

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação  
de Pesticidas Organoclorados (OCPs) e Bifenilas Policloradas (PCBs) em  
leite cru

CAROLINE ROHR

Porto Alegre, 2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação  
de Pesticidas Organoclorados (OCPs) e Bifenilas Policloradas (PCBs) em  
leite cru

Dissertação apresentada por **Caroline Rohr** para a  
obtenção do grau de MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria Bergold

**Co-orientador:** Dr. Fabiano Barreto

Porto Alegre, 2018

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul e aprovada em 30.05.2018 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Magda Targa Martins

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento LANAGRO/RS

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Renata Pereira Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Rohr, Caroline  
Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Determinação de Pesticidas Organoclorados (OCPs) e Bifenilas Policloradas (PCBs) em leite cru / Caroline Rohr. -- 2018.  
105 f.  
Orientador: Ana Maria Bergold.  
Coorientador: Fabiano Barreto.  
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.  
1. Desenvolvimento de metodologia. 2. Leite cru. 3. Organoclorados. 4. Bifenilas Policloradas. I. Bergold, Ana Maria, orient. II. Barreto, Fabiano, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Laboratório de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (RPM) do Laboratório Nacional Agropecuário/RS (LANAGRO/RS), localizado em Porto Alegre.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que me acompanhou nesta etapa, me proporcionando saúde e força para ultrapassar todas as dificuldades, contudo foi o grande mestre em todos os momentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de fazer o mestrado.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Maria Bergold, pelo suporte, orientação, apoio, confiança e amizade.

Ao meu co-orientador Fabiano Barreto pelo suporte técnico.

Ao professor Pedro, professor Martin e professora Solange pela orientação, na ausência da professora Ana.

Ao meu noivo, Eduardo Renner, pelo amor, incentivo, compreensão, e paciência.

À minha mãe e à minha irmã pelo incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço, que nos momentos da minha ausência, sempre compreenderam a importância do meu estudo.

A minha amiga e colega Layane Lenardon Vinciguerra, que disponibilizou a sua casa diversas vezes.

A equipe do LANAGRO/RS, setor RPM, Louise Jank, Caroline Andrade Tamaszewski, Daniel Rodrigo Hillesheim, Tamara dos Santos Castilhos, Renata Batista Rau e Cristina Belissimo Dias Ribeiro pelo suporte técnico e doação de materiais.

A empresa Piccadilly, na qual eu atuo, pela disponibilidade de horários.

A todos que fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.





*“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”*

Roger Von Oech



## RESUMO

Dados recentes de literatura têm demonstrado um aumento expressivo nas contaminações acidentais em alimentos, decorrentes de resíduos encontrados em alimentos, ou seja, pesticidas, resíduos provenientes de medicamentos veterinários, metais pesados presentes no ambiente e micotoxinas. Estes chegam nos alimentos através de ecossistemas ambientais e podem causar câncer. Devido ao alto perfil de consumo, um dos alvos é o leite, o qual pode sofrer contaminação por compostos persistentes como pesticidas organoclorados (OCPs) e bifenilas policloradas (PCBs) através de pastos, rações e produtos veterinários. Portanto existe a necessidade de monitoramento em relação a presença e quantidade destas substâncias nos alimentos que passa a ser um desafio analítico. Para detecção e quantificação destes contaminantes é necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas que apresentem sensibilidade e especificidade adequadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de metodologia analítica baseado no preparo das amostras seguindo o método de QuEChERS e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em *tandem* (GC-MS/MS) para quantificação de OCPs e PCBs. O método de QuEChERS mostrou ser eficiente e prático na extração dos analitos, possibilitando a extração e clean-up de várias amostras ao mesmo tempo. A validação foi realizada e os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, repetibilidade, recuperação, precisão intermediária, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ), segundo 2002/657 / EC e SANCO 2009. Resultados satisfatórios foram obtidos para Aldrin, Mirex, PP-DDE, PCB101, PCB 138, PCB 153 e PCB 180. O método desenvolvido foi testado para 20 amostras reais de leite proveniente do Serviço de Inspeção Federal, e nenhum resíduo foi detectado. Com a metodologia desenvolvida e validada foi possível realizar a quantificação dos compostos de interesse em leite cru, tendo como objetivo

principal a utilização nas ações de controle oficial do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC).

**Palavras-chave:** contaminações alimentares, leite, detecção, GC-MS/MS, fiscalização, validação.

## ABSTRACT

### **Development and Validation of Analytical Methodology for Determination of Organochlorine Pesticides (OCPs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in raw milk**

Recent literature has shown a significant increase in accidental contamination in food, resulting from residues such as pesticides, residues from veterinary drugs, heavy metals present in the environment and mycotoxins. These arrive in food through environmental ecosystems and can cause cancer. Due to the high consumption profile, one of the targets is milk, which can be contaminated by persistent compounds such as OCPs (organochlorine pesticides) and PCBs (polychlorinated biphenyls) through pasture, feed and veterinary products. Therefore, there is a need to monitor the presence and quantity of these substances in food, which becomes an analytical challenge. For the detection and quantification of these contaminants it is necessary to develop analytical techniques that have adequate sensitivity and specificity. Thus, the objective of this work was the development and validation of an analytical methodology based on gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) for quantification of OCPs and PCBs with sample preparation following the QuEChERS method. The QuEChERS method showed to be efficient and practical in the extraction of the analytes, allowing the extraction and clean-up of several samples at the same time. The validation was performed and the parameters evaluated were specificity, linearity, repeatability, recovery, intermediate precision, accuracy, detection limit, limit of quantification and limit of decision ( $CC\alpha$ ) according to 2002/657 / EC and SANCO 2009. Satisfactory results were obtained for Aldrin, Mirex, PP-DDE, PCB101, PCB 138, PCB 153 and PCB 180. The developed method was tested for 20 actual samples of milk from the Federal Inspection Service, and no residue was detected. With the methodology developed and validated, it was possible to quantify the compounds

of interest in raw milk, with the main objective being the use in official control measures of the National Plan for the Control of Residues and Contaminants (PNCRC).

**Keywords:** food contamination, milk, detection, GC-MS/MS, inspection, validation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química dos organoclorados (HAULER <i>et al</i> , 2014, LAGO, 2006, NOVAK & KOVAC, 2011, NOVOTNÝ, 2009, SHI <i>et al</i> , 2016, YOGUI, 2002).....	38
<b>Figura 2:</b> Estrutura química das bifenilas policloradas (HAULER <i>et al</i> , 2014, LAGO, 2006, NOVAK & KOVAC, 2011, NOVOTNÝ, 2009, SHI <i>et al</i> , 2016, YOGUI,2002).....	40
<b>Figura 3:</b> Diagrama esquemático de um cromatógrafo a gás. Adaptado de (COLLINS,1997).....	45
<b>Figura 4:</b> Esquema das principais partes de um Espectrômetro de Massas. (LANÇAS, 2009). .....	46
<b>Figura 5:</b> Cromatogramas obtidos para as amostras “brancas” para o modo de visualização qualitativo e quantitativo, respectivamente.. .....	63
<b>Figura 6:</b> Cromatogramas obtidos para o analito Aldrin para o modo de visualização qualitativo e quantitativo respectivamente.....	63
<b>Figura 7:</b> Cromatogramas obtidos para o analito PCB 101 para o modo de visualização qualitativo e quantitativo respectivamente. ....	64
<b>Figura 8:</b> Cromatogramas obtidos para o analito PP-DDE para o modo de visualização qualitativo e quantitativo respectivamente. . .....	65
<b>Figura 9:</b> Cromatogramas obtidos para o analito PCB 153 para o modo de visualização qualitativo e quantitativo respectivamente.. .....	65
<b>Figura 10:.</b> Cromatogramas obtidos para o analito PCB 138 para o modo de visualização qualitativo e quantitativo respectivamente.....	66
<b>Figura 11:</b> Cromatogramas obtidos para o analito PCB 180 para o modo de visualização qualitativo e quantitativo respectivamente..... . .....	67
<b>Figura 12:</b> Cromatogramas obtidos para o analito Mirex para o modo de visualização qualitativo e quantitativo respectivamente. . .....	67





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores de LMR dos OCs e PCBs.....	42
<b>Tabela 2:</b> Concentração dos analitos na solução de fortificação.....	53
<b>Tabela 3:</b> Concentrações das amostras de acordo com o nível de validação adotado.....	54
<b>Tabela 4.</b> Tempos de retenção e transições MRM para determinação de organoclorados e bifenilas policloradas em leite cru.....	68
<b>Tabela 5.</b> Resultados dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ).....	70
<b>Tabela 6.</b> Resultados para os parâmetros de validação avaliados no método.....	71
<b>Tabela 7.</b> Resultados da Reprodutibilidade.....	72
<b>Tabela 8.</b> Valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para cada analito.....	74



## LISTA DE ABREVIATURAS

1. CC $\alpha$  Limite de decisão
2. DAD Detecção por diodos
3. ECD Detecção por captura de elétrons
4. EFSA Autoridade Europeia para Segurança Alimentar
5. FDA Administração de alimentos e medicamentos (do inglês *Food and Drug Administration*)
6. FPD Detecção fotométrica de chama
7. GC Cromatografia gasosa
8. GC-uECD Detecção por captura de micro elétrons por cromatografia gasosa
9. GC-MS/MS Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas operando no modo Tandem
10. GPC Cromatografia de permeação em gel
11. IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
12. IN Instrução Normativa
13. LANAGRO Laboratório Nacional Agropecuário
14. LC Cromatografia líquida
15. LMR Limite Máximo de Resíduo
16. MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
17. NPD Detecção por nitrogênio-fósforo
18. OCPs Pesticidas Organoclorados
19. OCs Organoclorados
20. PCBs Bifenilas Policloradas
21. PNRC Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
22. PSA Amina Primária/Secundária
23. SPE Extração em fase sólida
24. SPME Micro extração em fase sólida
25. TS Padrão de tecido (do inglês *Tissue Standard*)
26. TR Tempo de retenção



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	29
2.1 Objetivo Geral .....	31
2.2 Objetivos Específicos .....	31
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	33
3.1 Leite.....	35
3.2 Contaminações alimentares.....	35
3.3 Organoclorados.....	36
3.4 Bifenilas Policloradas.....	39
3.5 Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal.....	40
3.6 Metodologias.....	42
3.6.1 Extração e purificação .....	42
3.6.2 Detecção e Quantificação.....	44
3.7 Validação.....	47
3.7.1 Especificidade e Seletividade.....	47
3.7.2 Linearidade.....	47
3.7.3 Repetitividade e Reprodutibilidade.....	48
3.7.4 Recuperação.....	48
3.7.5 Exatidão.....	49
3.7.6 Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ).....	49
3.7.7 Limites de Decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ ).....	49
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	51
4.1 Padrões.....	53
4.2 Reagentes.....	54
4.3 Amostras.....	54
4.4 Extração.....	55
4.5 Análise das amostras por GC-MS/MS.....	56
4.6 Validação.....	56
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	59
5.1 Análise por GC-MS/MS.....	62
5.2 Extração.....	69
5.3 Procedimento de Validação.....	70

5.3.1 Linearidade.....	70
5.3.2 Precisão.....	70
5.3.3 Repetibilidade e Reprodutibilidade.....	71
5.3.4 Recuperação.....	72
5.3.5 Limite de Detecção e de Quantificação.....	73
5.3.6 Exatidão.....	73
5.3.7 Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ ).....	74
5.3.8 Especificidade e Seletividade.....	74
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>8 ARTIGO CIENTÍFICO – Desenvolvimento e validação de metodologia para pesticidas em leite cru utilizando as técnicas de QuEChERS e GC-MS/MS.....</b>	<b>91</b>







As projeções demonstram que a produção de leite no Brasil deve crescer em 2018, com uma estimativa entre 2,1% e 3% anualmente para os próximos 10 anos. Porém a crise de 2017 desestimulou esta taxa de crescimento, com a diminuição dos investimentos na produção leiteira, comprometendo assim a qualidade e volume de produção de leite. Observa-se ainda que a produção de leite mundial em 2018 deve exercer um aumento em relação ao ano anterior, devido à alta dos preços dos produtos lácteos (ZEN *et al* 2018).

A utilização de pesticidas organoclorados originou uma estabilização para a agricultura, trazendo grandes benefícios para a produção agrícola. Em contrapartida, os problemas causados por estas substâncias, resultaram em efeitos nocivos ao meio ambiente e à população humana, que consomem alimentos de origem vegetal e animal. Entre as principais doenças que podem ser provocadas por essas substâncias destaca-se o câncer. Os organoclorados afetam o material genético e podem alterar o perfil da expressão gênica. Eles se depositam nos tecidos adiposos, possuem uma meia-vida longa e sua degradação é lenta (CHAO *et al*, 2006). Desordens reprodutivas, doenças como Parkinson, Alzheimer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias crônicas como a asma podem advir da exposição ou ingestão de organoclorados na dieta (GEORGE & SHUKLA, 2011, MOSTAFALOU & ABDLLAHI, 2013).

Os PCBs foram utilizados em equipamentos, óleos, plásticos na indústria e em 1977 foram proibidos nos Estados Unidos. No Brasil a proibição ocorreu em 1981. Estudos comprovam que ainda existe a presença de PCBs em equipamentos antigos, o que facilita as contaminações. A toxicidade destes compostos afeta o sistema neurológico, imunológico e endócrino (MOHR & COSTABEBER, 2012).

Nos Estados Unidos os organoclorados tiveram uso aumentado nos anos de 1960 a 1980, quando o organoclorado DDT foi usado para prevenir doenças

como a malária, dengue e leishmaniose. O organoclorado lindano foi utilizado para matar piolhos nas cabeças das crianças (BENBROOK, 2002).

A contaminação de pesticidas no leite pode decorrer da contaminação de pastos, rações, cereais, domissanitários em currais e locais de produção leiteira, ambientes aquáticos e também produtos veterinários utilizados nos animais. Desta forma, o risco de exposição a este tipo de compostos torna-se bastante elevada (KAN & MEIJER, 2007).

Para garantir a proteção do consumidor quanto à segurança alimentar, um controle por parte das agências regulatórias se faz necessário. Dessa forma, o Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA) realiza este controle de resíduos em alimentos através do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), que tem por objetivo monitorar a exposição da população aos resíduos, e controlar os níveis destas substâncias em alimentos e medicamentos veterinários (BRASIL, 1999, JANK *et al* 2017).

Considerando que existem poucas publicações com métodos analíticos que possam ser úteis no monitoramento (triagem e confirmação) da presença de pesticidas em leite, o presente trabalho destina-se ao desenvolvimento de um método multirresíduo capaz de determinar no leite cru, simultaneamente, um grupo de 17 compostos organoclorados, incluindo bifenilas policloradas. O método desenvolvido contempla os valores máximos de resíduos regulamentados, visando à utilização do mesmo no âmbito do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.

Estudos recentes destacam que o que até agora vem sendo estudado em termos de metodologia na investigação de contaminantes em alimentos são a extração em fase sólida e cromatografia líquida de ultra alta eficiência na determinação de micotoxinas em leite, a técnica extração de QuEChERS modificada e posterior detecção por captura de micro elétrons por cromatografia gasosa (GC-  $\mu$ ECD) na investigação de Endrina e Gama-Ceto Endrina em

produtos alimentícios de origem animal, como porco, frango, ovo e leite. Ainda se pode citar a técnica de cromatografia líquida combinada com a espectrometria de massas na pesquisa de N-(3-aminopropil) -N-dodecilpropano-1,3-diamina em produtos lácteos e pesticidas em chá (SHIDA et al, 2018; SLIMANY et al, 2018; RAHMAN et al, 2018).







## 2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver e validar método para detecção e determinação quantitativa de organoclorados (Aldrin, Dieldrin, Dodecacloro (Mirex), Heptacloro, Heptacloroepoxido, Hexaclorobenzeno, Alfa-HCH, Gama-HCH, Trans-Clordane, PP-DDT, PP-DDE, OP-DDT) e bifenilas policloradas (PCB101, PCB 118, PCB138, PCB153 e PCB180) em leite cru.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver protocolo de preparo de amostras para extração empregando o método de QuEChERS.
- Desenvolver e validar método analítico para detecção de organoclorados e bifenilas policloradas em leite cru empregando a técnica GC-MS/MS.
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras reais, e avaliar a presença dos analitos.









### 3.1 Leite

O Brasil produziu 35,17 bilhões de litros de leite no ano de 2014, que corresponde a uma elevação de 2,7% em comparação com o ano anterior. E a Região Sul foi a região que mais produziu leite no presente ano, desde que começaram as pesquisas pelo IBGE. Dados coletados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos demonstraram que o Brasil se destaca pela quinta posição no ranking mundial de produção do leite no ano de 2014, tomando uma posição superior em relação à União Europeia, Índia, Estados Unidos e China. (DAIRY, 2015, IBGE, 2014). Já nos anos de 2015 e 2016 a produção leiteira no Brasil sofreu um crescente declínio, proveniente de crises financeiras no país, que acarretou quedas nas atividades industriais. Em 2017 registrou-se uma recuperação, com a produção de 34,5 bilhões de litros. (BRASIL, 2017)

Em todas as partes do mundo o leite é consumido, tanto na sua forma líquida como na forma de seus mais diversos derivados. O leite é composto por várias substâncias, sua principal função é servir como alimento fornecendo nutrientes. Ainda, o leite permite um amplo processamento industrial para diferentes produtos na alimentação humana. A preparação dos diferentes produtos lácteos depende das composições físico-químicas do leite (MOTTA, *et al.*, 2014).

### 3.2 Contaminações alimentares

Pesquisas demonstram que os desfechos negativos em termos de saúde pública decorrentes de contaminações em alimentos vêm sofrendo um crescente aumento em todo mundo, causando, riscos para a saúde da população e impacto na economia. Os métodos analíticos de detecção adequados em termos de especificidade e sensibilidade são imprescindíveis para o monitoramento e controle dos níveis de exposição a substâncias nocivas à saúde da população (MOORE *et al.*, 2012).

A segurança dos alimentos é uma questão que está cada vez mais sendo observada pelos consumidores, pois existem riscos sendo identificados e que podem ser veiculados nos alimentos de origem animal, o que compromete a saúde da população. Estudos apontam que as contaminações dos alimentos por agrotóxicos, ainda são vistas pela população como um risco invisível, pois seus efeitos somente são observados em longo prazo. Assim, um controle por parte das agências regulatórias se faz necessário para garantir a segurança dos consumidores (GALINDO & PORTILHO, 2015, VIEIRA, 2009).

Na Europa a Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA) assegura a segurança alimentar conduzindo estudos científicos e realizando o monitoramento em políticas públicas. Como exemplo da atuação deste órgão na segurança alimentar se pode citar o estudo de avaliação de risco de pesticidas em mel de abelha, onde se avaliou os riscos de exposição, caracterização do risco e perigos relacionados a ecossistemas ambientais (RORTAIS *et al*, 2017).

No Brasil e nos Estados Unidos os serviços de segurança alimentar são monitorados pelos governos federais. Podendo os Estados Unidos executar inspeções federais e estatais, e no Brasil as inspeções podem ocorrer através de representantes federais, estatais e municipais. Mas esta divisão de estrutura organizacional no Brasil, apresenta um aspecto desfavorável que é o custo em manter estas divisões interinamente em funcionamento (CARNEIRO & KANEENE, 2017).

### **3.3 Organoclorados**

Os organoclorados (OCs) são compostos persistentes, tóxicos, lipossolúveis e tem potencial de bioacumular-se, podendo ser cancerígenos e genotóxicos. Estes compostos são resistentes à degradação ambiental e apresentam solubilidade baixa em água. (LIU *et al* 2016, SANATCUMAR, 2014). Com um estudo realizado em 70 pacientes com câncer e supostamente

exposição a organoclorados, identificou-se maiores níveis de concentração de resíduos presentes nos tecidos tumorais destes pacientes, o que comprova a relação da exposição com o câncer destes pacientes (ELDAKROORY *et al* 2017)

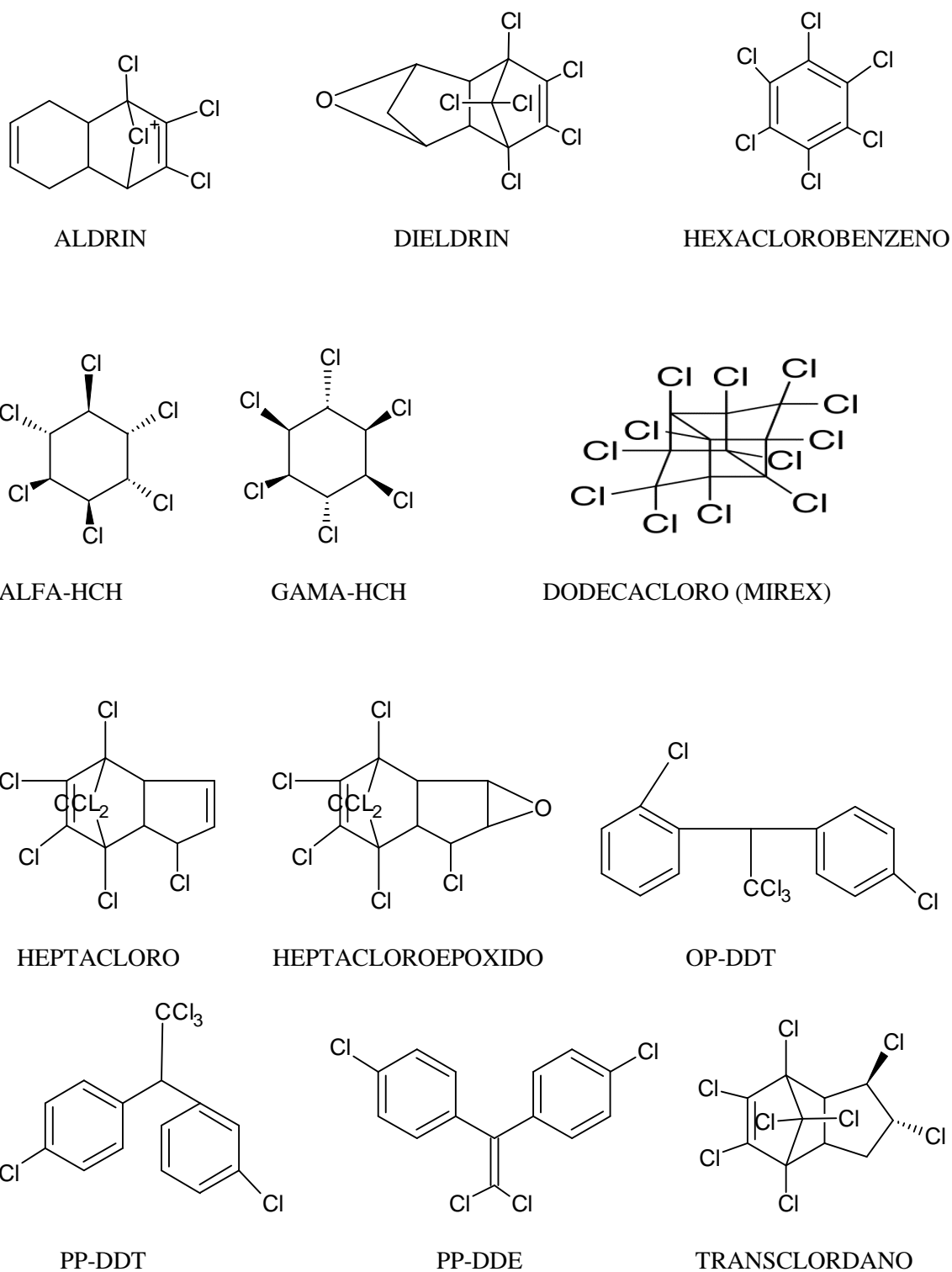
Estudos salientam que a contaminação de seres humanos por organoclorados pode ser decorrente de sistemas aquáticos contaminados, onde a água e alimentos marinhos podem estar contaminados. Um exemplo disto pode ser verificado através da pesquisa realizada no rio Indo na Ásia que apresentou contaminação por organoclorados na biota ribeirinha do rio devido ao uso destas substâncias na agricultura (LIU *et al* 2016, ROBINSON *et al* 2016 ).

A absorção dos organoclorados ocorre principalmente por via oral, onde posteriormente permeiam acessivelmente as membranas, transportados através do sangue para os outros compartimentos do corpo. O metabolismo se caracteriza por ser hepático e a excreção renal (AMARAL *et al*, 2015).

Os organoclorados foram proibidos no Brasil em 1985, com a publicação da portaria número 329, de 02 de setembro de 1985. (BRASIL, 1985) No período anterior à proibição, os organoclorados eram utilizados como pesticidas nas lavouras com o intuito de protegê-las contra agentes nocivos, a fim de garantir a produtividade nas produções agrícolas (CIRCUNVIS, 2010).

No estado do Mato Grosso do Sul foi realizado um estudo da presença e concentração de organoclorados no leite pasteurizado, onde se encontrou 90% de amostras contendo resíduos destas substâncias em um total de 100 amostras.

A estrutura química dos organoclorados focos deste estudo segue abaixo conforme Figura 1.



**Figura 1:** Estrutura química de organoclorados focos deste estudo (HAULER *et al*, 2014, LAGO, 2006, NOVAK & KOVAC, 2011, NOVOTNÝ, 2009, SHI *et al*, 2016, YOGUI, 2002).

### 3.4 Bifenilas Policloradas

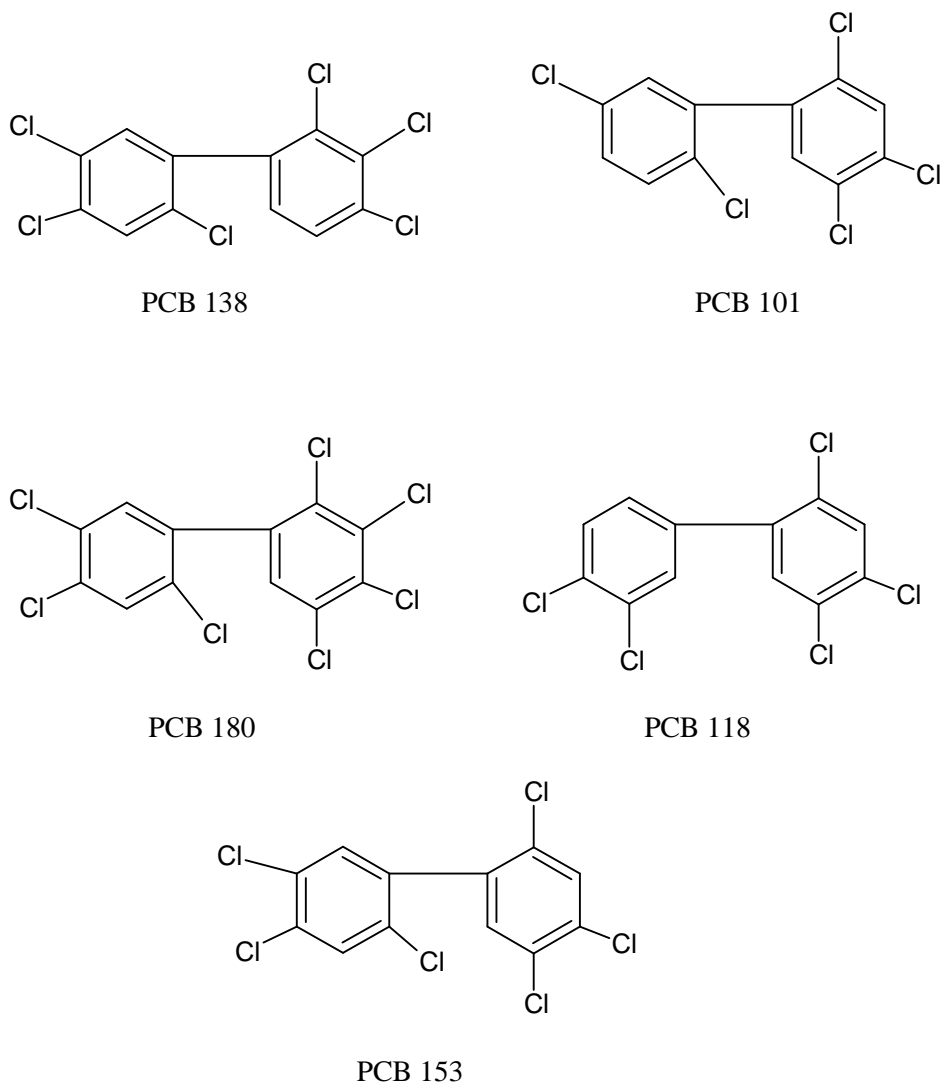
As bifenilas policloradas (PCBs) se caracterizam por ser uma classe de compostos orgânicos que tem uma estabilidade alta. Este tipo de compostos se caracteriza pela difícil eliminação (SANATCUMAR, 2014).

As PCBs foram muito utilizadas nas indústrias, em óleos e lubrificantes para equipamentos, e em capacitores e transformadores. A contaminação ambiental começou a ocorrer após a inutilização destes equipamentos e aparelhos contendo PCBs, que acabaram permanecendo nos ecossistemas globais devido ao descarte, contaminando assim, lençóis freáticos, solos, ar e conseqüentemente os alimentos (GEVAO *et al*, 2017, MOHR & COSTABEBER, 2012).

Nos Estados Unidos os PCBs tiveram sua utilização interrompida no ano de 1977. No Brasil a proibição ocorreu após a publicação da Portaria Interministerial 19, de 29 de janeiro de 1981 (MOHR & COSTABEBER, 2012). A contaminação ainda está presente no ecossistema global pelo uso indiscriminado antes destes compostos serem proibidos, causando malefícios à saúde dos humanos, ainda pela característica de persistência nos tecidos corporais (ZHENG *et al*, 2016).

Pesquisas apontam que não se tem um controle da quantidade dos PCBs nos países que estão em desenvolvimento, devido não se ter este tipo de substância em estoque nos países. Dados destas pesquisas relatam que a concentração maior está presente em áreas urbanas, pelo fato da utilização primária que acabou permanecendo nestes locais. No Kuwait foi realizado um estudo para identificar as concentrações presentes na atmosfera, que confirmou um aumento em áreas urbanas. O estudo sugere que pode servir de base para investigação em todo território global (GEVAO *et al*, 2017).

A estrutura química das bifenilas policloradas investigadas neste estudo seguem abaixo conforme Figura 2.



**Figura 2:** Estrutura química de bifenilas policloradas foco deste estudo (HAULER *et al*, 2014, LAGO, 2006, NOVAK & KOVAC, 2011, NOVOTNÝ, 2009, SHI *et al*, 2016, YOGUI, 2002).

### 3.5 Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) consiste em uma ferramenta que garante a qualidade para os sistemas de produção em todas as suas cadeias produtivas. O objetivo deste plano é promover uma melhora na qualidade e produtividade dos alimentos de procedência animal, assegurando os limites máximos de resíduos em substâncias de uso permitido e qualquer presença de resíduo de compostos proibidos no Brasil. Este plano é



dividido em controle de resíduos em alimentos de origem animal e controle de resíduos em alimentos de origem vegetal (BANDINI & SPISSO, 2017, BRASIL, 1999).

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) em produtos de origem animal enfatiza que os resíduos de organoclorados são objeto de investigação neste âmbito. A maior parte dos organoclorados obteve sua utilização proibida desde 1971 (BRASIL, 1999).

Vários países trabalham há muitos anos em programas de monitoramento ambiental para detecção de resíduos organoclorados. Este fato teve sua iniciativa baseada na verificação em que as áreas próximas ao Oceano Ártico continham indícios de depósito de organoclorados, prejudicando assim a população que vivia nestes locais. (POLDER *et al*, 2003). O governo dos Estados Unidos aponta que 60% de amostras testadas de vegetais orgânicos apresentaram contaminação por organoclorados, mesmo que estes já não estejam mais no mercado há 20 anos. Estudos também demonstram que a contaminação ambiental é um dos maiores motivos da contaminação de alimentos como queijo, carne e peixe. (AMENDOLA *et al*, 2015, BENBROOK, 2002).

Dados provenientes de fiscalizações por agências de fiscalização sanitárias apontam o mel como também predisposto à exposição a pesticidas organoclorados e bifenilas policloradas, onde o uso é justificado para manter a proteção dos enxames, e ainda existe a possibilidade que estas substâncias podem ser trazidas pelas abelhas até as colmeias (BANDINI & SPISSO, 2017).

O MAPA adota os Limites Máximos já internalizados pela ANVISA e para o caso da inexistência de limites, são utilizadas referências como MERCOSUL, Codex Alimentarius, Diretivas da União Europeia ou FDA/USA. Para o controle dos resíduos, o PNCRC utiliza subprogramas de monitoramento e investigação que verificam através de inspeções e análises laboratoriais, a

presença de compostos organoclorados em produtos de origem animal (BRASIL, 1999, BRASIL, 2015).

Na Tabela 1 estão demonstrados os valores de LMR (limite máximo de resíduo) dos OCs e PCBs objetos deste estudo definidos internamente pelo MAPA.

**Tabela 1:** Valores de LMR dos OCs e PCBs

<b>ORGANOCLORADOS (OCS)</b>	<b>LMR (ng/mL)</b>
Gama HCH	10
Alfa HCH	4
Hexaclorobenzeno	10
Aldrin	6
Dieldrin	6
Mirex	10
Heptacloro	6
Heptacloroepoxido	6
Trans-clordane	2
PP-DDE	20
OP-DDT	20
PP-DDT	20
<b>BIFENILAS POLICLORADAS (PCBs)</b>	<b>LMR (ng/mL)</b>
PCB 101	40
PCB 118	40
PCB 153	40
PCB 138	40
PCB 180	40

### 3.6 Metodologias

#### 3.6.1 Extração e purificação

As análises de determinação de resíduos em matrizes alimentares podem sofrer interferências nos resultados, pela ampla quantidade de substâncias que podem ser extraídas juntamente com o analito. Uma metodologia de análise para

determinação de pesticidas deve assegurar que os resultados sejam adequados em termos de precisão e exatidão, com limites de detecção baixos o suficiente para atendimento do propósito pretendido, para o maior número possível de compostos de interesse. Estudos demonstram que para extração de pesticidas podem ser utilizados vários métodos de extração dentre eles destacam-se a partição líquido-líquido, cromatografia de permeação em gel (GPC), extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME). Na preparação de amostras a tendência é a redução do volume de solvente utilizado, o que não impacta na eficiência de extração do analito, mas ao contrário disso, promove um aperfeiçoamento desta eficiência (LEDOUX, 2011, WILKOWSKA & BIZUIK, 2011).

O método de QuEChERS é um método prático para extração e clean-up de pesticidas em amostras complexas, que conforme demonstram os estudos foi sendo utilizado na extração dos pesticidas em alimentos. Este método se caracteriza por otimizar a rotina de laboratórios, por ser um método que possibilita a extração e clean-up de várias amostras ao mesmo tempo (ANASTASSIADES *et al*, 2003).

Desde a introdução do método por Anastassiades em 2003, o método de QuEChERS vem sendo muito utilizado em laboratórios nacionais e internacionais, com alterações de solventes e soluções para melhor desempenho nas extrações. Estudos apontam que este método foi utilizado para extração de pesticidas em vegetais e frutas, e mostrou ser adequado e eficiente para identificação de vinte inseticidas presentes nestes alimentos (DUBEY *et al*, 2018). Na extração do método de QuEChERS é utilizada a Amina Primária Secundária (PSA), que é mais amplamente utilizada para detecção de resíduos de pesticidas em alimentos, por ser responsável pela remoção de compostos polares (MU *et al*, 2016).

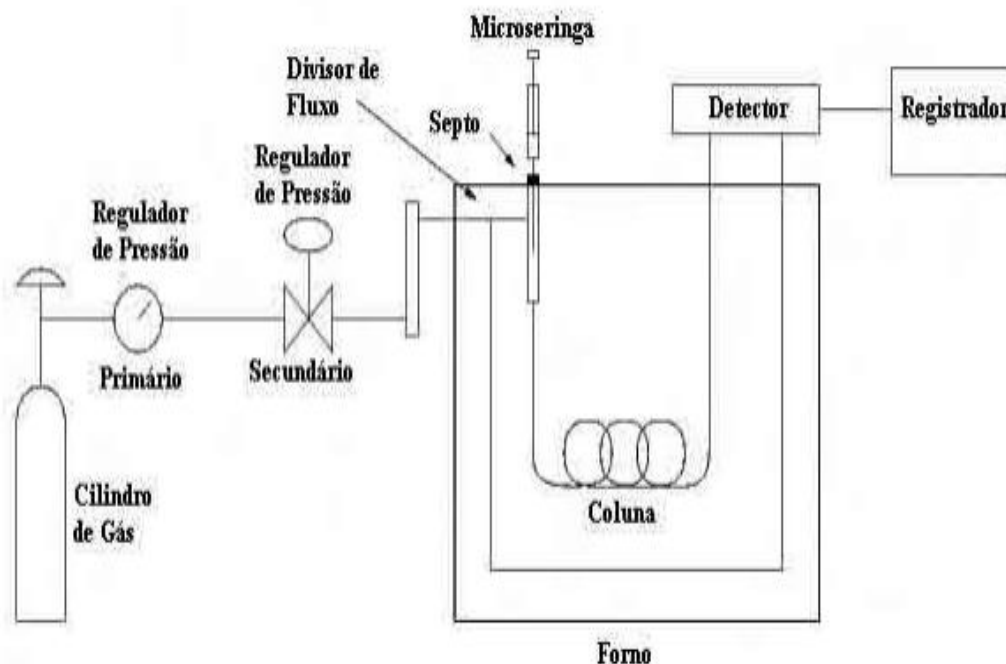
A purificação a baixas temperaturas tem a finalidade de auxiliar na extração, com o congelamento da amostra, eliminando interferentes, facilitando

assim, a extração de substâncias de interesse (BARBOSA *et al*, 2014). Durante a fase de congelamento ocorre o congelamento da gordura e as substâncias de interesse devem permanecer na solução (BODAI *et al*, 2014). A limpeza realizada no método de QuEChERS associada à purificação a baixas temperaturas facilita a precipitação de gorduras. (LEHOTAY *et al*, 2010)

### 3.6.2 Detecção e Quantificação

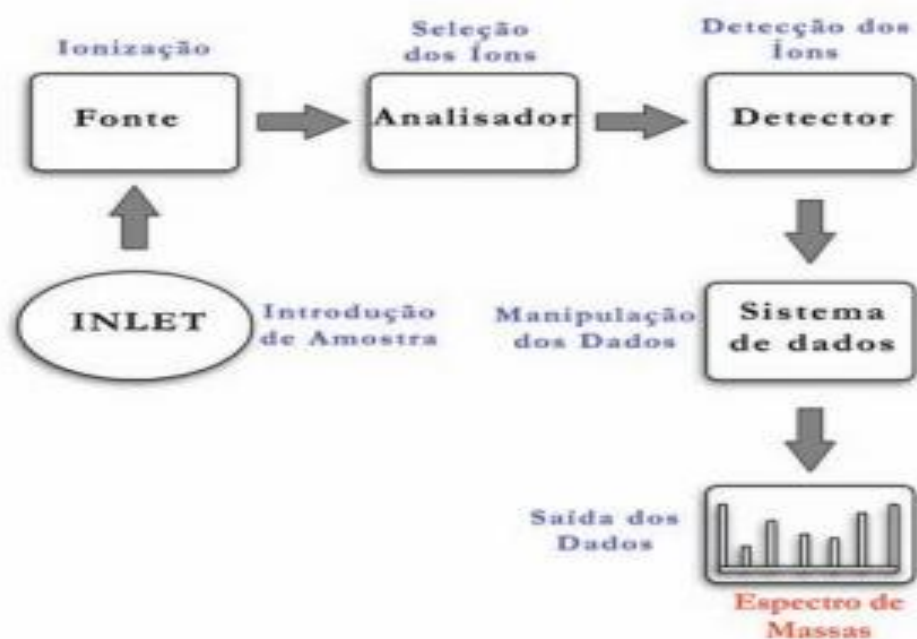
A cromatografia a gás (GC) e a cromatografia líquida (LC) são os métodos mais comumente utilizados para separação de pesticidas. O método de escolha para identificação e quantificação baseia-se nas características físico-químicas dos compostos de interesse. Estudos na investigação de pesticidas em produtos cárneos, produtos lácteos, ovos e peixes confirmam que atualmente os métodos de identificação e quantificação aplicados preferencialmente nas pesquisas destes compostos citam as técnicas de GC e LC acopladas à espectrometria de massas (MS) e espectrometria de massas em tandem (MS/MS) sendo as mais aconselháveis (LEDOUX, 2011). Testes comprovam que a técnica da Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas em modo Tandem (GC-MS/MS) permite uma maior sensibilidade e menor possibilidade de resultados falsos positivos. (CHUNG & CHEN, 2011)

A cromatografia gasosa tem como vantagens a sua sensibilidade, e torna-se conveniente para avaliações quantitativas. Na cromatografia gasosa, conforme Figura 3, gás atua como carreador através da coluna. A vazão do gás de arraste deve ser ajustada durante os procedimentos de otimização da metodologia analítica. A amostra é injetada no septo e posteriormente passa pela coluna, onde sofre uma separação seguindo-se a detecção. (COLLINS, 1997)



**Figura 3:** Diagrama esquemático de um cromatógrafo a gás. Adaptado de (COLLINS, 1997)

O funcionamento de um espectrômetro de massas segue conforme a Figura 4, onde a amostra deve ser introduzida em um local de entrada da amostra (Inlet), na sequência passa por uma fonte de íons, e posteriormente sofre uma seleção de íons no analisador. Assim os íons passam pelo sistema de detecção e após podem ser detectados e quantificados através de um sistema de dados no computador. (LANÇAS, 2009, WILSON e WALKER, 2010)



**Figura 4:** Esquema das principais partes de um Espectrômetro de Massas. (LANÇAS, 2009)

A técnica GC-MS/MS permite a quantificação de todos os analitos detectados. A combinação da cromatografia a gás com a espectrometria de massas, exerce uma alta resolução e proporciona dados precisos para identificação e quantificação de cada uma das substâncias separadamente. Nesta técnica ocorre a ionização por impacto de elétrons, onde é preservado o íon molecular e outros fragmentos de peso molecular elevado. Esta técnica é uma ferramenta importante para identificação de compostos que ainda não são conhecidos, e auxilia também na definição da estrutura molecular (HOLLER *et al*, 2009, LANÇAS, 2008, LANÇAS, 2009, STASHENKO, 2011).

A escolha da técnica GC-MS/MS de acordo com relatos de estudos é a técnica mais adequada para se detectar substâncias na área da toxicologia, pois ela permite através do detector (MS/MS) no sistema cromatográfico, tornar o método mais seletivo, quando se pretende trabalhar com baixas concentrações e matrizes distintas (TRUTA *et al*, 2016). A técnica vem sendo utilizada em

estudos de pesticidas em alimentos para detecção dos limites de resíduos presentes (CHANG *et al*, 2016).

### **3.7 Validação**

A validação de um método é considerada de suma importância para verificar se os resultados das análises são confiáveis, e se o método é adequado para a finalidade pretendida, antes de ser utilizado. (BROCH & HADDAD, 2014)

Os principais parâmetros avaliados em uma validação de resíduos em matrizes de alimentos são especificidade, linearidade, repetitividade, recuperação, precisão intermediária, exatidão, limite de detecção e quantificação, limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e a capacidade de detecção ( $CC\beta$ ). (BRASIL, 2003, COMISSÃO EUROPEIA, 2002)

Para se avaliar o desempenho de um método, deve ser determinada a veracidade e precisão, onde a curva de padrão deve apresentar pelo menos cinco níveis de concentração (MAPA/ACS, 2011).

#### **3.7.1 Especificidade/Seletividade**

A especificidade e seletividade são parâmetros com o intuito de verificar se existem interferentes de substâncias distintas que podem de alguma forma interferir na medição do método estudado. (COMISSÃO EUROPEIA, 2002)

#### **3.7.2 Linearidade**

A linearidade é avaliada considerando a curva de padrão, onde os resultados devem ter uma proporção conforme aumento da concentração do analito. A curva de calibração que resulta em uma reta significa que a sensibilidade se manteve constante ao longo da análise. Valores de coeficientes de determinação ( $R^2$ ) iguais ou superiores a 0,9 são aceitáveis. (MAPA, 2011)

### 3.7.3 Repetitividade e Reprodutibilidade

A repetitividade é a conformidade dos resultados de medições seguidas uma após a outra, onde deve se manter as mesmas circunstâncias de análise. Pode ser considerada como a precisão intra dia que deve obter resultados menores que 20%. Na repetitividade utilizam-se matrizes brancas que foram fortificadas com o composto objeto do estudo em três níveis de concentração, sendo eles 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o LMR (limite máximo de resíduo). (MAPA, 2011)

Na reprodutibilidade o desempenho do método pode ser avaliado através da precisão intermediária, mas com algumas alterações como, por exemplo, analista diferente, dias diferentes de análise, ou até mesmo sob diferentes condições ambientais. Deve ser avaliado o coeficiente de variação para o nível de concentração das amostras que foram fortificadas. (MAPA, 2011)

A precisão intermediária leva em consideração a repetitividade e a reprodutibilidade. Neste parâmetro, deve ser considerado o desvio padrão. Para análise devem ser utilizadas amostras brancas fortificadas em três níveis centrais, onde se devem analisar no mínimo seis réplicas individuais. A etapa deve ser repetida em mais dois dias diferentes. (MAPA, 2011, COMISSÃO EUROPEIA, 2002)

### 3.7.4 Recuperação

A recuperação equivale ao percentual do analito recuperado durante o processamento das análises, ou seja, que permanece na amostra sem ser extraído durante a marcha analítica. Nos casos em que são realizadas fortificações em uma matriz branca, o cálculo do fator de recuperação deve ser realizado conforme equação (COMISSÃO EUROPEIA, 2002, MAPA, 2011):

Equação 1:

$$f_{rec} = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{ad}} \times 100$$



$C_f$  = teor medido após a fortificação da matriz branca

$C_{nf}$  = teor medido na matriz branca não fortificada, antes da fortificação

$C_{ad}$  = teor do analito puro adicionado à matriz branca

### **3.7.5 Exatidão**

A exatidão pode ser considerada como sendo a conformidade de um valor real em comparação ao estabelecido pelo processo analítico. Os fatores determinantes são a veracidade e precisão (COMISSÃO EUROPEIA, 2002).

A veracidade é determinada através da concentração média que foi detectada e corrigida pela recuperação, multiplicado por 100 e dividido pelo valor certificado. É declarada como o desvio sistemático, e o grau de aceite entre vários resultados de uma série e um resultado de referência aprovado (COMISSÃO EUROPEIA, 2002).

Para a avaliação da precisão é considerado o valor de desvio padrão resultante do ensaio, onde defini-se como o grau de aprovação entre valores resultante de ensaios individuais em condições já anteriormente estabelecidas (COMISSÃO EUROPEIA, 2002).

### **3.7.6 Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)**

O limite de detecção e quantificação corresponde à menor quantidade em que o método está apto a, respectivamente, identificar e quantificar o analito. (MAPA, 2011, COMISSÃO EUROPEIA, 2002)

### **3.7.7 Limites de Decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ )**

Os limites de Decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ ) avaliam o comportamento do método analítico. Não existem critérios estabelecidos para os valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ , mas o que pode ser considerado como  $CC\alpha$  é a incerteza de medição no LMR. (COMISSÃO EUROPEIA, 2002, MAPA, 2011)

Através do Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ) é possível detectar uma amostra não conforme contendo uma probabilidade de erro  $\alpha$ . (COMISSÃO EUROPEIA, 2002) Na concentração zero o  $CC\alpha$  pode ser considerado o limite de detecção. (MAPA, 2011)

Segundo a Decisão da Comissão 2002/657/CE, a Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ ) é uma quantidade mínima que pode ser detectada com uma probabilidade de erro  $\beta$ , que equivale ao Limite de Decisão adicionado a 1,64, multiplicado pelo desvio padrão que corresponde à reprodutibilidade.

Os analitos que já tem definição de LMR resultam em valores superiores ao LMR para o  $CC\alpha$  e  $CC\beta$ , portanto estes valores devem ser superiores ao LMR. (MAPA, 2011)





#### 4.1 Padrões

Padrões dos pesticidas Gama-HCH, Alfa-HCH, Hexaclorobenzeno, Aldrin, Heptacloroepoxido, Dieldrin, Mirex, Heptacloro, OP-DDT, PP-DDE, PP-DDT, e PCB118 (em solução) foram da marca Dr. Ehrenstorfer GmbH. O padrão Trans-clordane (Supelco Analytical) e PCB101, PCB153, PCB138 e PCB180 (um mix em solução da marca Fluka). De acordo com a pureza dos padrões sólidos foi feita a correção das massas, de modo a pesar quantidade correspondente a 10 mg, se a pureza fosse 100%, que foi diluída em 10mL de Hexano para uma concentração final de  $1\text{mg mL}^{-1}$ . A solução de fortificação foi preparada a partir das soluções estoque, a fim de se utilizar esta solução para as curvas de padrão. Após fortificação, os analitos apresentaram as concentrações demonstradas na Tabela 2 na solução de fortificação.

**Tabela 2:** Concentração dos analitos na solução de fortificação

<b>Analito</b>	<b>Concentração (ng mL<sup>-1</sup>)</b>
Gama HCH	10
Alfa HCH	4
Hexaclorobenzeno	10
Aldrin	6
Heptacloroepoxido	6
Trans-clordane	2
Dieldrin	6
Mirex	10
Heptacloro	6
OP-DDT	20
PP-DDE	20
PP-DDT	20
PCB 118	40
PCB 101	40
PCB 153	40
PCB 138	40
PCB 180	40

As soluções de estoque e fortificação permaneceram armazenadas em freezer a -20°C.

#### 4.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: Hexano (Tedia95%); Acetonitrila (Merck 99,9%); Sulfato de Magnésio Anidro (Vetec); Cloreto de Sódio (Cromoline) e Amina Primária/Secundária (PSA) da marca Varian.

#### 4.3 Amostras

A quantidade de leite cru utilizada foi de 2,0 mL para cada amostra. O leite cru utilizado foi disponibilizado pelo LANAGRO.

As amostras foram fortificadas com a solução de fortificação de pesticidas organoclorados (OCPs), PCB 118 e mix de bifenilas policloradas (PCBs) assumindo a concentração conforme nível de validação adotado, demonstrado na Tabela 3. Para se manter a estabilidade dos analitos na solução de fortificação, esta foi armazenada em freezer a -20°C.

**Tabela 3:** Concentrações das amostras de acordo com o nível de validação adotado, conforme a Decisão da Comissão 2002/657/CE.

OCPs PCBs	0,25 LMR (ng/mL)	0,5 LMR (ng/mL)	1 LMR (ng/mL)	1,5 LMR (ng/mL)	2 LMR (ng/mL)
Gama HCH	2,5	5	10	15	20
Alfa HCH	1	2	4	6	8
Hexaclorobenzeno	2,5	5	10	15	20
Aldrin	1,5	3	6	9	12
Heptacloroepoxido	1,5	3	6	9	12
Cisclordane	0,5	1	2	3	4
Dieldrin	1,5	3	6	9	12
Mirex	2,5	5	10	15	20
Heptacloro	1,5	3	6	9	12

OP-DDT	5	10	20	30	40
PP-DDE	5	10	20	30	40
PP-DDT	5	10	20	30	40
PCB 118	10	20	40	60	80
PCB 101	10	20	40	60	80
PCB 153	10	20	40	60	80
PCB 138	10	20	40	60	80
PCB 180	10	20	40	60	80

#### 4.4 Extração

A extração seguiu conforme o método de QuEChERS concomitante com algumas modificações. O método de QuEChERS vem mostrando ser o método de extração mais eficaz para extração de pesticidas em alimentos, conforme apontam vários estudos de investigação neste tipo de substâncias. Dentre as alterações significativas realizadas na extração do método em comparação com o método original, pode se citar a redução da quantidade de amostra e consequentemente de solvente acetonitrila, e etapa de purificação a baixas temperaturas onde a amostra foi colocada no freezer por 40 minutos, com o intuito de facilitar a extração das substâncias de interesse com o congelamento da gordura. (BODAI *et al*, 2014, DUBEY *et al* 2018).

Na extração transferiram-se 2,0 mL de leite cru para tubo de centrífuga do tipo Falcon de 50 mL. Fortificou-se com a solução de fortificação de organoclorados, PCB118 e mix de PCBs. Agitou-se em Vortex por 5 segundos. Deixou-se em repouso por 10 minutos. Adicionaram-se 5,0 mL de Acetonitrila. Agitou-se em mesa agitadora (Thermo MaxQ 3000) durante 20 minutos. Pesaram-se 4,0 g de MgSO<sub>4</sub> e 1,0 g de NaCl em tubo de centrífuga de 50 mL. Esta pesagem foi adicionada ao tubo contendo a amostra e logo em seguida, agitou-se em agitador tipo Vortex por 20 segundos. Centrifugou-se em centrífuga (Thermo Scientific) a 4000 rpm por 10 min em temperatura de 21°C. Para limpeza, transferiu-se todo o sobrenadante para tubo de centrífuga de 15 mL. Colocou-se no freezer por 40 minutos. Centrifugou-se a 4000 rpm por 10 min em

temperatura de 5°C. Pesaram-se 0,15 g de MgSO<sub>4</sub> e 0,025 g de PSA em um tubo de centrífuga de 50 mL. Transferiu-se o conteúdo dos tubos centrifugados para os tubos com as pesagens de MgSO<sub>4</sub> e PSA. Agitou-se em Vortex por 20 segundos. Centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos em temperatura de 10°C. Transferiu-se o sobrenadante para tubo de centrífuga de 50 mL e levou-se para evaporar no concentrador de amostra (Tecnal, TE-0194) sob a temperatura de 45°C. Retomou-se 1mL de Acetonitrila e agitou-se no agitador tipo Vortex por 20 segundos.

#### **4.5 Análise das amostras por GC-MS/MS**

Após a etapa descrita acima, as amostras foram transferidas para vials a fim de serem inseridas no equipamento GC-MS/MS com Sistema de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (Agilent) utilizando uma coluna CG ZB-5 (5% Phenyl Methyl Silox) para identificação e quantificação de OCPs e PCBs. A corrida foi realizada com um volume de injeção de 3 ul, fluxo de gás Hélio e Nitrogênio de 18,8 mL por minuto.

A temperatura do forno foi programada inicialmente para 60°C. Aos 4 minutos de corrida o forno marcou 150°C. Aos 18 minutos subiu progressivamente para 220°C e 230°C aos 22,33 minutos, chegando a 300°C aos 37,33 minutos totais de corrida. O gradiente de aumento de temperatura é de grande importância para eliminação de componentes voláteis que restaram na amostra (CHEN *et al*, 2017).

#### **4.6 Validação**

O método de validação seguiu conforme a Decisão da Comissão 2002/657/CE, SANCO 2009 e Manual de Garantia da Qualidade Analítica para resíduos e contaminantes em alimentos MAPA, 2011.



Os critérios avaliados incluem a especificidade, linearidade, repetitividade, recuperação, precisão intermediária, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ). Na validação foram testados três lotes. Os lotes de validação foram constituídos por 31 amostras, sendo uma curva de calibração de seis pontos representados pelos níveis equivalentes a 0 LMR, 0,25 LMR, 0,50 LMR, 1 LMR, 1,5LMR e 2 LMR, conforme a Tabela 3, três amostras de TS (*Tissue Standard*) em uma amostra de branco, uma amostra branco, sete amostras fortificadas no nível equivalente a 0,5 x LMR (Tabela 3), sete amostras fortificadas no nível equivalente a 1,0 x LMR (Tabela 3) e sete amostras fortificadas no nível equivalente a 1,5 x LMR (Tabela 3). Este procedimento foi repetido em três dias diferentes, sendo que cada lote testado em um dia diferente.



---

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---



O PNCRC (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem animal) de 2017 auxilia no monitoramento de níveis de pesticidas organoclorados (OCPs) e bifenilas policloradas (PCBs) em alimentos de origem animal como, por exemplo, carnes, leite, mel, ovos e pescado. Este Plano ainda não abrange todos os OCPs e PCBs para possível investigação no leite cru. (BRASIL, 2017)

No Brasil, a definição dos limites máximos de resíduos é estabelecida pelo MAPA, ou no caso de inexistência de definição por parte deste órgão, aplicam-se as definições do MERCOSUL, Codex Alimentarius, Diretivas da União Europeia ou FDA/USA. Para investigação de controle de resíduos, segue-se o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), que assegura que os limites máximos de resíduos de substâncias sejam respeitados. (BRASIL, 1999, BRASIL, 2015)

Considerando que estas substâncias ao longo do tempo podem ser cancerígenas, torna-se importante o desenvolvimento de uma metodologia para triagem e confirmação da presença de OCPs e PCBs em leite (CHAO *et al*, 2006).

Para a extração de multirresíduos em alimentos o método que está sendo mais comumente utilizado é o método de QuEChERS, que se caracteriza por ser um método rápido, prático e, pelo que foi até o momento estudado, se adapta adequadamente com a técnica Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas operando no modo Tandem GC-MS/MS (ANASTASSIADES, *et al*, 2003).

Para auxiliar este monitoramento foi desenvolvida uma metodologia com a finalidade de detectar a presença de OCPs e PCBs no leite cru, e quantificar de acordo com os limites máximos de resíduos permitidos, por intermédio da técnica de GC-MS/MS.

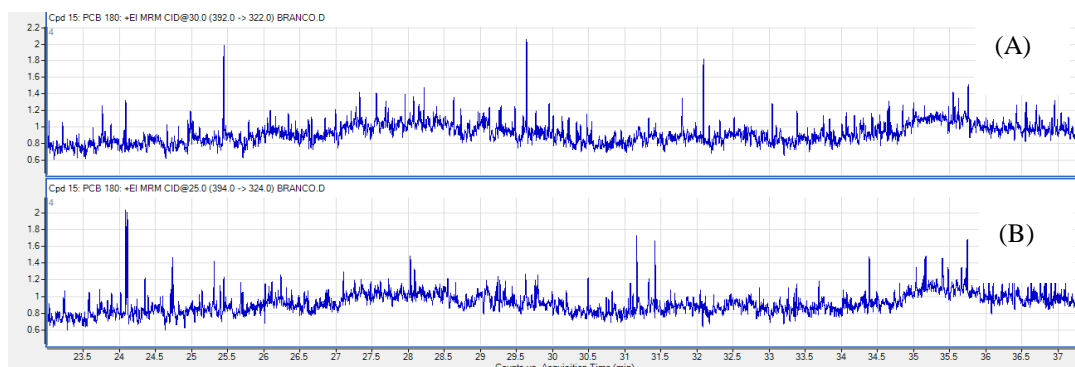
### 5.1 Análise por GC-MS/MS

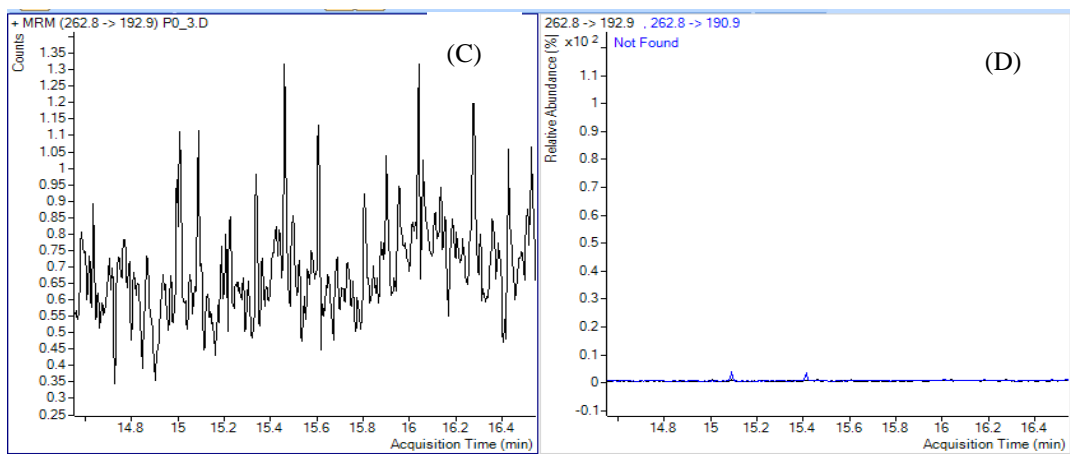
O tempo de corrida foi de 40 minutos, com um tempo de equilíbrio de 0,5 minutos, tornando-se adequado para a verificação dos cromatogramas obtidos.

A análise por GC-MS/MS possibilitou a injeção dos analitos em uma mesma solução, resultando em cromatogramas para cada analito em separado, o que facilita a visualização. Estudos em alimentos já vêm utilizando esta técnica e obtendo êxito quanto à satisfatória sensibilidade no auxílio da identificação e quantificação de resíduos (CHANG *et al.*, 2016).

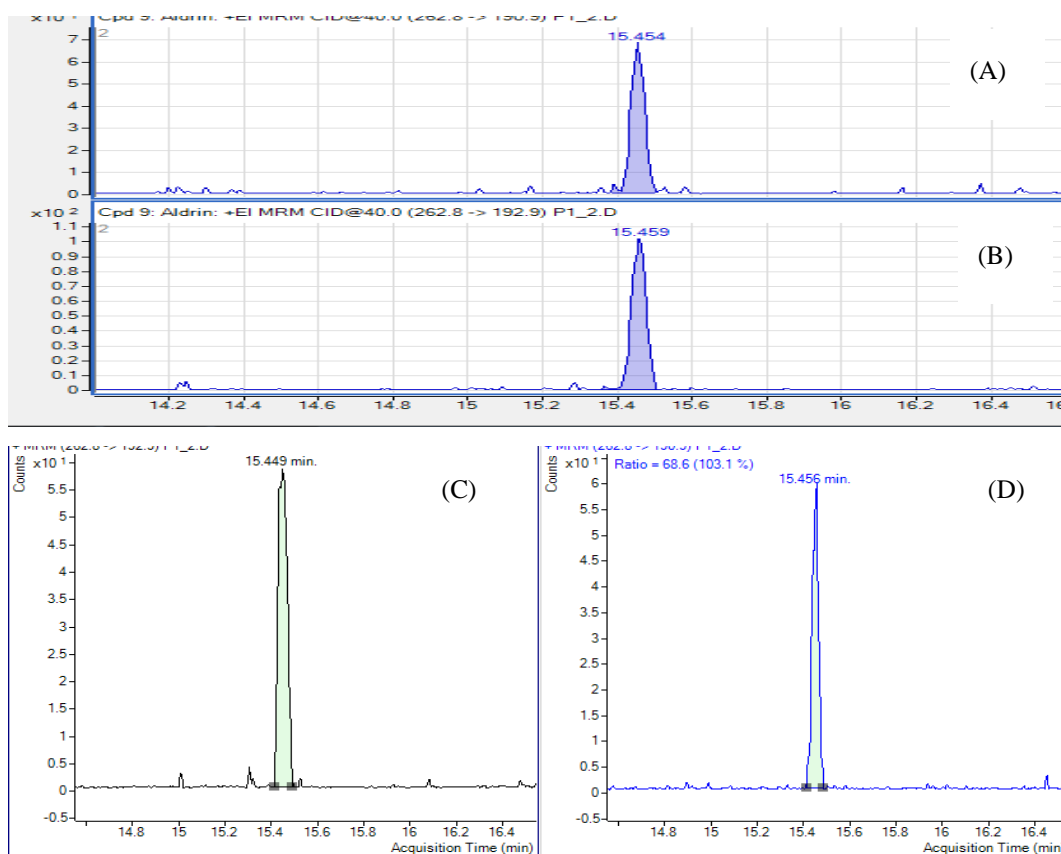
Na Figura 5 está demonstrado o cromatograma obtido para a amostra “branca” onde não houve fortificação. Neste é possível observar a ausência de picos, tanto para o modo de visualização qualitativo A e B, quanto para o modo de visualização quantitativo C e D.

Os cromatogramas obtidos dos pesticidas organoclorados e bifenilas policloradas, onde foram fortificadas as amostras de acordo com o nível de validação equivalente ao LMR, estão demonstrados nas Figuras 6 a 12, onde A e B representam o modo de visualização qualitativa e C e D o modo de visualização quantitativa, onde C representa o fragmento quantitativo e D o fragmento de confirmação. Observa-se que na Figura 10 no cromatograma resultante do método qualitativo, o primeiro pico, de acordo com o tempo de retenção é o pico do analito PCB 153, o qual apresentou tempo de retenção anterior ao analito PCB 138.

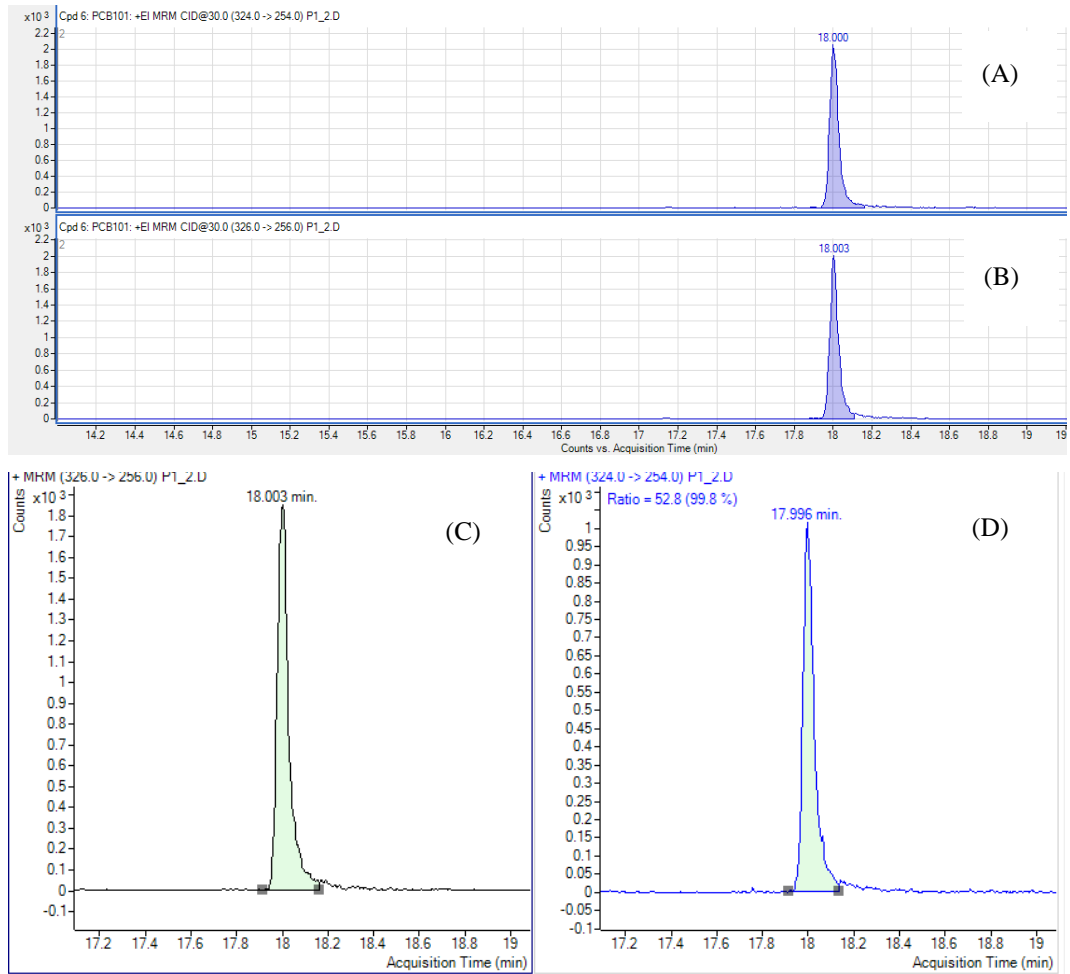




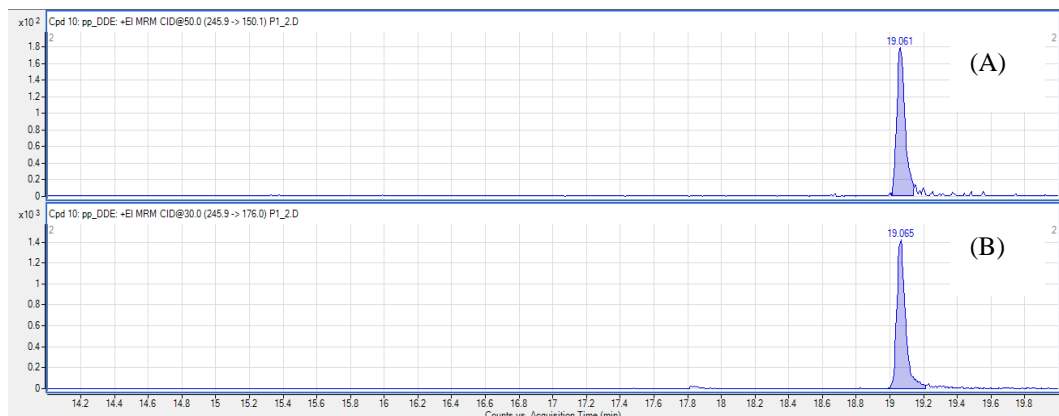
**Figura 5.** Cromatogramas obtidos para as amostras “brancas” para o modo de visualização qualitativo (A e B) e quantitativo (C e D), respectivamente.



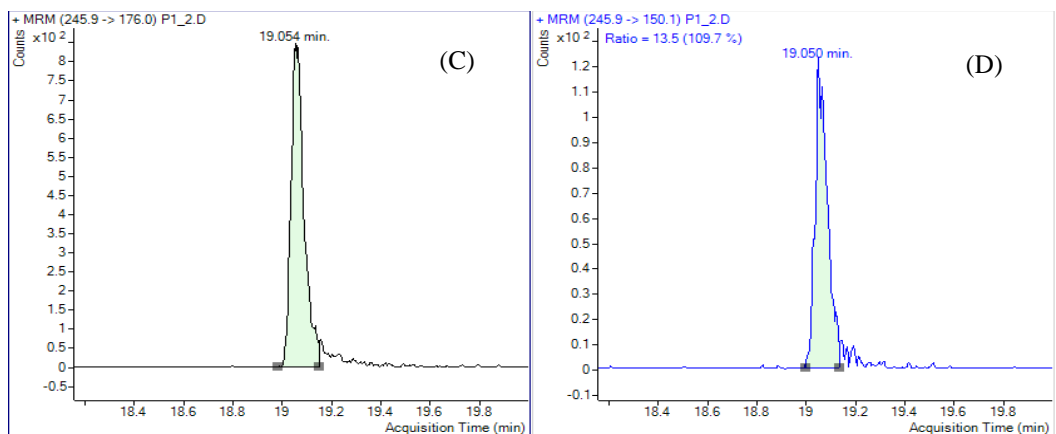
**Figura 6.** Cromatogramas obtidos para o analito Aldrin para o modo de visualização qualitativo (A e B) e quantitativo (C e D), respectivamente.



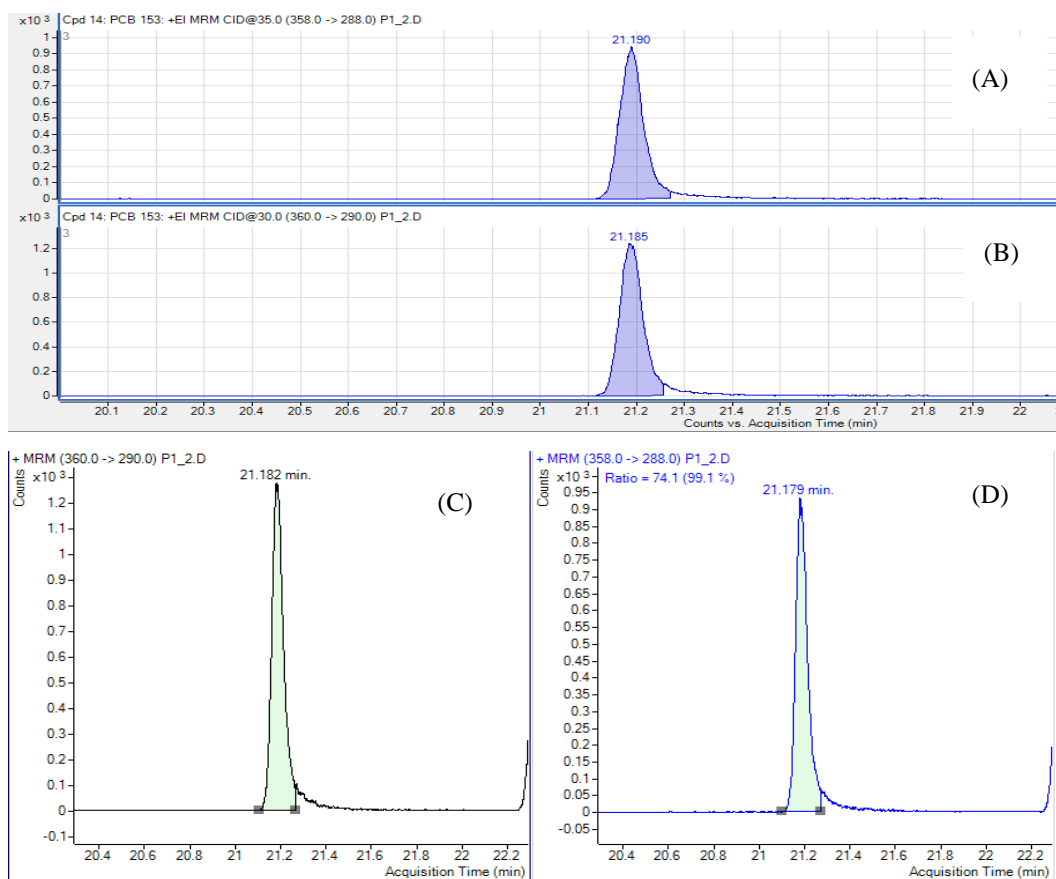
**Figura 7.** Cromatogramas obtidos para o analito PCB 101 para o modo de visualização qualitativo (A e B) e quantitativo (C e D), respectivamente.



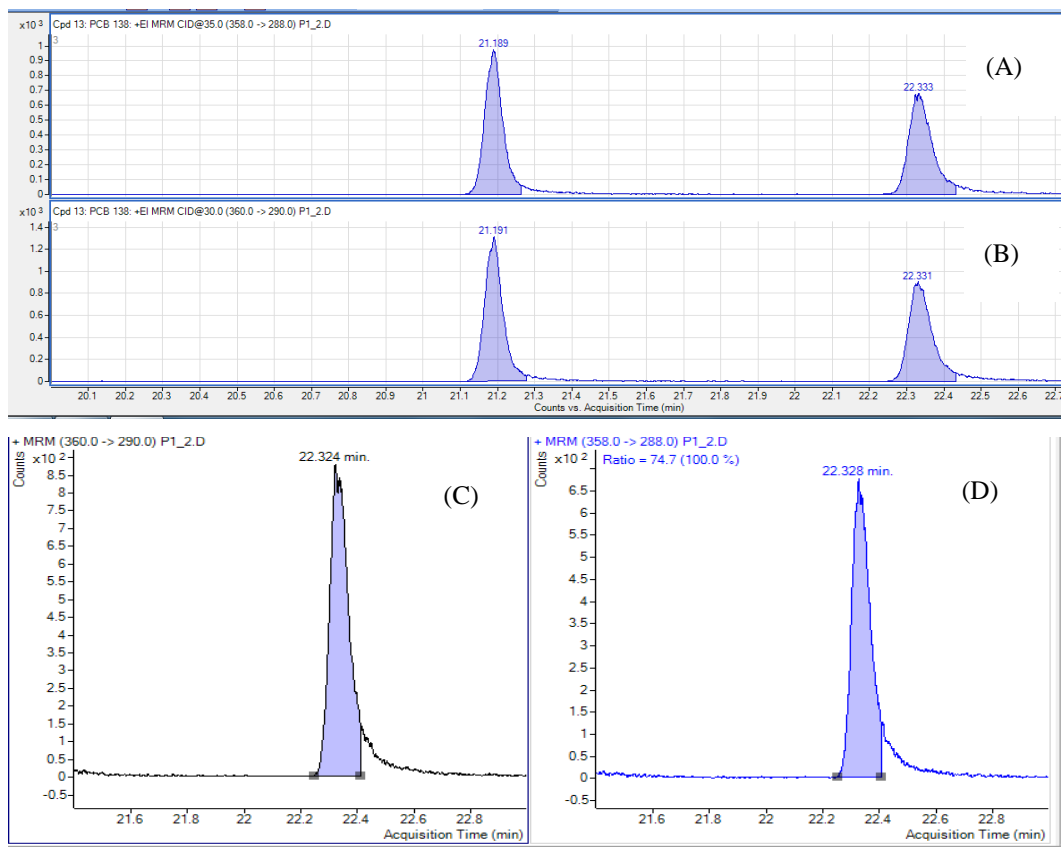




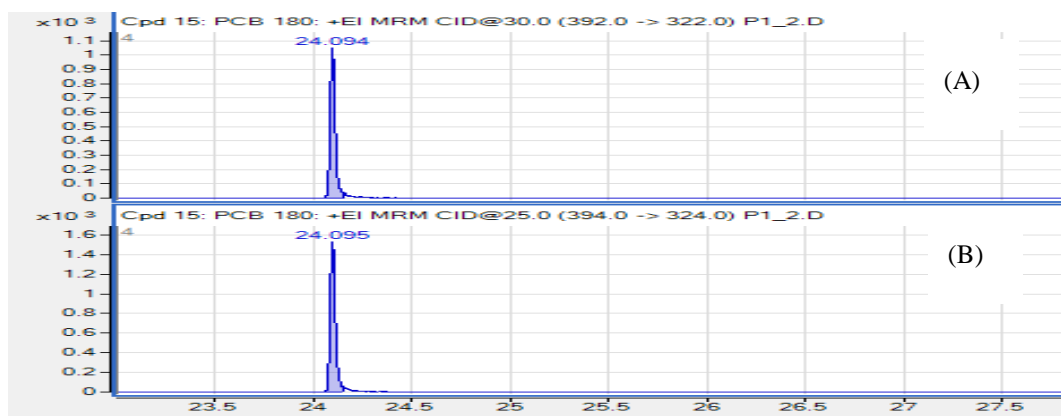
**Figura 8.** Cromatogramas obtidos para o analito PP-DDE para o modo de visualização qualitativo (A e B) e quantitativo (C e D), respectivamente.

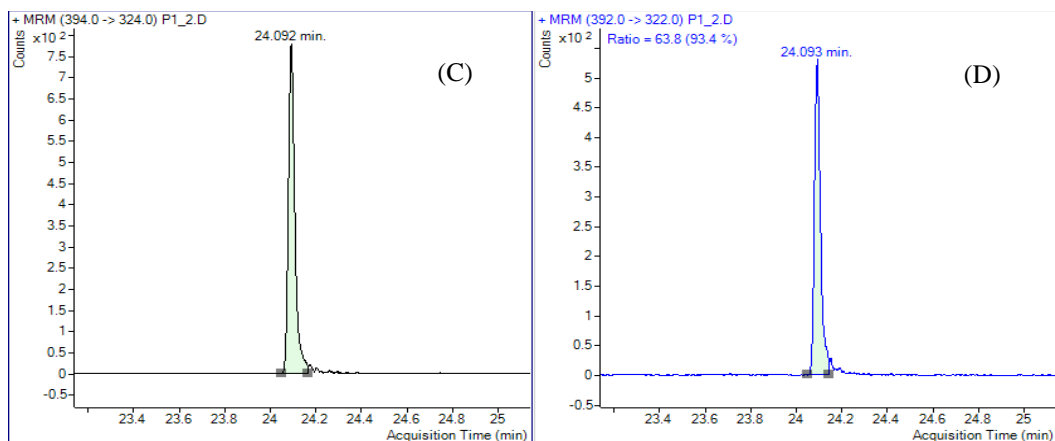


**Figura 9.** Cromatogramas obtidos para o analito PCB 153 para o modo de visualização qualitativo (A e B) e quantitativo (C e D), respectivamente.

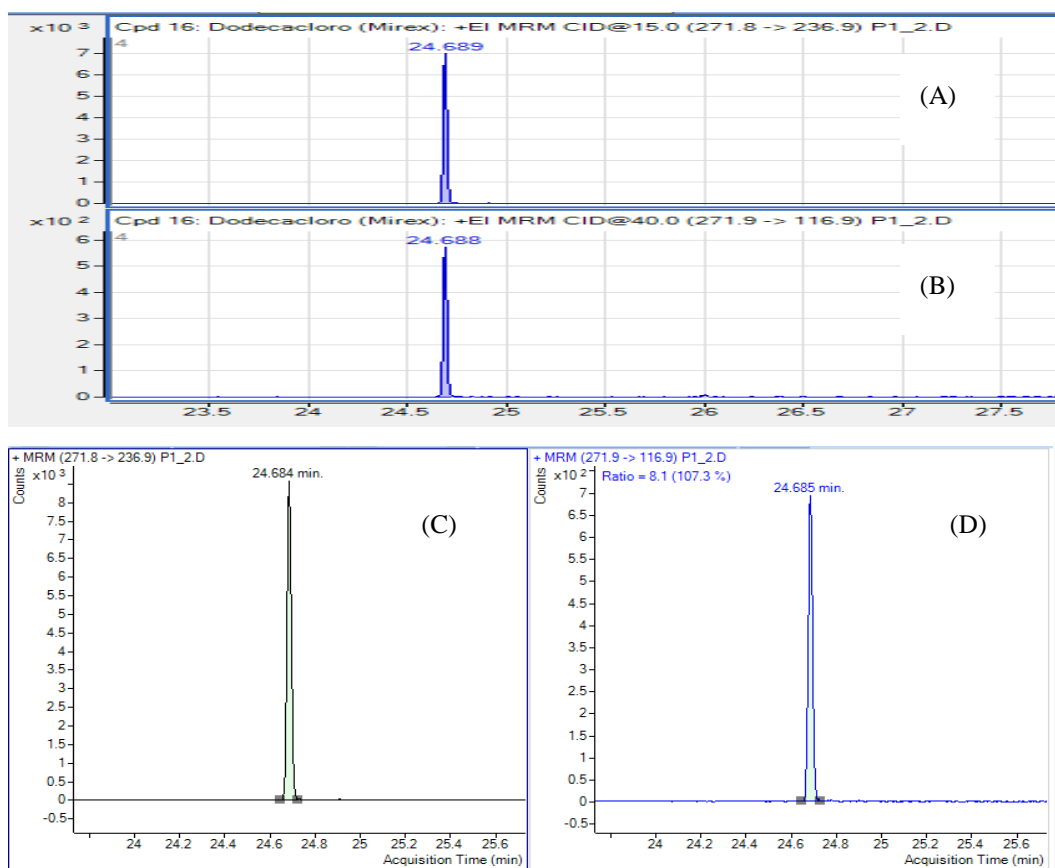


**Figura 10.** Cromatogramas obtidos para o analito PCB 138 para o modo de visualização qualitativo (A e B) e quantitativo (C e D), respectivamente. No modo de visualização qualitativo, o PCB 138 é representado pelo segundo pico.





**Figura 11.** Cromatogramas obtidos para o analito PCB 180 para o modo de visualização qualitativo (A e B) e quantitativo (C e D), respectivamente.



**Figura 12:** Cromatogramas obtidos para o analito Mirex para o modo de visualização qualitativo (A e B) e quantitativo (C e D), respectivamente.

Nos cromatogramas obtidos é possível observar a nitidez dos picos dos analitos, o que comprova a sensibilidade do método aos mesmos. Nas pesquisas já anteriormente realizadas demonstram que a sensibilidade da técnica GC-MS/MS tem desempenho satisfatório para investigação de pesticidas. (WU, 2017)

Os tempos de retenção resultantes dos picos cromatográficos variaram entre 15,5 minutos e 24,7 minutos, e os fragmentos resultantes para o product íon obtiveram valores aproximados, com exceção do analito Mirex que resultou em 236,9 e 116,9 para o product íon, isto, pois devido a diferenças de massas decorrentes do padrão isótopo do Cloro no Mirex. As transições MRM monitoradas, incluindo o tempo de retenção para cada analito estão representadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Tempos de retenção e transições MRM para determinação de organoclorados e bifenilas policloradas em leite cru.

<b>Analito</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Precursor Íon (m/z)</b>	<b>Product Íon (mz)</b>
Aldrin	15.5	262.8	192.9 190.9
PCB 101	18.0	326.0 324.0	256.0 254.0
PP-DDE	19.1	245.9	176.0 150.1
PCB 153	21.2	360.0 358.0	290.0 288.0
PCB 138	22.4	360.0 358.0	290.0 288.0
PCB 180	24.1	394.0 392.0	324.0 322.0
Mirex	24.7	271.8 271.9	236.9 116.9

## 5.2 Extração

O método de QuEChERS escolhido para a extração dos pesticidas organoclorados e bifenilas policloradas se mostrou um método de extração eficiente, com satisfatória recuperação, onde houve pequena utilização de solventes.

A extração com o método de QuEChERS possibilita a um único analista executar o método e analisar várias amostras ao mesmo tempo, sendo o método mais aplicado hoje para extração de pesticidas em alimentos, pois é possível extrair pesticidas de polaridades diferentes. (PRESTES *et al*, 2009)

O solvente Acetonitrila escolhido auxiliou satisfatoriamente a extração dos compostos foco deste estudo. Dados provenientes de estudos salientam que a Acetonitrila é um dos solventes de melhor escolha para extração de pesticidas, pois responde satisfatoriamente na recuperação de pesticidas com polaridades distintas. (PRESTES *et al*, 2009, LEHOTAY *et al*, 2005) A técnica de extração pelo método de QuEChERS utilizou no método desenvolvido neste estudo pequena quantidade de solvente acetonitrila no método desenvolvido neste estudo, demonstrando assim economia na utilização do solvente.

Uma das peculiaridades da acetonitrila conforme citado em estudos é que ela extrai resíduos de pesticidas em alimentos com baixa quantidade de lipídios (AMENDOLA *et al*, 2015). Estudos também têm demonstrado que com um teor de 80% de acetonitrila é possível obter boa sensibilidade para o método e a forma dos picos cromatográficos torna-se mais adequada (CHATTERJEE *et al*, 2017).

Com a adição de sais como NaCl promove-se o *salting out*, que dá uma melhoria na recuperação de analitos polares, mantendo o extrato da amostra sem diluir e as fases orgânicas e aquosas separadamente. O MgSO<sub>4</sub> foi utilizado com a finalidade de remover água e também esta substância favorece a extração de compostos apolares (PRESTES *et al*, 2011).

A utilização do PSA na extração foi responsável pela etapa de clean up, com o intuito de reter interferentes presentes na matriz, podendo ser ácidos

graxos ou outros componentes polares, e assim garantir uma limpeza efetiva evitando a contaminação da coluna e do sistema de cromatográfico (PRESTES, 2011).

### 5.3 Procedimento de Validação

#### 5.3.1 Linearidade

A avaliação da linearidade foi estabelecida construindo curvas de padrão de seis pontos com os analitos em estudo, área absoluta *versus* concentração do analito. As amostras foram testadas em três dias distintos e resultaram em coeficientes de determinação ( $R^2$ ) com valores acima de 0,9 conforme demonstrado na Tabela 5, o que demonstra que a reta obtida é adequada. (MAPA, 2011)

**Tabela 5.** Resultados dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ).

<b>Analito</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>
Aldrin	0.99	0.90	0.97
Mirex	0.98	0.93	0.98
PP-DDE	0.98	0.92	0.98
PCB 101	0.99	0.90	0.99
PCB 153	0.99	0.91	0.99
PCB 138	0.99	0.91	0.99
PCB 180	0.99	0.92	0.99

A resposta das curvas de padrão expressaram linearidade satisfatória, considerando os critérios estabelecidos.

#### 5.3.2 Precisão

A precisão foi considerada adequada avaliando os valores resultantes de desvio padrão, variância e coeficiente de variação, onde pode se constatar que o método é preciso, de acordo com a Tabela 6. Dados encontrados na literatura

preconizam a faixa de até 20% ideal para estes valores, podendo aumentar de acordo com a concentração que está sendo testada. (IMOTO *et al*, 2004, COMISSÃO EUROPEIA, 2002)

Uma investigação de pesticidas realizada em matriz de leite em pó baseada na diretriz da SANCO 2009, relata resultados satisfatórios para a precisão intra e inter dia avaliada em um método que utilizou a técnica GC-MS/MS para quantificação de 30 compostos organoclorados (ZHENG *et al*, 2014).

**Tabela 6.** Resultados para os parâmetros de validação avaliados no método.

Parâmetro de Validação	Veracidade (%)			Precisão Intra Dia (%)			Precisão Inter Dia (%)			Precisão Intermediária (%)		
	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5
Nível (x LMR)												
Analito												
Aldrin	83	107	105	14,3	18,9	14,4	12,4	10,3	12,1	18,9	21,5	18,8
Mirex	90	108	106	17,9	15,3	13,5	1,1	6,3	14,0	17,9	16,6	19,4
PP-DDE	90	111	111	19,1	14,7	13,9	5,1	7,4	6,4	19,8	16,4	15,3
PCB 101	88	103	100	15,8	17,4	13,8	9,3	2,4	5,9	18,3	17,5	15,0
PCB 153	89	104	99	15,2	16,7	12,5	7,6	6,0	8,0	17,0	17,7	14,8
PCB 138	88	104	100	17,0	18,2	13,7	8,0	4,3	6,7	18,7	18,7	15,2
PCB 180	89	104	100	17,4	17,6	13,0	7,2	5,1	6,4	18,8	18,3	14,5

### 5.3.3 Repetitividade e reprodutibilidade

Na avaliação da repetitividade foram utilizados os dados obtidos dos três lotes de validação. Nesta avaliação foi considerado o valor resultante de precisão intra e inter dia que permaneceu abaixo de 20% para todas as amostras testadas, fato considerado adequado segundo a Decisão da Comissão 2002/657/CE. As análises foram realizadas sob condições do mesmo sistema e do mesmo analista.

A reprodutibilidade foi testada sendo um lote de validação avaliado por outro analista em dia distinto, no mesmo equipamento. Para avaliação, foi considerado o coeficiente de variação até 20% no ponto equivalente ao LMR. A

reprodutibilidade foi considerada adequada, conforme se observa na tabela 6, pois os coeficientes de variação resultaram menores que 20%, conforme preconiza a Decisão da Comissão 2002/657/CE.

**Tabela 7.** Resultados da Reprodutibilidade

<b>Analito</b>	<b>Reprodutibilidade (CV %)</b>
Aldrin	12,77
Mirex	19,43
PP-DDE	17,63
PCB 101	19,42
PCB 153	18,38
PCB 138	17,35
PCB 180	19,24

### 5.3.4 Recuperação

Na recuperação, foram avaliadas amostras do tipo *tissue standard* (TS) que foram fortificadas após o processo de extração, em comparação com as amostras fortificadas na matriz anteriormente ao processo de extração. Comparando-se as amostras TS com as amostras extraídas se obtém o valor da recuperação (COMISSÃO EUROPEIA, 2002).

A recuperação foi considerada satisfatória, uma vez que a curva é construída em matriz, sendo a mesma desnecessária para correção dos valores quantificados. A recuperação retomou a concentração nas amostras com matrizes fortificadas com os padrões, demonstrando assim que não houve perda durante todo o processo de extração.

Existem estudos que demonstram que o método de QuEChERS associado à técnica GC-MS/MS já vem sendo utilizado na investigação de pesticidas em ovos e carne de porco, onde resultou em recuperação satisfatória para os pesticidas testados (LICHTMANNEGGER *et al*, 2015).



### **5.3.5 Limite de Detecção e de Quantificação**

O limite de detecção e quantificação foi testado através da confecção de uma curva de calibração de seis pontos, onde foram fortificadas amostras em matriz branca nas concentrações equivalentes aos níveis de validação 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 LMR, em três dias diferentes.

O limite de detecção foi avaliado através da menor concentração detectável no menor ponto da curva de calibração, intitulado como 0,25 LMR do nível de validação adotado.

Para o limite de quantificação foi avaliada a menor concentração quantificável localizada no ponto 0,25 LMR do nível de validação adotado, no que se refere ao ponto mais baixo da curva de padrão. Juntamente a esta avaliação foi observada a veracidade que deve estar entre 70 e 120%, e precisão com variação menor que 20% entre os resultados conforme preconiza a 2002/657/CE.

Os resultados demonstraram atendimento satisfatório para o limite de detecção e limite de quantificação.

### **5.3.6 Exatidão**

A exatidão avaliada através da veracidade foi considerada satisfatória pois os resultados obtidos para precisão foram até 20%. A veracidade foi considerada satisfatória para a maioria dos analitos, visto que permaneceu entre 80 e 110%, com exceção do PP-DDE que resultou em 111%, levemente acima do preconizado (SANCO, 2009).

Os resultados de uma validação de método para piretróides em leite cru bovino demonstrou ser satisfatório quanto à exatidão do método sugerido pela SANCO, onde obtendo variação nos resultados para precisão abaixo de 20% e os valores obtidos para veracidade permaneceram na faixa de 87 a 101% (MENEHINI et al, 2014)

### 5.3.7 Limites de Decisão ( $CC\alpha$ ) e Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ )

O Limite de Decisão ( $CC\alpha$ ) e a Capacidade de Detecção ( $CC\beta$ ) foram estabelecidos analisando-se os dados da curva de calibração dos três dias.

Os valores resultantes para  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  para cada analito seguem conforme Tabela 8. Estes valores podem ser considerados aceitáveis e satisfatórios, pois permaneceram próximos ao LMR estabelecido, que podem ser considerados como valores de incerteza para o método. O  $CC\beta$  mostra que os analitos foram detectados corretamente nos níveis de concentrações estabelecidos.

**Tabela 8.** Valores de  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  para cada analito

<b>Analito</b>	<b><math>CC\alpha</math> (ug/Kg)</b>	<b><math>CC\beta</math> (ug/Kg)</b>	<b>LMR (ug/Kg)</b>
Aldrin	8.2	10.4	6
Mirex	13.5	17.1	10
PP-DDE	30.0	39.9	20
PCB 101	54.1	68.3	40
PCB 153	59.4	78.8	40
PCB 138	53.9	67.8	40
PCB 180	54.0	68.0	40

### 5.3.8 Especificidade e Seletividade

A especificidade e seletividade do método foi avaliada analisando-se 20 amostras de leite brancas com o método de extração proposto e posteriormente confirmação por análise GC-MS/MS para investigar possíveis interferentes. Não encontrou-se nenhum vestígio, presença de picos ou sinal das substâncias analisadas.

O método pode ser considerado seletivo e específico quando houve a fortificação na matriz, comprovando a identificação dos analitos através dos tempos de retenção resultantes do sistema cromatográfico.





A alíquota de 2,0 mL escolhida como quantidade de matriz mostrou ser adequada, reduzindo assim a quantidade de utilização de padrão no preparo da solução de fortificação e quantidade de acetonitrila durante o processo de extração.

O método utilizando a extração de QuEChERS apresentou-se efetivo, rápido e com sensibilidade satisfatória para recuperação simultânea de três organoclorados e quatro bifenilas policloradas foco deste estudo.

A análise cromatográfica por GC-MS/MS apresentou resultados eficientes na separação dos compostos, o que se observou tanto na etapa qualitativa como na quantitativa. Para avaliação qualitativa foi considerado o primeiro lote de validação composto por amostras brancas fortificadas de acordo com a concentração de 0, 25, 50, 100, 150 e 200% equivalentes à concentração do LMR. Para avaliação quantitativa foram considerados os resultados de três lotes.

O método permitiu a análise concomitante de 17 analitos dentre eles organoclorados e bifenilas policloradas. Dentre estes, os que atenderam aos critérios de validação estabelecidos pela Decisão da Comissão 2002/657/CE de 2002 e SANCO 2009, foram Aldrin, Mirex, PP-DDE, PCB101, PCB 138, PCB 153 e PCB 180. A linearidade, precisão, repetitividade, reprodutibilidade, recuperação, limite de detecção e quantificação, exatidão, limite de decisão ( $CC\alpha$ ), capacidade de detecção ( $CC\beta$ ), especificidade e seletividade, foram os critérios de validação avaliados para o método.

Os organoclorados Gama-HCH, Alfa-HCH, Hexaclorobenzeno, Heptacloroepoxido, Transclordane, Dieldrin, Heptacloro, OP-DDT, PP-DDT, e a bifenila policlorada PCB 118 não atingiram os critérios de validação preconizados de acordo com a Decisão da Comissão 2002/657/CE de 2002 e SANCO 2009. Sugere-se a continuidade dos estudos, com mudanças, por exemplo, nas condições cromatográficas, tipo de solventes.

Analisar várias amostras concomitantemente proporciona praticidade para rotinas laboratoriais que trabalham com altas quantidades de amostras diárias. O

método obteve resultados satisfatórios no atendimento aos critérios de validação que são preconizados pela Comissão 2002/657/CE de 2002 e SANCO 2009, e ainda mostrou ser adequado e econômico pelo baixo consumo de reagentes. Este método entrará na rotina de análises do MAPA.

Após ser validado, o método foi aplicado em 20 amostras reais. Estas amostras foram recebidas pelo LANAGRO para análise de rotina do leite cru. Não foi encontrado nenhum dos compostos objeto deste estudo.

O método pode ser considerado prático e eficaz para análise de rotina, pois através dele é possível processar grande quantidade de amostras em menor espaço de tempo, condição ideal para laboratórios de rotina.

---

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---





AMARAL, A. V. C.; ASSIS, P. R.; FRANÇA, F. M., Intoxicação por organoclorado em Tamanduá-Bandeira – Relato de caso, Enciclopédia Biosfera, v. 11 n21, p. 1242, 2015.

AMENDOLA, G., PELOSI, P., BARBINI, D. A., Determination of pesticide residues in animal origin baby foods by gás chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry, v.50, p. 109-120, 2015.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J., Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v. 86, p. 412, 2003.

BANDINI, T. B.; SPISSO, B. F., Risco sanitário do mel no Brasil em relação a novas ameaças: resíduos e contaminantes químicos emergentes, Visa em Debate, v. 5 (1), p. 116-126, 2017.

BARBOSA, E. S.; EVANGELISTA, G. F.; PIMENTA, E. M.; SILVÉRIO, F. O.; PINHO, G. P., Otimização e validação da extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura de HPAS em lodo de esgoto, Química Nova, v.37 (3), p. 404-410, 2014.

BENBROOK, C. M., Organochlorine residues pose surprisingly high dietary risks, Journal Epidemiological Community Health, v. 56, p. 822 - 823, 2002.

BODAI, Z.; SZABO, B. S.; NOVAK, M.; HAMORI, S.; NYIRI, Z.; RIKKER, T.; EKE, Z., Analysis of Potential Migrants from Plastic Materials in Milk by Liquid Chromatography – Mass Spectrometry with Liquid – Liquid Extraction and Low-Temperature Purification, v. 62, p. 10028-10037, 2014.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portaria n° 329, de 02 de setembro de 1985, Proíbe, em todo território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados, destinados à agropecuária, dentre outros. In: Diário Oficial da União, 08 de maio de 1985.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa n° 42 de 20 de dezembro de 1999, Dispõe sobre a alteração do Plano

Nacional de Controle de Resíduos em produtos de origem animal. In: Diário Oficial da União, 22 de dezembro de 1999.

BRASIL, Ministério da Saúde – MS/ANVISA, Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003, Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". In: Diário Oficial da União, 02 de junho de 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº 13 de 15 de julho de 2015, In: Diário Oficial da União, 20 de julho de 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Projeções do Agronegócio, 8ª Edição, Agosto de 2017.

BROCH, S. C.; HADDAD, P. R., Method Validation, Journal of Chromatography A, v. 1353, p. 1 - 1, 2014.

CARNEIRO, P.; KANEENE, J. B., Food inspection services: A comparison of programs in the US and Brazil, Food Control, v. 80, p. 314-318, 2017.

CHANG, Q.; PANG, G.; FAN, C.; CHEN, H.; YANG, F.; LI, J.; WEN, B., High-Throughput Analytical Techniques for the Determination of the Residues of 653 Multiclass Pesticides and Chemical Pollutants in Tea, Part VII: A GC-MS, GC-MS/MS, and LC-MS/MS Study of the Degradation Profiles of Pesticide Residues in Green Tea, Journal of AOAC International, v. 99(6), p. 1619-1628, 2016.

CHAO, H.; WANG, S.; LIN, T.; CHUNG, X., Levels of organochlorine pesticides in human milk from central Taiwan, Chemosphere, v. 62, p. 1774 - 1785, 2006.

CHATTERJEE, N. S.; KUMAR, K. A.; AJEESHKUMAR, K. K.; KUMARI, K. R. R.; VISHNU, K. V.; ANANDAN, R.; MATHEW, S.; RAVISHANKAR, C. N., Screening Natural Content of water-soluble B vitamins in fish: enzymatic extraction, HILIC Separation, and Tandem Mass Spectrometric Determination, v. 100 (3), p. 579-586, 2017.

CHEN, H.; WANG, Y.; CAO, P.; LIU, Y., Effect of temperature on thermal oxidation of palmitic acid studied by combination of EPR spin trapping technique and SPME-GC-MS/MS, *Food Chemistry*, v. 234 p. 439-444, 2017.

CHUNG, S. W. C.; CHEN, B. L. S., Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities, *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 5555 - 5567, 2011.

CIRCUNVIS, B. C., Organochlorines and organophosphate: key characteristics and their potential effects on human health, *Uningá Review*, n. 03, p. 50-61, 2010.

COLLINS, C. H. *et al.* Introdução a métodos cromatográficos. 4. ed., p. 141 - 180, 1997.

COMISSÃO EUROPEIA Decisão da Comissão 2002/657/CE de 12 de Agosto de 2002 Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. In: *Jornal das Comunidades Europeias*, L221:8-36, 2002.

DAIRY, Cows Milk production and consumption: summary for selected countries, Estados Unidos: Department of Agriculture, 2015. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>. Acessado em 05 de maio de 2016.

ELDAKROORY, S.; MORSI, D. E.; ABDEL-RAHMAN, R.; ROSHDY, S.; GOUIDA, M.; KHASHABA, E., Correlation between toxic organochlorine pesticides and breast cancer, *Human & Experimental Toxicology*, v.36 (12), p. 1326-1334, 2017.

DUBEY, J. K.; PATYAL, S. K.; SHARMA, A., Validation of QuEChERS analytical technique for organochlorines and synthetic pyrethroids in fruits and vegetables using GC-ECD, v. 190(4) p. 1-11, 2018.

GALINDO, F.; PORTILHO, F., “O peixe morre pela boca”: Como os consumidores entendem os riscos dos agrotóxicos e dos transgênicos na alimentação, *Sustentabilidade em Debate*, v. 6 (2), p. 73-87, 2015.

GEORGE, J.; SHUKLA, Y., Pesticides and cancer: insights into toxicoproteomic - based findings, *Journal Proteomics*, v. 74 (12), p. 2713 - 2722, 2011.

GEVAO, B.; PORCELLI, M.; RAJAGOPALAN, S.; KRISHNAN, D.; KARELL, M.; ALSHEMMARI, H.; BAHLOUL, M.; ZAFAR, J., Seasonal variations in the atmospheric concentrations of polychlorinated biphenyls in Kuwait, *Chemosphere*, v. 189, p.652-660, 2017.

HAULER, C.; RIMKUS, G.; RISACHEF, C.; KNÖLKER, H.; VETTER, W., Concentrations of halogenated natural products versus PCB 153 in bivalves from the North and Baltic Seas, v. 490, p. 994 – 1001, 2014.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S.R., *Princípios de Análise Instrumental*, 6ª edição, São Paulo: Bookman, 2009.

IBGE, *Produção da pecuária municipal*, v.42, p. 1 - 39, 2014.

JANK, L.; MARTINS, M. T.; ARSAND, J. B.; MOTTA, T. M. C.; FEIJÓ, T. C.; CASTILHOS, T. S.; HOFF, R. B.; BARRETO, F.; PIZZOLATO, T. M, Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Multiclass Method for 46 Antibiotics Residues in Milk and Meat: Development and Validation, *Food Analytical Methods*, v. 10(7), p. 2152 – 2164, 2017.

KAN, C. A.; MEIJER, G. A. L., The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed, *Animal Feed Science and Technology*, v. 133, p. 84 - 108, 2007.

IMOTO, M. N.; FONTOURA, P. S. G.; FREITAS, R. J. S., Validação de método multirresíduo para análise de pesticidas organohalogenados em maçãs, *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 63(2), p. 186-192, 2004.

LAGO, C. F., Organoclorados na população do cetáceo *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) do extremo sul do Brasil, *Monografia*, 2006. Disponível em: <http://botosdalagoa.com.br/arquivos/monografiaD.pdf>. Acessado em 25 de maio de 2016.

LANÇAS, F. M., Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação: uma visão pessoal, *Scientia Chromatographica*, v. 0(0), p. 17 – 44, 2008.

LANÇAS, F. M., A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”?, *Scientia Chromatographica*, v. 1(2), p. 35 – 61, 2009.

LEDOUX, M., Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades, *Journal of Chromatography A*, v. 1218 (8), p. 1021 - 1036, 2011.

LEHOTAY S. J.; MAOTOVSKA K., YUN S. J., Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes, *Journal of AOAC International* v. 88(2), p. 630-638, 2005.

LEHOTAY, S. J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LUPIPATPIBOON, N., Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, *Journal of Chromatography A*, v.1217 (16), p. 2548-2560, 2010.

LICHTMANNEGGER, K; FISCHER, R.; STEEMANN, F. X.; UNTERLUGGAUER, H.; MASSELTHER, S., Alternative QuEChERS-based modular approach for pesticide residue analysis in food of animal origin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 407, p. 3727-3742, 2015.

LIU, J.; QI, S.; YAO, J.; YANG, D.; XING, X.; LIU, H.; QU, C., Contamination characteristics of organochlorine pesticides in multimatrix sampling of the Hanjiang River Basin, southeast China, *Chemosphere*, v. 163, p. 35-43, 2016.

MAPA, Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília – 2011.

MAPA/ACS, Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília – 2011.

MENEGHINI, L. Z.; RÜBENSAM G.; BICA V. C.; CECCON A.; BARRETO F.; FERRÃO, M. F.; BERGOLD, A. M., Multivariate Optimization for

Extraction of Pyrethroids in Milk and Validation for GC-ECD and CG-MS/MS Analysis, *Environmental and Public Health* v. 11: 11421 – 1143, 2014.

MOHR, S.; COSTABEBER, I. H., Toxicological aspects and occurrence of polychlorinated biphenyls in food, *Ciencia Rural*, v.42 (3), p. 559 – 566, 2012.

MOORE, J. C; SPINK, J.; LIPP, M., Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010, *Journal of Food Science*, v.77 (4), p.118 - 126, 2012.

MOSTAFALOU, S.; ABDLLAHI, M., Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives, *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.268, p. 157 - 177, 2013.

MOTTA, T.M. C, HOFF, R.B., BARRETO, F., ANDRADE, R.B.S., LORENZINI, D.M., MENEGHINI, L.Z., PIZZOLATO, T.M. Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis, *Talanta*, 120, 498–505, 2014.

MU, Z.; FENG, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, H., Trace analysis of three fungicides in animal origin foods with a modified QuEChERS method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, v. 408, p. 1515-1522, 2016.

NOVAK, I.; KOVAC, B., Electronic structure of pesticides: 1. Organochlorine insecticides, v.184, p. 421 – 426, 2011.

NOVOTNÝ, T. S., Implementação de método rápido e de baixo custo no LACEN/RJ para avaliação de organoclorados em água de soluções alternativas de abastecimento, Dissertação de mestrado, 2009. Disponível em: <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/4021>. Acessado em 24 de maio de 2016.

POLDER, A.; ODLAND, J. O.; TKACHEV, A.; FOREID, S.; SAVINOVA, T. N.; SKAARE, J. U., Geographic variation of chlorinated pesticides, toxaphenes and PCBs in human milk from sub-arctic locations in Russia, *The Science of the Total Environment*, v. 306, p. 179 - 195, 2003.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A., ADAIME, M. B., ZANELLA, R., QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas, *Química Nova*, v. 32(6), p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R., QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos, v. 3(1), p. 51-64, 2011.

RAHMAN, M. M.; LEE, H. S.; ATY, A. M. A.; KABIR, M. H.; CHUNG, H. S.; PARK, J.; KIM, J.; SHIN, H.; SHIN, S. S., SHIM, J., Determination of endrin and o-keto endrin in five food products of animal origin using GC-uECD: A modified Quechers approach to traditional detection, *Food Chemistry*, v. 263, p. 59-66, 2018.

ROBINSON, T.; ALI, U.; MAHMOOD, A.; CHAUDHRY, M. J. I.; LI, J.; ZHANG, G.; JONES, K. C.; MALIK, R. N., Concentrations and patterns of organochlorines (OCs) in various fish species from the Indus River, Pakistan: A human health risk assessment, *Science of The Total Environment*, v. 541, p. 1232-1242, 2016.

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; DORNE, J.; MORE, S.; SPERANDIO, G.; STREISSL, F.; SZENTES, C.; VERDONCK, F., Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: Principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority, *Science of The total Environment*, v. 587, p. 524-537, 2017.

SANATCUMAR, P., Implementação de uma metodologia analítica para a análise conjunta de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em matrizes sólidas por cromatografia gasosa, Dissertação de mestrado, 2014. Disponível em: <file:///F:/PROJETO/Prática/Validação%20Organoclorados%20e%20PCBS.pdf>. Acessado em 10 de outubro de 2017.

SANCO, Document SANCO/10684/2009, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, 2009.

SHI, H.; ZHAO, J.; WANG, Y.; ZHAO, G., A highly selective and picomolar level photoelectron chemical sensor for PCB 101 detection in environmental water samples, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 81, p. 503 – 509, 2016.

SHIDA, S. S.; HAMASSAKA, T.; NEMOTO, S.; AKIYAMA, H., Multiresidue determination of pesticides in tea by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry: Comparison between Orbitrap and time-of-flight mass analyzers, *Food Chemistry*, v. 256, p. 140-148, 2018.

SLIMANI, K.; PIROTAIS, Y.; MARIS, P.; ABJEAN, J. P.; PESSEL, D. H., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine, a biocidal disinfectant, in dairy products, *Food Chemistry*, v. 262, p. 168-177, 2018.

STASHENKO, E. E., Preparación de La muestra: um paso crucial para el análisis por GC-MS, *Scientia Chromatographica*, v. 3(1), p. 25-49, 2011.

TRUTA, L.; CASTRO, A. L.; TARELHO, S.; COSTA, P.; SALES, M. G. F.; TEIXEIRA, H. M., Antidepressants detection and quantification in whole blood samples by GC-MS/MS, for forensic purposes, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 128, p. 496-503, 2016.

VIEIRA, A. C. P., A percepção do consumidor diante dos riscos alimentares: a importância da segurança dos alimentos, *Âmbito Jurídico*, 2009. Disponível em: [http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?n\\_link=revista\\_artigos\\_leitura&artigo\\_id=6587](http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=6587). Acessado em 06 de outubro de 2017.

ZEN, S. D.; GRIGOL, N.; RIBEIRO, L. H.; MONTEIRO, C., ILENBURG, F., PIRES, A., Leite/CEPEA: O que esperar para 2018?, USP, 2018. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/leite-perspec-2018-o-que-esperar-para-2018.aspx>. Acessado em 09 de junho de 2018.

ZHENG, G.; HAN, C.; LIU, Y.; WANG, J.; ZHU, M.; WANG, C.; SHEN, Y. Multiresidue analysis of 30 organochlorine pesticides in Milk and Milk powder by gel permeation chromatography-solid phase extraction-gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Dairy Science* v. 97(10), p. 6016 – 6026, 2014.

ZHENG, X.; LI, H.; XIA, F.; TIAN, D.; HUA, X.; QIAO, X.; ZHOU, C., An electrochemical sensor for ultrasensitive determination the polychlorinated biphenyls, *Electrochimica Acta*, v. 194, p.413-421, 2016.



WILKOWSKA, A.; BIZUIK, M., Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology, Food Chemistry, v. 125, p. 803 - 812, 2011.

WILSON, K.; WALKER, J., Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, ed. 7, p. 352 – 394, 2010.

WU, C., Multiresidue method for the determination of pesticides in Oolong tea using QuEChERS by gas chromatography – triple quadruple tandem mass spectrometry, v. 229, p. 580-587, 2017.

YOGUI, G. T., Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e da Ilha Rei George (Antártica), Dissertação de Mestrado, 2002. Disponível em: [file:///C:/Documents%20and%20Settings/Usuario/Meus%20documentos/Downloads/Yogui2002%20\(4\).pdf](file:///C:/Documents%20and%20Settings/Usuario/Meus%20documentos/Downloads/Yogui2002%20(4).pdf). Acessado em 11 de junho de 2016.



O texto completo do item 8, que no texto da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 91 – 105, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido em periódico científico. Consta o desenvolvimento de um método simples e rápido para identificação e quantificação de pesticidas em leite cru, onde na extração utilizou-se o método de QuEChERS associado à purificação em baixa temperatura. A identificação e quantificação foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Resultados satisfatórios foram obtidos para Aldrin, Mirex, PP-DDE, PCB 101, PCB 138, PCB 153, e PCB 180.