

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO E LICENCIATURA EM QUÍMICA**

PATRÍCIA APPELT

**DETERMINAÇÃO DE ORGANOCLORADOS EM MATRIZES
GORDUROSAS DE ORIGEM ANIMAL - UM ESTUDO
QUALITATIVO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2011

PATRÍCIA APPELT

**DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE ORGANOCLORADOS EM MATRIZES
GORDUROSAS DE ORIGEM ANIMAL – ESTUDO QUALITATIVO**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Dr. Márcio Barreto Rodrigues
Co-orientador: Sirlei Dias Teixeira
Co-orientador: José Laurentino Ferreira

FOLHA DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE ORGANOCORADOS EM MATRIZES GORDUROSAS DE ORIGEM ANIMAL – ESTUDO QUALITATIVO** foi consideradode acordo com a ata da banca examinadora N° de 2010.

Fizeram parte da banca os professores.

Dr. Márcio Barreto Rodrigues

Ms. Simone Beux

Dr. Sirlei Dias Teixeira

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná, TECPAR - Curitiba, ao Laboratório de Pesticidas (LAPE), que me proporcionou esse desafio através deste trabalho.

Agradeço a todos os funcionários e estagiários do LAPE: Vânia, José, Marcos, Alex, Sara, Rafael; ao gerente Natalício Ferreira Leite e principalmente ao sub gerente José Laurentino Ferreira. Através do apoio e os conhecimentos adquiridos ao longo desse trabalho.

Ao professor Márcio Barreto Rodrigues meu orientador que possibilitou o estágio no Tecpar.

A professora Sirlei Dias Teixeira que muito colaborou nesse trabalho e que sempre esteve disposta a enriquecer os meus conhecimentos. Obrigada por sua paciência e carinho.

Aos meus amigos que sempre estiveram no meu lado. E a todos os meus professores (também amigos) que tiveram palavras amigas no momento em que precisei principalmente Diogo, Edimir, Raquel, e Simone.

*“Sempre desprezei as coisas mornas,
as coisas que não provocam ódio nem paixão,
as coisas definidas como mais ou menos.
Um filme mais ou menos, um livro mais ou menos.
Tudo perda de tempo.
Viver tem que ser mais perturbador,
é preciso que nossos anjos e demônios
sejam despertados,
e com eles sua raiva, seu orgulho,
seu asco, sua adoração ou seu desprezo.
O que não faz você mover um músculo,
o que não faz você estremecer,
suar, desatinar,
não merece fazer parte de sua biografia.”*

Martha Medeiros

RESUMO

Appelt, Patrícia. DETERMINAÇÃO DE ORGANOCLORADOS EM MATRIZES GORDUROSAS DE ORIGEM ANIMAL – UM ESTUDO QUALITATIVO. 2011. Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Os pesticidas, compostos utilizados na agricultura para combater vetores indesejáveis e garantir maior produtividade, tem sido estudado pelo seu uso intensivo nos últimos 40 anos. Apesar dos benefícios, o problema de intoxicações por defensivos agrícolas principalmente pelo grupo de pesticidas organoclorados preocupa as autoridades, especialmente pelo fato de que essas intoxicações acontecem pela ingestão gradativa destes produtos que contaminam água, solo e os alimentos. Diante dessa problemática, o avanço tecnológico busca utilizar métodos analíticos que sejam eficazes no monitoramento de resíduos de pesticidas. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho realizar um estudo qualitativo de pesticidas organoclorados em matrizes gordurosas a partir da análise de Cromatografia Gasosa com detector por captura de elétrons, verificando os limites máximos de resíduos (LMRs) para os compostos em estudo, e avaliando o preparo e extração de diferentes matrizes gordurosas de origem animal. A partir dos resultados obtidos baseados na interpretação dos cromatogramas das rotinas analíticas desenvolvidas foram encontrados os parâmetros de coeficiente de determinação (R^2), Limite de Detecção pelo método visual, Sensibilidade do método, Robustez, Curva analítica e Linearidade, respectivamente, os quais se mostraram satisfatórios e de significativa contribuição para a validação do método analítico em estudo.

Palavras Chaves: Pesticidas, Organoclorados, matriz gordurosa, CG-ECD.

ABSTRACTS

Appelt, Patricia. DETERMINATION OF MATRIX ORGANOCHLORINE animal fat - a qualitative study. 2011. Completion of course work, submitted to the Commission's graduation from the B.Sc. in Chemistry at the Federal Technological University of Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, as partial requirement for obtaining a bachelor's degree in chemistry.

The pesticide compounds used in agriculture to combat undesirable vectors and ensure greater productivity, has been studied for its intensive use in the last 40 years. Despite the benefits, the problem of poisoning by agricultural chemicals especially by the group of organochlorine pesticides worries the authorities, especially the fact that intoxication occurs by gradual ingestion of these products that contaminate water, soil and foods. Given this issue, the technological advance search using analytical methods that are effective in monitoring pesticide residues. Thus, this study aimed to conduct a qualitative study of organochlorine pesticides in fatty matrices from the analysis of gas chromatography with electron capture detector, checking the maximum residue limits (MRLs) for the compounds under study, and evaluating preparation and extraction of different samples of animal fat. The results were satisfactory for the qualitative parameters, demonstrating specificity of the method from the chromatograms. Moreover, the results are very important process contributing to the end of the method - analytical validation.

Keywords: Organochlorine pesticides, matrix, fat, gas chromatography electron capture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de alguns isômeros do dicloro-difenil-tricloroetano (o,p'-DDT e p,p'-DDT) e seus respectivos metabólitos.....	24
Figura 2 – Estrutura química de alguns isômeros do hexaclorociclohexano (HCH)..	25
Figura 3 - Estrutura química do hexaclorobenzeno (HCB) e do dodecaclorohidro- 1, 3,4- metano-1H-ciclobuta[c,d]pentaleno (mirex).....	27
Figura 4 – Fórmula estrutural das bifenilas policloradas (PCBs).....	28
Figura 5 – Estrutura química de alguns congêneres e isômeros do bifenil policlorado.	28
Figura 6 – Diagrama demonstrando o ruído da linha base, e o sinal para LOD e LOQ	37
Figura 7 – Curva analítica clássica.....	39
Figura 8 – Modos de diluição da solução estoque.	49
Figura 9 – a) Preparo da coluna cromatográfica , b) Evaporação do eluato.	53
Figura 10 – Balão com extrato de gordura da carne.	54
Figura 11 – Extração de pesticidas em gordura.	55
Figura 12 – Cromatograma da solução trabalho 5 ppb ²	61
Figura 13 – Cromatograma solução trabalho 10 ppb ²	61
Figura 14 – Cromatograma da solução trabalho 20 ppb ²	62
Figura 15 – Cromatograma amostra 1 (gordura origem animal) fortificada.	63
Figura 16 – Cromatograma amostra 2 (carne moída) fortificada.....	63
Figura 17 – Cromatograma amostra 3 (bacon) fortificada.	64
Figura 18 – Cromatograma amostra 1 (não fortificada).....	64
Figura 19 – Cromatograma amostra 3 (não–fortificada).....	65
Figura 20 – Comparativo entre cromatogramas da matriz de gordura fortificada e da matriz da gordura não-fortificada.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pesticidas e seus Alvos.....	18
Tabela 2 - Características técnicas de alguns pesticidas organoclorados usados na agricultura e na saúde pública de diversos países do mundo.	21
Tabela 3 - Exemplo de variação nos fatores para a determinação da robustez.....	36
Tabela 4 - Detectores usados na cromatografia com fase gasosa.....	43
Tabela 5 - Grau de pureza e fornecedores dos padrões em estudo.	48
Tabela 6 - Matrizes gordurosas utilizadas.	51
Tabela 7 - Concentração dos padrões na curva analítica.	56
Tabela 8 - Valores encontrados para pesticidas com LMRs igual.....	57
Tabela 9 – Robustez no ensaio.....	58
Tabela 10 - Resultado da inclinação, interseção e coeficiente de determinação das curvas analíticas dos pesticidas analisados.	59
Tabela 11 – Detecção dos pesticidas nas amostras.	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - de Plano Controle de Resíduos e Contaminantes - Carne.....	30
Quadro 2 - Programação da temperatura do cromatografo.....	46
Quadro 3 - Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio.....	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva Analítica Mirex.....	60
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 PESTICIDAS AGRÍCOLAS	17
2.2 PESTICIDAS ORGANOCLORADOS	20
2.2.1 Pesticidas organoclorados selecionados neste estudo	23
2.2.1.1 DDT	23
2.2.1.2 Isômeros do HCH	24
2.2.1.3 Ciclodienos	25
2.2.1.4 Mirex e HCB	26
2.2.1.5 Bifenilos policlorados	27
2.3 LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR)	29
2.4 MÉTODOS	30
2.4.1 Método Não - Empírico	30
2.4.2 Método Empírico	31
2.5 ERROS	31
2.5.1 Erro Sistemático	31
2.5.2 Erro Aleatório	31
2.6 AMOSTRAGEM	32
2.6.1 Técnicas de amostragem	32
2.6.2 Preparação de amostras	33
2.7 SEPARAÇÃO	33
2.7.1 Extração com solvente	33
2.7.1.1 Fase Aquosa	34
2.7.1.2 Fase Orgânica	34
2.8 PARÂMETROS EM UMA ANÁLISE QUALITATIVA	34
2.8.1 Especificidade/seletividade	34
2.8.2 Robustez	35
2.8.3 Limite de detecção e limite de quantificação	36
2.9 OUTROS PARÂMETROS IMPORTANTES NESSE ESTUDO	38
2.9.1 Precisão e exatidão	38
2.9.2 Linearidade	38
2.9.3 Superposição de matriz	40

2.9.4 Adição padrão	40
2.10 CROMATOGRAFIA.....	40
2.10.1 Processo de separação na cromatografia a gás	41
2.10.2 Detectores	42
2.10.3 Detector por Captura de elétrons (ECD)	43
2.11 MATRIZ ESCOLHIDA – GORDURA DE ORIGEM ANIMAL	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 MATERIAIS	46
3.1.1 Instrumentação.....	46
3.1.2 Gases utilizados	46
3.1.3 Reagentes e solventes.....	47
3.2 DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO (MÉTODO)	47
3.3 ESCOLHA DOS PESTICIDAS	47
3.4 PREPARO DE PADRÕES ANALÍTICOS	48
3.5 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E SOLUÇÃO DE TRABALHO	49
3.6 PROCEDIMENTO DE FORTIFICAÇÃO.....	50
3.7 PREPARO E EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS	50
3.7.1 Preparo e Extração – Amostra 1	51
3.7.1.1 Preparo da amostra.....	51
3.7.1.2 Método multirresíduo para determinação de pesticidas e bifenilas policloradas em produtos gordurosos	52
3.7.2 Preparo e Extração – Amostra 2	53
3.7.3 Preparo e Extração – Amostra 3	54
3.8 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	55
3.9 CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.2 PREPARO E EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS	58
4.3 ROBUSTEZ.....	58
4.4 CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE	58
4.5 CROMATOGRAMAS.....	60
4.5.1 Cromatogramas das soluções trabalhos	60
4.5.2 Cromatogramas das Amostras.....	62
4.5.3 Seletividade do método	66
4.5.4 Limite de Detecção.....	67

4.5.4.1 Método Visual.....	67
4.6 TRABALHO FUTURO	67
4.7 DIFICULDADES ENCONTRADAS.....	68
5 CONCLUSÕES	70
6 REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

Os pesticidas são produtos químicos destinados a controlar pragas, plantas, insetos, fungos indesejáveis, vetores de doenças que causam prejuízo na produção, no armazenamento, no transporte dos alimentos, visando garantir uma elevada produtividade agrícola.

A agricultura brasileira vem se destacando com números cada vez mais expressivos, na produção, em área plantada, na exportação e na quantidade de tecnologias empregadas no campo. Esse crescimento traz também à utilização de maiores quantidade de pesticidas na produção agrícola, colocando o Brasil como segundo maior consumidor mundial (ANVISA, 2006).

Porém, a utilização excessiva destes compostos químicos pode gerar resíduos os quais são definidos como qualquer substância presente nos alimentos ou ração animal resultante do uso de algum pesticida, transmitindo relevância toxicológica.

A ingestão de resíduos de pesticidas através da cadeia alimentar pode tornar-se problema de saúde pública, e tem sido motivo de estudos e discussões por parte de órgãos governamentais. Por causa da toxicidade, os pesticidas são responsáveis, mundialmente, por mais de 20.000 mortes não intencionais por ano (LARA; BATISTA, 1992).

Um grupo em destaque de estudo relacionado ao uso de pesticidas e a saúde humana são os pesticidas organoclorados, devido à sua intensa e ampla utilização, tanto na agricultura, como defensivos, e nos lares, como domissanitários (CUNHA, 2003). Os organoclorados são altamente lipossolúveis, sendo rápida e eficazmente absorvidos pelo trato digestivo, possuem persistência ambiental, bioacumulação e alta toxicidade.

Apesar disso, mais recentemente, o avanço do conhecimento científico e as novas tecnologias da área laboratorial, vêm permitindo a avaliação da qualidade dos alimentos que chegam à mesa da população.

Dessa forma observa-se a importância do desenvolvimento de metodologias analíticas para o monitoramento de pesticidas organoclorados em alimentos. Assim, objetivou-se nesse estudo: (a) Preparar diferentes padrões analíticos de pesticidas organoclorados; (b) Avaliar o método de preparo e extração de diferentes matrizes gordurosas de origem animal; (c) Avaliar o limite de máximo de resíduos (LMR) para

os compostos organoclorados em estudo; (d) Estabelecer condições cromatográficas para análise de organoclorados em matrizes gordurosas; e (e) Verificar através de uma análise qualitativa a presença de organoclorados nas amostras escolhidas a partir da Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétrons (CG-ECD).

A matriz escolhida nesse estudo tratou-se de gordura de origem animal devido ao crescente desenvolvimento da agropecuária no país e por se tratar de uma matriz complexa. Além disso, o Brasil proíbe a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados, destinados à agropecuária, em todo território nacional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PESTICIDAS AGRÍCOLAS

A agricultura, quando considerada num sentido mais amplo, é responsável direta pela alteração de mais de um terço da superfície terrestre do planeta, atingindo quase todos os biomas, e foi com seu surgimento que ocorreu a primeira grande modificação no grau de interferência humana no meio ambiente.

Aproximadamente 92 % dos alimentos do mundo constituem-se de vegetais e seus derivados, sendo a quase totalidade produzida pela agricultura que ocupa uma extensão de área girando em torno de 1,6 bilhões de hectares, equivalendo aproximadamente à área da América do Sul (ROSA, 1998).

Nos últimos 40 anos, a agricultura brasileira sofreu inúmeras mudanças que alteraram tanto a composição das culturas, como os processos de produção e padrões tecnológicos até então em vigor. Ocorreu uma série de transformações tecnológicas nos processos produtivos, intensificou o emprego de insumos, como máquinas, fertilizantes e agrotóxicos, que contaram com preços favoráveis e estímulos como crédito farto a juros subsidiados, que facilitaram sua ampla adoção no meio rural. Este modelo baseado no uso intensivo de insumos químicos, sementes melhoradas foi denominado “Revolução Verde” (TOMITA, 2005).

Desde então o mercado principalmente de agrotóxicos têm crescido continuamente, por mais que se tenha descoberto ao longo dos anos os problemas associados à aplicação dessas substâncias. Dados de 1993 a 1998 mostram que o crescimento médio anual nas vendas desses produtos foi de 4 % e chegou a alcançar aproximadamente U\$ 33 bilhões. O mercado brasileiro corresponde a cerca de 6 % do mercado mundial do consumo de pesticidas.

Apesar do gasto com agrotóxicos seja alto para os agricultores, estima-se que para cada dólar investido o retorno financeiro seja de 4 a 5 dólares, o que, por si só, justifica o grande consumo desses produtos (BARBOSA, 2004).

Os pesticidas, “venenos da lavoura” ou “agrotóxicos”, são compostos utilizados na agricultura para combater plantas, insetos ou fungos indesejáveis (herbicidas, inseticidas e fungicidas, respectivamente) visando garantir maior produtividade (BAIRD, 2002).

No Brasil, a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, define pesticidas e afins como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Pesticidas, agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas e biocidas são denominações diversas dadas a substâncias químicas ou misturas de substâncias, naturais ou sintéticas (SANCHES et al., 2003).

De acordo com Baird (2002), os pesticidas são substâncias que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira (por exemplo, interferindo no seu processo produtivo). As diferentes classes de pesticidas estão agrupadas na Tabela 1. Todos os pesticidas químicos têm a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital dos organismos para quais são tóxicos.

Tabela 1 - Pesticidas e seus Alvos

Tipo de Pesticida	Organismo-alvo
Acaricida	Ácaros
Algicida	Algas
Avicida	Pássaros
Bactericida	Bactérias
Desinfetante	Microorganismos
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas
Inseticida	Insetos
Larvicida	Larvas de insetos
Moluscicida	Caracóis, lesmas
Nematicida	Nematóide
Piscicida	Peixes
Raticida	Roedores

Fonte: Baird (2002).

Como observado na tabela 1, os pesticidas são divididos em diferentes classes. Tais compostos podem ser classificados dentro das várias classes químicas de acordo com sua estrutura química (TADEO et al., 2000). Dentre dessas se destacam: organoclorados, organofosforados, piretróides, carbamatos, derivados de uréia, triazinas, cloroacetamidas dentre outros (CUNHA, 2003).

O modelo de agricultura adotado no Brasil baseia-se no uso de pesticidas industrializados, e já tem mais de meio século o emprego desses compostos. Dessa forma, não se pode negar que estes produtos possibilitaram o aumento da produtividade agrícola, através de colheitas com qualidade, e possibilitando o atendimento da demanda alimentícia na maioria dos países (TOMITA, 2005; apud, ANVISA, 2006).

Apesar dos benefícios que trazem os pesticidas, o problema de intoxicações por defensivos agrícolas preocupa as autoridades, especialmente pelo fato de que essas intoxicações acontecem pela ingestão gradativa destes produtos que contaminam a água, o solo e uma variedade de alimentos. O uso de muitos destes compostos foi proibido devido à constatação do efeito cumulativo e prejudicial, que ocorre pela transferência de pequenas quantidades ao longo das cadeias alimentares (RISSATO et al., 2004).

Por sua toxicidade, os pesticidas são responsáveis, mundialmente, por mais de 20.000 mortes não intencionais por ano. E, além disso, tem dificultado a exportação de muitos produtos vegetais produzidos no Brasil, devido a muitos destes apresentarem resíduos de determinados pesticidas acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) aceitos pela comunidade internacional (LARA; BATISTA, 1992).

Cerca de metade dos alimentos consumidos nos Estados Unidos contém níveis mensuráveis de, no mínimo, um pesticida. Por essa razão, muitos deles foram banidos ou tiveram seu uso limitado (BAIRD, 2002).

Alguns pesticidas em destaque como os organoclorados: os bifenilos policlorados, os DDT e seus metabólitos (dicloro-difenil-tricloroetano), entre outros desse grupo (YOGUI, 2002). Nas últimas décadas, tem produzido acumulação de resíduos tóxicos em vários ecossistemas em todo mundo. A concentração destes compostos tem alcançado níveis tóxicos em vários organismos terrestres, como

pássaros e mamíferos, assim como em organismos aquáticos (RISSATO et al., 2004).

2.2 PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

Existem várias famílias de compostos orgânicos que são classificados como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Eles são assim denominados em função de sua prolongada meia-vida em todos os compartimentos ambientais: solo, sedimento, água, ar e biota.

Os POPs são tipicamente hidrofóbicos e lipofílicos. Essa característica faz com que essas substâncias sejam acumuladas nos tecidos gordurosos de organismos vivos, que aliada à resistência ao metabolismo leva a magnificação na cadeia alimentar.

Dentre as classes de POPs estão várias famílias de substâncias aromáticas e halogenadas como as bifenilas policloradas – PCB's, as dioxinas e furanos (PCDD/Fs-polychlorinated dibenzo-p-dioxins/furans), além dos diferentes agrotóxicos organoclorados (OCs), como o DDT e seus metabólitos (QUINETE, 2005).

Nos década de 40 e 50, as indústrias químicas da América do Norte e da Europa Ocidental produziram grandes quantidades de novos pesticidas (BAIRD, 2002). A primeira geração de pesticidas usados em larga escala foram os organoclorados (Tabela 2), utilizados principalmente após o início da Segunda Guerra Mundial em campanhas de saúde pública (YOGUI, 2002).

Tabela 2 - Características técnicas de alguns pesticidas organoclorados usados na agricultura e na saúde pública de diversos países do mundo.

NOME COMUM	APARÊNCIA DO PRODUTO	COMPOSIÇÃO TÉCNICA
DDT	sólido amorfo (cor creme)	<i>p,p'</i> -DDT (65-80%), <i>o,p'</i> -DDT (15-21%) e impurezas
DDD	sólido amorfo	<i>p,p'</i> -DDD (> 90%) e substâncias correlatas
HCH	sólido amorfo (cor cinza ou parda) com cheiro característico	α -HCH (55-70%), β -HCH (5-14%), γ -HCH (10-12%), δ -HCH (6-8%) e ϵ -HCH (3-4%)
aldrin	sólido (cor pardacenta)	aldrin (95%) e outros compostos (5%)
dieldrin	sólido (cor levemente escura)	dieldrin (85%) e outros produtos clorados (15%)
endrin	sólido (cor pardacenta)	endrin (85%) e outros compostos (15%)
heptacloro	sólido com aspecto de cera	heptacloro (67%) e substâncias correlatas (33%)
clordano	líquido (cor escura) de aspecto xaroposo e cheiro agradável	α -clordano e γ -clordano (60-75%) e produtos diversos (25-40%)

Fonte: LARINI, 1993.

A maioria desses pesticidas possuía ingredientes ativos que são organoclorados, muitos dos quais tinham em comum propriedades notáveis:

- Estabilidade contra a decomposição ou degradação ambiental.
- Solubilidade muito baixa em água, a não ser que oxigênio e o nitrogênio encontrem-se também presentes nas moléculas.
- Alta solubilidade em meios semelhantes a hidrocarboneto, tal como o material gorduroso da matéria viva.
- Toxicidade relativamente alta para insetos, mas baixa para seres humanos.

Um exemplo, o hexaclorobenzeno (HCB), C_6Cl_6 , é estável, fácil de preparar a partir de cloro e benzeno, extremamente persistente, e sendo utilizado durante várias décadas após a Segunda Guerra Mundial como fungicida de uso agrícola nas colheitas de cereais (BAIRD, 2002).

Os compostos organoclorados são hidrocarbonetos clorados e podem ser divididos em dois grupos: baixo e alto peso molecular. Os organoclorados de baixo peso molecular são constituídos pelos solventes industriais (dicloroetano, cloreto de vinil, etc) e pelos freons, clorofluorcarbonos (CFCs). Os mesmo possuem baixa acumulação na biota e seu impacto direto está associado à atmosfera.

Já os organoclorados de alto peso molecular (pesticidas e bifenilos policlorados) como já visto anteriormente fazem parte do grupo dos POPs, e provocam impacto direto e são acumulados na biota (YOGUI, 2002).

De acordo com Rissato et al (2004), os pesticidas organoclorados são considerados relativamente inertes e possuem alta estabilidade devido às ligações carbono-cloro (C – Cl).

Estão sendo muito estudados devido à alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e biossolubilidade em tecido lipídico. Alguns desses compostos podem persistir por 15 a 20 anos no solo e parte destes serem arrastados pelas chuvas para o interior dos cursos de águas, que também recebem estes compostos através de efluentes industriais, de esgotos, de sedimentos, da atmosfera e por contaminação direta durante a aplicação. Assim, tanto as águas de mananciais de rios e represas que abastecem as populações, quanto os peixes que se alimentam de materiais retirados do fundo desses locais apresentam concentração de agrotóxicos, mesmo anos após a cessar a aplicação destes em regiões vizinhas.

Segundo Santos et al (2006), as propriedades físicas de lipossolubilidade, resistência à metabolização e persistência no ambiente, conferem a estes compostos a capacidade de se depositarem nos tecidos lipídicos dos organismos vivos, sofrendo biomagnificação. Geralmente tendo efeitos ao longo prazo.

De acordo com Yogui (2002), a lipofilicidade dos pesticidas organoclorados são absorvidos pelos organismos através da alimentação (membrana do trato gastrointestinal), respiração (brânquias e pulmões) e pele. Após a absorção esses compostos são rapidamente distribuídos para vários tecidos (principalmente aqueles com alto teor de lipídios), assim, estabelecendo um fluxo entre estes tecidos e o sangue. A toxicologia desses contaminantes é altamente complexa e específica para cada composto. Dessa forma, pode haver múltiplas respostas tóxicas dependendo da espécie, sexo e órgão atingidos.

Como exemplo, os animais produtores de leite acumulam resíduos através de alimentos contaminados, pastagem e ar inalado, e a excreção por animais lactantes ocorre principalmente pela gordura do leite (SANTOS et al, 2006).

2.2.1 Pesticidas organoclorados selecionados neste estudo

Os pesticidas selecionados para esse estudo foram: Aldrin, Dieldrin, Heptaclor, Heptaclor epóxido, HCB, Mirex, PCB, Lindano, Methoxychlor, DDT e seu metabólitos p p'DDE, p p'DDD. A seguir é relatado a característica de cada composto.

2.2.1.1 DDT

Uma das primeiras substâncias utilizadas nas lavouras brasileiras foi o DDT (2,2 bis[p-clorofenil]-1,1,1-tricloroetano), considerado um dos primeiros pesticidas modernos (ANVISA,2006). Antes do DDT, os únicos inseticidas disponíveis eram aqueles com base nos compostos de arsênio, que eram tóxicos e persistentes, e aqueles extraídos de plantas, que perdiam rapidamente sua efetividade uma vez expostos. Por isso, o DDT parecia ser o primeiro inseticida ideal: não era muito tóxico para as pessoas, mas era altamente tóxico para os insetos; e persistente (BAIRD, 2002).

A substância foi sintetizada em 1874, porém, somente no início da segunda guerra mundial é que começou a ser utilizada no combate de pragas, especialmente do mosquito transmissor da malária (ANVISA, 2006).

De acordo com Yogui (2002), o DDT sofre transformação por duas vias: uma oxidativa e outra redutiva. Na via redutiva há apenas a perda de um átomo de cloro, com conseqüente formação do DDD (dicloro-difenil-dicloroetano). Mas, na via oxidativa, a molécula do DDT perde um átomo de cloro e outro de hidrogênio transformando-se em DDE (dicloro-difenil-dicloroetileno). A Figura 1 apresenta os principais isômeros do DDT e seus respectivos metabólitos.

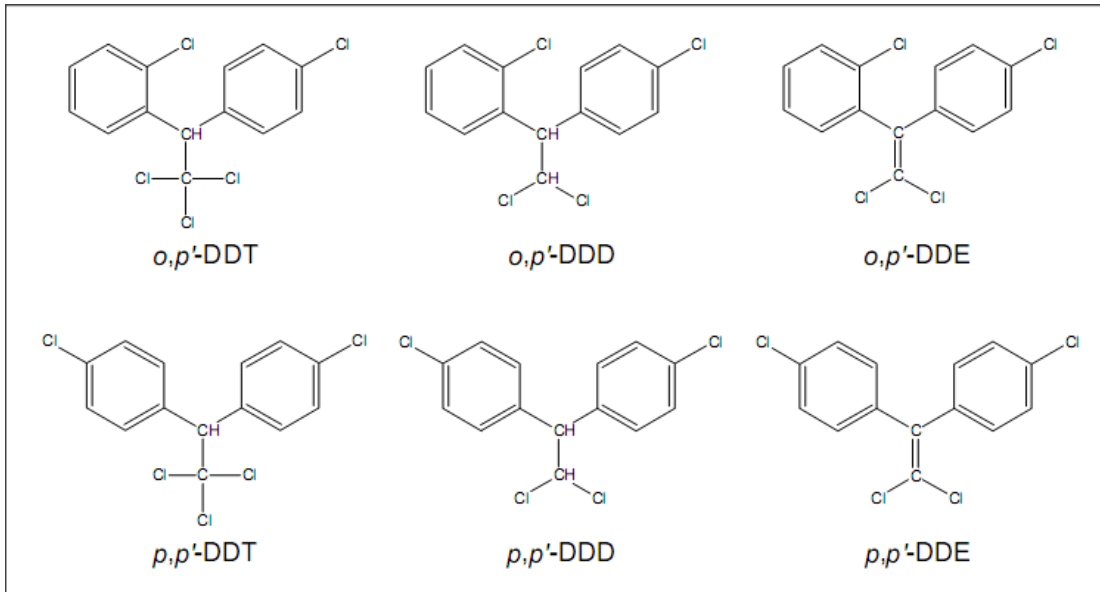


Figura 1 – Estrutura química de alguns isômeros do dicloro-difenil-tricloroetano (*o,p'*- DDT e *p,p'*-DDT) e seus respectivos metabólitos.

Fonte: YOGUI, 2002.

O DDT, bem como alguns outros pesticidas organoclorados foram banidos no Brasil tendo em vista os efeitos nocivos detectados após a introdução do seu uso (ANVISA, 2006).

2.2.1.2 Isômeros do HCH

O HCH (hexaclorociclohexano), também erroneamente chamado BHC (hexacloreto de benzeno), começou a ser utilizado quase na mesma época do DDT, como veneno de contato para insetos. O BHC foi sintetizado pela primeira vez em 1825 pelo químico inglês Michael Faraday (BARBOSA, 2004).

Ele é um composto muito volátil, sendo perdido em altas taxas para a atmosfera durante sua aplicação. Um estudo realizado no sul da Índia revelou que 99,6% do HCH aplicado em campos de arroz podia ser perdido para a atmosfera (YOGUI, 2002).

O HCH a nível mundial foi muito usado como fumegante na proteção de sementes devido a sua estabilidade em altas temperaturas. No Brasil, ele foi especificamente usado no tratamento de culturas de café, soja e algodão, bem como no controle da doença de Chagas (YOGUI, 2002).

A formulação técnica possui uma série de isômeros (Figura 2), entre os quais o único que apresenta propriedades inseticidas é o γ -HCH. Durante o processo comercial de produção do HCH, normalmente se obtém uma mistura contendo até 7 isômeros, ressaltando-se que a concentração do γ -HCH varia de 8 a 15 %. O produto comercial que contém o γ -HCH puro é conhecido pelo nome de lindano, em homenagem ao químico Van Der Lindem, que o isolou pela primeira vez em 1912 (SANTOS et a., 2001, apud YOGUI, 2002).

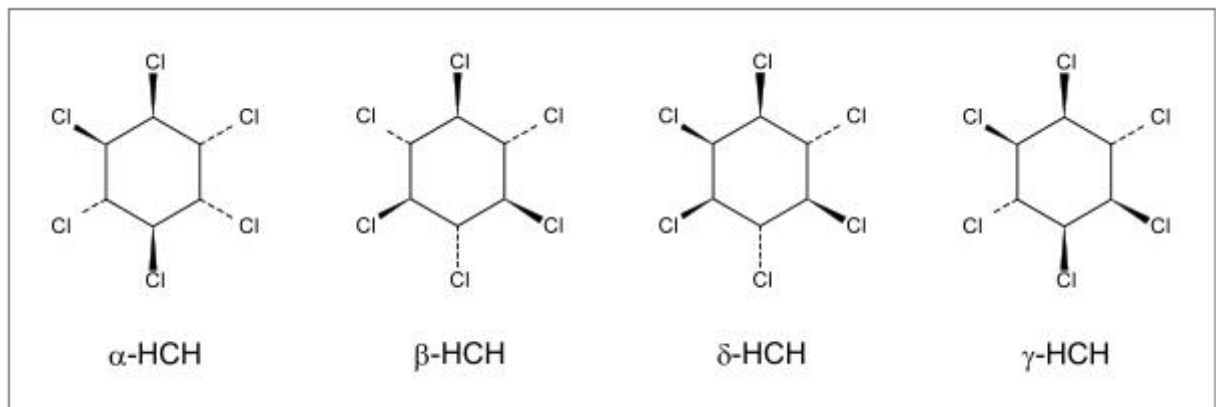


Figura 2 – Estrutura química de alguns isômeros do hexaclorociclohexano (HCH).

Fonte: YOGUI, 2002.

O preparo de produtos comerciais contendo apenas o isômero γ -HCH teria sido importante do ponto de vista ambiental e da toxicologia humana, pois, além de diminuir consideravelmente a quantidade de HCH utilizada, reduz a contaminação de organismos não-alvos, pois outros isômeros, como o β , acumulam-se mais facilmente nos tecidos adiposos (BARBOSA, 2004).

2.2.1.3 Ciclodienos

Muitos hidrocarbonetos cíclicos clorados formam uma classe de compostos conhecida como pesticidas ciclodienos. Entre eles pode-se destacar aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro, heptacloro epóxido, clordano, oxiclordano, nonacloro, entre outros. Estes compostos incluem os inseticidas organoclorados mais tóxicos, especialmente em termos de toxicidade aguda. Os ciclodienos são altamente neurotóxicos e provavelmente apresentam mecanismo de ação diferente do DDT, tanto em nível celular como bioquímico (YOGUI, 2002).

Os compostos aldrin, dieldrin, heptacloro, heptacloro epóxido, são as substâncias dessa classe em estudo.

De acordo com Baird (2002), os pesticidas desse ciclo, começando por aldrin, dieldrin, chegaram ao mercado por volta de 1950. Sua potencial toxicidade é a tendência a se acumular em tecidos gordurosos e a suspeita de que ao menos o dieldrin causa mortalidade excessiva de águia- calvas adultas. O uso de quase todos esses compostos está proibido na América do Norte e na maioria dos países Europeus.

Os compostos aldrin, dieldrin e endrin são sintetizados pelo processo químico conhecido como reação de Diels-Alder (daí a origem dos nomes). Estes três compostos têm alta absorção através da pele, o que resulta numa DL50 dérmica bastante próxima da DL50 oral (LARINI, 1993).

Na natureza, aldrin e heptacloro são transformados, respectivamente, em dieldrin e heptacloro epóxido, ambos mais tóxicos e persistentes do que seus precursores. O clordano, formado principalmente por uma mistura de policlorometanoindenos, é um veneno de amplo espectro que afeta adversamente muitos organismos aquáticos. Sua formulação técnica inclui outros componentes persistentes, como heptacloro, nonacloro e oxiclordano (YOGUI, 2002).

2.2.1.4 Mirex e HCB

De acordo com Baird (2002), se duas moléculas de perclorociclopentadieno são combinadas quimicamente, a molécula resultante é conhecida como mirex (Figura 3). Sendo efetiva contra formigas saúvas nos Estados Unidos. De acordo com Yogui (2002), posteriormente usado como aditivo retardante de chama de polímeros.

Resíduos de mirex podem ser acumulados em altas concentrações nos organismos marinhos (YOGUI, 2002). O maior uso de mirex foi nos anos 60, apesar de banidos nos anos 70, é um POPs, e como Poluente Prioritário da IJC dos Grandes Lagos. No Lago Ontário o mirex acumulou-se porque foi produzido com fins comerciais nas proximidades do rio Niágara. Devido sua alta persistência demorará cerca de um século para abandonar a área (BAIRD, 2002).

O HCB (Figura 3) é muito problemático, pois pode causar câncer de fígado em roedores de laboratório, e, portanto, talvez em humanos. Ele é muito solúvel em

meios orgânicos, como hidrocarbonetos líquidos. Foi extensamente utilizado como fungicida no tratamento de sementes e na proteção de madeiras. Também ocorre como subproduto de processos industriais (por exemplo, fabricação de tetracloreto de carbono, pentaclorofenol e monômeros do cloreto de vinil). Ele é um contaminante altamente persistente, sendo encontrado nos ambientes marinho e estuarino adsorvido a partículas de sedimento. Em 1959, na Turquia, foi relatado um envenenamento envolvendo 4000 pessoas que consumiram grãos tratados com HCB. A síndrome ficou conhecida como “a nova doença”, caracterizando-se por infecções cutâneas (BAIRD, 2002; apud, YOGUI, 2002).

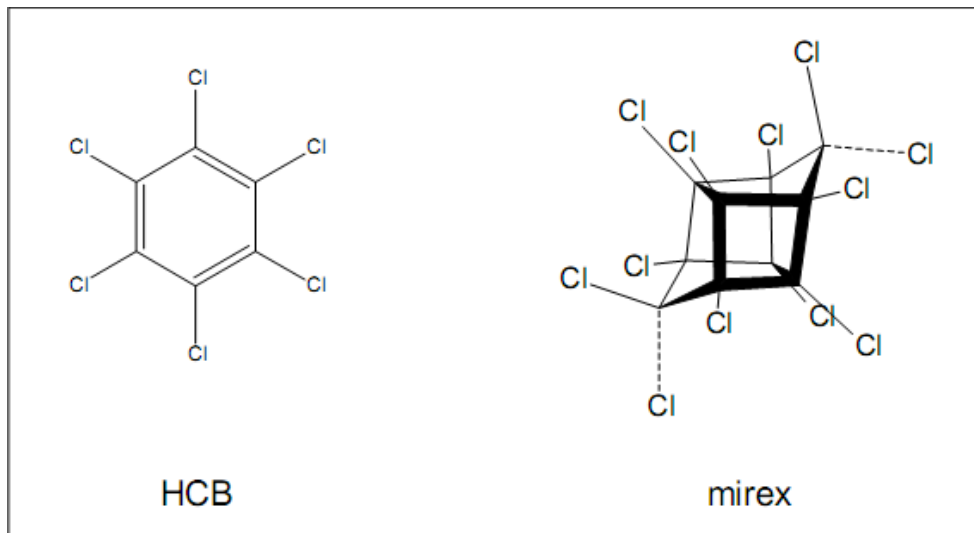


Figura 3 - Estrutura química do hexaclorobenzeno (HCB) e do dodecaclorohidro- 1, 3,4- metano-1H-ciclobuta[c,d]pentaleno (mirex).

Fonte: YOGUI, 2002.

2.2.1.5 Bifenilos policlorados

De acordo com YOGUI (2002), os PCBs (bifenilos policlorados) foram sintetizados pela primeira vez no final do século XIX na Alemanha, mas começaram a ser produzidos em nível comercial em 1929.

Conforme a figura 4, através da cloração do grupo bifenil são possíveis 209 isômeros congêneres, por apresentar diversas substituições no que concerne à quantidade de átomos de cloro. Por mais que seja possível 209 isômeros, apenas 130 deles tenham sido produzidos em escala industrial (LEITE, 2008).

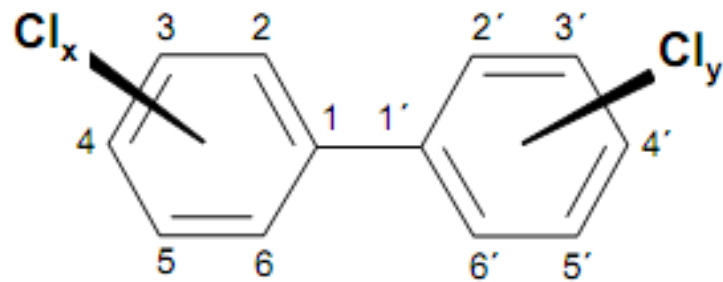


Figura 4 – Fórmula estrutural das bifenilas policloradas (PCBs).

Fonte: LEITE, 2008.

Alguns congêneres estão apresentados na figura 5:

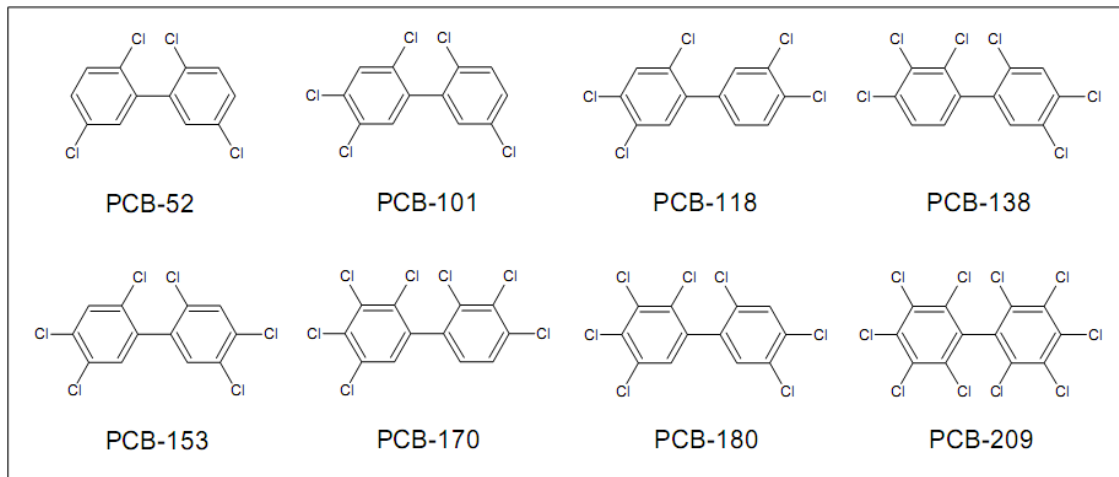


Figura 5 – Estrutura química de alguns congêneres e isômeros do bifenil policlorado.

Fonte: YOGUI, 2005.

Dentre as principais características dos PCBs pode-se destacar: grande estabilidade química, alta constante dielétrica e resistência a temperaturas elevadas. Isso demonstra o porquê eles foram usados em: transformadores e capacitores, como fluidos isolantes; tintas e vernizes, como plastificantes; borrachas e resinas de poliéster, como retardantes de chama; e aditivos de óleo lubrificante, em máquinas agrícolas. Outro importante uso dos PCBs foi como agente sinérgico para aumentar o período de vida ativa dos inseticidas organoclorados (LEITE, 2008).

Penteado e Vaz (2001) descrevem inúmeros relatos de acidentes envolvendo PCBs, tanto no exterior quanto no Brasil. Entre eles destaca-se o caso Yusho, ocorrido no Japão em 1968, quando mais de 1600 pessoas consumiram um óleo de

arroz contaminado com esses compostos. Tal episódio marcou o grande reconhecimento dos PCBs como contaminantes nocivos ao homem.

2.3 LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR)

O risco potencial que os pesticidas oferecem ao homem através da alimentação, devido a uma exposição crônica diária, determinou a exigência de Limites Máximos de Resíduos (LMR) que é a concentração máxima de pesticidas legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica da cultura, desde sua produção até o consumo. É expressa em miligramas de resíduos por quilograma de alimento (mg. kg^{-1}) (ANVISA, 2006).

O objetivo principal de estabelecer o LMR é garantir, com certa segurança, que a população ao consumir produtos cujos níveis de resíduos de pesticidas estejam dentro dos limites estabelecidos não deverá, segundo os conhecimentos científicos atuais, ter nenhum problema de saúde associado a esta ingestão.

Estes LMR's foram estabelecidos para diferentes produtos agrícolas e pesticidas, sendo freqüentemente revisados. Nesse estudo os Limites máximo de resíduo seguem no anexo 1, através da INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 8, DE 29 DE Abril DE 2010, da SECRETÁRIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, O PROGRAMA DE CONTROLE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM CARNES - PNCRC/2010. O Grupo estudado foi de Pesticidas, Organoclorados e PCBs em Gordura de origem animal, no quadro 1 é mostrado o analito e o limite de referência, nesse caso LMRs.

Grupo	Analito	Matriz	LIMITE DE REFERÊNCIA*				Nº de Itens de ensaio
			(µg/kg)				
			Bovina	Equina	Suína	Aves	
Pesticidas, Organoclorados e PCBs	Aldrin	C	50	75	75	75	B (45) A (45) S (45) E (45)
	Alfa-HCH		100	150	150	150	
	HCB		100	150	150	150	
	Dieldrin		50	75	75	75	
	Heptaclor		50	75	16	75	
	Heptacloropóxido		50	75	75	75	
	Cis Clordane		12	16	75	16	
	Trans Clordane		12	16	16	16	
	pp'-DDT(h)		125	187,5	187,5	187,5	
	pp'-DDE(h)		125	187,5	187,5	187,5	
	op'-DDT(h)		125	187,5	187,5	187,5	
	pp'-DDD(h)		125	187,5	187,5	187,5	
	PCB 101(i)		16	24	24	24	
	PCB 118(i)		16	24	24	24	
PCB 138(i)	16	24	24	24			
PCB 153(i)	16	24	24	24			
PCB 180(i)	16	24	24	24			
Mirex	50	75	75	75			

Quadro 1 - de Plano Controle de Resíduos e Contaminantes - Carne.

Fonte: PNCR, 2010.

2.4 MÉTODOS

2.4.1 Método Não - Empírico

O método empírico é um método destinado a produzir resultados que são independentes do método utilizado. Neste caso é necessário um estudo de tendência do método, que pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado/valor esperado). Ainda em alguns casos em que variações de substrato, ou matriz, tenham efeitos significativos e imprevisíveis, geralmente é desenvolvido um procedimento com o único fim de conseguir comparabilidade entre laboratórios medindo-se o mesmo material, sem que haja a intenção de se obter uma medida absoluta de verdadeira grandeza do analito presente. Os resultados então são normalmente relatados sem correção para a tendência do método ou efeito da matriz, sendo considerados empíricos (FERREIRA, 2003).

2.4.2 Método Empírico

Tem seu resultado totalmente dependente da escolha das condições. O método quando utilizado dentro do escopo definido para ele, tem sua tendência definida como zero. Portanto, as estimativas de tendências estão relacionadas com o desempenho do laboratório e não com a tendência intrínseca do método (FERREIRA, 2003).

2.5 ERROS

Toda medida possui alguma incerteza, que é chamada de erro experimental. São divididos os erros em Sistemático e erro Aleatório (HARRIS, 2011).

2.5.1 Erro Sistemático

Um erro sistemático, também chamado de erro determinado, surge a uma falha de um equipamento ou na falha no projeto de um experimento. Se realizarmos o experimento novamente, exatamente da mesma maneira, o erro é reprodutível. A princípio, o erro sistemático pode ser descoberto e corrigido, embora isso possa não ser fácil (HARRIS, 2011).

De acordo com Leite (2002), entre os erros sistemáticos mais comuns temos: erros instrumentais, erros devido à presença de impurezas, erros de operação, erros pessoais, erros de método.

2.5.2 Erro Aleatório

O erro aleatório também chamado de erro indeterminado resulta dos efeitos de variáveis que não estão controladas nas medidas. A probabilidade do erro aleatório ser positivo ou negativo é a mesma. Ele está sempre presente e não pode ser corrigido.

São erros devido a variações ao acaso, de causas não conhecidas exatamente, em geral irregulares e pequenas e de difícil controle como, por exemplo: umidade, temperatura, iluminação, pureza dos reagentes, etc. (LEITE, 2002).

2.6 AMOSTRAGEM

2.6.1 Técnicas de amostragem

As medidas analíticas têm amplo emprego: monitorar e regular a composição de matérias-primas usadas comercialmente, controlar e otimizar processos industriais, controlar impurezas e subprodutos, assegurar a conformidade com a legislação quanto às composições máxima e mínima, assegurar a qualidade de alimentos e bebidas, salvaguardar a saúde e a segurança das pessoas no local de trabalho, manter ambiente de trabalho seguro e monitorar e proteger o meio ambiente em geral.

Estima-se que nos países ricos cerca de 3 % do produto nacional bruto é usado em análises. Assim, a amostragem é a primeira tarefa, normalmente a mais difícil do procedimento analítico (VOGEL, 2002).

A amostragem é uma das operações mais importantes em uma análise química (SKOOG, 2008). A tomada de amostra, ou Amostragem, é a primeira etapa no estabelecimento de um método analítico. O objetivo é isolar-se uma pequena quantidade de amostra que seja representativa de uma vasta população, isto é que contenha as características básicas aplicáveis a todas as outras espécies daquela população (LANÇAS, 1993). O processo de amostragem envolve a obtenção de uma pequena quantidade de material que represente de maneira exata todo o material que está sendo analisado. A coleta de uma amostra representativa é um processo estatístico (SKOOG, 2008).

É necessária extrema cautela nesta etapa do método, pois a escolha de uma amostra inadequada ou contaminada irá introduzir erros os quais irão acumular-se ao longo da análise (LANÇAS, 1993).

A maioria dos métodos analíticos não é absoluta e necessita que os resultados sejam comparados com aqueles obtidos para materiais padrão, de composição exatamente conhecida (SKOOG, 2008).

No contexto estatístico, a amostra corresponde a várias pequenas partes tiradas de partes diferentes de todo o material. Para evitar confusão, geralmente os químicos chamam a coleção de unidades de amostragem ou os incrementos de amostragem de *amostra bruta*.

2.6.2 Preparação de amostras

Segundo Leite (2002), uma das dificuldades é a abertura de uma amostra. Abertura é a palavra que vem sendo utilizada no meio químico para expressar a transformação das espécies em estado de difícil análise para a forma que facilita a utilização das marchas analíticas convencionais ou instrumentais.

O preparo da amostra é o processo em que uma amostra representativa é convertida em uma forma apropriada para uma análise química (HARRIS, 2011).

2.7 SEPARAÇÃO

A validade dos resultados das análises químicas depende, inicialmente, da qualidade e da amostra a ser analisada. Na maior parte dos casos, a amostra a ser analisada tem mais de um componente e exige uma etapa de separação ou de concentração da amostra a ser feita antes a análise propriamente dita. Considera-se a amostra como sendo normalmente constituída pela (s) substância (s) a ser (em) analisada (s), o(s) *analito* (s). O restante do material é denominado *matriz*.

Por sua própria natureza, algumas técnicas analíticas são seletivas ou mesmo específicas e podem ser usadas para a detecção ou determinação do analito desejado, sem que seja necessária a separação prévia.

As técnicas de separação podem ser classificadas em dois grupos principais:

- Separações em grande escala
- Separações com instrumentos.

Em cada caso, são empregados diferentes modos de operação para realizar a separação que, podem ser agrupados como métodos físicos ou químicos (VOGEL, 2002).

2.7.1 Extração com solvente

A extração de materiais sólidos com solventes ainda é muito usada. As técnicas simples são a agitação da mistura sólido-líquido, seguida por filtração ou por centrifugação, e o uso de aparelhagens de extração contínua, como o aparelho de Soxhlet (VOGEL, 2002).

Segundo Vogel (2002), é bem conhecido o fato de que certas substâncias são mais solúveis em alguns solventes que em outros. A remoção de um soluto de uma solução aquosa, por meio de um solvente imiscível em água, é denominada extração por solvente, técnica que muitas vezes empregada para separações.

2.7.1.1 Fase Aquosa

De acordo com Vogel (2002), quando o solvente de extração, isto é, o solvente que não contém inicialmente o analito, é água, pode-se geralmente, garantir sua pureza e também que ele não contribuirá para contaminar a amostra final. Porém, quando é preciso adicionar a água agentes modificadores como ácidos, bases, tampões, é necessário que eles também tenham alto grau de pureza. Um problema, é que se o analito estiver inicialmente dissolvido em água, para que a extração com uma fase orgânica seja eficiente será provavelmente necessário modificar o analito de modo a torná-lo preferencialmente solúvel na fase orgânica, isto é, será necessário tornar o analito menos hidrofílico e mais hidrofóbico.

2.7.1.2 Fase Orgânica

A escolha do segundo solvente é determinada por um critério simples: ele tem que ser imiscível com a água, isto é, devem se formar duas fases. Embora existam dois líquidos que, postos em contato, sejam totalmente imiscíveis, por razões práticas a solubilidade de um solvente no outro não deve ultrapassar 10 %, aproximadamente.

2.8 PARÂMETROS EM UMA ANÁLISE QUALITATIVA

2.8.1 Especificidade/seletividade

De maneira geral, uma amostra, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz, e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas

que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são freqüentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações (INMETRO, 2007).

De acordo com Ribani et al. (2004), a seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo. Ela garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse.

Especificidade e seletividade tem tido o mesmo significado, mas basta diferenciar. Um método que produz resposta para uma única substância de interesse, normalmente um dado elemento, pode ser chamado de específico e um método que produz resposta para vários compostos, pode ser chamado de seletivo.

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro. Estas duas maneiras são as mais utilizadas. O método de adição padrão também pode ser aplicado para os estudos de seletividade.

2.8.2 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão. Na tabela 3, segue exemplo de robustez.

Tabela 3 - Exemplo de variação nos fatores para a determinação da robustez.

FATOR	NOMINAL	VARIAÇÃO
Tempo de agitação	10 min.	12 min.
Tamanho da amostra	5 g	10 g
Concentração ácida	1M	1,1M
Temperatura de aquecimento	100°C	95°C
Tempo de aquecimento	5 min.	10 min.
Agitação	Sim	Não
pH	6,0	6,5

Fonte: INMETRO, 2007.

2.8.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de quantificação é um parâmetro quantitativo, mas será exemplificado abaixo, pois se trata de importante parâmetro.

Segundo Silva (2005), a sensibilidade de um método analítico de modo geral é definida em termos de Limite de Detecção (LOD ou LD) e Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*).

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, usando um determinado procedimento experimental.

O LOQ ou LQ (limite de quantificação) é a menor concentração da substância em análise que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais. O LOD e o LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração (RIBANI et al., 2004).

O LD ou LOD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros de curva analítica (RIBANI et al, 2004).

Considera-se para determinar o LOD a concentração cujo sinal cromatográfico obtido for três vezes maior, em relação ao ruído da linha de base, no tempo de retenção dos picos de interesse, ou seja, 3 vezes maior que o nível de ruído médio medido com a solução de controle ou branco (conforme recomendado por normas da IUPAC) (SILVA, 2005; apud LEITE, 2002).

De acordo com Yogui (2002), o limite de detecção de um método é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida com 99 % de

confiança de que essa concentração é maior que zero e pode ser determinada em uma matriz contendo o analito. Dessa forma, uma das maneiras de se calcular o limite de detecção é através da quantificação de uma pequena quantidade de analitos adicionados a uma matriz que contenha os compostos de estudo.

Para determinar o LOQ considera-se a concentração cujo sinal cromatográfico obtido for dez vezes maior, em relação ao ruído da linha de base, no tempo de retenção dos picos de interesse.

A Figura 6 demonstra de forma representativa como foi obtida a relação entre o sinal e o ruído da linha de base, e conseqüentemente, o LOD e o LOQ (SILVA, 2005).

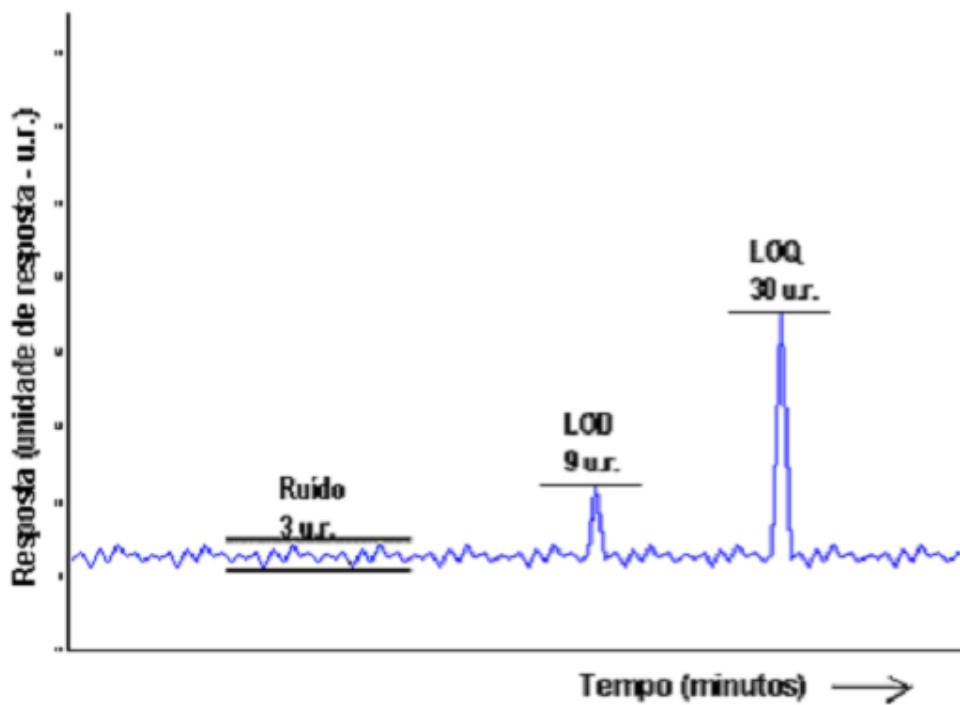


Figura 6 – Diagrama demonstrando o ruído da linha base, e o sinal para LOD e LOQ

Fonte: SILVA, 2005.

2.9 OUTROS PARÂMETROS IMPORTANTES NESSE ESTUDO

2.9.1 Precisão e exatidão

A precisão é uma medida da reprodutibilidade de um resultado. Se uma grandeza for medida várias vezes e os valores forem muito próximos uns dos outros, a medida é precisa. Se os valores variarem muito, a medida não é precisa. A exatidão se refere a quão próximo um valor de uma medida está do valor “real”. Se um padrão conhecido estiver disponível, a exatidão é o quão próximo o valor determinado está do valor do padrão (HARRIS, 2011).

2.9.2 Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2007).

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida. A relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Um exemplo de curva analítica pode ser visto na Figura 7. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados.

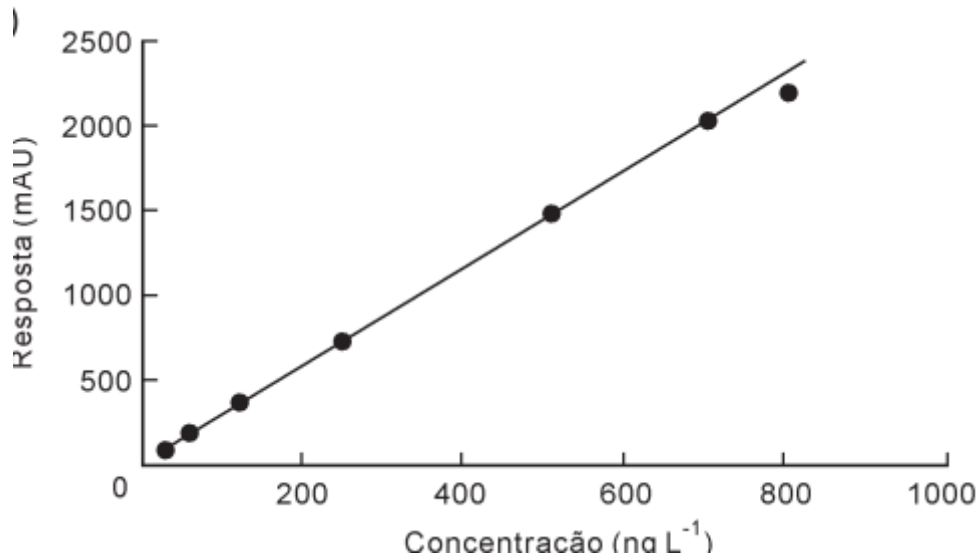


Figura 7 – Curva analítica clássica.

Fonte: RIBANI et al., 2004.

Segundo Ribani et al. (2004), a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação R . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

Em qualquer técnica instrumental, a relação linear descrita pela equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

INMETRO (2007).

2.9.3 Superposição de matriz

O método de superposição de matriz (“*matrix-matched*”) consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância, e posteriormente a construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. O método de superposição de matriz pode ser utilizado para calibração, tanto com a padronização interna como com a padronização externa. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

2.9.4 Adição padrão

O método de adição padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Estas amostras com o padrão incorporado são utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada. O método de adição padrão é trabalhoso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse. (RIBANI et al., 2004).

2.10 CROMATOGRAFIA

Os termos relacionados à cromatografia são atribuídos ao botânico russo Mikhael Semenovitch Tswett, o qual no ano de 1906 utilizou estes termos para descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas e

gema de ovo. Utilizando-se de colunas de vidro recheadas com vários sólidos, arrastando os componentes com éter de petróleo (COLLINS, 2009).

De acordo com Lanças (1993), a cromatografia é inicialmente um método físico-químico de análise largamente empregado na separação, identificação de compostos químicos. Por mais que seja usada principalmente na separação de compostos, a cromatografia se presta largamente à identificação (Análise Qualitativa) e quantificação (Análise Quantitativa) das espécies separadas.

O objetivo principal da Análise Qualitativa é determinar-se a natureza química das espécies separadas, ou seja, o que está presente: na cromatografia em fase gasosa deixa a desejar sendo, usualmente, necessário recorrer-se a outros métodos analíticos, devido ao fato de que o método cromatográfico utiliza tempo de retenção do composto na coluna para identificá-lo através de comparação com padrões.

Já na Análise Quantitativa é importante determinar quanto de cada espécie está presente na amostra analisada (LANÇAS, 1993).

Os primeiros experimentos que podem ser classificados como cromatografia gasosa foram feitos por Martin e James em 1951 para a separação de ácidos de baixo peso molecular. O primeiro cromatógrafo comercial chegou ao mercado em 1955, hoje, a cromatografia com fase gasosa é uma das técnicas de separação mais utilizadas nos laboratórios (VOGEL, 2002).

A cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Ao realizar-se uma separação por cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e injetada na cabeça da coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte (SKOOG et al., 2008).

2.10.1 Processo de separação na cromatografia a gás

A cromatografia gasosa é um procedimento físico utilizado para separar-se uma amostra em seus componentes individuais. A base para esta separação é a distribuição da amostra entre duas fases – uma fase estacionária e uma fase gasosa móvel. O analito é transportado através da coluna por uma fase gasosa móvel, conhecida como gás de arraste ou gás portador, trata-se de um gás inerte cuja

finalidade é transportar as moléculas a serem separadas através da coluna (HARRIS, 2011; apud LANÇAS, 1993).

A fase estacionária divide-se em cromatografia gás-líquido (C.G.L) e cromatografia gás-sólido (C.G.S).

As unidades fundamentais de um sistema cromatográfico são:

- Gás de arraste;
- Injetor;
- Coluna;
- Controle de Temperatura;
- Detector;
- Registrador. (LANÇAS, 1993).

2.10.2 Detectores

O detector é o principal responsável pela quantidade mínima de substância a ser detectada, ou seja, a função do detector situado na saída da coluna é registrar e medir as pequenas quantidades dos componentes da mistura separados na coluna e levados pelo fluxo do gás de arraste. O sinal de saída do detector alimenta um dispositivo que produz um gráfico denominado *Cromatograma* (LANÇAS, 1993; apud VOGEL, 2002).

De acordo com Vogel (2002), a escolha do detector vai depender de alguns fatores como o nível de concentração e a natureza dos componentes da mistura. Dentre os detectores mais usados na cromatografia a gás estão os de condutividade térmica, ionização de chama e captura de elétrons. Na Tabela 4, estão descritos alguns detectores, com diferentes sensibilidades e seletividades.

Tabela 4 - Detectores usados na cromatografia com fase gasosa.

Detector	Abreviação	Faixa dinâmica	Sensibilidade	Aplicação
Filamento aquecido	HWD	10^4 a 10^5	10^{-8} gml ⁻¹	Universal
Condutividade Térmica	TCD	10^4 a 10^5	10^{-8} gml ⁻¹	Universal
Ionização de chama	FID	10^7	2 pg s ⁻¹	Compostos orgânicos
Captura Elétrons	ECD	10^2 a 10^3	0,01 pg s ⁻¹	Eletrólitos (halogênios)
Fotometria de chama	FPD	10^3 a 10^4	1-10 pg s ⁻¹	Enxofre, fósforo
Chama alcalina	AFD ^a	10^4 a 10^5	0,05 pg s ⁻¹	Nitrogênio, fósforo
Fotoionização	PID	10^7	1 pg	Compostos orgânicos
Emissão atômica	AED	2×10^4	1 - 100 pg s ⁻¹	Elementos
Espectrometria de massas	MS	$>10^5$	1 - 100 pg	Estrutura

Fonte: VOGEL, 2002.

Nesse estudo o Detector por captura de elétrons é o utilizado.

2.10.3 Detector por Captura de elétrons (ECD)

Os detectores por captura de elétrons diferem dos demais detectores porque exploram o fenômeno da recombinação baseado na captura de elétrons por compostos que têm afinidade por elétrons livres. O detector mede, então a diminuição e não o aumento da corrente (VOGEL, 2002).

Na medida em que o gás de arraste (geralmente nitrogênio) flui através do detector, uma lâmina contendo a fonte radioativa, raios β (contendo ^3H ou ^{63}Ni) ioniza as moléculas do gás e forma elétrons lentos. Os elétrons assim migram atraídos pelo ânodo sob um potencial fixo e provocam uma corrente de fundo estável. Quando uma molécula contendo grupos que contenham afinidade por elétrons sendo eluída da coluna junto com o gás de arraste, ao passar pelo detector irá capturar os elétrons livres produzidos na ionização do gás de arraste. Como consequência, o resultado é a substituição do elétron por um anion de massa muito maior e redução da corrente e o aparecimento de um pico (LANÇAS, 1993; apud VOGEL, 2002).

Segundo Vogel (2002), a resposta do detector relaciona-se claramente a afinidade das moléculas do eluato por elétrons e o detector é especialmente sensível para compostos que contêm halogênios ou enxofre, anidridos, compostos em que a carbonila está conjugada, compostos organometálicos.

É um detector seletivo, sensível (pode chegar a detectar picogramas de substância) e não destrutivo (LANÇAS, 1993). Muitas aplicações do ECD envolvem a determinação de resíduos persistentes de pesticidas (organoclorados) em alimentos, águas e amostras ambientais.

De acordo com Baird (2002), dado que muitos pesticidas importantes que contêm cloro são detectados por ECD, porém os únicos compostos com cloro cuja detecção não se presta a essa técnica são aqueles que por apresentarem ponto de ebulição alto, impossibilitam sua análise por CG.

Entre muitas outras aplicações, o ECD tem sido usado para medir a presença e quantidade de DDT e a substância relacionada DDE no tecido do morcego-sem-rabo no México.

2.11 MATRIZ ESCOLHIDA – GORDURA DE ORIGEM ANIMAL

Essa matriz foi escolhida a partir da necessidade de se realizar ensaios na área de organoclorados em matrizes gorduras, utilizando a gordura da carne como matriz de origem animal em estudo.

Entre os componentes básicos da carne, como umidade, proteína, gordura e cinza, do ponto de vista qualitativo e quantitativo, o mais variável é a fração de gordura e, por isso, merece ser estudada mais detalhadamente.

A gordura acumula-se principalmente em quatro depósitos: cavidade corporal, zona subcutânea e as que se localizam inter e intramuscularmente. Em cada um desses depósitos possui um papel contínuo e importante no metabolismo energético.

A gordura animal é composta por vários lipídeos, embora predominem os lipídeos neutros, que são em forma de triglicerídeos, nos depósitos de tecido adiposo e associados aos septos de tecido conectivo frouxo que se encontram entre feixes musculares (gordura intramuscular), formando o que se conhece como betado ou marmorização. Os fosfolipídios e outros lipídeos polares, ainda que sejam

minoritários, também exercem funções muito importantes, contribuindo para a estrutura e a funcionalidade das membranas celulares.

Entre os animais de abate, o suíno e o cordeiro são os que geralmente contêm maior proporção de gordura, com 5,25 e 6,6 %, enquanto frango, coelho, e carnes de bovino apresentam níveis mais baixos entre 2 e 3,2 % (ORDÓÑEZ, 2005).

Os compostos organoclorados tem elevada lipofilicidade e são absorvidos principalmente na gordura e na pele dos organismos vivos.

No Brasil, a Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985 proíbe a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados, destinados à agropecuária, em todo território nacional. O uso desses compostos é permitido apenas em campanhas de saúde pública no combate a vetores de agentes etiológicos de moléstias, quanto aplicados pelos órgãos públicos competentes (ANVISA, 1985).

Devido a isso, cabe ressaltar a importância desse estudo que busca inicialmente um método qualitativo para detecção desses compostos tóxicos em matrizes de origem animal e posteriormente como trabalho futuro o processo de validação do método.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Instrumentação

Os seguintes equipamentos e materiais foram empregados no estudo: Sistema GC-ECD: cromatógrafo gasoso *Varian CP-3800 Gas Chromatograph* com micro detector de captura de eletros de Ni⁶³ e coluna capilar Agilent modelo HP -5 (Crosslinked 5 % PH ME siloxane), de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura de fase estacionária. As análises cromatográficas foram realizadas segundo as condições: volume de injeção 1µL. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio. A programação da temperatura segue no quadro 2. Utilizou-se duas colunas cromatográficas e vidrarias em geral para preparo e extração das amostras e das soluções utilizadas no método.

Temperature program	Rate (°C/min)	Step (°C)	Time (min)
	Initial	120	1.00
	14.5	220	6.00
	20.0	240	5.00
	20.0	260	3.00
		Total time	23.90

Quadro 2 - Programação da temperatura do cromatógrafo.

3.1.2 Gases utilizados

- Gás de arraste: Hélio 99,999 % de pureza (Air Liquid, França);
- Gás make up: Nitrogênio 99,999 % de pureza (Air Liquid, França);
- Hidrogênio 99,999 % de pureza (Air Liquid, França);
- Ar sintético 99,999 % de pureza (Air Liquid, França);
- Nitrogênio comercial 99,9 % para o amostrador automático (Air Liquid, França);
- Nitrogênio comercial 99,9 % (White Martins, Brasil).

3.1.3 Reagentes e solventes

Os seguintes reagentes e solventes foram empregados no estudo:

- Água destilada e deionizada;
- Água purificada (destilada, deionizada e purificada em sistema Milli-Q®);
- Diclorometano (Mallinckrodt, EUA);
- Hexano (Mallinckrodt, EUA);
- Sulfato de sódio anidro (Merck, Alemanha).
- Padrões sólidos dos pesticidas observados no item 4.1.
- Padrões para Cromatografo.

3.2 DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO (MÉTODO)

O desenvolvimento desse estudo foi dividido em várias etapas que estão descritas a seguir. Cabe ressaltar que o estudo foi realizado em dois locais: no Laboratório de Pesticidas (LAPE) pertencente ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e no laboratório de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco.

3.3 ESCOLHA DOS PESTICIDAS

Os pesticidas selecionados para esse estudo foram: Aldrin, Dieldrin, Heptaclor, Heptaclor epóxido, HCB, Mirex, PCB, Lindano, Methoxychlor, DDT e seu metabólitos p p'DDE, p p'DDD. A escolha dos mesmos foi verificada através da PCNCR/2010, observando o limite de referência para cada um.

A tabela 5 apresenta o grau de pureza e os respectivos fornecedores dos pesticidas usados nesse estudo.

Tabela 5 - Grau de pureza e fornecedores dos padrões em estudo.

Pesticidas	Fornecedores	Pureza (%)
HCB	Accu Standard	99,5
LINDANO	Dr. Ehrenstorfer	99
Heptaclor epóxido	Dr. Ehrenstorfer	99,37
Heptaclor	Dr. Ehrenstorfer	99,9
Aldrin	Dr. Ehrenstorfer	97
Dieldrin	Dr. Ehrenstorfer	99
Mirex	Dr. Ehrenstorfer	98,6
p p'DDE	Dr. Ehrenstorfer	99
p p'DDT	Dr. Ehrenstorfer	98,5
p p'DDD	Dr. Ehrenstorfer	99
Methoxychlor,	Dr. Ehrenstorfer	97,5

3.4 PREPARO DE PADRÕES ANALÍTICOS

O preparo dos padrões analíticos de pesticidas foi desenvolvido no TECPAR – Laboratório de Pesticidas (LAPE).

Os padrões são acondicionados em freezers, mantidos com temperatura controlada, separados em uma única sala para o seu adequado preparo.

Para todos os padrões sólidos anotaram-se as seguintes informações: nome, concentração, lote, validade e marca - controle de qualidade do laboratório. Posteriormente, iniciou-se o preparo dos 12 padrões analíticos de pesticidas.

Pesou-se cada padrão sólido em um frasco de 5 mL identificado, utilizando hexano como solvente, até concentração aproximada de 2000 ppm para serem utilizados como padrões estoques. Após o preparo de cada padrão foram realizados os cálculos para o preparo da solução estoque (chamados de mix estoque) e em seguida o preparo da solução trabalho (chamados de mix trabalho). É importante ressaltar que a concentração de cada padrão é de suma importância no andamento dos cálculos.

Para melhor entendimento seguem dois exemplos dos cálculos:

Pesticida Aldrin:

$$\begin{aligned}
 \text{Massa utilizada: } 10,48 \text{ mg} & & 10480\mu\text{g} & \text{-----} & 5\text{mL} \\
 & & X & \text{-----} & 1\text{mL} \\
 & & X = 2096 & \mu\text{g/mL} &
 \end{aligned}$$

Pesticida Heptachlor:

Massa utilizada: 10,00 mg

10000 μ g -----5mL

X ----- 1mL

X= 2000 μ g/mL

3.5 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E SOLUÇÃO DE TRABALHO

Segundo Ribane et al. (2004), o preparo das soluções padrão pode ser realizado de diversas maneiras. Em uma delas, prepara-se uma solução mais concentrada, a partir da pesagem do padrão, denominada *solução estoque*, que deve ser preparada de acordo com o tempo de estabilidade da substância em solução ou pelo menos a cada seis meses. As soluções preparadas por diluição são chamadas *soluções de trabalho* e recomenda-se que sejam preparadas pelo menos a cada duas ou três semanas.

Duas abordagens ocorrem no preparo das soluções por diluição. Na primeira, as soluções de trabalho podem partir de uma única solução estoque, através de diluições sucessivas das soluções de trabalho anteriormente preparadas ou através do preparo de todas as soluções diluídas, partindo sempre da solução estoque. Este último modo é o mais recomendado, porém, dependendo da faixa de concentração em questão, diluições diretamente da solução estoque podem envolver medições de volumes tão pequenos que o erro se torna grande. A Figura 8 relata um esquema da seqüência de diluição a partir da solução estoque.

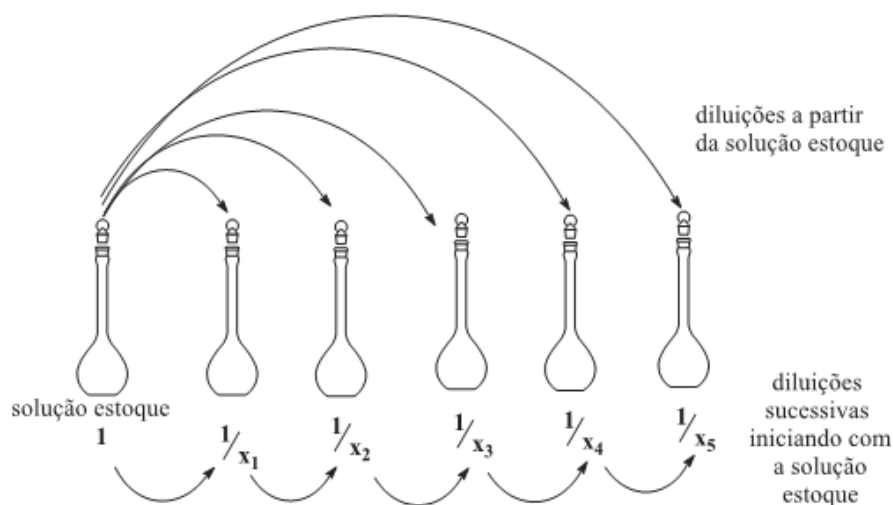


Figura 8 – Modos de diluição da solução estoque.

Fonte: RIBANI, et al., 2004.

O preparo das soluções estoques de pesticidas foi desenvolvido no TECPAR – Laboratório de Pesticidas (LAPE). E o preparo das soluções trabalhos foi desenvolvido em réplicas no LAPE e no Laboratório de Química (N005) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Como visto cada padrão foi preparado (pesado e diluído em suas respectivas concentrações) e em seguida realizou-se os cálculos através de uma planilha do *Microsoft Excel* (Planilha para o cálculo dos limites de Fortificação, anexo 2), que tem como objetivo calcular a concentração da solução padrão na fortificação, a concentração da amostra no volume final, o volume da solução padrão usada na fortificação, assim como a extração (massa de amostra, volume de aferição e alíquota retirada), Além do limite de fortificação, que nesse estudo, de acordo com a PNCRC/2010, mostra que cada padrão de pesticida possui um LMR diferente. Devido a isso, utilizou-se o mesmo volume da solução padrão usada na fortificação.

A seguir foram realizadas as diluições para o preparo da solução estoque e a solução trabalho (utilizada no processo de fortificação), a partir da qual foram feitas diluições para posterior obtenção das curvas analíticas.

3.6 PROCEDIMENTO DE FORTIFICAÇÃO

Foram fortificadas três das cinco amostras, sendo que as amostras não fortificadas são duplicatas da amostra 1 e amostra 3. O objetivo da fortificação é a adição de substâncias conhecidas (nesse estudo o mix de pesticidas organoclorados) à amostra, antes do seu preparo. A fortificação é utilizada para obtenção dos cromatogramas base e para a construção da curva analítica.

As amostras foram fortificadas com 30 µL antes do preparo das mesmas e homogeneizadas, e após submetidas ao procedimento do método de multirresíduos.

3.7 PREPARO E EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

O preparo de todas as amostras e as suas respectivas extrações foi realizado no Laboratório de Química da UTFPR, Campus Pato Branco.

As matrizes utilizadas estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Matrizes gordurosas utilizadas.

AMOSTRA	DESCRIÇÃO	OBTENÇÃO DA GORDURA
Amostra 1	Gordura animal pronta (“banha”).	Gordura pronta.
Amostra 2	Carne moída.	Obtenção da gordura através da extração com método de Soxhlet.
Amostra 3	Bacon.	Obtenção da gordura a partir da fusão do bacon, metodologia adaptada Multi-residue Method 1 – Analytical Methods for Pesticide Residues. in Foodstuffs).

Seguiu-se o Manual de Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (Instituto Adolfo Lutz - IAL, 1985) e utilizou o Método multirresíduo para determinação de pesticidas e bifenilas policloradas em produtos gordurosos.

A seguir são relatados cada método de extração e preparo para os 3 tipos diferentes de amostras.

3.7.1 Preparo e Extração – Amostra 1

A amostra 1 tratava-se de gordura de origem animal (comprado no comércio local).

3.7.1.1 Preparo da amostra

O procedimento de preparo da amostra consistiu da pesagem de 2 gramas e dissolução em 25 mL de hexano. Posteriormente retirou-se uma alíquota de 5 mL da solução de gordura, transferindo-a para coluna cromatográfica.

O método utilizado foi o *método multirresíduo para determinação de pesticidas e bifenilas policloradas em produtos gordurosos*.

3.7.1.2 Método multirresíduo para determinação de pesticidas e bifenilas policloradas em produtos gordurosos

a) Descrição

Este método aplica-se à determinação de resíduos dos pesticidas: lambdacialotrina, cipermetrina, DDT total (op'DDT, pp'DDT, pp'DDE, pp'DDD), dieldrin, deltametrina, endosulfan total (alfa, beta e sulfato de endosulfan), endrin, HCH total (alfa, beta e gama HCH), heptacloro, heptacloro epóxido, hexaclorobenzeno, mirex, bifenilas policloradas (PCBs congêneres: 28, 52, 101, 138, 153, 180) em produtos gordurosos como: leite, ovo, manteiga, carnes (frango, peixe), etc. Os pesticidas são extraídos com uma mistura de solventes, a purificação é feita em uma única etapa em coluna de sílica gel e a determinação qualitativa e quantitativa é feita por cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons.

b) Procedimento

Preparou uma coluna cromatográfica 15 g de sílica gel desativada a 10 % com adição de aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro, empacotando muito bem a coluna (Figura 9a). Em seguida retirou-se uma alíquota de 5 mL da solução de gordura, equivalente a 0,4 g e transferiu para a coluna cromatográfica. Posteriormente, elui com 100 mL da mistura de n-hexano-diclorometano na proporção de 4:1 (v/v) e em seguida, com 100 mL da mistura de n-hexanodichlorometano na proporção de 1:1 (v/v).

Evaporam-se os dois eluatos em capela e se for necessário com auxílio de uma chapa aquecedora (50° C), até quase a secura (Figura 9b). Após, adiciona-se aproximadamente 5 mL de n-hexano e assim, concentra-se novamente até que todo o diclorometano seja evaporado. Transfere-se quantitativamente para um tubo graduado, completando o volume para 5 mL com n-hexano. Identifica-se e quantifica em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons.

Após a quantificação no cromatógrafo, realiza-se os cálculos e a curva analítica. A curva analítica relaciona as quantidades da substância adicionada a amostra com as respectivas áreas obtidas que serão observadas no item 3.9.

Durante o estudo realizou-se algumas adaptações no método como diminuir a quantidade de solvente utilizada na eluição, pois no método indicava 200 mL e foi utilizada a metade.

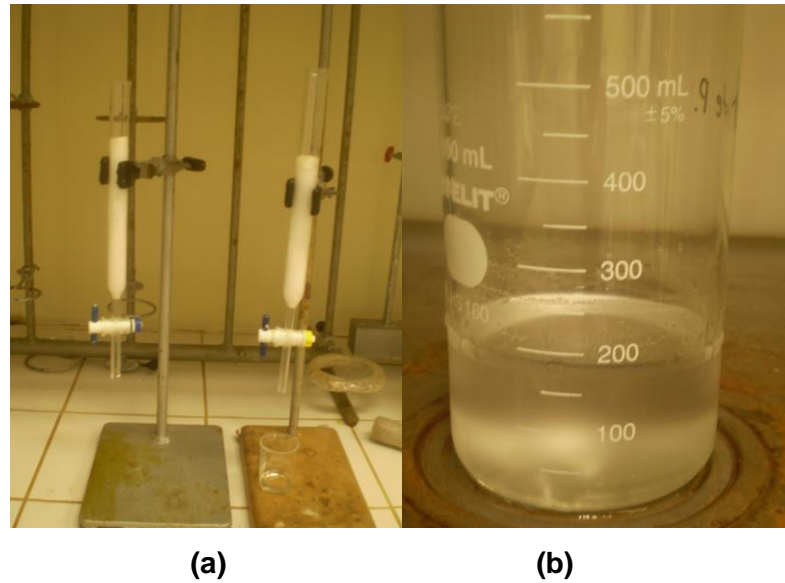


Figura 9 – a) Preparo da coluna cromatográfica , b) Evaporação do eluato.

Fonte: APPELT, P.

3.7.2 Preparo e Extração – Amostra 2

A carne moída foi comprada em comércio local. Para extração da gordura foi necessário a realização de extração direta em Soxhlet, seguindo IAL – Lipídios ou extrato etéreo, (Anexo 3).

Após a extração da gordura da carne moída (Figura 10) segue o mesmo procedimento do método multirresíduo de pesticidas descrito para a amostra 1.



Figura 10 – Balão com extrato de gordura da carne.

Fonte: APPELT, P.

3.7.3 Preparo e Extração – Amostra 3

Para preparo da amostra foi utilizada a metodologia adaptada Multi-residue Method 1 – Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs) para extração de matrizes gordurosas que consistia no procedimento descrito a seguir:

Cortar o material em cubos, transferir aproximadamente 25 gramas para um funil sobre um outro frasco (erlenmeyer) e aquecer por aproximadamente 65° C entre 4 a 8 horas em estufa. Em seguida dissolver com éter de petróleo e recolher a gordura.

Em seguida prepara-se uma solução contendo 4 gramas da amostra de gordura e dissolve com 50 mL de hexano.

Após retira-se uma alíquota de 5 mL e segue o mesmo procedimento do método multirresíduo de pesticidas (Figura 11) descrito para a amostra 1.



Figura 11 – Extração de pesticidas em gordura.

Fonte: APPELT, P.

3. 8 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A análise por Sistema GC-ECD foi realizada no Laboratório de Pesticidas – LAPE (TECPAR) Curitiba-PR.

As condições cromatográficas estão descritas a seguir.

a) Sistema GC-ECD

- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Programação da válvula do split do injetor: split aberto com razão 1:10;
- Coluna capilar: CP Sil 8 CB;
- Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 45 °C, com incremento de temperatura de 10 °C min⁻¹ até 250 °C;
- Volume de injeção de 4 µL;
- Vazão da purga do septo: 3 mL min⁻¹;
- Vazão do gás de make up (nitrogênio): 30 mL min⁻¹;
- Vazão do gás de arraste (hélio) constante em 2,0 mL min⁻¹;
- Temperatura do detector: 300 °C.

b) Robustez

A robustez nesse método de ensaio foi verificada através de variações do tamanho da amostra, no volume de solvente no preparo da solução de gordura, no volume de solvente na eluição e no aquecimento. A variação está descrita no item 4.3.

3.9 CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE

As curvas analíticas foram obtidas colocando-se os valores de concentração de cada solução trabalho da curva no eixo das abscissas e as áreas obtidas no eixo das ordenadas, com auxílio do programa Microsoft® Excel versão 7.0, o qual forneceu o coeficiente de determinação (R^2), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b) da curva analítica. Através dos dados obtidos construiu-se as curvas analíticas e assim calculado o (a), (b) e (R^2), como observado no item 5.4.

Diferentes volumes da solução de trabalho foram utilizadas para preparar as soluções analíticas para obtenção dos pontos da curva. A concentração dos pontos (Tabela 7) foi calculada a partir dos grupos de pesticidas que possuem o mesmo LMRs.

Tabela 7 - Concentração dos padrões na curva analítica.

Grupos de Pesticidas com iguais LMRs	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
HCB, LINDANO,	4; 10; 20; 40
Heptaclor epóxido, Mirex, Aldrin, Dieldrin	2; 5; 10; 20
Heptaclor,	0,42; 1,06; 2,13; 4,3
p p'DDE, p p'DDD, p p'DDT	5; 12,5; 25; 50
Methoxychlor,	3; 3,33; 6,67; 13,33
PCB	0,64; 1,6; 3,2; 6,4

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARO DE SOLUÇÕES ESTOQUE E TRABALHO

Na Tabela 8 é possível ser observados os grupos de pesticidas com iguais Limites Máximos de Resíduos (LMRs), a concentração de cada pesticida utilizado no processo de fortificação, a concentração da solução estoque (mix estoque) e a concentração de cada padrão. Além da alíquota retirada de cada padrão para preparação das soluções estoque e trabalho.

Em seguida tendo a solução trabalho realizam-se as diluições com hexano para preparar as soluções trabalhos (pontos): 5ppb2, 10 ppb2 e 20 ppb2.

Tabela 8 - Valores encontrados para pesticidas com LMRs igual.

Grupos de Pesticidas com iguais LMRs	C. Fortificação	C. Estoque	C. Padrão	Alíquota (µL)
HCB	10	100	2000	250
Lindano			2048	244
Heptaclor			2018	124
Mirex	5	50	2006	125
Aldrin			2096	119
Dieldrin			2072	121
Heptaclor,	1,067	10,67	2000	26,67
p p'DDE	12,5	125	1980,	316,
p p'DDD			2000	312
p p'DDT			2000	312,5
Methoxychlor,	3,33	33,33	2195	76
PCB	1,6	16	400	200

Legenda:

C. Fortificação: Concentração na Fortificação.

C. Padrão: Concentração do Padrão.

C. Estoque: Concentração do Estoque.

A unidade para as concentrações (µg/mL), exceto para Alíquota (µL).

4.2 PREPARO E EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

Em relação ao preparo e extração das cinco amostras (três fortificadas e duas não-fortificadas) consideramos os ensaios satisfatórios em relação ao tempo gasto para realização dos mesmos.

Isso pode ser comprovado quando se adaptou a metodologia de multirresíduo reduzindo a quantidade de solvente na eluição de 200 mL para 100 mL.

O ideal seria realizar um processo de otimização para observar qual método de extração é mais indicado para essa metodologia, assim também em relação as diferentes amostras apresentadas.

4.3 ROBUSTEZ

Foi verificado algumas variações consideradas como parâmetro de robustez, como tamanho da amostra, o volume de solvente no preparo da solução de gordura, o volume de solvente na eluição e o aquecimento (quando foi necessário para evaporação do solvente), mostrado na Tabela 9 as respectivas variações.

Tabela 9 – Robustez no ensaio.

Fator	Nominal	Varição
Tamanho da amostra	2 g	4 g
Volume de solvente no preparo da solução de gordura	25 mL	50 mL
Aquecimento	50 ° C	65 ° C
Volume de solvente na eluição	200 mL	100 mL

4.4 CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE

A Tabela 10 apresenta a inclinação (a), a interseção (b) e o coeficiente de determinação (R^2) das curvas analíticas, obtidas para as soluções analíticas de cada padrão analisadas por GC-ECD.

A curva de calibração foi construída preparando-se as soluções analíticas padrões dos pesticidas em solvente. A curva preparada em solvente relaciona o sinal do instrumento com a concentração do analito.

Tabela 10 - Resultado da inclinação, interseção e coeficiente de determinação das curvas analíticas dos pesticidas analisados.

PESTICIDAS	A	B	R²
HCB	697,785714	1247	0,9939
LINDANO	494,471429	2452	0,9941
Heptaclor epóxido	1220,92857	1490,5	0,9981
Heptaclor	1593,25211	1361,5	0,9999
Aldrin	1210,91429	2219	0,9989
Dieldrin	1116,27143	3032,5	0,9977
Mirex	1220,75714	8864,5	0,9999
p p'DDE	336,411429	2005	0,9986
p p'DDT	378,005714	5735,5	0,9985
Methoxychlor,	757,123603	1714,76878	0,9962

De acordo com ANVISA recomenda-se um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO recomenda um valor acima de 0,90 (RIBANI, et al., 2004). Assim, comparando-se com o coeficiente de correlação (R^2) encontrado nesse estudo (Tabela 10) para os padrões analíticos de pesticidas pode-se considerar um excelente parâmetro de qualidade da curva, reduzindo o grau de incerteza. Portanto, o resultado obtido, em torno de 0,99 para todos os padrões está absolutamente de acordo com o recomendado.

Segundo Peixoto (2007), a linearidade refere-se à capacidade do método cromatográfico de gerar resultados proporcionais à concentração do analito, enquadrados na faixa analítica específica. Este parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de determinação (R^2) do gráfico analítico. E como já observado o coeficiente de determinação (R^2) nesse estudo mostrou-se com resultados satisfatórios, indicando um modelo linear adequado para todos os pesticidas em estudo.

No Gráfico 1, segue o exemplo da curva analítica para o padrão pesticida Mirex.

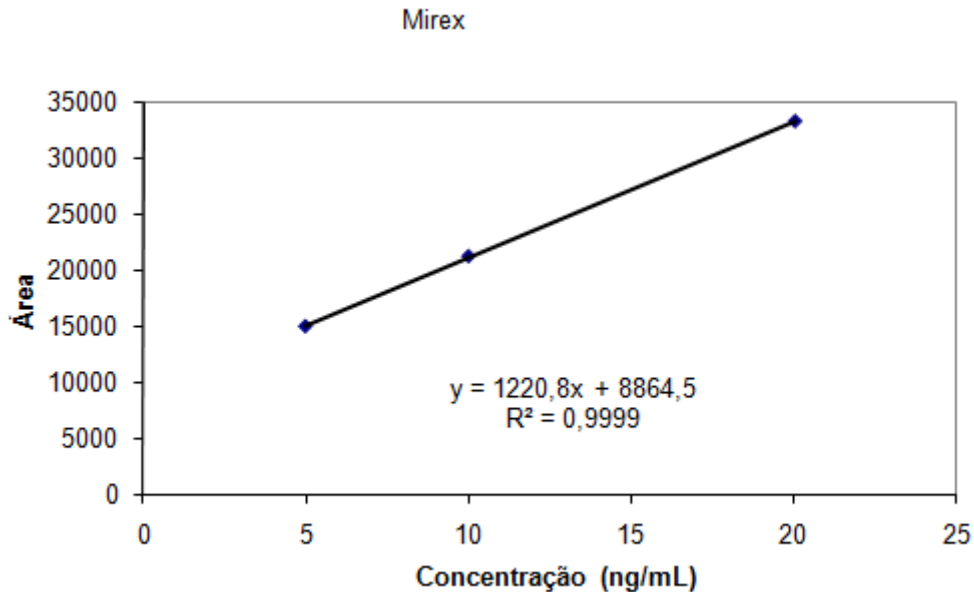


Gráfico 1 – Curva Analítica Mirex.

4.5 CROMATOGRAMAS

4.5.1 Cromatogramas das soluções trabalhos

Nas Figuras 12, 13 e 14, estão apresentados os cromatogramas obtidos por GC-ECD nas condições cromatográficas descritas no item 4.8, das soluções utilizadas como ponto analítico: 5 ppb₂, 10 ppb₂ e 20 ppb₂. O número 2 descrito no ppb (ppb₂) é designado assim pois foi realizada as soluções em duplicatas.

Os cromatogramas obtidos abaixo mostram os picos com os seus tempos de retenção relacionados com a área. Os mesmos são considerados parâmetros essenciais para posterior comparativo com os cromatogramas das amostras de pesticidas em estudo.

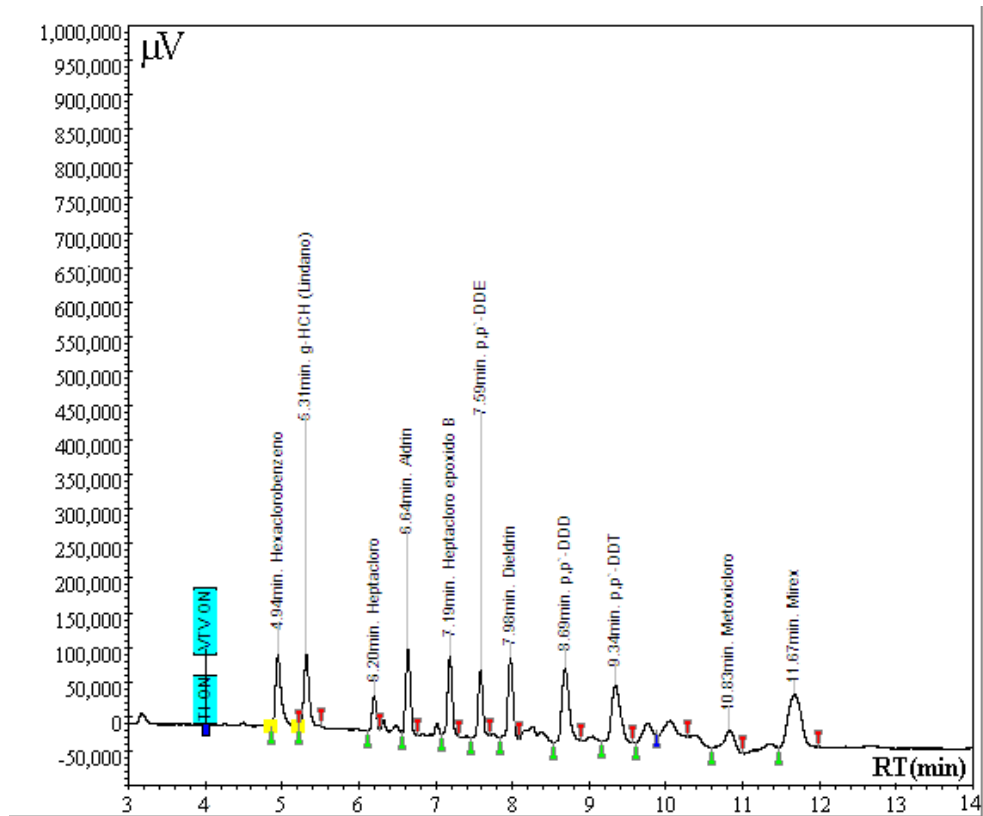


Figura 12 – Cromatograma da solução trabalho 5 ppb2.

Fonte: APPELT, P.

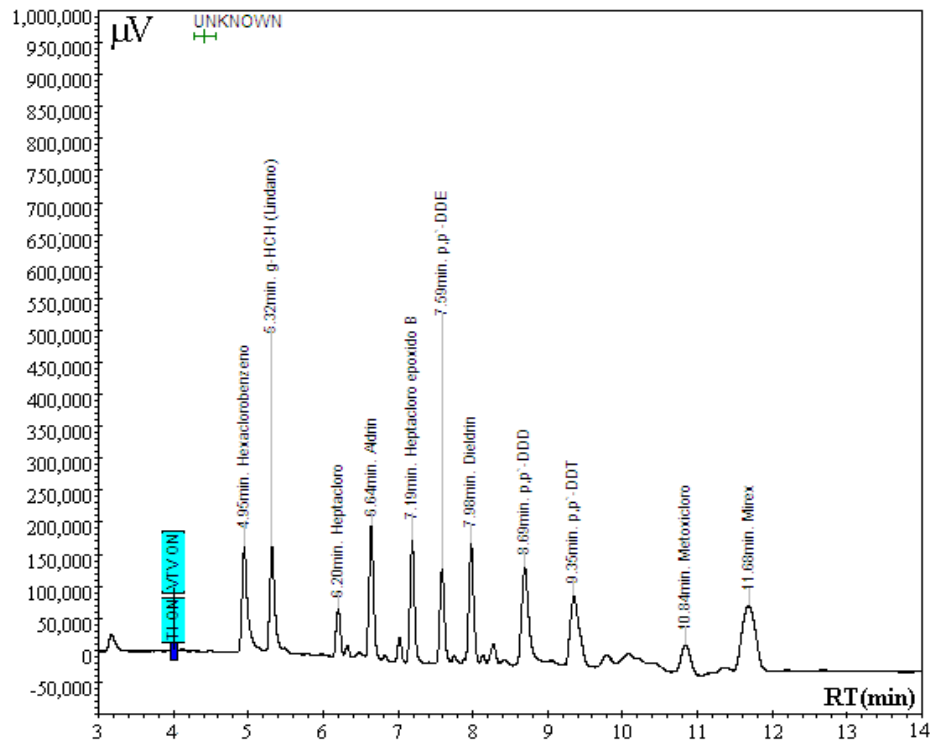


Figura 13 – Cromatograma solução trabalho 10 ppb2

Fonte: APPELT, P.

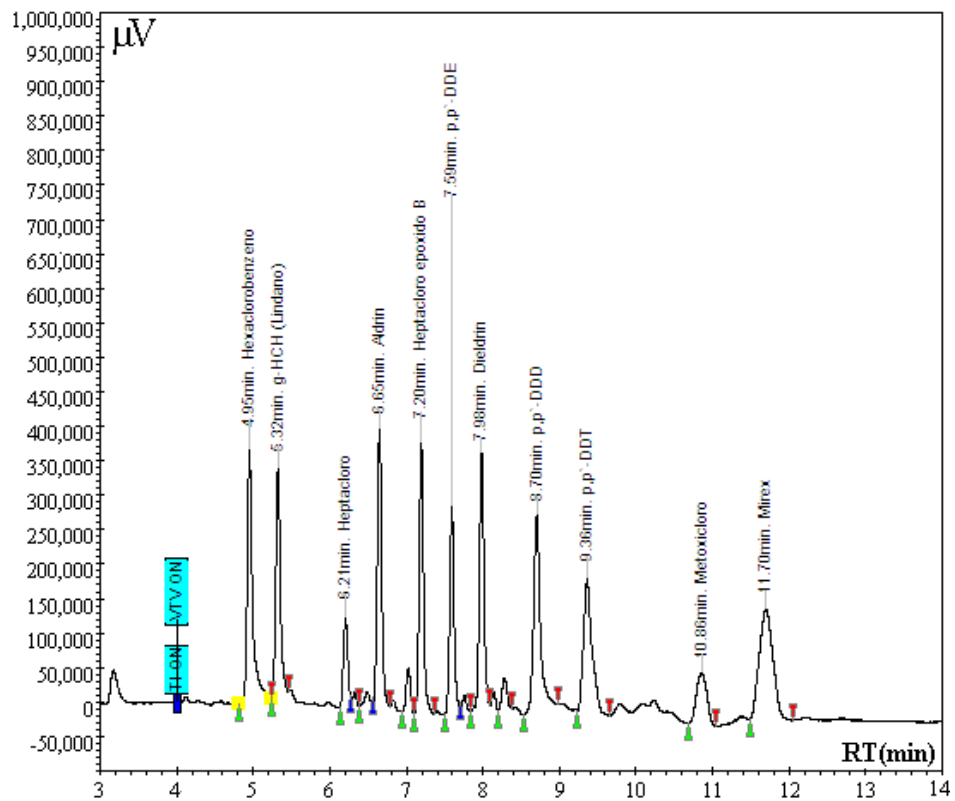


Figura 14 – Cromatograma da solução trabalho 20 ppb2

Fonte: APPELT, P.

4.5.2 Cromatogramas das Amostras

A seguir são observados os cromatogramas das amostras 1, 2 e 3 fortificadas (Figura 15,16 E 17) e das amostras 1 e 3 (Figura 18 e 19) não-fortificadas.

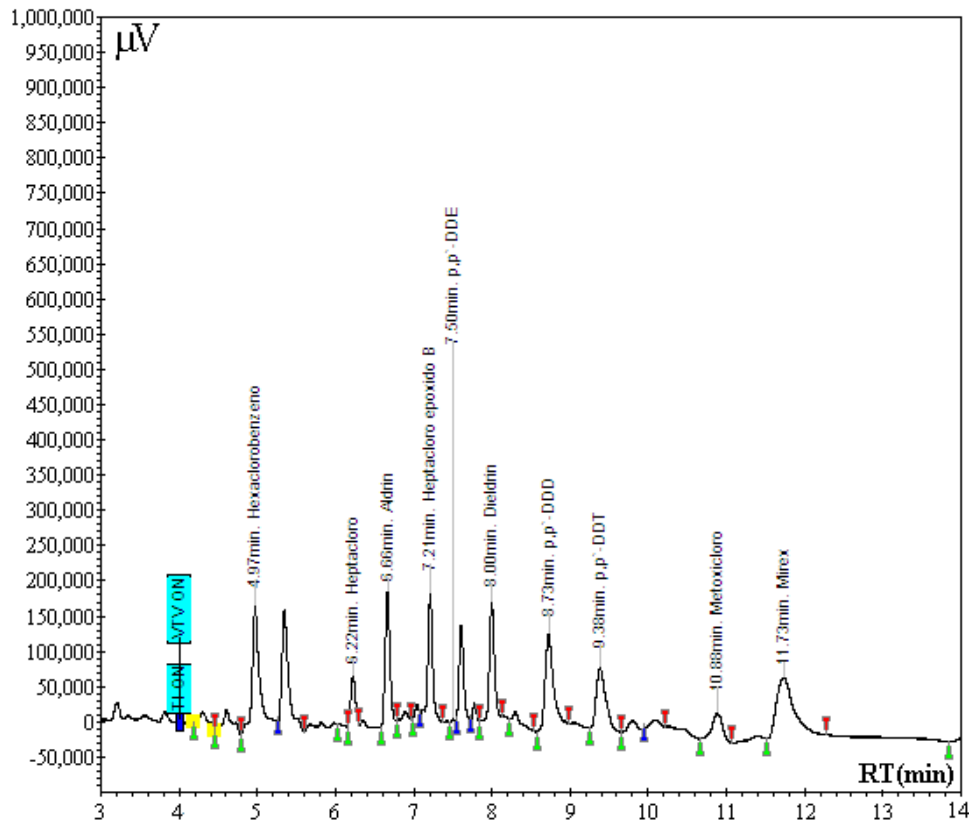


Figura 15 – Cromatograma amostra 1 (gordura origem animal) fortificada.

Fonte: APPELT, P.

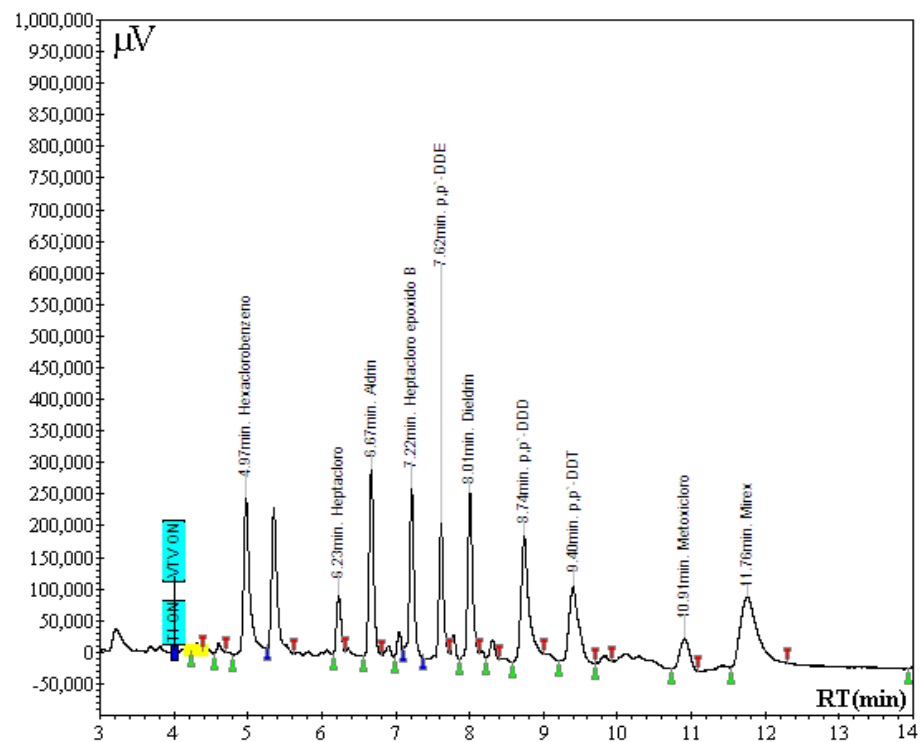


Figura 16 – Cromatograma amostra 2 (carne moída) fortificada.

Fonte: APPELT, P.

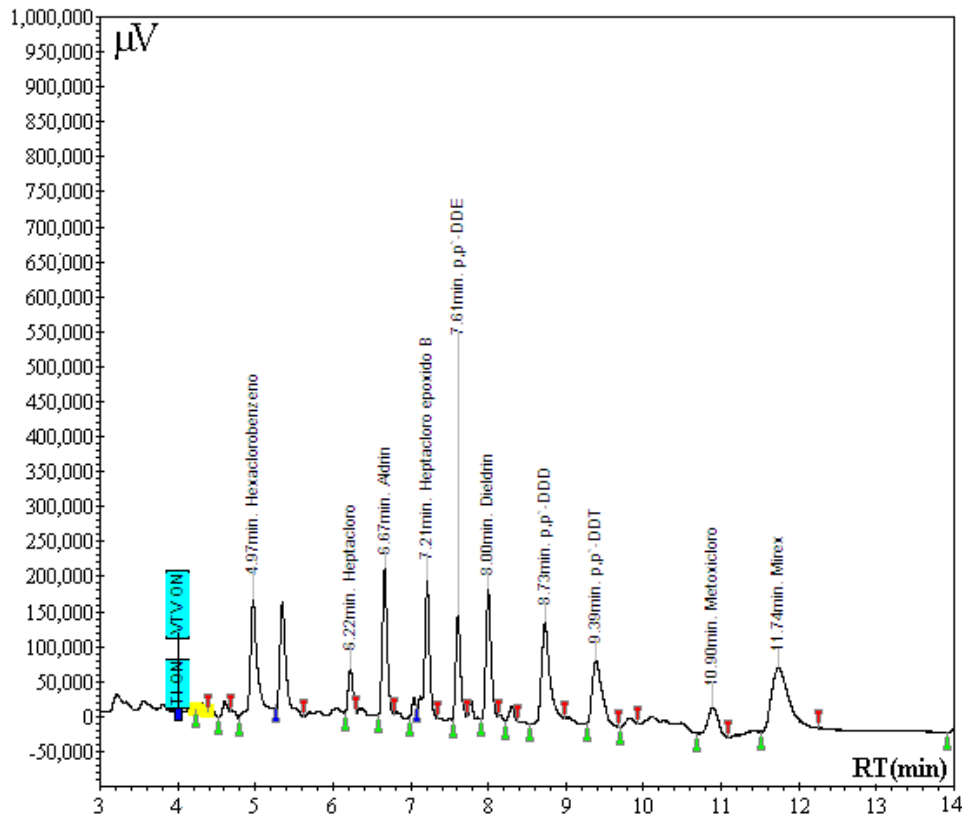


Figura 17 – Cromatograma amostra 3 (bacon) fortificada.

Fonte: APPELT, P.

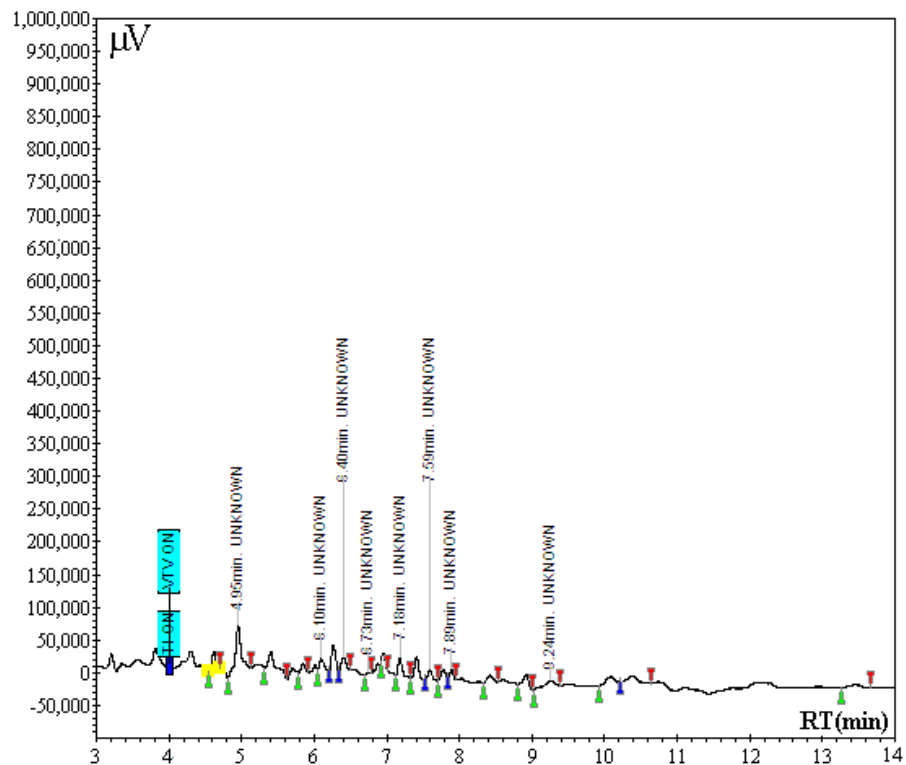


Figura 18 – Cromatograma amostra 1 (não fortificada).

Fonte: APPELT, P.

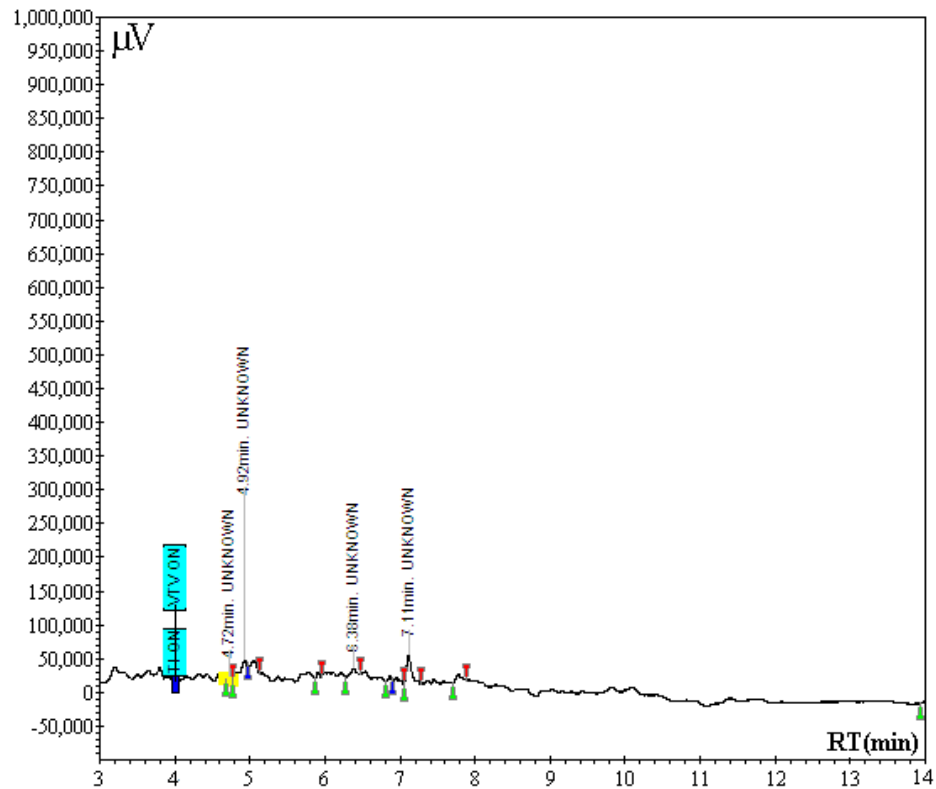


Figura 19 – Cromatograma amostra 3 (não–fortificada)

Fonte: APPELT, P.

Nos cromatogramas das amostras 1, 2 e 3 fortificadas, visualizamos os picos com seus respectivos tempos de retenção de cada pesticida em estudo. A partir desses cromatogramas percebemos que a fortificação foi eficiente ao compararmos com os cromatogramas das amostras 1e 3 não- fortificadas.

A tabela 11 mostra a detecção dos pesticidas em todas as amostras.

Tabela 11 – Detecção dos pesticidas nas amostras.

PESTICIDAS	AMOSTRAS				
	A1	A1N	A2S	A3	A3N
HCB	+	-	+	+	-
Lindano	+	-	+	+	-
Heptaclor epóxido	+	-	+	+	-
Heptacloro	+	-	+	+	-
Aldrin	+	-	+	+	-
Dieldrin	+	-	+	+	-
Mirex	+	-	+	+	-
p p'DDE	+	-	+	+	-
p p'DDT	+	-	+	+	-
pp'DDD	+	-	+	+	-
Methoxychlor,	+	-	+	+	-

LEGENDA: (+)Detectado e (-)Não-Detectado

A1 = Amostra 1 Fortificada.

A1N = Amostra 1 Não-Fortificada

A2S = Amostra 2 Soxhlet Fortificada

A3 = Amostra 3 Fortificada

A3N = Amostra 3 Não-Fortificada.

De acordo com os cromatogramas e a tabela acima foi possível observar resultados positivos para detecção desses pesticidas em estudo para as três amostras fortificadas nos seus Limites Máximos de Resíduos, sendo possível uma análise qualitativa quando comparado com as soluções trabalhos de 5 ppb², 10 ppb² e 20 ppb².

4.5.3 Seletividade do método

Para melhor comparativo observa-se a figura abaixo onde colocaram-se os dois cromatogramas da amostra 1 fortificada e da amostra 1 não-fortificada, ou seja,

a seletividade do método foi avaliada comparando-se os cromatogramas do extrato de uma matriz de gordura isenta de pesticidas com extratos de uma matriz fortificada com os pesticidas em estudo. Portanto, comparando-se os cromatogramas mostrados na Figura 20 observa-se que nenhum interferente com resposta próxima ao tempo de retenção dos compostos estudados foi detectado.

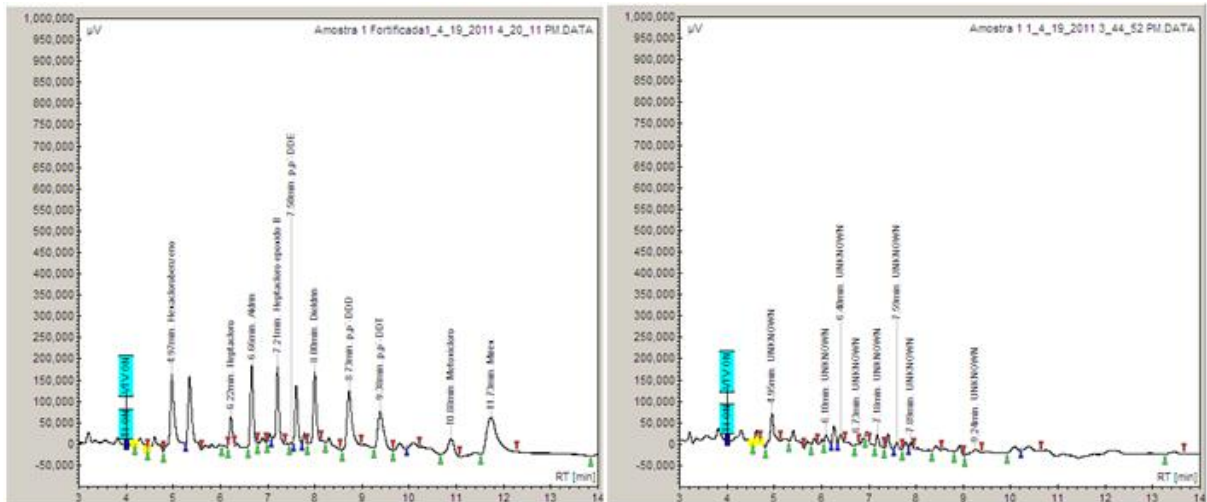


Figura 20 – Comparativo entre cromatogramas da matriz de gordura fortificada e da matriz da gordura não-fortificada

Fonte: APPELT, P.

4.5.4 Limite de Detecção

4.5.4.1 Método Visual

Nesse estudo foi realizado a detecção através do método visual que determina o limite de detecção utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas das substâncias de interesse (mix de pesticidas organoclorados), de tal maneira que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Dessa forma, observando os cromatogramas das amostras foi possível visualizar pelo método imposto o limite de detecção dos pesticidas em estudo.

4.6 TRABALHO FUTURO

Neste trabalho verificaram-se os resultados qualitativos: seletividade, robustez e limite de detecção. Entretanto, cabe ressaltar que futuramente o objetivo desse

estudo é concretizar o processo de validação desse método, pois já estão sendo desenvolvidos alguns passos importantes para a validação, como por exemplo, o parâmetro de linearidade e curva analítica.

Os parâmetros que necessitam ser calculados durante um processo de validação podem variar de acordo com o tipo de ensaio como mostra o Quadro 2. Para esse estudo um dos parâmetro relevantes é a recuperação do método e o limite de quantificação que já estão em desenvolvimento.

Parâmetros	Tipo de ensaio			
	Qualitativo	Determinação do Principal Componente	Análise de Traços	Propriedades Físicas
Precisão		✓	✓	✓
Especificidade/seletividade	✓	✓	✓	✓
Tendência recuperação		✓	✓	✓
Robustez	✓	✓	✓	✓
Sensibilidade / linearidade / faixa de trabalho		✓	✓	✓
Limite de detecção	✓		✓	
Limite de quantificação			✓	

Quadro 3 - Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Fonte: INMETRO (2007).

4.7 DIFICULDADES ENCONTRADAS

Durante o desenvolvimento desse trabalho foram encontradas muitas dificuldades. As mesmas repercutirão na falta de resultados positivos e na conclusão do trabalho em relação à proposta inicial: *Validação do método*.

Uma das grandes dificuldades seguiu por o estudo estar dividido em locais diferentes (Pato Branco – PR e Curitiba – PR (Tecpar)). A parte de preparo e extração das amostras foi realizada no Laboratório de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), e a outra parte de quantificação no sistema de Cromatografia por Captura de Elétrons se deu no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Esse fator pode ser considerado o principal dentre as

dificuldades encontradas, como o deslocamento até outra cidade de longe acesso e às vezes a falta de comunicação que gerou os erros encontrados.

Também pode-se ressaltar que apesar deste trabalho não ter cumprido com sua proposta original, ele terá continuidade afim de obter recuperação adequada para o método.

Este estudo teve inicio a partir do desenvolvimento do estágio supervisionado obrigatório no Tecpar. Este estágio consistiu de uma proposta Através de uma proposta no mês de março e que obteve muitos resultados até maio, por isso pode considerar o fato de que o trabalho obteve um ótimo rendimento pelo pouco tempo estudado.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de estudo em métodos para determinação de resíduos de pesticidas é de suma importância na garantia da qualidade de alimentos mais seguros para a população.

A matriz estudada é considerada complexa e, portanto de difícil estudo. No entanto, os parâmetros analíticos avaliados apresentaram resultados satisfatórios comparando-se com a literatura.

A partir dos ensaios de fortificação e extração, pode-se observar resultados interessantes da utilização dos três métodos, por meio de análise dos cromatogramas resultantes.

Em relação à seletividade do método observou-se que não houve interferentes, visualizando o pico exclusivamente dos compostos organoclorados, se comparando com a matriz de gordura isenta de pesticidas com extratos da matriz fortificada com os pesticidas em estudo.

Os resultados obtidos para o coeficiente de correlação (R^2) em torno de 0,99 para todos os padrões está absolutamente de acordo com o recomendado pela literatura.

Portanto, o estudo dos parâmetros analíticos para o método mostrou-se adequado para resultados qualitativos à análise de pesticidas organoclorados, tendo como objetivo futuro a validação do método de organoclorados em gordura animal.

6 REFERÊNCIAS

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Resíduos de agrotóxicos em alimentos**. Revista Saúde Pública, v. 40, n. 2, p. 361-363, 2006.

ANVISA, Agência nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria num. 329, 02 de setembro de 1985**: Proíbe a comercialização, uso e distribuição de produtos agrotóxicos organoclorados destinados à agropecuária. Brasília, 1985.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2 Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BARBOSA, Luiz Claudio A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 08 jan 2002.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 junho 2003.

CHASIN, A. A. NASCIMENTO, E. S. RIBEIRO-NETO, L. M. **Toxicologia**. Revista Brasil, v.11, p. 1-6, 1998.

COLLINS, C. H. **Químicos redescobrem a Cromatografia Líquido-Sólido**. Scientia Chromatographica. Instituto Internacional de Cromatografia, v. 1, n. 2, p. 7-11. Editora Átomo, 2009.

CUNHA, Marcelo L. Ferreira. **Determinação de resíduos de pesticidas em sedimentos dos principais rios do Pantanal Mato-Grossense por CG/EM**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, 2003.
Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 01/05/2011.

FERREIRA, José Laurentino. **Técnicas estatísticas aplicada à validação de metodologias químicas – Estudo de caso: Validação de um método modificado para determinação de cafeína em erva mate**. Monografia apresentada para obtenção do título de especialista no curso de Pós-Graduação em Controle Estatístico da Qualidade, Departamento de Estatística, setor Ciências Exatas, UFPR, Curitiba, 2003.

HARRIS, D. **Análise Química Quantitativa**. 7 Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Revisão 02 - Junho, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Vol. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3 ed. São Paulo: IMESP, 1985.

LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia em fase aquosa**. São Carlos: Acta, 1993.

LARA, W. H., BATISTA, G. C., **Química Nova**. Vol. 15, n. 2, p. 161-166, 1992.

LARINI, L.. **Toxicologia**. 2 Ed. São Paulo: Manole, pp. 136-183, 1993.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 4 Ed. Campinas, SP: Átomo, 2002.

ORDÓÑEZ, Juan A. **Tecnologia de Alimentos**. Vol. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PEIXOTO, S. C. **Estudo da estabilidade a campo dos pesticidas Carbofurano e Quincloraque em água de lavoura de arroz irrigado empregando SPE e HPLC- DAD**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

QUINETE, Natalia Soares. **Extração de poluentes organoclorados persistentes em fragmentos remanescentes da Mata Atlântica, RJ: comparação de métodos**. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Fluminense (UFF). Niterói, 2005.

RIBANI, M. BOTTOLI, C. B. G. COLLINS, C. H. JARDIM, I. C. S. F. MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova. Vol. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RISSATO, S. R. LIBÂNIO, M. GIAFFERIS, G. P. GERENUTTI, M. **Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP)**. Química Nova, Vol. 27, n. 5, p. 739-743, 2004.

ROSA, A. V. **Agricultura e Meio Ambiente**. São Paulo: Atual, 1998.

SANCHES S. M; SILVA, C. H. T. P; CAMPOS, S. X; VIEIRA, E. M. **Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água**. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 13, p.53-58, 2003.

SANTOS, J. S. XAVIER, A. A. O. RIES, E. F. COSTABEBER, I. H. EMANUELLI, T. **Níveis de organoclorados em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Sul**. Revista Ciência Rural. Vol. 36, n. 2 p. 630-635. Santa Maria - RS, 2006.

SILVA, Rosselei Caiél. **Comparação entre métodos cromatográficos, empregando GC-ECD, GC-FPD e GC-MS, e espectrofotométrico para determinação de ditiocarbamatos em alface**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, área de concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS). Santa Maria, RS, 2005.

SKOOG, D. A. WEST, D. M. HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. **Química Analítica**. 8 Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

TADEO, J. SANCHEZ-BRUNETTE, C. PÉREZ, R. FERNÁNDEZ, M. **Analysis of herbicides residues in cereals, fruits and vegetables**. Journal of Chromatography A 882, p. 175-191, 2000.

TOMITA, R. Y. **Legislação de agrotóxicos e sua contribuição para a proteção da qualidade do meio ambiente.** *Biológico*, vol. 67, n. 1, p. 1-10. São Paulo, 2005.

VOGEL, Arthur Israel. **Química Analítica Qualitativa.** 5 ed.. São Paulo: Mestre Jou, 2002.

YOGUI, Gilvan Takeshi. **Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e da Ilha Rei George (Antártica).** Dissertação apresentada a Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 8, DE 29 DE ABRIL DE 2010

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe conferem os arts. 10 e 42 do Anexo I do Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010, tendo em vista o disposto na Portaria MA nº 51, de 6 de fevereiro de 1986, na Portaria MAARA nº 527, de 15 de agosto de 1995, na Portaria MAPA nº 45, de 22 de março de 2007, e o que consta do Processo nº 21000.001330/2010-72, resolve:

Art. 1º Aprovar os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2010, na forma dos Anexos à presente Instrução Normativa.

Art. 2º As análises relativas aos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2010 serão realizadas nos laboratórios oficiais e credenciados pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

Parágrafo único. A Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes - CCRC/SDA determinará, para plena execução do Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes - PNCRC no exercício de 2010 (PNCRC/2010), e ouvida a Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial - CGAL/SDA, o remanejamento remessa de amostras para outro laboratório habilitado a realizar as análises requeridas pelo PNCRC sempre que tomar conhecimento que o laboratório anteriormente escolhido

apresentou qualquer não conformidade que impossibilite a realização da programação para o exercício de 2010.

Art. 3º As alterações técnicas complementares ao PNCRC de que trata esta Instrução Normativa serão publicadas no Diário Oficial da União.

Art. 4º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

INÁCIO AFONSO KROETZ

ANEXO II

PROGRAMA DE CONTROLE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM CARNES -
PNCRC/2010

Plano de Controle de Resíduos e Contaminantes - Carnes

Grupo	Análito	Matriz	LIMITE DE REFERÊNCIA*				Nº de Itens de ensaio
			(µg/kg)				
			Bovina	Equina	Suína	Aves	
Pesticidas, Organoclorados e PCBs	Aldrin	G	50	75	75	75	B (45) A (45) S (45) E (45)
	Alfa-HCH		100	150	150	150	
	HCB		100	150	150	150	
	Dieklrin		50	75	75	75	
	Heptaclor		50	75	16	75	
	Heptaclor epóxido		50	75	75	75	
	Cis Clordane		12	16	75	16	
	Trans Clordane		12	16	16	16	
	pp'-DDT(h)		125	187,5	187,5	187,5	
	pp'-DDE(h)		125	187,5	187,5	187,5	
	op'-DDT(h)		125	187,5	187,5	187,5	
	pp'-D'DD(h)		125	187,5	187,5	187,5	
	PCB 101(i)		16	24	24	24	
	PCB 118(i)		16	24	24	24	
	PCB 138(i)		16	24	24	24	
	PCB 153(i)		16	24	24	24	
	PCB 180(i)		16	24	24	24	
Mirex		50	75	75	75		
Antiparasitários	Abamectina (e)	F	100	10*(II)	10*(II)	10*(II)	B (192) A (75) S (340) E (170)
	Doramectina		100	10*(II)	100	100	
	Ivermectina (f)		100	100	15	10*(II)	
	Eprinomectina		2000	10*(II)	10*(II)	10*(II)	
	Moxidectina		100	100	10*(II)	10*(II)	
	Dimetridazol	M	--	11,1	10*(II)	10*(II)	
Albendazol	M	100	--	100	--	B (75) S (75)	
Organofosforados	Clorpirifos Etil	M	10	--	--	--	B (75)
	Clorpirifos Metil		10	--	--	--	
	Diazinon		10	--	--	--	
	Metamidofós		20	--	--	--	
	Mecifós		20	--	--	--	
	Acefato		20	--	--	--	
	Primifós Metil		10	--	--	--	
	Paration		10	--	--	--	
	Primifós Etil		10	--	--	--	
	Metidation		10	--	--	--	
	Azinifós Metil		40	--	--	--	
Azinifós Etil		20	--	--	--		
Piretróides	Ciflutrina	G	200	25	25	25	B (75) A (75) S (75) E (75)
	Deltametrina		500	25	25	500	
	Gamacicalotrina		400	25	400	25	
	Lambdacialotrina		400	25	400	25	
	Permetrina		500	25	25	25	
	Fenvalerato		250	25	25	25	

ANEXO IX

LEGENDA - TERMOS E ABREVIACÕES UTILIZADAS NESTA INSTRUÇÃO NORMATIVA ESPÉCIE MATRIZ

A - Ave E - Equina M - Músculo G - Gordura

B - Bovina (abatido) S - Suína F - Fígado U - Urina

BV - Bovina (vivo) R - Rim

(a) O Limite de Referência refere-se ao somatório de todas as Tetraciclinas.

(b) O Limite de Referência refere-se ao somatório de todas as Sulfonamidas.

(c) O Limite de Referência refere-se ao somatório de Heptaclor e Heptaclor Epóxido.

- (d) O Limite de Referência refere-se ao somatório de Cis-clordane e Trans-clordane.
- (e) O Limite de Referência da Abamectina é expresso como Abamectina B1a.
- (f) O Limite de Referência da Ivermectina é expresso como 22,23-Dihidro-avermectina B1a.
- (g) O Limite de Referência refere-se ao somatório de enrofloxacina e ciprofloxacino (metabólito)
- (h) O Limite de referência refere-se ao somatório de DDT e metabólitos (pp'DDE; pp'DDD; op'DDT;pp'DDT)
- (i) O Limite de referência refere-se ao somatório dos PCBs (PCB 101; PCB 118; PCB 138; PCB153; PCB180)

LIMITE DE REFERÊNCIA*

- (I) Quando se tratar de substância permitida para a espécie alvo, o Limite de Referência para Tomada de Ação Regulatória adotado será o respectivo Limite Máximo de Resíduo (LMR) ou o Teor Máximo de Contaminante (TMC), quando estabelecidos.
- (II) Quando se tratar de substância permitida para a espécie alvo, mas seu respectivo LMR / TMC não for estabelecido, o Limite de Referência para Tomada de Ação Regulatória adotado será igual a 10 µg/kg.
- (III) Quando se tratar de substância banida ou de uso proibido para a espécie alvo no país, o Limite de Referência para Tomada de Ação Regulatória adotado será igual ou menor ao respectivo Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR), quando estabelecido.


- (IV) Quando se tratar de substância banida ou de uso proibido para a espécie alvo no país, mas sem o respectivo LMDR estabelecido, o Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) será de 2 µg/kg, sendo que o Limite de Referência para Tomada de Ação Regulatória adotado será igual ou menor a 2µg/kg, sendo considerado o respectivo Limite de Detecção do Método.
- (V) Os Limites de Quantificação (LQ), os métodos de análise utilizados para cada analito, assim como maiores detalhamentos a respeito de cada laboratório participante do PNCRC/2010, estão presentes no sítio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (www.agricultura.gov.br » Serviços » Credenciamento »

Laboratórios » Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários » Resíduos e Contaminantes em Alimentos » Laboratórios Oficiais / Laboratórios Credenciados).

(VI) Para substâncias de uso proibido e produzidas endogenamente não se estabelece Limite Máximo de Resíduo (LMR).

(VII) Não há limite definido na legislação para todos os HPAs. Ação regulatória prevista apenas para benzo(a)pireno.

ANEXO 2

	<p style="text-align: center;">INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ - TECPAR DIVISÃO DE ANÁLISES E ENSAIOS TECNOLÓGICOS - DETEC LABORATÓRIO DE PESTICIDAS</p>	
<p>PLANILHA PARA O CÁLCULO DOS LIMITES DE FORTIFICAÇÃO</p> <p>SS: <u>Desenvolvimento - Organoclorados em gordura</u></p> <p>PRINCÍPIO ATIVO: <u>p,p' - DDE, p,p' - DDD, p,p' - DDT</u></p> <p>CULTURA: <u>gordura</u></p>		
<p>CÁLCULO DOS LÍMITES DE FORTIFICAÇÃO</p> <p>Dados da análise:</p> <p>Massa da amostra (g): <u>2,0</u></p> <p>Volume de extração (mL): <u>25</u></p> <p>Aliquota retirada: <u>5</u></p> <p>Limite inferior (Limite de Quantificação)</p> <p>Limite de fortificação (mg/kg): <u>0,188</u></p> <p>Volume da solução padrão usada na fortificação (mL): <u>0,030</u></p> <p>Volume de aferição da amostra (mL): <u>5,00</u></p> <p>Concentração da solução padrão utilizada na fortificação (ug/mL): <u>12,5</u></p> <p>Concentração da amostra no volume final (ug/mL) : <u>0,01500</u></p> <p>Limite superior:</p> <p>Limite de fortificação (mg/kg): <u></u></p> <p>Volume da solução padrão usada na fortificação (mL): <u></u></p> <p>Volume de aferição da amostra (mL): <u></u></p> <p>Concentração da solução padrão utilizada na fortificação (ug/mL): <u>#DIV/0!</u></p> <p>Concentração da amostra no volume final (ug/mL) : <u>0,0000</u></p>		
DATA	TÉCNICO RESPONSÁVEL	GERENTE DO LABORATÓRIO
<p>Planilha para o Cálculo dos Limites de Fortificação – REG-LAPE 09 - Rev. C - Data: 03/11/09 - pág. 1/1</p>		

ANEXO 3

Lipídios

Os lipídios são compostos orgânicos altamente energéticos, contêm ácidos graxos essenciais ao organismo e atuam como transportadores das vitaminas lipossolúveis. Os lipídios são substâncias insolúveis em água, solúveis em solventes orgânicos, tais como éter, clorofórmio e acetona, dentre outros. Estes são classificados em: simples (óleos e gorduras), compostos (fosfolipídios, ceras etc.) e derivados (ácidos graxos, esteróis). Os óleos e gorduras diferem entre si apenas na sua aparência física, sendo que à temperatura ambiente os óleos apresentam aspecto líquido e as gorduras, pastoso ou sólido. A determinação de lipídios em alimentos é feita, na maioria dos casos, pela extração com solventes, por exemplo, éter. Quase sempre se torna mais simples fazer uma extração contínua em aparelho do tipo Soxhlet, seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente empregado. O resíduo obtido não é constituído unicamente por lipídios, mas por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente. Estes conjuntos incluem os ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, as lecitinas, as ceras, os carotenóides, a clorofila e outros pigmentos, além dos esteróis, fosfatídios, vitaminas A e D, óleos essenciais etc., mas em quantidades relativamente pequenas, que não chegam a representar uma diferença significativa na determinação. Nos produtos em que estas concentrações se tornam maiores, a determinação terá a denominação mais adequada de extrato etéreo. Uma extração completa se torna difícil em produtos contendo alta proporção de açúcares, de proteínas e umidade. Em certos casos, podem ser aplicados outros métodos na determinação dos lipídios, tais como: a extração com solvente a frio (método de Bligh-Dyer ou Folch), hidrólise ácida (método de Gerber ou Stoldt-Weibull) ou alcalina (método Rose-Gotlieb-Mojonnier).

032/IV Lipídios ou extrato etéreo – Extração direta em Soxhlet

Material

Aparelho extrator de Soxhlet, bateria de aquecimento com refrigerador de bolas, balança analítica, estufa, cartucho de Soxhlet ou papel de filtro de 12 cm de

diâmetro, balão de fundo chato de 250 a 300 mL com boca esmerilhada, lã desengordurada, algodão, espátula e dessecador com sílica gel.

Reagente

Éter

Procedimento – Pese 2 a 5 g da amostra em cartucho de Soxhlet ou em papel de filtro e amarre com fo de lã previamente desengordurado. No caso de amostras líquidas, pipete o volume desejado, esgote em uma porção de algodão sobre um papel de filtro duplo e coloque para secar em uma estufa a 105°C por uma hora. Transfira o cartucho ou o papel de filtro amarrado para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Acople o extrator ao balão de fundo chato previamente tarado a 105°C. Adicione éter em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Adapte a um refrigerador de bolas. Mantenha, sob aquecimento em chapa elétrica, à extração contínua por 8 (quatro a cinco gotas por segundo) ou 16 horas (duas a três gotas por segundo). Retire o cartucho ou o papel de filtro amarrado, destile o éter e transfira o balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105°C, mantendo por cerca de uma hora. Resfrie em dessecador até a temperatura ambiente. Pese e repita as operações de aquecimento por 30 minutos na estufa e resfriamento até peso constante (no máximo 2 h).

Cálculo

Cálculo

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{lipídios ou extrato etéreo por cento m/m}$$

N = nº de gramas de lipídios

P = nº de gramas da amostra