.ed. New York: Saunders College, 1989.

UNEP, United Nations Environmental Programme. **Persistent Organic Pollutants**. 1999.

UE. União Européia. Limites máximos de resíduos em mel. Disponível em <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>> acessado em 18 de Fevereiro de 2019.

UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. **World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables**. Working Paper No.ESA/P/WP/248 2017.

VARELI, C. S. **Métodos individual e multirresidual para determinação de agrotóxicos em camas biológicas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 2018, 169 p. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

VEIGA, M, M. **Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça sócio ambiental**. *Ciência e Saúde coletiva*, v. 12, p. 145-152, 2007.

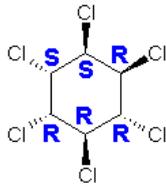
VERNICH, P. C., et al. Pesticides residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. **Environmental Pollution**, v. 241, p. 106-114, 2018.

WORLDPOPDATA. 2017 World population Data Sheet. Disponível em: <<http://www.worldpopdata.org/>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

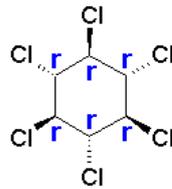
YOO, M. et al. Association between urinary 3-phenoxybenzoic acid and body mass index in korean adults: 1<sup>st</sup> korean national environmental health survey. **Ann. Occup. Environ. Med.**, 28, 2, 2016.

Zhao, L.N. **Residue and risk assessment of 7 kinds of pyrethroids in water environment in the Pearl River Delta**. 2014 (Dissertação de Mestrado). Shanghai Ocean University, Shanghai, China.

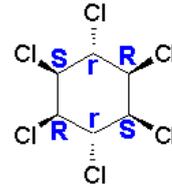
# APÊNDICE 1



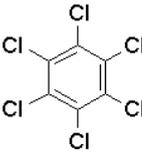
Alfa-Hexaclorociclohexano



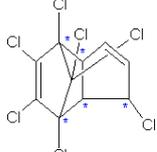
Beta-Hexaclorociclohexano



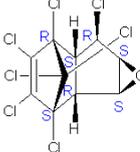
Gama-Hexaclorociclohexano



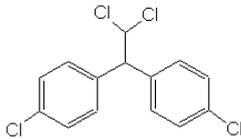
Hexaclorobenzeno



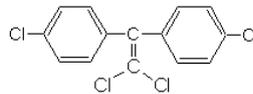
Heptacloro



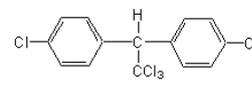
Heptacloro-epóxido



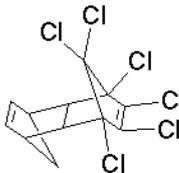
4,4 DDD



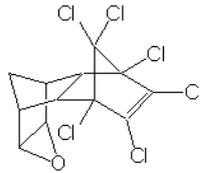
4,4 DDE



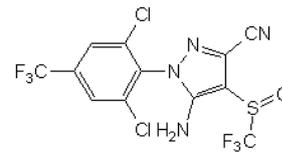
4,4 DDT



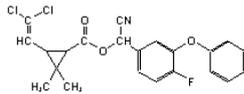
Aldrin



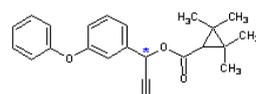
Endrin



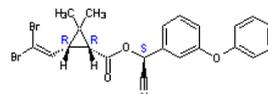
Fipronil



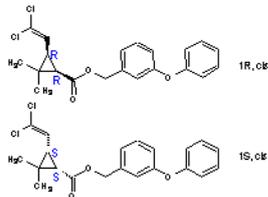
Ciflutrina



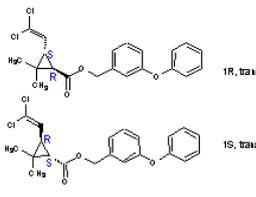
Fempropatrina



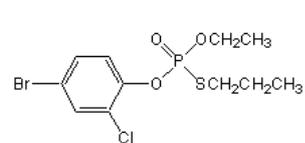
Deltametrina



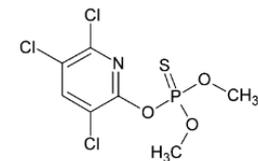
Cis-Permetrina



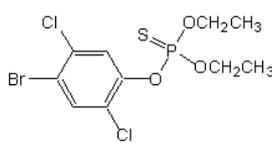
Trans-Permetrina



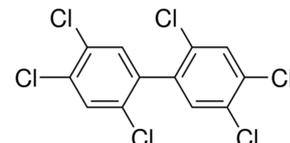
Profenofós



Clorpirifós



Bromofós-etílico



PCB- 153

## APÊNDICE 2

